



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques

Référence ..... / 2024

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :  
**Hammou Khadîdja et Hachani Imane**

Le: [Click here to enter a date.](#)

## *Synthèse : Les bactéries du genre Sinorhizobium isolées à partir des légumineuses des régions arides et semi arides en Algérie*

---

### Jury:

Mme. Mohamedi Kenza	Pr	Univ Mohamed Khider de Biskra	Président
Mme. Baba Arbi Souad	MCB	Univ Mohamed Khider de Biskra	Rapporteur
Mme. Bouguenoun Wided	Pr	Univ Mohamed Khider de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2023-2024

## **Remerciements**

*Nous tenons à remercier tout d'abord ALLAH le tout-puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour terminer ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements et nos profondes gratitudees à notre encadreur Mm. **BABA ARBI Souad** d'avoir accepté de diriger ce travail, et pour son aide très précieuse.*

*Nous exprimons tous nos remerciements à l'ensemble des membres de notre jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce mémoire.*

*A tous les enseignants de département SNV qui ont contribué à notre formation universitaire.*

*En fin, un grand merci à toute personne qui a contribué de près ou le loin à la réalisation de ce modeste travail.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à tous les amis.*

## Dédicace

"وأخر دعواتهم أن الحمد لله رب العالمين"

*Je dédie ce modeste travail :*

*À ma mère et à mon père, Ma réussite n'est que le fruit de votre  
éducation.*

*À ma seconde mère, **Habiba***

*Ma très chère sœur, **Meriem***

*Mon chère frère **Zin Laabidine***

*À mes chères tantes, **Naïma, Karima, Samira, et Chahira***

*Mes amies de toujours, **Razika et Safa***

*Sans oublier l'équipe : **Oumaima, Melek, Kaouthar, Doua, Chourouk,  
Hadil, Hadjer et Nassim***

*À tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que  
j'aime*

*Je dédie ce travail.*

***Hammou Khadîdja***

*À la source de tendresse inépuisable, à celle qui m'a porté malgré la faiblesse, à celle qui a veillé des nuits entières pour que je dorme paisiblement, à celle qui s'est levée pour moi, à ma chère mère « **Malika** », que Dieu la protège et lui accorde une longue vie, je dédie le fruit de mes efforts.*

*À celui qui m'a enseigné et m'a doté d'une personnalité exceptionnelle, et qui ne m'a jamais privé de ses conseils et de ses orientations, à mon père « **Azzedine** », que Dieu le protège et lui accorde une longue vie.*

*À mon soutien dans la vie, mes frères « **Akram, Chaker, Noufel, Ilyess, Qussay, Iyed** » et ma sœur « **Ikram** » et ses enfants « **Taim et Sanad** », et aux meilleures amies « **Kalthoum, Khadîdja, Hadjer ...** », que dieu vous garde pour moi.*

*Et enfin, je dédie cette recherche à mon mari « **Hatem** », compagnon de route, en reconnaissance pour son soutien dans la réalisation de mes rêves et de mes ambitions.*

***Hachani Imane***

Remerciements	
Dédicace	
Liste des matières	
Liste des Tableaux.....	<b>I</b>
Liste des Figures.....	<b>II</b>
Liste des abréviations .....	<b>III</b>
Introduction générale.....	<b>1</b>

## **Partie I.Synthèse bibliographique**

### **Chapitre 1 : Généralités sur la symbiose fixatrice d'azote légumineuses-*rhizobia***

1. Les zones arides et semi arides en Algérie.....	3
2. Les légumineuses .....	3
2.1. Généralités .....	3
2.2. Classification des légumineuses .....	4
2.3. Taxonomie des légumineuses .....	4
2.4. Importance des légumineuses .....	5
3. Les <i>rhizobia</i> .....	5
3.1. Généralités .....	5
3.2. Classification de <i>rhizobia</i> .....	6
3.3. Mécanismes de tolérance à l'aridité et salinité .....	6
4. La fixation symbiotique d'azote.....	7
4.1. Etablissement de la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses .....	7
5. Importance de la fixation symbiotique d'azote .....	9

## **Partie II : Synthèse des travaux scientifiques choisis**

### **Chapitre II : La méthodologie suivie dans les travaux choisis**

2.	Isolement des bactéries à partir des nodules .....	13
2.1.	Stérilisation de la surface des nodules .....	13
2.2.	Écrasement des nodules et ensemencement des boîtes.....	13
3.	Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des <i>rhizobia</i> .....	14
3.1.	Caractérisation phénotypique.....	14
3.1.3.	Test de tolérance aux différents pH .....	14
3.1.4.	Tests biochimiques.....	15
3.1.5.	Test de nodulation.....	15
3.2.	Caractérisation phylogénétique .....	16
3.2.1.	Séquençage et analyse phylogénétique des gènes de l'ARNr 16S .....	16
3.2.2.	Extraction de l'ADN bactérien .....	16
3.3.2.	Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S numérotation de titre.....	16

### **Chapitre III : Résultats et discussion des travaux choisis**

1.	Isolement des bactéries à partir des nodules .....	18
2.	Caractères morphologiques et culturaux .....	19
2.1.	Caractères culturaux des isolats de <i>rhizobia</i> .....	19
2.2.	Caractéristiques morphologiques.....	20
3.	Caractérisation phénotypique.....	21
3.1.	Les tests physiologiques .....	21
3.1.1.	Tolérance aux différentes concentrations de NaCl .....	21
3.1.2.	La tolérance à la température .....	23
3.1.3.	Test de tolérance aux différents pH .....	24
3.1.4.	Tests biochimiques.....	25
3.1.5.	Test de nodulation.....	26
4.	Caractérisations phylogénétique .....	29

4.1. Séquençage et l'analyse phylogénétique des gènes de l'ARNr 16S.....	29
Conclusion.....	<b>33</b>
Références bibliographiques .....	<b>43</b>
Annexe .....	<b>48</b>
Résumés	

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1:</b> Les légumineuses étudiés dans les différentes régions en Algérie.....	11
<b>Tableau 2:</b> Les promoteurs d'amplification et de séquençage.....	17
<b>Tableau 3:</b> Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses dans les différentes régions. ....	18
<b>Tableau 4:</b> La nodulation des légumineuses par différentes souches.....	26
<b>Tableau 5:</b> Analyse des résultats du séquençage des gènes d'ARNr 16S.....	29

# Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Différentes étapes de l'établissement de la symbiose <i>rhizobia</i> -légumineuse. ....	9
<b>Figure 2.</b> (a, b) Caractéristiques morphologiques, (c) <i>Rhizobium</i> cultivé sur milieu YMA + Rouge Congo, (d) <i>Rhizobia</i> cultivés sur milieu YMA + Bleu de Bromothymol ( <b>BTB</b> ).....	21
<b>Figure 3.</b> Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des <i>rhizobia</i> .....	22
<b>Figure 4.</b> Effet des différents pH sur la croissance des <i>rhizobia</i> .....	24
<b>Figure 5.</b> Les pourcentages de nodulation de chaque article analysé.....	27
<b>Figure 6.</b> Résultats de nodulation pour chaque plante étudiée. ....	28
<b>Figure 7.</b> Pourcentage de genre <i>Ensifer</i> ( <i>Sinorhizobium</i> ) dans les souches des <i>rhizobia</i> analysées.....	31

## Liste des abréviations

**ONU** : Organisation des Nations Unies.

**NodD**: Nodulation Désignation.

**YEMA**: Yeast-extract Mannitol Agar.

**TY**: Yeast Extract-Tryptone.

**BTB**: Bleu de bromothymol.

**RC**: Rouge Congo.

**PH** : potentiel hydrogène.

**ARN** : Acide ribonucléique.

**ADNr** : Acide désoxy ribonucléique ribosomique.

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique.

**16S** : Svedberg.

**QIAAmp** : QIAGEN amplification .

**PCR** : Polymérase Chain réaction (réaction en chaine de polymérisation).

# **Introduction générale**

## Introduction générale

La surface de la Terre est constituée en grande partie de zones arides et semi-arides. Ces zones s'étendent sur une grande superficie en Algérie et se distinguent par des conditions environnementales difficiles, comme des températures élevées, des précipitations faibles et des sols pauvres en nutriments. Ces éléments restreignent grandement la diversité biologique et la production agricole. Toutefois, certaines espèces végétales comme les légumineuses ont connu une évolution afin de résister à ces conditions difficiles. Leur réussite est principalement due à leur aptitude à établir des liens symbiotiques avec des bactéries du genre *Sinorhizobium*, qui sont des agents de fixation de l'azote (**Bensaïd, 2006**).

