

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE
LA NATURE ET DE LA VIE

N° :



DOMAINE : SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : ECOLOGIE ET
ENVIRONNMENT

OPTION : ECOLOGIE DES MILLEUX
NATURELE

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique**

Par:

SOUYAH Asma, SEDIRA Nadjat, TOUMIAT Ikram

Intitulé

**Caractérisation phénotypique des souches
isolées d'une légumineuse de la tribu
des *Genisteeae* (*Spartium junceum* L.).**

Soutenu devant le jury composé de :

Mr AILAM Oussama	MCA	Université de M'Sila	Président.
M ^{me} AHNIA Hadjira	MCB	Université de M'Sila	Rapporteuse.
M ^{me} BERRIMI Nedjoudja	MCB	Université de M'Sila	Examinatrice.

Année universitaire : 2024 /2025

Remerciement

Je voudrais exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, plus ou moins, à l'achèvement de ce mémoire de fin de cycle.

Tout d'abord, je tiens à remercier notre encadreuse M^{me} AHNIA Hadjira pour ses sages Conseils, sa disponibilité et son soutien continu tout au long de ce travail.

Nous exprimons également notre sincère gratitude au Dr. AILAM Oussama pour avoir accepté de présider le jury . Nous remercions le Dr BERRIMI Nedjoua pour avoir accepté d'exami lecture.

Nous oublion pas de remercier les professionnels et les experts que avons eu l'occasion de rencontrer et qui ont accepté de répondre à notre questions, en particulier (**chahra Zed Botout, Zahra Briki,Imad Ghamid**). Leurs témoignages et leurs opinions éclairées ont grandement influencé ce travail de recherche.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes chers parents qui ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu tout au long de ces longues années d'études. En signe de reconnaissance. qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude pour tout ce qu'ils ont consenti d'efforts et de moyens pour me voir réussir dans mes études.

A mon Frère et mes sœurs

Houssam, sara, yassmine, imene,

A toute ma famille.

Et A toutes mes amies.

Et à tous les gens qui me connaissent et que je connais en particulier.

Dédicaces

je dédie ma réussite et mon diplôme aux trois jours durant lesquels mon père a étudié avec moi jusqu'à ce que je comprenne la valeur du savoir et de l'apprentissage, à celui dont je porte le nom avec fierté, à celui qui a ôté les épines de mon chemin vers la connaissance, à celui qui m'a guidé et éclairé ma voie vers le savoir : Mon père « Sedira Hassen » cette montagne solide qui me protège lorsque les jours deviennent trop durs.

Et je la dédie à celle qui m'a appris les principes de la vie, à celle qui m'a appris que la morale précède le savoir, à celle qui a semé dans mon âme sa bonté et sa sincérité, et à ma première enseignante qui a veillé sur mes premières paroles, à la précieuse pour qui je lève la tête avec fierté car elle est ma mère « Zaïter Safia », à mon soutien qui a accompli mes rêves par ses prières, ma mère, ma médecin, mon enseignante inspirante, ma compagne, mon ingénieure, ma superviseuse en toutes choses. à ma conseillère dans tous les domaines, à celle qui a affronté la vie pour moi, à celle qui a semé le rêve dans mon cœur et l'arrosé de prières, à ma première et dernière source d'inspiration.

Je vous remercie infiniment pour ces moments où vous avez été présents à mes côtés dans les hôpitaux, pendant ma maladie. Vous étiez tels des médecins dévoués, priant et demeurant toujours à mes côtés. Merci pour votre patience, pour cet amour dont je puise ma force. merci pour tout ce que vous avez accompli pour moi.

À ceux qui ont été la lumière de mon chemin et mon ombre lorsque les jours étaient lourds mon frère et mes deux sœurs, compagnons de mes années et de mes jours : « Abd el raouf, Aya, Abir ».

Je vous remercie ma deuxième mère, à ma tante bien-aimée, douce délicate pleine de bonté et d'encouragements, source d'inspiration et de patience, mon modèle et mon exemple à suivre « Zaïter Rahma »

Maintenant, à moi-même je dédie ma réussite et toutes ces années d'efforts à moi-même, qui a toujours été et demeure la base de tout les défis et difficultés je suis fière de moi, fière de mes efforts, fière de tout ce qui m'a menée à cette distinction.

A toute la grande et la petite famille « Sedira », ainsi qu'à toute la grande et la petite famille « Zaïter » surtout mes grand pères « Sedira Ali » et « Zaïter Mohamed » que dieu leur fasse miséricorde

À tous ceux qui m'ont appris une lettre, et à tous ceux qui ont contribué

à ce succès, merci et mille mercis.

Nadjet.

Dédicace

À celle qui a planté en moi les graines de l'ambition et m'a abreuvé de son amour

et de sa tendresse ...

À celui qui m'a enseigné la patience, le goût de l'effort et m'a soutenu à chaque

étape...

À mes chers parents, je dédie cette œuvre, en témoignage de mon amour et de

ma profonde gratitude .

À mes frères et sœurs, pour leur soutien indéfectible et leurs encouragements

constants ...

À tous ceux qui m'ont aidé, ne serait-ce que par un mot bienveillant ou une prière

silencieuse ...

À vous tous, je dédie ce travail avec fierté et reconnaissance .

Ikram.

Sommaire
Remerciements
Dédicace

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des photos

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse Bibliographique.....	
I.1. L'azote.....	3
I.1.1. Cycle d'azote.....	3
I.1.2. Fixation biologique de l'azote	5
I.2. Symbiose Rhizobium-Légumineuse	5
I.2.1. Macro-symbionte	6
I.2.2. Micro-symbionte : Rhizobium	7
I.3. Processus de la nodulation	8
I.3.1. Préinfection.....	8
I.3.2. Infection	9
I.3.3. Organogenèse	9
I.4. Facteurs influençant la fixation d'azote.....	9
I.4.1. pH du sol	10
I.4.2. Stress salin	10
I.4.3. Stress hydrique.....	10
I.4.4. Stress thermique.....	12
I.4.5. Métaux lourds.....	11
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	
I. Matériel biologique	13
II. Méthodes	13
II.1. Analyse physico-chimique du sol	13
II.1.1. Mesure du pH du sol	13
II.1.2. Dosage de l'azote total.....	14
II.2. Collecte des nodules.....	14
II.2.1. Stérilisation des nodules en surface	15
II.2.2. Isolement et purification des bactéries à partir des nodules de <i>Spartium junceum</i> L.	15

II.3. Critères morphologiques des isolats de <i>Spartium junceum</i> L.....	15
II.3.1. Caractérisation culturelle des souches	15
II.3.2. Morphologie des bactéries	16
II.4. Caractérisation physiologique.....	17
II.4.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne.....	17
II.4.2. Effet de la température sur la croissance bactérienne	17
II.4.3. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne	18

Chapitre III : Résultat et Discussion.....

III.1. Analyse physico-chimique du sol.....	20
III.2. Isolement et purification des bactéries à partir des nodules de <i>Spartium junceum</i>L.	20
III.3. Critères morphologiques des isolats de <i>Spartium junceum</i> L.	20
III.3.1. Caractérisation culturelle des souches.....	20
III.3.2. Morphologie des bactéries.....	21
III.4. Caractérisation physiologique	22
III.4.1. Effet du PH	22
III.4.2.Effet de température.....	23
III.4.3. Effet de Nacl	24
Conclusion	27

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

NH₄⁺ : Ammonium

NH₃ : Ammoniac

. **NO₂⁻** : Nitrite

. **NO₃⁻** : Nitrate

. **N₂** : Diazote

. **CO₂** : Dioxyde de carbone

CPS : Capsular Polysaccharides

LPS : Lipopolysaccharides

EPS : Exopolysaccharides

HSP : Heat Shock Proteins

DO : Densité Optique

YMA: Yeast Mannitol

YMB: Yeast Mannitol Both

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

CPS : polysaccharides capsulaires

LPS : lipopolysaccharides

EPS : exopolysaccharides

Liste des figures

Figure 1: Schéma des agents participants au cycle de l'azote (Pujic, 2009)

Figure 2: Les étapes du Processus de la nodulation racinaires chez les légumineuses(Burdass, 2000).

Figure 3: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).

Figure 4 : Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais.

Figure 5: les etaps de coloration de Gram.

Figure 5: Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif (Grossissement 40*100). Coloration rose.

Figure 6 : Observation microscopique d'une suspension bactérienne à l'etat frais(Grossissement 40*100) Forme bâtonnets

Figure 7 : Effet du pH sur les souches étudiées

Figure 8 : Effet de température sur les souches étudiées

Figure 9 : Effet de Nacl sur les souches étudiées

Liste de photos

Photo 1: photo de *Spartium junceum* L.avec des nodules.

Photo 2: Aspect des colonnies bactériennes sur milieu YMA.

Photo 3: Aspect des colonnies bactériennes sur milieu YMA.