Les légumineuses jouent un rôle essentiel tant sur le plan économique qu'environnemental. En s'attachant aux bactéries qui fixent l'azote, ils ont la capacité d'améliorer la qualité du sol et de diminuer l'utilisation d'engrais chimiques. Dans les systèmes agricoles traditionnels en Algérie, ces plantes jouent un rôle essentiel dans la durabilité des pratiques agricoles dans des environnements difficiles (**Murray, 2004**).

L'importance de la bactérie *Sinorhizobium* dans les systèmes symbiotiques des légumineuses a été montrée par des recherches précédentes (**Rome et al., 1996 ; Baudoin, 2001 ; Murray, 2004**). Ils ont souligné la variété génétique de ces bactéries et leur aptitude à accumuler de l'azote dans des conditions arides. Toutefois, nous ne sommes pas encore pleinement familiers avec les diverses souches de *Sinorhizobium* présentes dans les sols arides et semi-arides d'Algérie et avec leurs interactions particulières avec diverses espèces de légumineuses (**Willems et al., 2006**).

Les objectifs de cette étude sont nombreux, tout d'abord, ce travail pourrait favoriser une meilleure compréhension des écosystèmes des zones arides et leurs influences sur la diversité des espèces du genre étudié. En plus, cela pourrait permettre de repérer les souches de *Sinorhizobium* identifiées dans ces écosystèmes et qui pourrait être exploitées afin d'améliorer la productivité des légumineuses dans les zones arides ce qui est crucial pour développer des pratiques agricoles durables. Finalement, cette étude peut offrir des solutions afin de rétablir les sols dégradés et renforcer la résistance face au changement climatique.

Pour atteindre ces objectifs, nous allons essayer de répondre dans cette étude de questions suivantes : Quels sont les types de souches de *Sinorhizobium* présents dans les sols arides et semi-arides en Algérie ? Quelles sont les effets des différentes conditions environnementaux sur la diversité de ces souches et l'efficacité de leurs relations symbiotiques avec leurs plantes hôtes ?

Toutes ces informations seront le résultat de l'analyse et de la comparaison entre les résultats des articles scientifiques liés au sujet. Pour cela, ce travail est structuré en deux parties :

Première partie : il s'agit des généralités sur la symbiose fixatrice d'azote légumineuses-*rhizobia* et les deux partenaires de cette relation.

La deuxième partie répartie en deux chapitres concerne une synthèse de méthodes utilisées pour l'identification et l'étude des effets des conditions environnementales sur ces bactéries. Le deuxième chapitre représente les résultats obtenus par les différents auteurs dans ce sujet.

**Partie I.**  
**Synthèse bibliographique**

**Chapitre 1.**  
**Généralités sur la symbiose**  
**fixatrice d'azote**  
**légumineuses-*rhizobia***

# Chapitre 1 : Généralités sur la symbiose fixatrice d'azote légumineuses-*rhizobia*

## 1. Les zones arides et semi arides en Algérie

L'Algérie, située dans la région de l'Afrique du Nord, offre une diversité géographique remarquable, caractérisée par une juxtaposition de terrains arides et semi-arides. Au nord, le pays est bordé par la mer Méditerranée, dont l'influence se fait sentir dans les régions côtières, modérant les températures et apportant des précipitations significatives. En revanche, au sud, s'étend le vaste désert du Sahara, où règnent des conditions arides et inhospitalières. Entre ces deux extrêmes, dans les zones semi-arides, on trouve un paysage typique de steppe, ponctué de végétation broussailleuse et parsemé d'oasis éparses. Les précipitations y sont rares, et les températures peuvent être extrêmes, avec des étés chauds et secs contrastant avec des hivers relativement doux (**Bensaïd, 2006**).

Cette géographie variée et la répartition des zones arides et semi-arides en Algérie exercent une influence majeure sur la formation des écosystèmes locaux, les schémas climatiques et les activités socio-économiques du pays. En effet, l'agriculture, le pastoralisme et le développement urbain sont tous profondément façonnés par ces conditions géographiques particulières. Les agriculteurs s'adaptent aux défis posés par la rareté des précipitations et les variations de température, tandis que les nomades pastoralisâtes exploitent les pâturages disponibles pour leur bétail. De même, les centres urbains se développent souvent le long des zones côtières fertiles ou à proximité des oasis, où l'eau est plus abondante et la vie plus viable. Ainsi, la géographie complexe de l'Algérie est un élément central de son identité nationale et de son développement socio-économique (**Bensaïd, 2006**).

## 2. Les légumineuses

### 2.1. Généralités

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille botanique des *Fabaceae*, qui représente la troisième famille de plantes par le nombre d'espèces, après les *Asteraceae* et *Orchidaceae*. Elles sont caractérisées par : des fleurs papilionacées, une gousse

contenant des graines, et la capacité de fixer l'azote atmosphérique par l'établissement d'une relation symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote (Chabbi, 2008).

Les légumineuses constituent une grande famille *Fabaceae* qui regroupe des plantes à visée ornementale (pois de senteur), fourragère (trèfle) et bien sûr alimentaire. Ces dernières se répartissent en 3 groupes : les « légumes secs » (lentilles, pois cassés, pois chiches, fèves, haricots secs...) ; les oléagineux (arachide, soja ...) et les légumes à cosses (petits pois, haricots verts...). Les légumineuses représentent une source importante de protéines pour l'alimentation humaine et animale et de composés azotés combinés pour la biosphère (Chabbi, 2008).

## 2.2. Classification des légumineuses

Les légumineuses représentent la troisième famille des *Angiospermes*, derrière les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*, avec plus de 700 genres et près de 20 000 espèces, divisées en trois sous-familles : les *Caesalpinoideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae*, divisées elles-mêmes en groupes de genres communément appelés *Tribus*. Chez les deux sous-familles de *Mimosoideae* et de *Papilionaceae* (Dekak, 2018).

Les *Papilionoideae* : cette sous-famille est très cosmopolite et compte environ 14 000 espèces divisées en 476 genres de légumineuses tropicales et tempérées. Les *Papilionoideae* sont réparties en deux grands groupes de plantes cultivées : les légumineuses tempérées (ou Galegoïdes) comme les genres *Pisum* (pois), *Cicer* (pois chiche), *Melilotus* (mélilots), *Lens* (lentilles), *Medicago* (luzerne), *Lotus* (lotier), *Trifolium* (trèfle) et *Vicia* (vesce). Les légumineuses tropicales (ou phaseoloïdes), comme notamment les genres *Cajanus*, *Phaseolus* (haricot) et *Glycine* (soja) (Dekak, 2018).

Les *Caesalpinoideae* : des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux, comptent 162 genres et près de 3000 espèces. Les *Mimosoideae* sont composés surtout des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Cette sous-famille renferme 77 genres et 3000 espèces (Dekak, 2018).

## 2.3. Taxonomie des légumineuses

**Régné** : *Plantae*

**Sous-règne** : *Trachéobionta*

**Division** : *Magnoliophyta*

**Classe :** *Magnoliopsidia*

**Sous classe :** *Rosidae*

**Ordre :** *Fabales*

**Famille :** *Fabaceae*

**Sous-famille :** *Papilionoideae ; Mimosoideae ; Caesalpinioideae (Chaich et al., 2017).*

## **2.4. Importance des légumineuses**

Pour la consommation animale et humaine, les légumineuses à graines (pois, féveroles, soja, pois chiches) et les légumineuses fourragères (luzerne, trèfle, lupin) sont des sources essentielles de protéines. La présence de métabolites secondaires et d'autres composés à haute valeur ajoutée dans les légumineuses ouvre de nouvelles perspectives d'utilisation des légumineuses à des fins non alimentaires (molécules bioactives, bioénergie, biopolymères) (**Gough, 2009**). Les légumineuses présentent un intérêt écologique et économique dans le domaine de l'agriculture. L'année 2016 a été désignée par l'ONU comme « année internationale des légumineuses » dans le but de faire connaître leur intérêt tant sur le plan nutritionnel que sur le plan agroécologique, dans le but de préserver une agriculture durable et une biodiversité face au changement climatique (**Baudoin, 2001**).