Introduction

Introduction

Les rhizobiums sont des bactéries symbiotiques appartenant principalement au genre *Rhizobium* et à d'autres genres apparentés comme *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Azorhizobium*. Ces micro-organismes jouent un rôle écologique et agronomique fondamental grâce à leur capacité unique de fixer l'azote atmosphérique en association avec les légumineuses. Cette symbiose conduit à la formation de nodules racinaires, où l'azote moléculaire (N_2) est converti en ammonium (NH_4^+), une forme directement assimilable par la plante (Oldroyd & Downie, 2008).

Dans un contexte mondial marqué par la nécessité de réduire l'usage des engrais azotés de synthèse, coûteux et polluants, l'utilisation de rhizobiums comme biofertilisants constitue une alternative durable pour améliorer la fertilité des sols et la productivité agricole (Zahran, 2001). La diversité génétique et fonctionnelle des souches de rhizobium, ainsi que leur adaptation aux conditions édaphiques et climatiques locales, sont des facteurs clés pour optimiser cette symbiose (Hungria & Vargas, 2000).

De plus, les interactions rhizobium-légumineuse sont influencées par de nombreux paramètres biotiques et abiotiques, notamment la composition du sol, le pH, la température, ainsi que la présence de métaux lourds ou de stress hydriques. Comprendre ces facteurs est essentiel pour développer des inoculants efficaces et adaptés aux environnements spécifiques (Sessitsch et al., 2002).

Ce travail s'inscrit dans cette démarche, en étudiant des souches locales de isolate capables de noduler *Spartium junceum* L. collectée dans la région de Bouira (Parc National de Djurdjura.).

L'objectif de cette étude est donc de caractériser phénotypiquement les souches bactériennes isolées à partir des nodules de cette légumineuse, afin de mieux connaître leur identité, leur potentiel symbiotique et leur capacité à résister à différents stress abiotiques.

Les résultats obtenus permettront de mieux valoriser ces microorganismes dans le cadre de l'agriculture durable et de la restauration des sols.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique.

I.1. L'azote

L'azote est l'un des nutriments essentiels pour les plantes, représentant 78 % de l'atmosphère. Il constitue le quatrième élément principal des végétaux et intervient dans la synthèse de nombreuses biomolécules cruciales, telles que la chlorophylle (qui contient 4 atomes d'azote), les acides nucléiques (ADN, ARN), les hormones ainsi que dans toutes les protéines structurelles et enzymatiques (Epstein, 1972).

De plus, cet élément joue un rôle clé chez les végétaux en stimulant le développement et l'activité des racines. Il favorise l'utilisation des hydrates de carbone, l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance générale des plantes. Une carence ou un déficit en azote se manifeste souvent par des symptômes tels que la chlorose, le nanisme ou encore la stérilité, entre autres (Tourte et *al.*, 2005).

L'azote subit une transformation continue entre ses formes minérales et organiques. La matière organique contenant de l'azote est décomposée par les microorganismes du sol. Cette décomposition permet ensuite la libération d'azote sous une forme minérale. Ce processus illustre un cycle simplifié de l'azote au sein des écosystèmes terrestres (Pujic, 2009).

I.1.1. Cycle d'azote

Le cycle de l'azote est un cycle biogéochimique qui décrit les processus de transformation et la manière dont l'azote circule dans l'environnement (Figure 1). Les processus en jeu, décrits ci-après, produisent de l'azote sous différentes formes et concourent à rendre cet élément mobilisable par la plante ou au contraire à le rendre indisponible.

Ammonification L'ammonification correspond à la production d'ammonium (NH_4^+) ou d'ammoniac (NH_3) à partir de la décomposition de matière organique d'origine végétale ou animale, présente dans le sol. Ce processus est assuré par divers microorganismes présents dans les sols et les milieux aquatiques (Figure 1) (Machefert et *al.*, 2002).

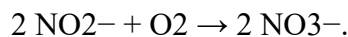
Nitrification La nitrification est un processus strictement aérobie qui s'effectue en deux étapes via deux types de populations bactériennes distinctes. La première étape, la

nitrosation, est réalisée par des bactéries nitrosantes, lesquelles transforment l'ammoniac en nitrites. La seconde étape, appelée nitratisation, est accomplie par des bactéries nitratantes qui convertissent les nitrites en nitrates (Figure 1). Les principaux microorganismes responsables de ce processus sont les *Nitrosomonas* pour la nitrosation et les *Nitrobacter* pour la nitratisation. Cette réaction d'oxydation dépend de divers facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité et le pH (Machefert et *al.*, 2002).

Équation simplifiée de la nitrosation :



Équation chimique de la nitratisation :



Dénitrification La dénitrification est un processus anaérobie qui implique la transformation des nitrates en diazote (N_2) par l'action de bactéries dénitrifiantes. Ces bactéries utilisent les nitrates comme source d'oxygène pour produire l'énergie nécessaire à leur métabolisme (Figure 1). L'azote ainsi formé s'échappe sous forme gazeuse dans l'atmosphère. Ce processus génère également des produits secondaires tels que le dioxyde de carbone (CO_2) et l'oxyde nitreux (N_2O), un gaz à effet de serre ayant un impact négatif sur la couche d'ozone dans la stratosphère. Les activités humaines amplifient la dénitrification, notamment par l'utilisation d'engrais azotés à base d'ammonium (NH_4^+ , NH_3) ou de nitrates (NO_3^-) (Barton et *al.*, 1999).

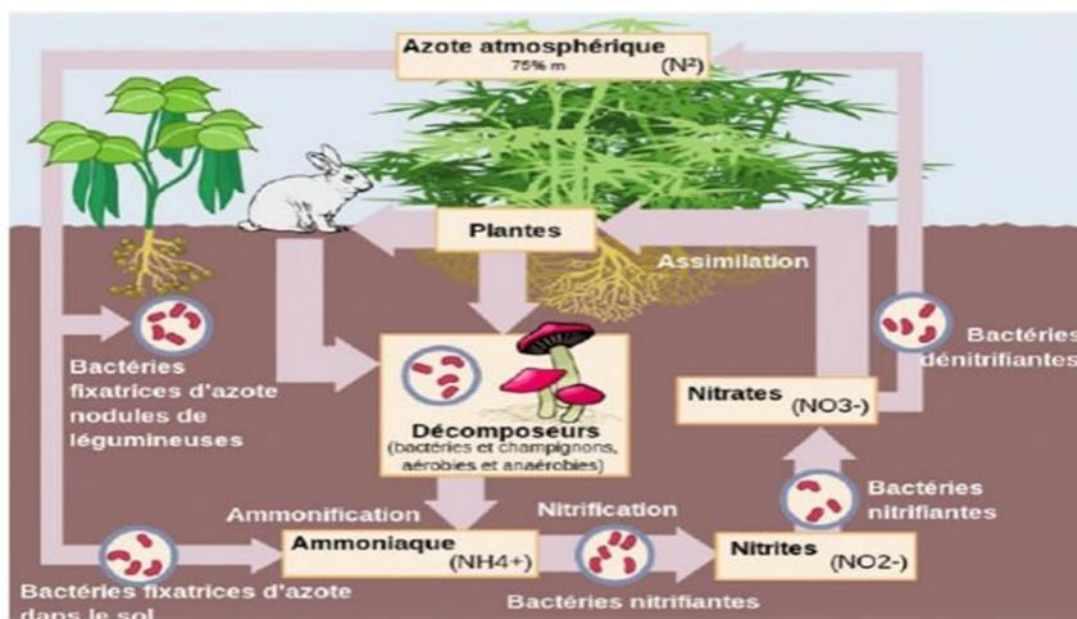


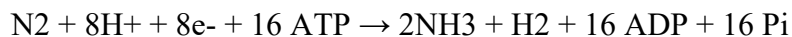
Figure 1: Schéma des agents participants au cycle de l'azote (Pujic, 2009).

I.1.2. Fixation biologique de l'azote

L'azote est, après le carbone, l'élément essentiel pour la croissance des végétaux. Ce gaz représente 78 % de la composition de l'atmosphère terrestre, où il existe sous forme moléculaire diatomique (N₂), un état relativement inerte. Toutefois, sous cette forme, l'azote n'est pas directement assimilable par les plantes qui tirent cet élément du sol sous sa forme minérale, sauf pour les légumineuses qui peuvent également l'obtenir de l'air.

La fixation biologique de l'azote (N₂) est un processus d'une importance capitale réalisé par certains microorganismes spécifiques. Seules quelques espèces bactériennes possèdent la capacité de fixer l'azote atmosphérique. Ces bactéries produisent une enzyme particulière appelée nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote (N₂) en ammoniac (NH₃).

La réaction globale de fixation d'azote catalysée par la nitrogénase s'écrit ainsi :



Ce processus enzymatique constitue un phénomène écologique majeur, permettant la fixation annuelle d'environ 170 millions de tonnes d'azote, selon (Roger et *al.* 1996). Certaines bactéries photosynthétiques exploitent directement l'énergie solaire pour contribuer à ce cycle. En revanche, d'autres groupes de microorganismes ne parviennent à accomplir cette tâche qu'en établissant une relation symbiotique avec des plantes hôtes : on parle alors de fixation symbiotique.

Dans ce type d'association, c'est l'énergie métabolique fournie par la plante qui permet une intensification significative de la fixation de l'azote en comparaison aux organismes libres. Parmi ces symbioses, celle entre les bactéries rhizobiennes et les légumineuses est la plus étudiée et la mieux comprise, comme le mentionne (Roger et *al.* 1996).