Les légumineuses sont des fertilisants écologiques : elles apportent une fertilisation naturelle aux sols et sont largement employées dans la rotation des cultures. Les légumineuses n'ont pas besoin d'azote et accumulent l'azote dans le sol, ce qui permet de diminuer les apports d'engrais pour la culture suivante. Ceci entraîne une diminution de la consommation globale d'azote, ce qui contribue à réduire la consommation d'énergie fossile et les émissions de gaz à effet de serre (**Vincent, 2019**).

## **3. Les *rhizobia***

### **3.1. Généralités**

Le *rhizobium* est une bactérie bacille à Gram négatif, aérobie et non sporulée, vivant librement dans le sol. Phylogénétiquement, ils appartiennent au clade *Alpha* des protéobactéries.

Les *rhizobiums* sont les partenaires symbiotiques des légumineuses. Ils favorisent le développement de nodules à l'intérieur desquels ils fixent l'azote atmosphérique

Sous une forme combinée que les plantes peuvent utiliser. Dans la plupart des cas, l'azote atmosphérique est fixé à l'intérieur de nodules (racine ou tige), qui sont un organe symbiotique entre les légumineuses et les bactéries. (Sadowsky *et al.*, 1983 ; Somasegaran et Hoben, 1985 ; Prin *et al.*, 1993). Cependant, chez certaines espèces non légumineuses des *Caesalpinaceae* et *Parasponia*, les *rhizobiums* ne percent pas les parois cellulaires, mais fixent plutôt l'azote atmosphérique dans des cordons infectieux, appelés cordons de fixation (Zakhia, 2001).

On distingue généralement deux groupes pour les cultures de *Rhizobium* : Les *rhizobiums* à croissance rapide font partie du premier groupe, qui génère de la turbidité dans le bouillon et a une croissance assez rapide à la surface d'un milieu solide en 3 à 5 jours. Les *rhizobiums* à croissance lente sont le deuxième groupe, qui a besoin de 7 à 9 jours ou plus pour atteindre à peu près le même développement (Allen et Allen, 1950).

### 3.2. Classification de *rhizobia*

Aujourd'hui, il existe 13 genres et 117 espèces de *rhizobia*. Elles font partie de la classe alpha des protéobactéries, avec des genres tels que *Rhizobium*, *Mesorhizobium* et *Bradyrhizobium*. Ces dernières années, on a également trouvé des *rhizobia* dans les bêta protéobactéries, notamment dans les genres *Shinella*, *Cupriavidu* et *Herbaspirillum*. Les diverses espèces des *rhizobia* sont regroupées dans les genres mentionnés ci-après : Le genre *Rhizobium* comprend 49 espèces. *Mesorhizobium* est une espèce de 21 espèces. L'ensifère anciennement appelé *Sinorhizobium*, renferme 17 espèces. *Bradyrhizobium*, qui renferme 9 variétés. *Burkholderia* (Chen *et al.*, 2013) est composé de 7 espèces. *Azorhizobium*, qui comprend deux variétés. *Microvirga*, (Arley *et al.*, 2011), comprenant trois espèces. *Phyllobacterium*, qui regroupe trois espèces. *Ochrobactrum*, (Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2007), qui renferme deux espèces. *Methylobactérieum* dont 1 espèce est présente. *Cupriavidus* avec une seule espèce. *Devosia* comprend une seule espèce. *Shinella*, (Lin *et al.*, 2008), avec une seule espèce.

### 3.3. Mécanismes de tolérance à l'aridité et salinité

La recherche récente a dévoilé des informations précieuses sur les interactions jusqu'alors non documentées entre les légumineuses et les *rhizobiums* dans des milieux naturels hostiles, caractérisés par des températures élevées et des précipitations limitées. Les Données pédologiques ont mis en lumière la texture légère du sol et les niveaux de nutriments relativement bas, confirmant ainsi les conditions environnementales difficiles auxquelles sont confrontés les organismes vivants dans ces habitats. Cependant, des isolats spécifiques se sont révélés capables de capter et de fixer l'azote atmosphérique provenant de diverses espèces de légumineuses, contribuant ainsi à la stabilisation des dunes de sable et au maintien de l'équilibre écologique des écosystèmes désertiques. Cette découverte souligne l'existence de légumineuses nodulaires adaptées aux conditions naturelles, notamment dans les couches supérieures du sol (**Bogusz, 1985**).

La survie des bactéries du sol, telles que les *rhizobia*, repose sur une panoplie de stratégies, dont la protection de leurs membranes contre les agressions environnementales constitue un exemple significatif. Compte tenu des défis inhérents à leur mode de vie double, où ils évoluent à la fois dans le sol et dans les racines des plantes, il n'est guère surprenant que les *rhizobiums* aient développé une diversité de stratégies pour relever les défis environnementaux. Ces adaptations comprennent notamment des modifications au niveau des composants protéiques et lipidiques de leurs membranes, permettant ainsi à ces micro-organismes de s'adapter et de prospérer dans des environnements variés et souvent hostiles (**Bogusz, 1985**).

#### **4. La fixation symbiotique d'azote.**

##### **4.1. Etablissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses**

L'établissement de la symbiose entre les *rhizobia* et les légumineuses repose sur un dialogue moléculaire complexe qui donne naissance à des structures racinaires spécialisées appelées nodules. Ce processus implique une collaboration étroite entre la plante et la bactérie, caractérisée par des échanges de composés spécifiques. Les *rhizobia* ont la capacité unique de convertir l'azote atmosphérique en ammonium dans ces nodules nouvellement formés, fournissant ainsi à la plante une source d'azote essentielle à sa croissance. En retour, la plante fournit aux *rhizobia* des hydrates de carbone produits par photosynthèse ainsi qu'un environnement protecteur favorable à leur développement (**Perry et al., 2004**).

#### 4.1.1. Formation de nodulation

La formation des nodosités est remarquable en raison de son haut degré de spécificité. Cette symbiose est le résultat d'une interaction dynamique entre les *rhizobia* et leur plante hôte, où une multitude de signaux moléculaires spécifiques sont échangés tout au long du processus de formation des nodules (**Revellin, 2012**).

#### 4.1.2. Echange de signal d'infection

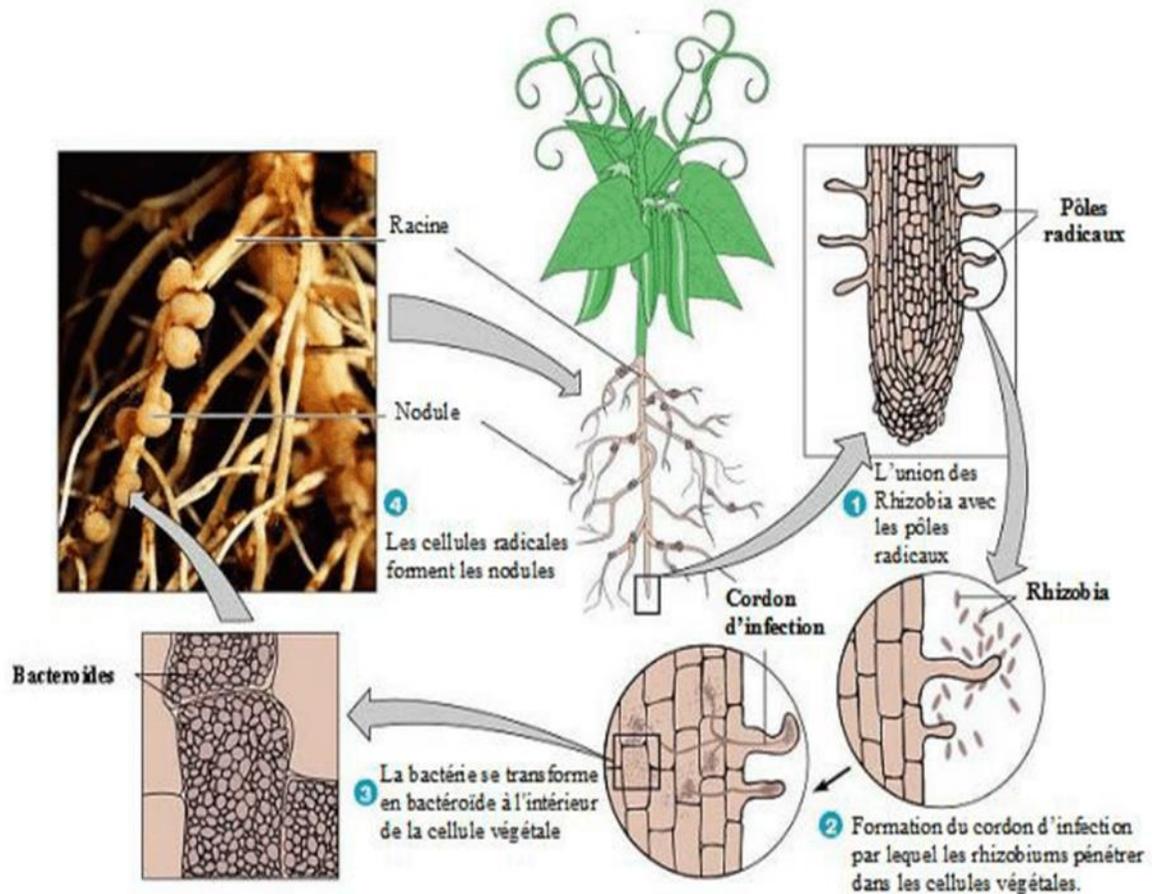
Pour la plupart des légumineuses étudiées, la nodulation commence par la production de légumineuses d'un mélange de composés, principalement des flavonoïdes, qui entraînent la synthèse de la protéine NodD chez les *rhizobia*. La transcription d'autres gènes impliqués dans la nodulation est activée par la protéine *NodD*, y compris ceux indispensables à la production de facteurs Nod, les molécules signal produites par le *rhizobium* et détectées par la plante, qui entraînent l'organogenèse des nodules (**Andrews, 2017**).