I.2. Symbiose Rhizobium-Légumineuse

Vue d'ensemble du processus de symbiose La symbiose entre le Rhizobium et les légumineuses constitue une interaction mutuellement bénéfique qui permet aux plantes de la famille des légumineuses (macrosymbiontes) de fixer l'azote atmosphérique en s'appuyant sur l'activité des bactéries rhizobiennes (microsymbiontes).

Les légumineuses libèrent des composés phénoliques qui attirent ces microorganismes. Cette association mène à la formation d'un organe spécialisé au niveau des racines, appelé nodule. À l'intérieur de ce dernier, les bactéries, grâce à leur enzyme nitrogénase, sont capables de fixer l'azote atmosphérique, qu'elles transfèrent ensuite à la plante sous une forme assimilable.

En échange, la plante fournit aux bactéries les éléments nutritifs nécessaires à leur développement. Ce partenariat représente une véritable symbiose avec des bénéfices réciproques pour les deux partenaires. (Gibson et *al.* 2008).

I.2.1.Macro-symbionte

Les légumineuses, ou *Fabaceae*, appartiennent à la catégorie des Angiospermes et plus précisément des Eudicotylédones. Avec 770 genres et environ 20 000 espèces, elles constituent la troisième plus grande famille d'Angiospermes après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Azani et *al.*, 2017). Sur le plan économique, les légumineuses, aussi appelées Leguminosae, occupent la seconde place après les *Poaceae*. Depuis les débuts de l'agriculture, elles ont été domestiquées parallèlement aux graminées et ont joué un rôle crucial dans le développement agricole (Hancock, 2012). Pour souligner leur importance nutritionnelle et agroécologique, notamment dans le cadre d'une agriculture durable face au changement climatique, l'ONU a proclamé 2016 « année internationale des légumineuses » (Domergue, 2017). Une caractéristique notable des légumineuses réside dans leur système racinaire : elles entrent en symbiose avec les bactéries rhizobia du sol. Ce partenariat leur permet d'accéder à l'azote de l'air pour leur croissance, offrant également une source significative d'azote pour enrichir les sols cultivés (Solomon et Fassil, 2014). Au niveau mondial, les légumineuses représentent 35 % des protéines végétales consommées pour l'alimentation humaine et animale. Leur profil en acides aminés complète celui des céréales : ces dernières sont pauvres en lysine, tandis que les légumineuses à graines manquent d'acides aminés soufrés et de tryptophane (Wang et *al.*, 2003). En plus de leur apport nutritionnel, certaines sont exploitées pour produire des huiles alimentaires, comme le soja ou l'arachide. Les légumineuses ne se limitent pas à des bienfaits nutritionnels : elles contribuent également à des services écosystémiques variés. Par exemple, elles favorisent la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, permettent la reforestation et le contrôle de l'érosion des sols, et constituent un couvert végétal pour les terres dégradées lorsqu'elles sont cultivées en association (Henault et Revellin, 2011).

De plus, elles soutiennent la survie de la faune sauvage en servant de ressource mellifère pour les pollinisateurs comme les abeilles (Terzo et Rasmont, 2007). Grâce à leur symbiose avec les rhizobia, les légumineuses peuvent également être utilisées en phytoremédiation. Elles facilitent la dégradation des contaminants tels que les pesticides et herbicides présents dans certains sols. Elles jouent par ailleurs un rôle dans la réduction des émissions de protoxyde d'azote (N₂O), un puissant gaz à effet de serre, en le convertissant en azote moléculaire (N₂). Ces propriétés ont notamment été observées sur un sol cultivé avec de la luzerne en symbiose avec *Sinorhizobium meliloti* (Henault et Revellin, 2011). Ainsi, la culture des légumineuses s'impose comme une solution idéale pour produire des protéines tout en respectant l'environnement. Elle représente un modèle exemplaire dans une perspective d'agriculture durable.

I.2.2. Micro-symbionte : Rhizobium

Le terme rhizobia désigne l'ensemble des bactéries du sol capables de fixer l'azote atmosphérique et de former des nodules sur les racines des plantes légumineuses. Ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en ammoniac, rendant ainsi cet élément assimilable par les plantes (EL-FIKI, 2005 ; WILLEMS, 2006 ; ASADI RAHMANI *et al.*, 2009). De plus, les rhizobia peuvent interagir avec le système racinaire de plantes non légumineuses, contribuant ainsi à l'amélioration de la productivité agricole. Elles font partie d'un groupe désigné comme Bactéries promotrices de la croissance végétale (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ou PGPR). Contrairement aux relations symbiotiques traditionnelles impliquant la formation d'organes spécifiques, la relation entre ces bactéries et les plantes est mutualiste mais non obligatoire, chaque organisme en retirant des bénéfices. Diverses recherches mettent en lumière les effets positifs de *Rhizobium leguminosarum* sur des cultures telles que la laitue et la canne à sucre (SINGH *et al.*, 2013). Ces bienfaits incluent notamment la synthèse de phytohormones, la production de sidérophores (AHEMAD et KHAN, 2011). et une amélioration de la solubilisation du phosphate (KHAN *et al.*, 2010).

Classification des rhizobia

Actuellement les rhizobia sont repartis en 13 genres et 481 espèces selon :

<https://www.rhizobia.co.nz/taxonom/rhizobia>

- o *Rhizobium* qui contient 111 espèces.
- o *Mesorhizobium* qui contient 46 espèces.
- o *Ensifer (formerly Sinorhizobium)* contient 21 espèces.
- o *Bradyrhizobium* contient 38 espèces.
- o *Burkholderia* contient 120 espèces.
- o *Azorhizobium* contient 3 espèces.
- o *Microvirga* contient 16 espèces.
- o *Phyllobacterium* contient 11 espèces.
- o *Ochrobactrum* contient 18 espèces.
- o *Methylobactérieum* contient 52 espèces.
- o *Cupriavidus* contient 16 espèces.
- o *Devosia* qui contient 22 espèces.
- o *Shinella* qui contient 7 espèces.

I.3. Processus de la nodulation

L'établissement de la symbiose (figure 2) entre les rhizobia et les légumineuses requiert un contact moléculaire entre les deux partenaires (Baba Arbi, 2016). Cette association symbiotique passe par plusieurs étapes : préinfection, infection et organogénèse (Perry et al., 2004). Le processus de nodulation est sous le contrôle des gènes de la bactérie et de la plante légumineuse. Divers phénomènes interviennent pour permettre l'expression de ces gènes, dont certains ne sont activés qu'en présence de flavonoïdes synthétisés par la plante. Ce processus comprend trois principales étapes (figure 2).

I.3.1. Préinfection

L'interaction entre les légumineuses et les rhizobia débute dans la rhizosphère (Saoudi, 2008). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par un mécanisme de chimiotactisme induit par les flavonoïdes ou isoflavonoïdes, qui agissent comme des molécules signal. Ces bactéries produisent des facteurs nod qui déclenchent le processus de nodogénèse. La reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante sont rendus possibles grâce à des facteurs de surface tels que la protéine rhicadhésine, les polysaccharides capsulaires (CPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) (Baba Arbi, 2016).

I.3.2. Infection

Cette étape correspond à la pénétration des rhizobia au niveau de différents points du système racinaire. Après avoir pénétré par les poils absorbants, les bactéries se retrouvent entourées d'un filament d'infection, facilitant ainsi leur passage et la formation d'un méristème nodulaire à travers lequel elles continuent leur cheminement. Cela permet aux rhizobia d'atteindre les couches les plus profondes des racines (Baba Arbi, 2016). Deux types d'infection peuvent être identifiés : le premier débute entre les jonctions intercellulaires, comme dans le cas des nodules formés à la base des racines ; le second démarre dans les poils absorbants, typique des légumineuses tempérées. Ce processus se décompose en deux phases : l'initiation de l'infection suivie par la formation du cordon, puis la progression de ce cordon d'infection (Teillet, 2008).

I.3.3. Organogenèse

Chez les légumineuses, deux types de nodules peuvent être différenciés selon la présence ou l'absence de méristème actif (Teillet, 2008). Une fois à l'intérieur du symbiosome, les cellules bactériennes subissent d'importants changements physiologiques et morphologiques (Mergaert et al., 2006). La nitrogénase bactérienne, enzyme clé dans la fixation de l'azote, est inhibée en présence d'oxygène. Toutefois, l'hémoglobine sécrétée autour du symbiosome agit comme une protection contre l'effet toxique de l'oxygène, permettant ainsi à la nitrogénase de fonctionner efficacement (Ott et al., 2005).