#### 4.1.3. L'infection

L'infection proprement dite commence lorsque les *rhizobia* pénètrent dans les poils racinaires, entraînant la formation d'une barrière cellulaire qui entoure l'infection en développement. Ce processus crée un fil d'infection qui se propage à travers le cortex racinaire, se ramifiant plusieurs fois pour permettre la colonisation des cellules corticales par les *rhizobia* (**Andrews, 2017**).

#### 4.1.4. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Le développement ultérieur des nodules et la maturation des bactéroïdes marquent les dernières étapes de la symbiose. Les *rhizobia* sont libérés dans les cellules corticales, où ils se divisent et se différencient en bactéroïdes, des cellules spécialisées dans la fixation de l'azote. Ce processus complexe assure un approvisionnement adéquat en azote pour la plante hôte, tout en permettant aux *rhizobia* de prospérer dans leur environnement symbiotique (**Downie, 2012**).



**Figure 1.** Différentes étapes de l'établissement de la symbiose *rhizobia*-légumineuse (Faghir, 2012).

### 5. Importance de la fixation symbiotique d'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique, un processus essentiel à la survie de la vie sur Terre, joue un rôle aussi crucial que la photosynthèse. Ce processus, qui implique la symbiose entre les *rhizobia* et les légumineuses, est l'un des mécanismes les plus importants influençant la production végétale et la fertilité des sols (Serraj *et al.*, 2004 ; Franche *et al.*, 2009). En effet, les *rhizobia* présents dans les nodules racinaires des légumineuses sont capables de fixer de grandes quantités d'azote atmosphérique dans le sol (Abdel-Ghafar, 1989 ; Franche *et al.*, 2009).

Cette symbiose est cruciale pour la productivité agricole et le cycle biogéochimique de l'azote, étant donné sa capacité à réduire les coûts, à diminuer l'utilisation d'engrais azotés et à éviter les conséquences écologiques néfastes associées à leur utilisation (Perry *et al.*, 2004).

Dans le cadre des pratiques agronomiques visant à réduire l'utilisation d'intrants, la symbiose *rhizobia*-légumineuses revêt une importance capitale en fournissant les éléments fertilisants essentiels. Par exemple, cette association peut conduire à une fixation d'azote atmosphérique pouvant atteindre 200-300 kg par hectare pour des légumineuses fourragères ou des plantes à graines comme le soja (**Adolphe *et al.*, 2017**).

# **Partie II : Synthèse des travaux scientifiques choisis**

# **Chapitre II : La méthodologie suivie dans les travaux choisis**

## Chapitre II : La méthodologie suivie dans les travaux choisis

Un total de 15 articles scientifiques a été sélectionnés pour faire notre analyse dont on cite : (Sebbane *et al.*, 2004 ; Mrabet *et al.*, 2016 ; Amrani *et al.*, 2010 ; Nouredine *et al.*, 2010 ; Boukhatem *et al.*, 2012 ; Chreiet *et al.*, 2014 ; Baba Arbi *et al.*, 2015 ; Sobti *et al.*, 2015 ; Boukhatem *et al.*, 2016 ; Chaïch *et al.*, 2017 ; Benselama *et al.*, 2017 ; Azib *et al.*, 2019 ; Djouadi *et al.*, 2019 ; Azib *et al.*, 2021 ; Djouadi *et al.*, 2021).

### 1. Collecte d'échantillons

Il est important de sélectionner et d'étudier les nodules pendant une période précise où la plante est en pleine activité. La récolte est réalisée au printemps, en mars et en avril, lorsque la terre est sèche. Au cours de cette période de l'année, les nodules sont développés et visibles au niveau des racines, et sont d'un rougeâtre qui peut suggérer la présence de legmoglobine et de fixation active de l'azote (Rejili *et al.*, 2007).

D'après les 15 études sélectionnées, la collecte est réalisée en utilisant la méthode de Vincent (1970) et Beck *et al.* (1993). Pour récupérer l'ensemble de l'appareil racinaire, il est nécessaire de creuser une fosse d'environ 15cm au tour de la plante et de 20cm de profondeur. Ensuite, il est nécessaire de retirer délicatement le sol entourant les racines avec les mains. Les nodules sont ensuite placés dans des sacs en plastique et transportés immédiatement au laboratoire.

**Tableau 1:** Les légumineuses étudiés dans les différentes régions en Algérie.

Articles	Régions	Espèces (plantes)
Mrabet <i>et al.</i> (2006)	- Sebkhia (Misserghin) - West Algérie	- <i>Medicago ciliaris</i> - <i>M. polymorpha</i>
Armani <i>et al.</i> (2010)	- Tlemcen - Djelfa	- <i>Acacia saligna</i> - <i>A. longifolia</i> - <i>A. melanoxylon</i> - <i>A. ehrebergiana</i> - <i>A. nilotica</i> - <i>A. tortilis</i>
Nouredine <i>et al.</i> (2010)	- Tlemcen	- <i>Acacia tortilis</i> subsp

	- Tindouf - Béchar	- <i>A. raddiana</i>
<b>Boukhatem et al. (2012)</b>	- Oran - Mostaganem - Relizane - Ain Defla - El Bayadh - Adrar - Tamanrasset	- <i>Acacia seyal</i> - <i>A. karroo</i> - <i>A. saligna</i> - <i>A. ehrenbergiana</i> - <i>A. nilotica</i>
<b>Chaïch et al. (2017)</b>	- Metlili - Taïbet (East Sahara)	- <i>Genistae Saharae</i>
<b>Benselama et al. (2017)</b>	- Algérie	- <i>Vicia faba</i>
<b>Djouadi et al. (2021)</b>	- Oran - Batna - Blida - Khenchela - Djelfa - Ghardaïa - Laghouat	- <i>Hippocrepis multisiliquosa</i> - <i>H. minor</i> - <i>H. atlantica</i> - <i>H. monticola</i> - <i>H. constricta</i> - <i>H. areolata</i>
<b>Djouadi et al. (2017)</b>	- Djelfa - Tamanrasset	- <i>Lotus Roudareii</i> - <i>L. glinoides</i> - <i>L. jolyi</i> - <i>L. arabicus</i>
<b>Azib et al. (2021)</b>	- Ghardaïa - Ouargla - El Oued	- <i>Medicago sativa</i>
<b>Boukhatem et al. (2016)</b>	- Tamanrasset	- <i>Acacia ehrenbergiana</i> - <i>A. nilotica</i> - <i>A. seyal Delile</i> , - <i>A. tortilis</i>

		- <i>A. laeta Delile</i>
<b>Baba Arbi et al. (2015)</b>	- Touggourt	- <i>Medicago littoralis</i> - <i>M. indicus</i>
<b>Sobti et al. (2015)</b>	- Ouargla	- <i>Medicago sativa</i>
<b>Azib et al. (2019)</b>	- Ouargla	- <i>Medicago sativa</i>
<b>Cheriet et al. (2014)</b>	- Zerizer	- <i>Medicago ciliaris</i>
<b>Sebbane et al. (2004)</b>	- Béjaïa	- <i>Medicago polymorpha</i> , - <i>M. minima</i> , - <i>M. arabica</i> , - <i>M. orbicularis</i>

## 2. Isolement des bactéries à partir des nodules

Il s'agit de la méthode décrite par Somasegaran et Hoben (1994). Les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés en les plongeant dans de l'eau distillée stérile pendant 24 heures dans le réfrigérateur à 4°C, puis en les utilisant immédiatement après une heure à température ambiante. Cette méthode a été utilisée par les 15 études sélectionnées.

### 2.1. Stérilisation de la surface des nodules

D'après les études sélectionnées, La surface des nodules est stérilisée en les plongeant pendant 30 secondes dans de l'éthanol (95 % V/V), puis pendant 3 minutes dans de l'hypochlorite de sodium à 5,25 % ou 3 % de peroxyde d'hydrogène, puis en les lavant six fois avec de l'eau distillée stérile.

Ensuite, ils ont été stérilisés individuellement en surface en les plongeant dans 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 15 secondes à 2 minutes en fonction de leur taille. Cette étape a été réalisée par Boukhatem et al. (2012).

### 2.2. Écrasement des nodules et ensemencement des boîtes

Les nodules stériles dans tous les études sélectionnées étaient écrasées dans une grosse goutte d'eau stérile dans une boîte de Pétri à l'aide d'une pince à bout arrondi lors de la première étape du processus d'isolement selon la méthode de Somasegaran et Hoben, (1994). Les bactéries fixatrices

d'azote sont isolées directement des nodules racinaires de la plante hôte ou du sol en utilisant des extraits de levures sur un milieu de culture sélectif au mannitol (YEM).

Après une incubation de 4 à 5 jours à une température de 28°C, les cultures successives ont été effectuées pour purifier les colonies, puis elles ont été analysées au microscope photonique pour vérifier leur pureté. Ensuite, les isolats ont été conservés à -80°C avec du glycérol (1 :1 v/v) dans un laboratoire Eppendorf .

### **3. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des *rhizobia***

#### **3.1. Caractérisation phénotypique**

##### **3.1.1. Tolérance aux différentes concentrations de NaCl**

Ce test vise à évaluer la résistance des bactéries aux conditions de salinité, ainsi qu'à identifier les valeurs inhibitrices des souches.

(Sebbane *et al.*, 2004), (Merabet *et al.*, 2006), (Boukhatem *et al.*, 2012) ainsi que (Sobti *et al.*, 2015), (Baba Arbi *et al.*, 2015) (Boukhatem *et al.*, 2016), (Chaich *et al.*, 2017) et (Azib *et al.*, 2021) évaluent la tolérance des souches au sel en mesurant leur croissance dans un milieu YEMA avec une addition de chlorure de sodium à différentes concentrations (40, 60, 80, 170, 340, 510, 680, 1034 et 1280 mM de NaCl). Les plaques ont subi une incubation de 7 jours. On a évalué la tolérance des bactéries en se basant sur la densité de croissance.

Les études restantes n'ont pas fait le test de tolérance aux différentes concentrations de NaCl.

##### **3.1.2. Tolérance à la température**

Pour évaluer les températures maximales de croissance, les souches sont cultivées dans le milieu YEMA à diverses températures (4, 28, 37, 40, 45 et 50 °C) Les lectures sont réalisées après une incubation de 24 à 72 heures jusqu'à 10 jours (Boukhatem *et al.*, 2012 ; Baba Arbi *et al.*, 2015 ; Boukhatem *et al.*, 2016 ; Chaich *et al.*, 2017 ; Azib *et al.*, 2021).

Les études restantes n'ont pas fait le test de tolérance à la température.

##### **3.1.3. Test de tolérance aux différents pH**

Le but de ce test est d'évaluer l'aptitude des isolats à tolérer des différents pH (4, 4.5, 5, 5.5, 6.8, 8, 9 et 10). Le test a été effectué en suivant la même méthode que les tests précédents, en utilisant YEMA ajusté avec des solutions de NaOH et HCl variées en termes de pH. Les boîtes sont

incubées pendant trois jours à une température de 28 °C. Les résultats de ce test sont évalués de la même manière que le test précédent (Sebbane *et al.*, 2004 ; Baba Arbi *et al.*, 2015 ; Cheriet *et al.*, 2015 ; Azib *et al.*, 2021).

Les études restantes n'ont pas fait le test de tolérance aux différents pH.

#### **3.1.4. Tests biochimiques**

L'étude menée par Baba Arbi *et al.* (2015) est la seule étude qui a fait les tests de métabolisme des glucides. Les tests sont effectués à l'aide du système API 20 NE et de la galerie API 50 CH, qui sont des systèmes standardisés comportant respectivement 20 et 50 tests. Les tests API 20 NE visent à identifier les bâtonnets Gram négatifs conformément aux recommandations des fabricants, tandis que la galerie API 50 CH est utilisée pour évaluer la capacité des isolats à métaboliser les glucides. Les galeries sont incubées à 28 °C et observées quotidiennement pendant une période de 7 jours.

#### **3.1.5. Test de nodulation**

Ce test vise à examiner la capacité des isolats à noduler et à fixer l'azote sur les plantes.

Chacune des études (Sebbane *et al.*, 2004), (Mrabet *et al.*, 2006), (Armani *et al.*, 2010), (Noureddine *et al.*, 2010), (Boukhatem *et al.*, 2012), (Baba Arbi *et al.*, 2015), (Boukhatem *et al.*, 2016) (Chaich *et al.*, 2017), (Bensalma *et al.*, 2017), (Djouadi *et al.*, 2017), (Djouadi *et al.*, 2021) a réalisé ce test.

Avant d'être utilisées, les graines ont été stérilisées et avec une lame coupante les nodules sont transversalement coupés afin de libérer la dormance.

Pour confirmer que les nodules et les graines ont été stérilisés de surface en les roulant sur gélose nutritive, puis en les incubant à 28°C. Par la suite, les graines sont prégermés sur gélose à l'eau (0,75 % p/v) pendant trois jours à une température de 25°C, puis semées dans des pots en plastique contenant 300 g d'un mélange stérile de sable noir de rivière et de tourbe, ou de sable de construction qui est utilisée par Baba Arbi *et al.* (2015).

Trois ml d'une culture bactérienne (d'un bouillon TY ou YEMA en phase exponentielle) ont été utilisés pour inoculer les plantes jeunes. Deux mois après l'inoculation, les plantes ont été collectées et analysées afin de rechercher la présence de nodules racinaires. La couleur vert foncé des feuilles, la vitalité des plantes et l'apparition de couleurs rouges ou roses dans les coupes

transversales des nodules ont été utilisées pour évaluer l'efficacité des partenaires symbiotiques. Cette couleur est due à l'accumulation de leghémoglobine, une hémoprotéine qui se trouve exclusivement dans l'azote (**Boukhatem et al., 2016**).

Pour le reste des études, ils n'ont pas réalisé le test de nodulation.

### **3.2. Caractérisation phylogénétique**

Chacune des études (Mrabet *et al.*, 2006), (Amrani *et al.*, 2010), (Noureddine *et al.*, 2010), (Boukhatem *et al.*, 2012), (Baba Arbi *et al.*, 2015), (Boukhatem *et al.*, 2016), (Chaich *et al.*, 2017), (Djouadi *et al.*, 2017), (Azib *et al.*, 2021), (Djouadi *et al.*, 2021) a réalisé la caractérisation phylogénétique.

#### **3.2.1. Séquençage et analyse phylogénétique des gènes de l'ARNr 16S**

Le séquençage de l'ADNr 16S a acquis une importance capitale dans la classification des bactéries. Les séquences codant de l'ARNr 16S se composent des zones très rares et de parties de séquences très variables (**Boukhatem et al., 2016**).

La méthode la plus efficace et la plus rapide pour identifier les relations et la position phylogénétique des bactéries symbiotiques des légumineuses est l'analyse de l'ADNr 16S (**Boukhatem et al., 2016**).

#### **3.2.2. Extraction de l'ADN bactérien**

L'étude génotypique des souches peuvent être réalisée selon différents protocoles d'extraction d'ADN et d'amplification du gène de l'ARNr 16S présentés par les différents auteurs (**Amrani et al., 2010**).

L'ADN total des souches est extrait à partir d'aliquotes de 1,5 ml de cultures menées en milieu TY. Cette étape est réalisée selon les protocoles développés par les constructeurs.