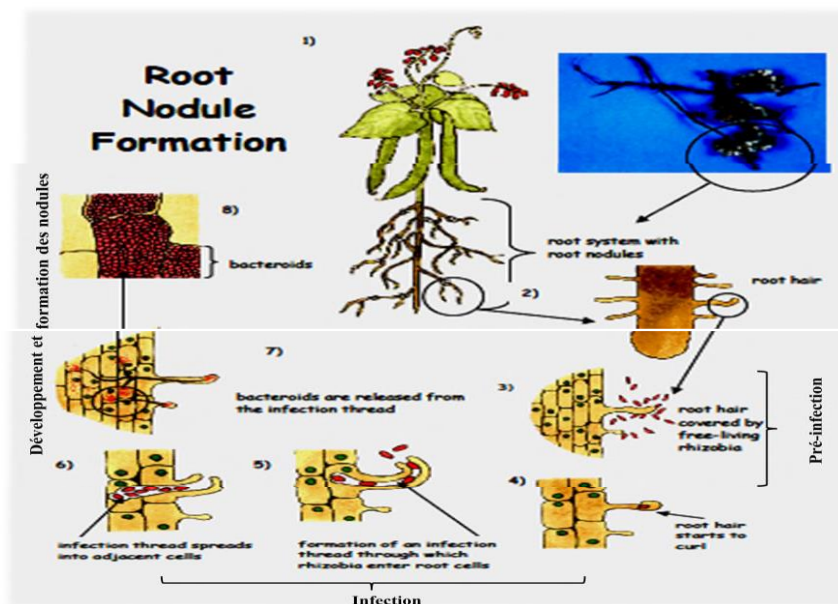


Figure 2 : Les étapes du Processus de la nodulation racinaires chez les légumineuse (Burdass, 2000).

I.4. Facteurs influençant la fixation d'azote

Diverses conditions environnementales sont identifiées comme des éléments restreignant la croissance et l'activité des plantes fixatrices d'azote dans le cadre de la symbiose entre rhizobiums et légumineuses. Le processus de fixation du N₂ est étroitement associé au bon état physiologique de la plante hôte. Il apparaît donc improbable qu'une souche rhizobienne compétitive et persistante atteigne son plein potentiel pour fixer l'azote si des facteurs comme la salinité, le pH, une carence nutritive, la toxicité minérale, des températures extrêmes, une humidité insuffisante ou excessive du sol, des métaux lourds ou certains antibiotiques imposent des contraintes à la vigueur de la légumineuse hôte.

I.4.1. pH du sol

Les valeurs extrêmes de pH affectent la relation symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses. Cependant, selon Fitouri (2011), la plupart des légumineuses nécessitent un pH neutre ou légèrement acide pour établir une relation symbiotique efficace. Une acidité excessive du sol peut entraîner la dissolution des éléments minéraux et des troubles de la nutrition minérale, ce qui affecte la croissance et le développement des plantes hôtes ainsi que l'efficacité de la croissance des rhizobiums, entraînant finalement une réduction de la nodulation (Munns, 1977).

I.4.2. Stress salin

Le sel affecte le processus d'infection des nodules (Paye Kapay 2006) ainsi que leur développement et leur fonction (Rao et *al.*, 2002). Premièrement, l'activité de nodulation est plus sensible au stress salin que l'activité de fixation (Payakapong et *al.*, 2006). Les réductions de l'activité de fixation de l'azote comprennent :

- Réduction de la respiration.
- Déformation de la structure nodulaire.
- Photosynthèse réduite.

I.4.3. Stress hydrique

Le stress hydrique se manifeste lorsque la vitesse de transpiration des plantes dépasse celle de leur absorption en eau. Ce phénomène se traduit généralement par une diminution de la croissance, ainsi que par des altérations dans les échanges gazeux et le

métabolisme global de la plante (Tiliouine, 2008). La capacité des légumineuses à fixer l'azote atmosphérique de manière symbiotique est particulièrement vulnérable en cas de manque d'eau (Zahran, 1999). Le stress hydrique impacte la fixation symbiotique de l'azote à plusieurs niveaux : il influence la formation et la croissance des nodules, le métabolisme du carbone et de l'azote, l'activité de la nitrogénase, ainsi que la perméabilité des nodules à l'oxygène (Aduirrealea et Sanchez-dgaz., 1989 ; Sadowsky, 2005).

I.4.4. Stress thermique

Des températures excessives dans la rhizosphère peuvent perturber l'infection des racines par les bactéries et la fixation symbiotique de l'azote chez de nombreuses légumineuses. Certaines études ont révélé que des températures élevées retardent la nodulation et diminuent l'activité de la nitrogénase ainsi que la fixation symbiotique (Zahran, 1999). La température influence la symbiose et joue un rôle crucial dans le processus d'infection des poils racinaires. De plus, elle peut affecter la survie des rhizobies dans le sol, ainsi que la nodulation et la fixation de l'azote (Graham et Yance, 2003).

I.4.5. Métaux lourds

D'un point de vue biologique, les métaux lourds se divisent en deux catégories : les métaux essentiels et les métaux toxiques. Ces derniers ont un impact négatif sur les microorganismes, en perturbant leur croissance, leur morphologie et leurs activités (Gusmao-Lima et *al.*, 2005). Par conséquent, ils diminuent la taille des populations de rhizobiums et altèrent de manière irréversible leur croissance ainsi que leurs performances symbiotiques (Koomen et *al.*, 1990). Le cadmium (Cd), par exemple, est l'un des métaux les plus toxiques pour la symbiose et le développement des deux partenaires (Pereira et *al.*, 2006 ; Younis, 2007). Il nuit à la croissance et à l'activité microbienne (Stan et *al.*, 2011).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

Ce travail a été réalisé sur des nodules racinaires de *Spartium junceum* L. (Genét *d'Espagne*) qui est une espèce de la tribu des *Genisteeae* de la famille des *Fabaceae*. Cette plante a été récoltée au sein du Parc National de Djurdjura (Bouira).

La récolte s'effectue au printemps, durant les mois de mars et avril, lorsque le sol est sec. À cette période de l'année, les nodules sont bien développés, visibles sur les racines, et présentent une coloration rougeâtre qui indique la présence de légghémoglobine et une activité de fixation de l'azote (Chabbi, 2010). Pour son identification nous avons pris référence la flore de Quezel et Santa (1962-1963).

Une analyse pédologique du sol a été effectuée au sein du laboratoire afin de déterminer le pH du sol ainsi que le dosage de l'azote.

Dans cette étude nous avons aussi utilisé des souches de référence à titre comparatif pour la plupart des tests phénotypiques à savoir : *Bradyrhizobium algeriense* (Ahnia et al., 2018), et *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982).

II. Méthodes

II.1. Analyse physico-chimique du sol

L'analyse physico-chimique des échantillons du site de collecte ont permis de déterminer le pH et l'azote total, selon les techniques utilisées par le centre d'études phytosociologiques et écologiques Louis Emberger de Montpellier, France (Emberger et Godron, 1983).

Ces analyses ont été effectuées dans le laboratoire de pédologie de l'université de Bejaia sur une terre fine (diamètre = 2 mm) après plusieurs traitements.

II.1.1. Mesure du pH du sol

Le pH du sol traduit le degré d'acidité ou d'alcalinité de l'eau en contact avec le sol étudié, déterminé par l'emploi d'un pH-mètre à électrode de verre calibré à l'aide de deux solutions tampons (pH 4 et pH 7). Deux mesures de pH ont été déterminées, ce sont : pHeau et pHkcl

- pH_{eau} : Exprimé par la concentration en ions H^+ dissociés présents dans la solution (sol/eau) à un instant donné.
- pH_{KCl} : Exprimé par la quantité totale des ions H^+ dissociés présents dans la solution (sol/chlorure de potassium) à un instant donné.

II.1.2. Dosage de l'azote total

Le principe de cette méthode est basé sur trois étapes réalisées. La minéralisation repose sur la transformation des composés organiques en azote ammoniacal sous l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant. Cette transformation faite en présence d'un catalyseur renfermant du sulfate de cuivre ainsi que du sulfate de potassium et de sélénium.

L'azote organique du sol est transformé en azote ammoniacal. Ce dernier, libéré de sa forme combinée par distillation après alcalinisation à l'aide d'une base forte (NaOH) puis recueilli dans une solution borique qu'on dose avec du H_2SO_4 .

II.2. Collecte des nodules

La méthode de collecte utilisée suit le protocole décrit par Vincent (1970) :

- Creuser sur une profondeur de 20 à 50 cm et dans un périmètre d'environ 15 cm autour de la plante.
- Soulever avec précaution le bloc de sol englobant les racines. - Éliminer délicatement la terre tout en cassant les blocs sans endommager les racines principales et secondaires (sites de nodulation).
- Disposer l'ensemble de la plante avec soin dans un sachet en plastique.
- Au laboratoire, retirer la partie supérieure de la plante, puis laver minutieusement les racines sous l'eau courante.
- Pour le stockage des nodules, couper les racines à 1 ou 2 mm du site d'attache des nodules, afin de garantir une bonne conservation et permettre l'obtention de cultures bactériennes viables et propres lors de leur isolement. Enfin, sécher les nodules à l'aide de papier filtre avant leur mise en stockage.

II.2.1. Stérilisation des nodules en surface

Les nodules racinaires récoltés sont immergés dans de l'eau pour éliminer le sol. Par la suite, on les découpe individuellement tout en les laissant lié avec un peu de la racine. Les nodosités sont immergées dans de l'éthanol à 96% durant 30 sec puis dans de l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 3 min. Ceci est suivi par plusieurs rinçages successifs.

II.2.2. Isolement et purification des bactéries à partir des nodules de *Spartium junceum* L.

Les nodules stérilisés sont transférés individuellement dans des tubes eppendorfs stériles, à l'aide d'une tige métallique au bout arrondie. Les nodules sont écrasés, et les broyats sont ensemencés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA (Annexe I) puis incubé à 28°C pendant plusieurs jours jusqu'à l'apparition des colonies visibles. Cette opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (Vincent, 1970). Après plusieurs purifications les colonies bien isolées sont repiquées sur des nouvelles boîtes contenant de l'YMA et incubées à 28°C pendant quelque jour jusqu'à obtention des isolats purs.

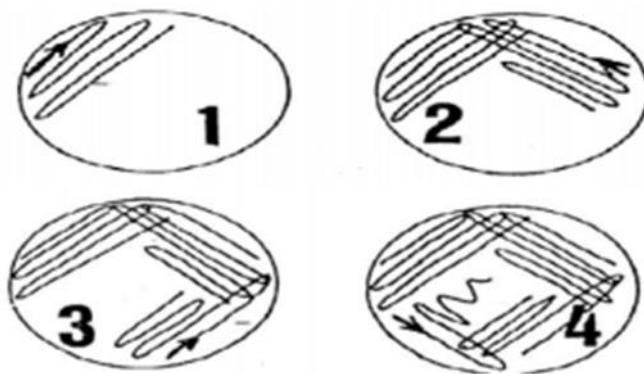


Figure 3 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).

II.3. Critères morphologiques des isolats de *Spartium junceum* L.

II.3.1. Caractérisation culturelle des souches

La forme, la couleur, la taille des souches étudiées sont déterminées sur milieu YMA (Annexe I). En effet à l'aide d'une anse de platine des souches étudiées sont ensemencées dans des boîtes Pétri contenant le milieu YMA. L'incubation se fait à 28°C pendant 10 jours.

II.3.2. Morphologie des bactéries

L'examen à l'état frais des souches permet de mettre en évidence leur forme ainsi que leur mobilité. En effet, après avoir homogénéisé la culture liquide YMB (Annexe I), nous avons pris une suspension bactérienne et déposée sur une lame et observé sous microscope optique au Grossissement 10*40 (Figure4).

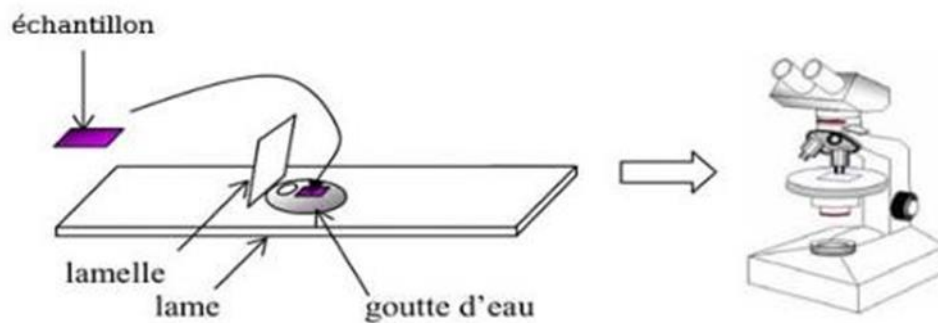


Figure 4 : Etapes de la réalisation d'un frottis à l'état frais.

Coloration de Gram

Cette technique permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle est utile pour distinguer les bactéries dites Gram+ et des bactéries dite Gram – (Tortora et *al.*,2003)

Le test Gram a été effectué sur toutes les souches cultivées sur un milieu YMB et incubées à 28°C après l'apparition d'un trouble.

La technique consiste à :

1. Préparer un frottis sur lame de verre.
2. Fixer un frottis à la chaleur.
3. Recouvrir la lame par un colorant basique (le violet de gentiane) et laisser agir pendant 1minute .
4. Verser sur la lame la solution iodée (Lugol) et laisser agir pendant 30 secondes .
5. Rincer à l'alcool .
6. Laver soigneusement avec l'eau pour arrêter l'action de l'alcool .
- 7.Recolorer avec de la fuchsine et laisser agir 1minute.
8. Laver à l'eau distillée.
9. Egoutter la lame sur du papier absorbant.

10. Observer sous microscope optique (Grossissement 10^*100) en ajoutant une goutte d'huile à immersion.



Figure 5 : les étapes de coloration de Gram.

II.4. Caractérisation physiologique

Afin de caractériser les souches isolées des nodules racinaires de *Spartium juncem* L. Nous avons étudié l'effet du pH, Température et du NaCl sur la croissance de ces isolats.

Après incubation, la croissance des souches est estimée par l'absorbance à une longueur (DO) à 620nm. Trois exemplaires ont été pris en considération pour chaque test.

II.4.1. Effet du pH sur la croissance bactérienne

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB liquide à différents pH : 4, 5, 6, 7, 8 en présence d'un témoin à pH 6.8, ensuite incubées à une température de 28°C pendant 10 jours. La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 620 nm.

II.4.2. Effet de la température sur la croissance bactérienne

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu YMB liquide et incubées à différentes températures :

4°C, 20°C, 28°C, 30°C, 32°C, 37°C avec présence d'un témoin. L'incubation sous agitation pendant 10 jours.

II.4.3. Effet du NaCl sur la croissance bactérienne

Les souches bactériennes sont mises en culture dans des tubes contenant 5 ml du milieu YMB, additionné de quantités croissante de NaCl (100, 200, 300, mM). La valeur de la croissance est obtenue par lecture de la densité optique (DO) à 620 nm, Après incubation sous agitation à 28°C pendant 10 jours.

Chapitre III : Résultat et Discussion

III.1. Analyse physico-chimique du sol

Les résultats de l'analyse physico-chimique du sol prélevé du site de la récolte des nodules de *Spartium junceum* L. présentent un pHeau de 6,3 et un pH KCl de 6.2. Selon l'échelle donnée par Gaucher et les normes mondiales, la nature de ce sol est acide.

Les résultats obtenus du dosage du sol en azote donnent la valeur de 0.0173%, cela indique que le sol en question est pauvre en azote. Ceci favorise la nodulation de la plante par la bactérie d'après Vincent (1970).

III.2. Isolement et purification des bactéries à partir des nodules de *Spartium junceum* L.

Huit nodules ont été prélevés sur les racines de la plante *Spartium junceum* L. après l'ensemencement du jus de broyat de ces nodules réalisés sur milieu YMA, incubés à 28°C, nous avons pu obtenir des colonies bien isolées et faciles à caractériser selon la technique d'épuisement et repiquages successifs. Au final cinq souches bactériennes pures ont été isolées des nodules de notre plante modèle.



Photo 1 : photo de *Spartium junceum* L. avec des nodules.

III.3. Critères morphologiques des isolats de *Spartium junceum* L.

III.3.1. Caractérisation culturelle des souches

Les isolats cultivés sur YMA à 28°C forment des colonies, certaines produisent des EPS d'autres non. L'observation montre des petites et des grandes colonies opaques, translucides. De forme circulaire, régulière, aplatie ou convexe, elles sont de couleurs

différentes (blanc-gris, blanche,). Bien sûr le nombre des colonies diffère d'une boîte à l'autre du moment que les nodules sont traités isolément (photo2,3.).



Photo 2 : Aspect des colonies bactériennes sur milieu YMA.



Photo 3 : Aspect des colonies bactériennes sur milieu YMA.

Tableau I : Caractérisation morphologique des colonies.

Les souches	EPS	Couleur	Transparence	formes
SJ1	Présence	Blanche	Opaque	Régulier
SJ2	Absence	Blanc-gris	Translucide	Régulier
SJ3	Absence	Blanche	Translucide	Régulier
SJ4	Présence	Blanche	Translucide	Régulier
SJ5	Présence	Blanche	Opaque	Régulier

III.3.2. Morphologie des bactéries

L'observation microscopique à l'état frais des suspensions bactériennes, montre des cellules qui ont une forme bâtonnets aux extrémités arrondies et mobiles (Figure 6). La coloration a confirmé leur appartenance aux bactéries Gram négatif (Figure 5). En effet ces bactéries présentent un aspect réfringent dû à la présence de granules de poly β hydroxybutyrates confirmé par (Pedrosa, 1988). Ces critères correspondent à la description de rhizobia selon Jordan (1984).

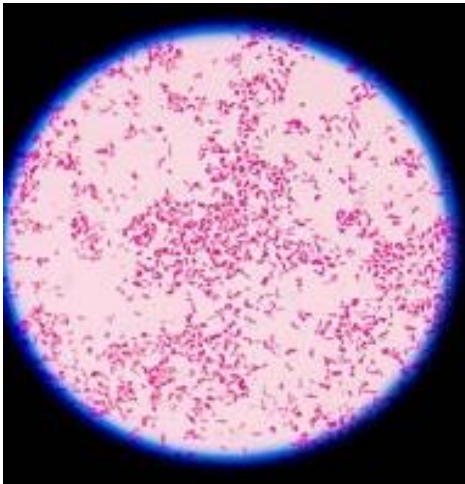


Figure 5: Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif (Grossissement 10*100). Coloration rose.