Le mini kit QIAamp (QIAGEN, Düsseldorf, Allemagne), ou le kit d'extraction et de purification d'ADN Spin Clean (Mbiotech, Inc., Séoul, Corée du Sud) (Amrani *et al.*, 2010).

#### **3.3.2. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S numérotation de titre**

Les fragments des gènes de l'ARNr 16S des isolats sont amplifiés. Le programme de PCR comprenait une étape initiale de dénaturation, suivie des cycles de dénaturation, d'hybridation et

d'extension, puis une étape finale d'extension (Merabet *et al.* ; 2006 ; Amrani *et al.*, 2010 ; Baba Arbi *et al.*, 2015).

**Tableau 2:** Les promoteurs d'amplification et de séquençage.

Amorces	Séquences 5' → 3'	Références
<b>FD1</b> <b>rD1</b>	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	<b>Baba Arbi <i>et al.</i> (2015)</b>
<b>FGPS 6</b> <b>FGPS 1509</b> <b>16S-1080r</b>	5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3' 5'-AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA-3' 5'-GGG ACT TAA CCC AAC ATC T-3'	<b>Merabet <i>et al.</i> (2006)</b> <b>Boukhatem <i>et al.</i> (2012)</b> <b>Boukhatem <i>et al.</i> (2016)</b>
<b>16F27</b> <b>16R1488</b> <b>16F530</b> <b>16R343</b>	5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 5' -CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3' 5' -TTCGTGCCAGCAGCCGCGG-3' 5' -ACTGCTGCCTCCCGTA-3'	<b>Amrani <i>et al.</i> (2010)</b> <b>Djouadi <i>et al.</i> (2021)</b> <b>Djouadi <i>et al.</i> (2017)</b>

Les trois restant études ne mentionnent pas les amorces utilisées.

Les amplifiants ont été purifiés puis séquencés en bidirection en utilisant les mêmes amorces dans le tableau 2 (Merabet *et al.*, 2006 ; Amrani *et al.*, 2010 ; Baba Arbi *et al.*, 2015).

Pour le reste des études, ils n'ont pas réalisé la caractérisation phylogénétique.

# **Chapitre III : Résultats et discussion des travaux choisis**

## Chapitre III : Résultats et discussion des travaux choisis

Dans cette partie on présente les résultats rapportés dans les 15 travaux étudiés concernant les parties relatives à la recherche de souches de *Sinorhizobium* présentes dans les sols arides et semi-arides en Algérie.

### 1. Isolement des bactéries à partir des nodules

D'après les 15 articles que nous avons étudiés, sept cent trente-deux (732) isolats ont été obtenus et étudiés des nodules racinaires des légumineuses (**Tableau1**) de différentes régions résumées dans (**Tableau 3**).

**Tableau 3:** Nombre d'isolats obtenus à partir des nodules racinaires des légumineuses dans les différentes régions.

Article	Régions	Nombre d'isolat
<b>Sebbane et al. (2004)</b>	-Béjaïa	<b>10</b>
<b>Mrabet et al. (2006)</b>	- Sebkha (Misserghin) West Algérie	<b>27</b>
<b>Amrani et al. (2010)</b>	-Tlemcen -Djelfa	<b>27</b>
<b>Noureddine et al. (2010)</b>	-Tlemcen - Tindouf -Béchar	<b>51</b>
<b>Boukhatem et al. (2012)</b>	-Oran -Mostaganem - Relizane -Ain Defla -El Bayadh - Adrar - Tamanrasset	<b>48</b>
<b>Chaïch et al. (2017)</b>	-Metlili -Taïbet(EastSahara)	<b>57</b>

<b>Bensalma <i>et al.</i> (2017)</b>	-Algérie	<b>20</b>
<b>Djouadi <i>et al.</i> (2021)</b>	-Oran -Batna -Blida -Khenchela -Djelfa -Ghardaia -Laghouat	<b>26</b>
<b>Djouadi <i>et al.</i> (2017)</b>	-Djelfa -Tamanrasset	<b>38</b>
<b>Azib <i>et al.</i> (2021)</b>	-Ghardaïa -Ouargla -El Oued	<b>48</b>
<b>Boukhatem <i>et al.</i> (2016)</b>	-Tamanrasset	<b>81</b>
<b>Baba Arbi <i>et al.</i> (2015)</b>	-Touggourt	<b>40</b>
<b>Sobti <i>et al.</i> (2015)</b>	-Ouargla	<b>07</b>
<b>Azib <i>et al.</i> (2019)</b>	-Ouargla	<b>60</b>
<b>Chreiet <i>et al.</i> (2014)</b>	-Zerizer	<b>37</b>

Toutes les souches rhizobiales isolées sont identifiées d'abord sur la base des caractéristiques phénotypiques suivantes :

## 2. Caractères morphologiques et culturels

Pour l'isolement de ces bactéries, le milieu de culture utilisé est l'YEMA additionné du colorant rouge Congo (RC) par l'étude de Benselama *et al.* (2017) et de Baba Arbi *et al.* (2015) et du BTB par l'étude de Sobti *et al.* (2015) selon la méthode de Somasegaran et Hoben en 1994. Les souches sont ensuite caractérisées à l'aide de plusieurs tests. Tout d'abord, l'examen de la morphologie des colonies a été effectué, suivi de l'évaluation du taux de croissance et de la morphologie cellulaire au microscope optique en plus de la réaction de coloration de Gram.

### 2.1. Caractères culturels des isolats de *rhizobia*

Amrani *et al.* (2010) et Bensalma *et al.* (2017) rapportent que les *rhizobia* présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lentes et les bactéries à croissance rapide.

En règle générale, la durée de croissance est comprise entre 3 et 5 jours pour les croissances rapides et entre 5 et 7 jours pour les croissances lentes, dans ce cas il faut environ 7 à 12 jours pour que les colonies atteignent leur taille maximale sur gélose ou pour qu'elles se développent en milieu liquide. Le taux de croissance dépend de la température d'incubation (idéalement entre 25 et 30 °C), de l'origine (culture ou nodule), de l'aération (dans les cultures liquides) et de la composition du milieu (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les isolats obtenus dans les différentes études ont présenté des caractéristiques morphologiques et culturelles typiques aux *rhizobia* à croissance rapides

## 2.2. Caractéristiques morphologiques

### 2.2.1. Caractéristiques macroscopiques

Le résultat de Mrabet *et al.* (2006) montrent quelles colonies sont généralement circulaires, convexes, et ont une surface lisse à fine, bien que certaines puissent être légèrement irrégulières. Elles sont généralement translucides à semi-translucides, bien que des variations de couleur puissent être observées.

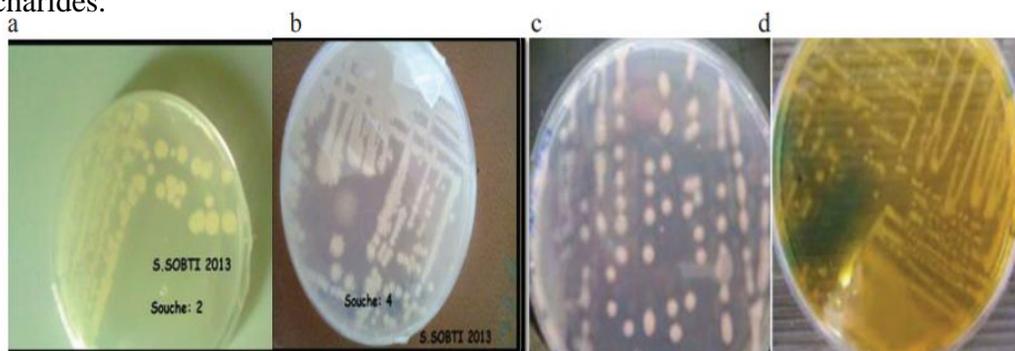
Azib *et al.* (2021) rapportent que les isolats obtenus présentent des colonies mesurent généralement de 1 à 5 mm de diamètre après quelques jours d'incubation. En plus, les isolats de Baba Arbi *et al.* (2015) présentent un aspect muqueux due à la produit une quantité significative de polysaccharides, ce qui peut être observé comme une substance luisante ou gélatineuse autour de la colonie.

Selon Benselama *et al.* (2017) et Baba Arbi *et al.* (2015) la majorité des isolats ne montrent pas d'absorption de colorant rouge Congo dont Somasegaran et Hoben (1994) rapportent que c'est un caractère des *rhizobia* alors que les bactéries endophytes absorbent ce colorant en donnant des colonies rouges.