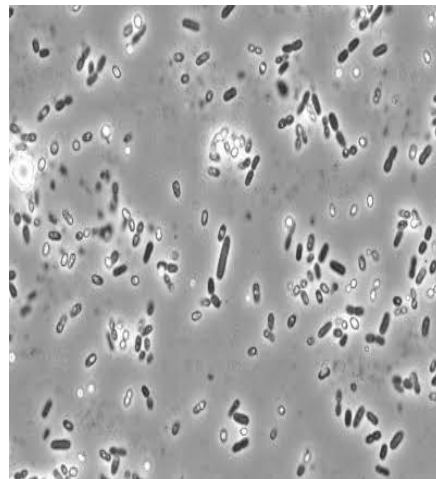


Figure 6 : Observation microscopique d'une suspension bactérienne à l'état frais (Grossissement 40*10) Forme bâtonnets

III.4. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet du pH, température et de NaCl sur la croissance des souches isolées des nodules racinaires de *Spartium junceum* L. Les souches ont été incubées sur milieu YMB pendant 10 jours. Les valeurs données représentent la moyenne des trois répétitions pour chaque test (AnnexeII).

III.4.1. Effet du PH

Les résultats de L'effet du pH sur la croissance des souches étudiées sont illustrés dans la (figure7) . Ces résultats montrent une croissance des souches étudiées entre pH 4 et pH 8 avec un optimum à pH6. à l'exception de la souche SJ3 qui présente un optimum à pH7.

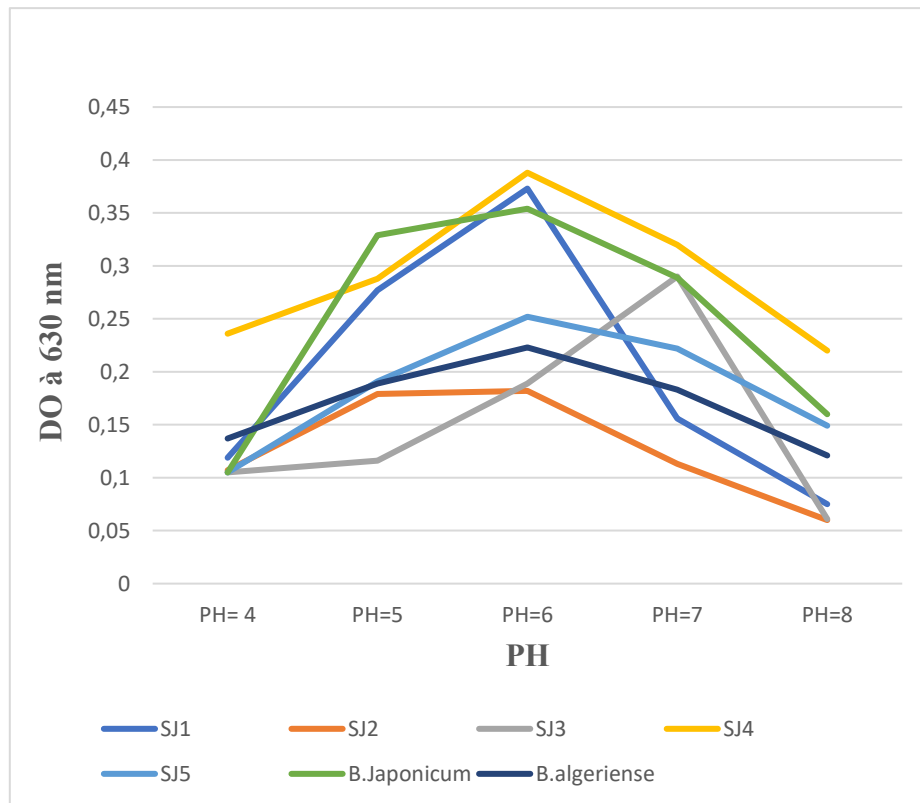


Figure 7 : Effet du pH sur les souches étudiées

Il a été rapporté par Raza et *al.*, (2001). que les souches de rhizobies isolées de deux espèces *Lupinus luteus* et *Lupinus angustifolius* ont une très bonne croissance à des pH entre 4 à 10. D'autres ont montré que l'acidité du sol limite la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie du rhizobies et sa persistance dans les sols, ainsi que la réduction de la nodulation (Appunu et Dhar, 2006).

III.4.2.Effet de température

Les résultats obtenus du test de température (Figure 8) montrent que toutes les souches testées ont une bonne croissance entre 20°C et 30°C avec un optimum à 28°C. Toutes ces souches sont inhibées à la température 4, 32 et 37°C.

Le caractère mésophile des rhizobies a été déjà signalé par Graham (1992) et Zahran (1999) indiquant que la gamme de température optimale pour la croissance des rhizobies est de 28 à 31°C, et beaucoup ne peuvent pas se développer à 37°C.

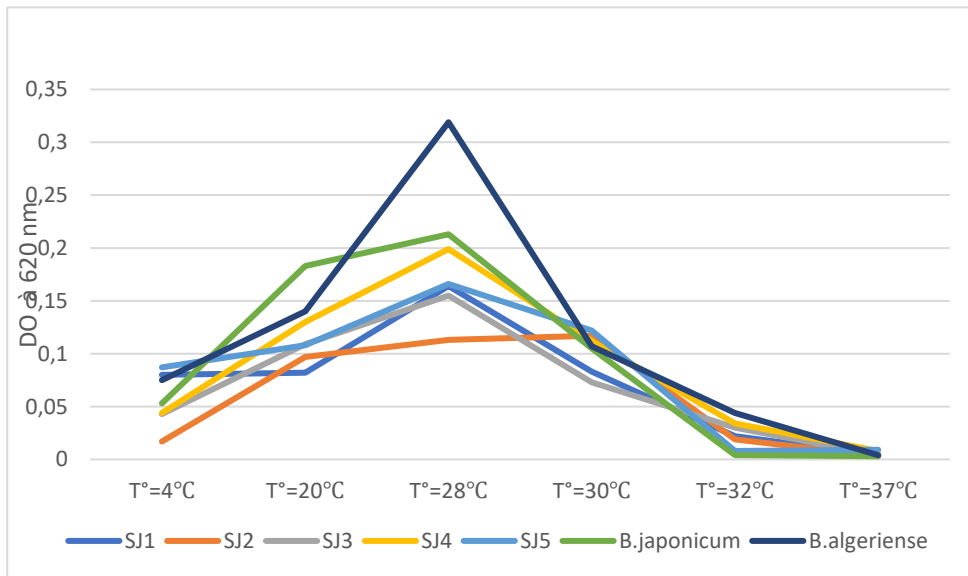


Figure 8 : Effet de température sur les souches étudiées

Il a été ainsi rapporté que les températures critiques de la fixation d'azote sont de 30°C pour la trèfle et le pois (Michiels et *al.*, 1994). de 30°C à 33°C pour le Haricot (Piha et Munns, 1987). et varient entre 35°C et 40°C pour les graines de cacahuètes et de soja (Michiels et *al.* , 1994).

III.4.3. Effet de NaCl

L'analyse des résultats obtenus du test de NaCl (Figure 9) montre que les isolats de *S. junceum* L. ainsi que les souches de référence utilisées dans cette étude sont nettement affectée par les différentes concentrations de NaCl. À l'exception de la souche SJ5 semble avoir une croissance entre 100 à 200 mM ceci pourrait être dû à une adaptation de cette souche à la salinité. Ainsi, ce comportement pourrait être un atout pour l'utilisation de cette souche dans les projets de restauration des sols salins.

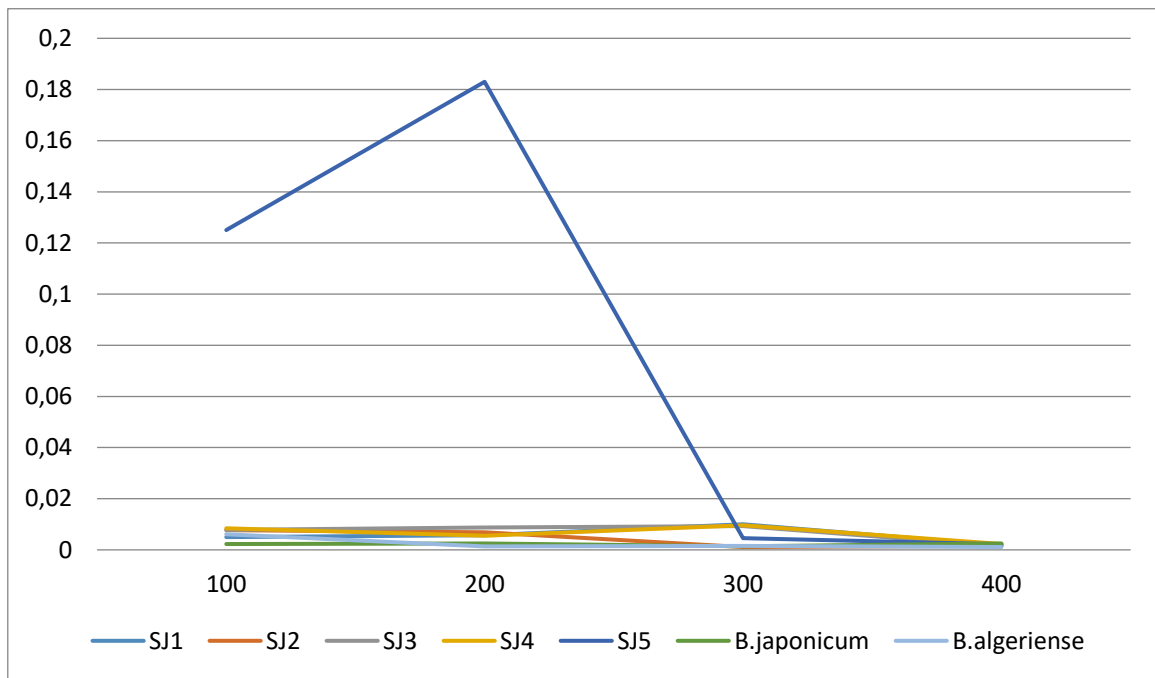


Figure 8 : Effet de NaCl sur les souches étudiées.