De même, Sobti *et al.* (2015) rapportent que les colonies des *Sinorhizobium* peuvent varier en couleur, allant du blanc translucide au jaune. Certaines études mentionnent des colonies blanches, d'autres des colonies jaunes ou même marbrées.

Selon Sobti *et al.* (2015), sur milieu de culture (YEMA ou TY) additionné de BTB, les souches peuvent acidifier le milieu de culture, ce qui est indiqué par un changement de couleur du milieu de bleu à jaune, cette propriété distingue les *rhizobia* à croissance rapide comme le genre *Sinorhizobium* de deuxième type à croissance lente (tel que *Bradyrhizobium*) qui conserve la couleur bleue de milieu au cours de leur croissance d'après Somasegaran et Hoben (1994).

L'étude menée par Caïche *et al.* (2017) montre que dans certains cas, les colonies peuvent se fusionner former une croissance confluyente dû à la production de mucilage ou de polysaccharides.



**Figure 2.** (a, b) Caractéristiques morphologiques, (c) *Rhizobium* cultivé sur milieu YMA + Rouge Congo, (d) *Rhizobia* cultivés sur milieu YMA + Bleu de Bromothymol (BTB) (Sobti *et al.*, 2015).

### 2.2.2. Caractéristique microscopique

Afin de vérifier le type de Gram des cultures bactériennes, il est nécessaire d'effectuer une microscopie. Tous les travaux étudiés rapportent que les isolats obtenus présentent après coloration de Gram des *coccobacilles* Gram négatif. Il est connu que les *rhizobia* sont des bactéries à Gram négatif (Somasegaran et Hoben, 1994).

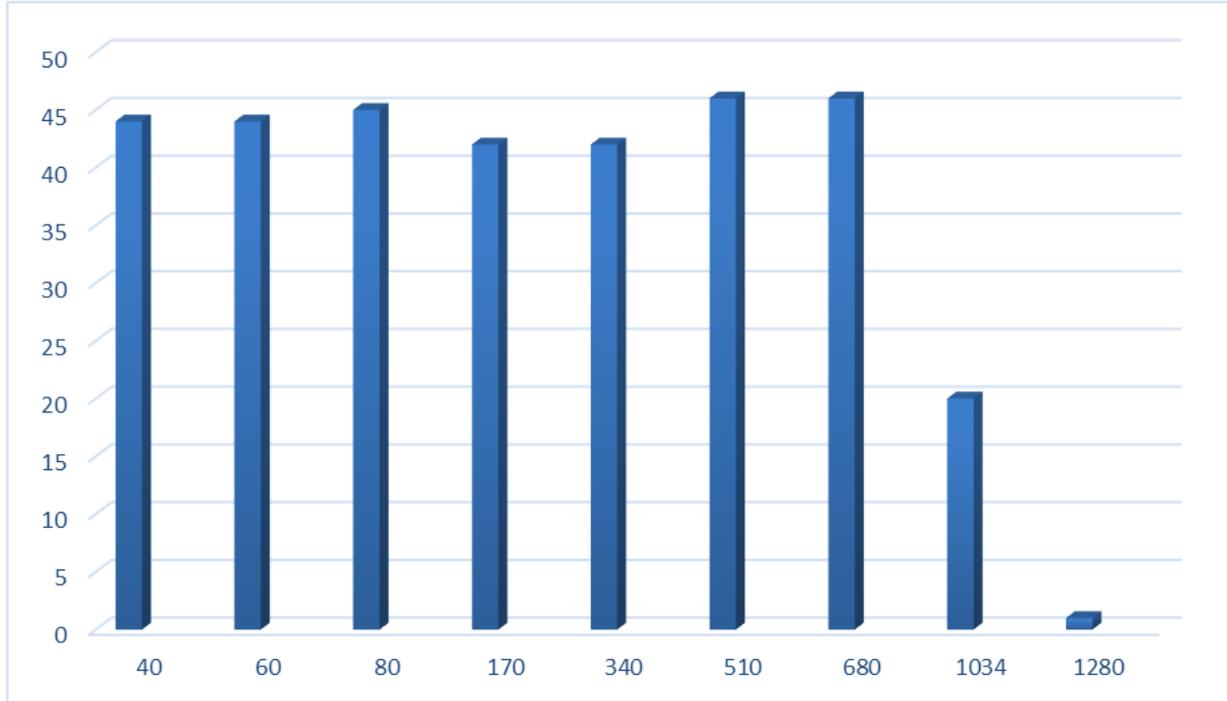
## 3. Caractérisation phénotypique

### 3.1. Les tests physiologiques

#### 3.1.1. Tolérance aux différentes concentrations de NaCl

Ce test est effectué afin de déterminer le niveau de tolérance des isolats à la salinité en utilisant différentes concentrations de NaCl (40, 60, 80, 170, 340, 510, 680, 1034 et 1280 mM de NaCl).

Toutes les études qui réalisent le test rapportent que les souches étudiées ont montré une tolérance assez élevée à la salinité *in vitro*, car environ 20 % d'entre elles ont atteint le niveau testé de 1 034 mM de NaCl.



**Figure 3.** Effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des *rhizobia*.

- Les axes dans la figure 3 représentent les pourcentages des souches qui ont capables à croitre les différentes concentrations de NaCl.
- À des concentrations de NaCl de 40, 60, 80, 170, 510 et 680 mM, la croissance des *rhizobia* est presque constante et élevée
- Le graphique indique clairement qu'à des concentrations de NaCl supérieures à 680 mM, la croissance des *rhizobia* commence à diminuer de manière significative.
- À 1280 mM, le NaCl a un effet presque totalement inhibiteur sur la croissance des *rhizobia*.

Selon Baba Arbi *et al.* (2015), Boukhatem *et al.* (2016), Chaich *et al.* (2017), Azib *et al.* (2021), les résultats montrent que les *rhizobia* à croissance rapide, sont plus tolérants à la salinité que celles à croissance lente sont également en accord avec ceux Zahran, (1999), Cacciari *et al.* (2003), Thami-Alami *et al.* (2010).

Les résultats d'Azib *et al.* (2021) Les souches isolées de Ghardaïa ont présenté la plus faible tolérance à la salinité, en revanche, aux concentrations les plus élevées, sont les souches d'El Oued, la région la plus saline, qu'ont donné les meilleurs résultats.

Hatimi *et al.*, (2001) rapportent que le niveau de tolérance à la salinité dépend du milieu écologique d'origine des souches.

Par contre Boukhatem *et al.* (2012) indiquent quelles bactéries hautement tolérantes ont été isolées pour la plupart dans des sites non salins (El Bayadh, Adrar, Mestghanem, Ain Djelfa, Relizane...).

Ce qui indique que les souches ont la capacité a adaptées les conditions défavorables.

### 3.1.2. La tolérance à la température

Généralement, les *rhizobia* (en particulier les *Sinorhizobium*) ont une température de croissance optimale comprise entre 28 et 31°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

Selon Baba Arbi *et al.* (2015), Azib *et al.* (2021), les souches de *Rhizobia* sont bien développées aux températures entre 20 et 40°C, mais pas de croissance à 45°C, malgré que ces isolats soient échantillonnés à partir de région chaudes (Ghardaïa ; Ouargla ; Touggourt et El Oued).

Jordan en (1984) rapporte que les *rhizobia* sont des bactéries qui peuvent être inhibées en augmentant ou en diminuant la température d'incubation il a observé que les *rhizobia* à croissance lente étaient considérablement plus résistants aux températures élevées que les *rhizobia* à croissance rapide.

Par contre, Jordan (1984) note également que les *rhizobia* à croissance rapide sont plus sensibles aux températures élevées et subissent une inhibition significative lorsque la température d'incubation est augmentée.