La littérature indique que la croissance de la plupart des rhizobia est affectée dès que la molarité du milieu atteint 100mM de NaCl beaucoup de *Bradyrhizobium* sont inhibés à 1% de NaCl (Chahboune et *al.*, 2011, 2012, Jordan, 1982, Vinuesa et *al.*, 2005, Wang et *al.*, 2012, Chang et *al.*, 2010, Guerrouj et *al.*, 2013) qui ont décrit les espèces suivantes *B.cytisi*, *B. rifense*, *B. japonicum*, *B.canariens*, *B.arachidis*, *B.lablabi*, *B.retamae*,

Le stress salin est une contrainte qui provoque la synthèse des exopolysaccharides des rhizobia qui sont utiles dans l'adaptation (Hung et *al.*, 2005).

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est l'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries nodulant *Spartium junceum* L. une légumineuse de la tribu des *Genisteae*, récoltée au Parc National de Djurdjura (Bouira).

Les résultats de l'analyse physico-chimique du sol du site de récolte de l'espèce en question montrent que le sol est de nature acide et pauvre en Azote.

Cinq souches bactériennes ont été isolées et purifiées à partir de nodules racinaires de *Spartium junceum* L.

L'étude phénotypique, basée sur l'analyse des caractéristiques morphologiques, cellulaires et physiologiques de ces isolats bactériens a montré que :

- ✓ Tous ces isolats présentent des colonies de couleur blanches ou blanc gris, opaques ou translucides avec présence ou absence de d'EPS.
- ✓ Toutes les souches étudiées sont des bâtonnets mobiles, Gram négatif, ces critères correspondent à la description des rhizobia selon Jordan (1984).
- ✓ Les souches isolées ont une croissance lente ce qui suggère leur appartenance au genre *Bradyrhizobium*.
- ✓ L'étude de l'effet du pH sur la croissance de ces souches montre que l'optimum de leur croissance se situe entre pH6 et pH8.
- ✓ L'étude de l'effet de la température sur la croissance des souches étudiées montre que ces dernières présentent une bonne croissance entre 20°C et 30°C.
- ✓ L'effet du NaCl sur la croissance de ces souches montre que la souche SJ5 pourrait être sélectionnée pour le projet de restauration des sols salins et ou dégradés des zones arides.

En perspective, il est souhaitable :

- ✓ Réaliser une caractérisation phylogénétique afin d'identifier ces souches.
- ✓ D'enrichir cette collection par d'autres souches provenant de différentes régions arides d'Algérie.
- ✓ D'élargir cette étude par d'autres paramètres.
- ✓ Réaliser des tests sur la plante et sur champs.

Références bibliographiques.

A

AZANI, N., BABINEAU, M., BAILEY, C.D., BANKS, H., BARBOSA, A.R., PINTO, R.B., BOATWRIGHT, J.S., BORGES, L.M., BROWN, G.K., BRUNEAU, A., 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon* 66, 44–77.

Appunu, C et Dhar, B. (2006). Symbiotic effectiveness of acid-tolerant Brady rhizobium strains with soybean in low pH soil Africa *Journal of Biotechnology*.5(10).842-845.

ASADI RAHMANI , H., SALEH-RASTIM N, KHAVAZI K, ASGHAZADEH A, FEWER D, KIANI S, LINDSTRÖM K. (2009). Selection of thermotolerant bradyrhizobial strains for nodulation of soybean (*Glycine max* L.) in semiarid regions of Iran. *World J. Microbiol Biotechnol*, 25: 591-600.

AHEMAD,F.&, KHAN , M.S. (2011). Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria: Recent advancements. *Insight Microbiol*. 1: 39-54.

B

Barton L, McLay CDA, Schipper LA, Smith CT. 1999. Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: a review. *Australian Journal of Soil Research*. 37: 1073-1093.

Baba arbi S,(2016), Etude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotique des légumineuse spontanées *Medicago littoralis Rhode et Melilotus indicus (L)*. Présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (wilaya de Ouargla). Thèse de magister université Annaba, PP 26-27.

C

Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., & Udvardi, M.K. (2004). Global changes in transcription orchestrate , J., metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 39(4), 487-512. , <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02150.x>

Cheng, Q. (2008). Perspectives in Biological Nitrogen Fixation Research. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), 786-798.

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00700.x>

Chahboune, H., Harrington, D. A., Criscione, J. M., et al. (2011). Determining the fate of seeded cells in venous tissue-engineered vascular grafts using serial MRI. *The FASEB Journal*, 25(12), 4150–4161.

Chahboune, H., Mhamdi, R., Bekkaoui, F., et al. (2012). Diversité génétique des souches de Bradyrhizobium isolées de *Cytisus striatus* dans le nord du Maroc. Étude publiée sur la caractérisation moléculaire des rhizobia.

Chang, S.-H., Fang, M.-C., & Chang, H.-Y. (2010). Enhancing three bliss concepts among ,nursing home elders in Taiwan. *Journal of Clinical Nursing*, 19(5-6), 682–690.

D

Duhoux E.& Nicole M. (2004). *Biologie végétale : association et interaction chez les plantes*,Edition : Dunod. Paris. 166 p.

DOMERGUE O. 2017. Diversité fonctionnelle de rhizobia associés à la féverole en agro-écosystème Sud de France. Thèse doctorat. Université de recherche. Paris. France.231p.

E

Ertl, G. (2012). The Arduous Way to the Haber-Bosch Process. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 638(3-4), 487-489.

<https://doi.org/10.1002/zaac.201190458>

Epstein E. (1972). *Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives*. John Wiley.124p.

EI-FIKI A.I. (2005). Genetic Diversity in Rhizobia Determined by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *J Agri Social Scien* 9 : 121-129.

G

Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., & Peix, Á. (2013). Definition of a novel symbiovar (sv. retamae) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(3), 180–186.

Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., & Cosby B.J. (2003). The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 53(4), 341-356.
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)

Graham, Peter H., & Vance, C. P. (2003). *Legumes: Importance and Constraints to Greater Use*. *Plant Physiology*, 131(3), 872-877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>

Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*. 42: 413–441.

H

Hung, C.-H. (2005). Measuring postpartum stress. *Journal of Advanced Nursing*, 50(4), 417–424.

HANCOCK, J.F. (2012). *Plant Evolution and the Origin of Crop Species* (CABI).

Hénault C. and Revellin C., (2011). Inoculants of leguminous crops for mitigating soil emissions of the greenhouse gas nitrous oxide. *Plant and Soil*. 346(1) :289-296.

Hungria, M., & Vargas, M. A. T. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2–3), 151–164.

J

Jordan D. C., (1984). Family III: rhizoiaceae. In :Kreig N.R. et Holt J.C (EdS): *Bergeys manual of systematic bacteriology* . Williams et Wilkins. Baltimore. USA. PP, 234 – 244.

Jordan, P. (1982). Stationary, spherically symmetric solutions of Jordan's unified theory of gravity and electromagnetism. *Foundations of Physics*, 12(5), 467–478.

K

KHAN , M.S., ZAIDI M, AHEMAD M, OVEN M, WANI P.A., (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing-fungi current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci* 56: 73-98.

M

Margaert p., Uchiumi T., AlunniB., EvannoG., CatriceO., Mausset AE., Barloghubler F., GalibertF., Kondorosi A.,(2006). Eukargotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the rhizobium-legume symbiosis. *Proceeding of the National Academy of scienticia of the united states of America* .103:5230-5235.

Michiels J., Verreth C., Vanderleyden. (1994). Effects of temperature stress on bean nodulating Rhizobium strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (4). pp 1206 1212.

Machefert SE, Dise NB, Goulding KWT, Whitehead PG. 2002. Nitrous oxide emission from a range of land uses across Europe. *Hydrology and Earth System Sciences*. 6: 325-337.

O

Ott T., Van Dongen J.T., Gunther.C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Zechouski T., Geigenberger P., Udvardi M.K., (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* .15:531-535.

Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519–546.

P

Pedrosa F.O. (1988). Physiology biochemistry and genetics of Azospirillum and other root associated Nitrogen-fixing bacteria. *C.R.Scein.* 6. pp 345-348.

Piha M. I et Munnus D.N. (1987). Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant Soil*. 98. pp 183-194.

Pujic P., Normand P. (2009). La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofetur.* **28. (298).** pp 26-29.

Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180–201.

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.

Perry J.J., Staley J.T., Lory S.,(2004). *Microbiology.* ED. Dunod, paris .889 P.

Pujic P, Normand P. 2009. La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantesactinorhiziennes. *Biofetur.* 298: 26–29.

R

Roger P.A,& Dommergues Y, Balandreau J, Dreyfus B, Sougoufara B. 1996. La fixation biologique de l'azote, quelles potentialités pour le développement, conférence-débat de l'ORSTOM présentée le 30 mai 1996.

Rae D., Giller K. E., Yea A. R., Flowers T.J., (2002). The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann.Bot.*89 :563-570.
Robert E., Ricklefs G., Miller L., (2005). *Ecologie.* Ed. De Boeck. Paris. 214p

RasaS., Jorngard B., Abou-Taleb H., Christiansen J.L. (2001). Tolerance of Bradyrhizobium sp. (*Lupini*) stains to Salinity, PH, CaCO₃ and antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 32 (6). pp 379-383.

S

SOLOMON, L., et FASSIL, A. 2014.Symbiotic And Phenotypic Characteristics of Rhizobia Nodulating Faba Bean (*Vicia Faba*) From Tahtay Koraro, Northwestern Zone Of Tigray Regional State, Ethiopia. *Ijtee*, 2347-4289.

SINGH RK, MALIK N, SINGH S. 2013. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Bioscience* 5: 8-14.

Saoudi. M, (2008), Les Bactéries nodulants les légumineuses (BNLP) caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuses *Astragalus armatus*, UNV Mentouri de Constantine, PP, 21-22.

Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H., & Martínez-Romero, E. (2002). Advances in Rhizobium research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 323–378.

T

Teillet A, (2008), Caractérisation de deux déterminants moléculaire impliqués dans le processus d'infection lors de l'interaction symbiotique entre la légumineuses modèle *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium mélioti*. Thèse de doctorat, univ de Toulouse, PP, 11.

Terzo , M. Et Rasmont , P., (2007). Abeilles sauvages, bourdons et autres insectes pollinisateurs. Les livrets de l'agriculture. Ministère de la Région wallonne. 61p.

Tourte Y., Bordonean M., Henry M. (2005). Le monde des végétales organisations, physiologie et génomique. De DUNOD. Paris. France.

V

Vincent J.M.(1970.) A manual for the practical study of the root nodule bacteria.IBP. Handbook n°15 –Blackwell scientific publishers, Oxford.

Vinuesa, C. G., Cook, M. C., Angelucci, C., et al. (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*, 435(7041), 452–458.

W

Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334-342.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736>.

Wang Y., Shirogame T., Liu D., Harper J. W. Elledge S.J. Exit from exit: resetting the cell cycle through Amn1 inhibition of G protein signaling. *Cel.l* 112(5):697-709.

WILLEMS , A.(2006). The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287: 3–14.

Wang, Z., Zhang, C., Qi, Y., et al. (2012). Wnt signaling regulates postnatal development of the hypothalamic arcuate nucleus. *Developmental Biology*, 370(1), 1–12.

Y

Yaw Boakeye E., Dotse Lawson I.Y., Akyea Danso S.K., Kwame offei S.

(2016). Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis*.69. 89p.

Z

Zahran, H. H. (2001). Rhizobium–legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 968–989.

<https://www.rhizobia.co.nz/taxonom/rhizobia>

Annexes.

Annexe :

Annexe I : Composition des Milieux de Cultures.

Milieu YMA (Yaest Mannitol Agar)

Mannitol10 g
Extrait de levure 0,4 g
K₂HPO₄..... 0,5 g
MgSO₄, 7H₂O0,2 g
NaCl.....0,1 g
Agar.....15 g
Eau distillée qsp.....1000 ml
pH ajusté à 6,8

Milieu YMB (Yaest Mannitol Broth)

Mannitol10 g
Extrait de levure 0,4 g
K₂HPO₄..... 0,5 g
MgSO₄, 7H₂O0,2 g
NaCl.....0,1 g
Eau distillée qsp.....1000 ml
pH ajusté à 6,8

Annexe II : La moyennes des différents tests effectués

Tableau I : Caractérisation morphologique des colonies:

Les souches	EPS	Couleur	Transparence	formes
SJ1	Présence	Blanche	Opaque	Régulier
SJ2	Absence	Blanche	Translucide	Régulier
SJ3	Absence	Blanche	Translucide	Régulier
SJ4	Présence	Blanche	Translucide	Régulier
SJ5	Présence	Blanche	Opaque	Régulier

TableauII : Caractérisation biochimique des souches bactériennes

Les souches	Forme	Mobilité	Flagelle
SJ1	Batonnet	+	+
SJ2	Batonnet	+	+
SJ3	Batonnet	+	+
SJ4	Batonnet	+	+
SJ5	Batonnet	+	+

Tableau III : La moyenne des DO obtenue aux différents PH

les souches	PH= 4	PH=5	PH=6	PH=7	PH=8
SJ1	0,119	0,277	0,373	0,156	0,075
SJ2	0,107	0,179	0,182	0,113	0,060
SJ3	0,105	0,116	0,189	0,29	0,061
SJ4	0,236	0,288	0,388	0,320	0,220
SJ5	0,105	0,191	0,252	0,222	0,149
<i>B.japonicum</i>	0,105	0,329	0,354	0,289	0,160
<i>B. algeriense</i>	0,137	0,189	0,223	0,183	0,121

Tableau V : La moyenne des DO obtenue aux différents Températures.

les souches	T°=4°C	T°=20°C	T°=28°C	T°=30°C	T°=32°C	T°=37°C
SJ1	0,080	0,082	0,164	0,083	0,022	0,004
SJ2	0,017	0,097	0,113	0,117	0,019	0,003
SJ3	0,043	0,109	0,155	0,073	0,03	0,004
SJ4	0,044	0,13	0,199	0,112	0,034	0,008

SJ5	0,087	0,108	0,166	0,122	0,008	0,009
<i>B.japonicu</i> <i>m</i>	0,053	0,183	0,213	0,105	0,004	0,003
<i>B.algeriense</i>	0,075	0,140	0,319	0,107	0,044	0,004

Tableau VI : La moyenne des DO obtenue aux différentes concentrations de NaCl.

les souches	100	200	300	400
SJ1	0,0050	0,0057	0,01	0,0018
SJ2	0,0077	0,0069	0,0011	0,0015
SJ3	0,0078	0,0087	0,0093	0,0014
SJ4	0,0084	0,0055	0,0096	0,0023
SJ5	0,125	0,183	0,0046	0,0022
<i>B.japonicum</i>	0,0023	0,0025	0,0014	0,0025
<i>B.algeriense</i>	0,0061	0,0013	0,0016	0,0011

Résumé

5 souches bactériennes ont été isolées de *Spartium junceum* L. de la tribu des *Genisteeae* ont fait l'objet d'une caractérisation cellulaire, morphologique et physiologique. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches sont mobiles, Gram- et de forme bâtonnets, avec présence ou absence d'EPS et de couleur blanche ou blanc gris. Les résultats de la caractérisation physiologique montrent une bonne croissance des souches entre pH4 et pH8 et entre 20°C et 30°C. aucune tolérance en présence de NaCl à l'exception de la souche SJ5 qui semble avoir une croissance entre 100 à 200 mM.

Mots -clés : Caractérisation morphologique, *Spartium junceum* L., *Genisteeae*, NaCl

Abstract

Five bacterial strains were isolated from *Spartium junceum* L. of the *Genisteeae* tribe and were subjected to cellular, morphological, and physiological characterization. The results show that all strains are motile, Gram-negative, and rod-shaped, with the presence or absence of EPS and a white or grayish-white color. The results of the physiological characterization show good growth of the strains between pH 4 and pH 8 and between 20°C and 30°C. There is no tolerance to NaCl, except for strain SJ5, which appears to grow between 100 and 200 mM.

Keywords : Morphological characterization, *Spartium junceum* L., *Genisteeae*, NaCl

ملخص

عُزلت خمس سلالات بكتيرية من بكتيريا *Spartium junceum* L. من فصيلة *Genisteeae* ، وخضعت لتوصيف خلوي ومورفولوجي وفسولوجي. أظهرت النتائج أن جميع السلالات متحركة، سالبة الجرام، وعصوية الشكل، مع وجود أو غياب EPS ولون أبيض أو أبيض مائل للرمادي. أظهرت نتائج التوصيف الفسيولوجي نموًا جيدًا للسلالات بين درجتي حموضة 4 و8، وبين 20 و30 درجة مئوية. لا يوجد تحمل لـ NaCl ، باستثناء السلالة SJ5 ، التي يبدو أنها تنمو بين 100 و200 ملي مولار.

الكلمات المفتاحية: التوصيف المورفولوجي، *Spartium junceum* L. ، *Genisteeae* ، NaCl