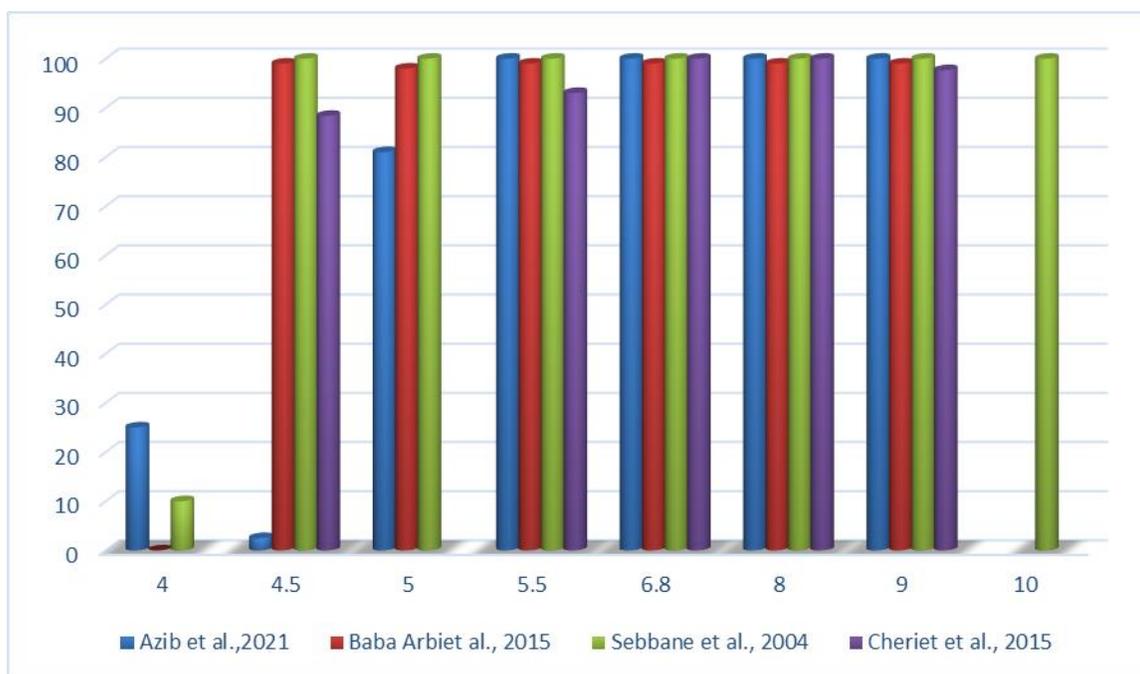
Les résultats de Boukhatem *et al.* (2012), Boukhatem *et al.* (2016) et Chaich *et al.* (2017), montrent que les souches ont la capacité de se développer à des températures de 35 à 50°C, avec une tolérance plus remarquable à 40 que à 50°C malgré que ces isolats soient échantillonnés aussi à partir des régions chaudes.

Certaines souches de *rhizobia* puissent tolérer des températures élevées, leur capacité de croissance optimale se situe généralement dans une plage plus restreinte.

### 3.1.3. Test de tolérance aux différents pH

Selon le graphique nous avons les résultats suivants :

- Les axes dans la figure 4 représentent les pourcentages des souches qui ont capables à croitre les différents pH.
- Il existe une variation significative de la croissance des *rhizobiums* à des niveaux de pH extrêmes (4, 4.5 et 10) entre les différentes études.
- La croissance des *rhizobiums* est optimale aux niveaux de pH 5, 5.5, 6.8, 8 et 9 dans toutes les études.



**Figure 4.** Effet des différents pH sur la croissance des *rhizobia*.

En ce qui concerne la tolérance à l'acidité et à l'alcalinité, les résultats des études indiquent que toutes les souches rhizobiennes des régions arides ont prospéré à un pH légèrement acide, neutre et alcalin.

Les souches de *rhizobium* à croissance rapide sont généralement considérées comme moins tolérantes au pH acide que les souches à croissance lente (Yan *et al.*, 2000 ; Priefer *et al.*, 2001).

Selon ces résultats de Azib *et al.* (2021) les souches se développaient de manière différente en fonction des variations de pH. Les pH alcalins et neutres ont été plus tolérés par eux que les pH acides. Les souches ont été exposées à des pH trop acides et ont connu des taux de croissance de 32,43 % et 81,63 % respectivement à pH 4 et 5.

Selon Baba Arbi *et al.* (2015) la majorité (soit 99%) des isolats et des souches de référence appartenant à *Ensifer meliloti* ont pu croître sur un milieu avec des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 9,5.

Les résultats de Sebbane *et al.* (2004) rapportent que les *rhizobia* isolées à partir de quatre espèces de *Medicago* de région subhumide sont capables de croître entre pH 5 et pH10. Une seule souche a la capacité à tolérer à pH 4.

Ils montrent que d'un point de vue physiologique, la tolérance à pH 4 a été signalée pour des souches aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (Aurag *et al.*, 1992).

Des observations similaires sont rapportées par Cheriet *et al.* (2015) dont les résultats montrent que de 93,02 à 100 % des isolats de région humide ont poussé dans un pH légèrement acide et neutre. À faible pH, certains isolats sont capables à tolérer pH 8, alors que tous les isolats ont poussé dans des pH alcalins.

Les résultats d'Azib *et al.* (2021) sont également en accord avec ceux d'Elboutahiri *et al.* (2010), Thami-Alami *et al.* (2010) qui indiquent que les souches de *Sinorhizobium meliloti* nodulatrice de luzerne étaient toutes résistantes aux pH alcalins 8 et 9.

Basé sur les résultats précédents, nous notons qu'il existe une similitude entre les résultats obtenue dans les régions arides et humides. De là, nous résultons que les *rhizobia* de genre *sinorhizobium* ont la capacité à s'adapter aux conditions défavorables au changement climatique.

#### 3.1.4. Tests biochimiques

Les *rhizobiums* à croissance rapide ont la capacité de métaboliser une variété plus étendue de substrats carbonés que les souches à croissance lente (Somasegaran et Hoben, 1994).

Baba Arbi *et al.* (2015) montrent que 44 des 49 sources de glucides sont utilisées par les souches testées, y compris l'isolat de référence *Ensifer meliloti*.

### 3.1.5. Test de nodulation

Les résultats de Boukhatem *et al.* (2012), montrent que sur les 48 isolats soumis à l'analyse moléculaire, 25 se sont révélés capables de noduler leurs plantes hôtes cinq semaines après l'inoculation, l'efficacité de la symbiose est évaluée qualitativement en fonction de la couleur des nodules, de la vigueur des plantes et de la couleur du feuillage par rapport aux plantes témoins non inoculées.

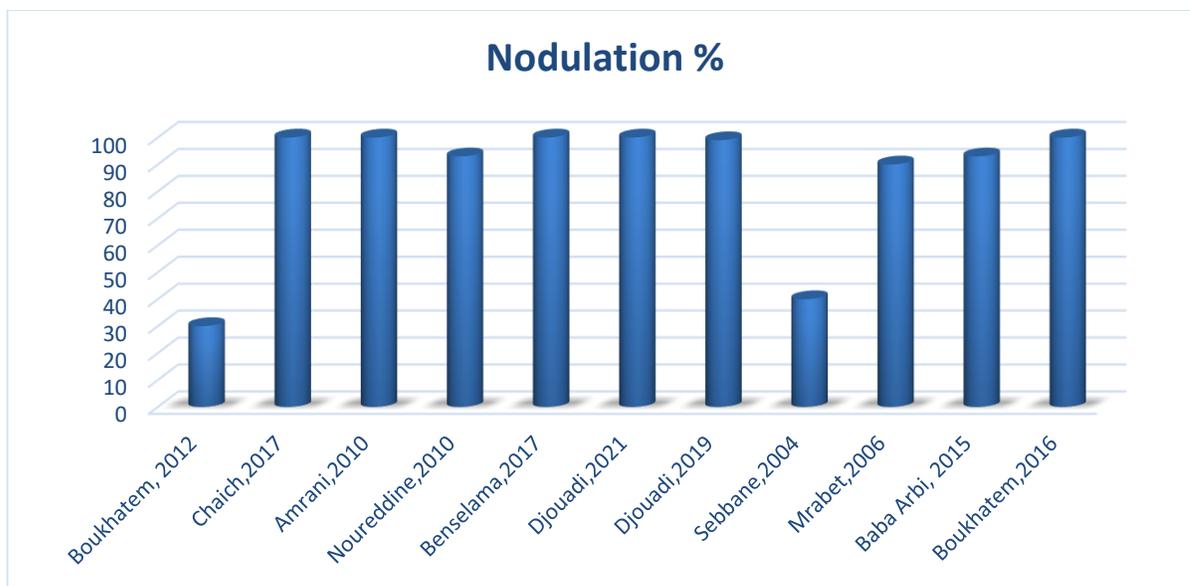
D'après les études menées par Chaïch *et al.* (2017) la couleur rouge brun des nodules des isolats (sur les plantes de *Genista*) témoigne de leur efficacité dans la fixation d'azote. Les 57 Isolats ont induit la formation des nodules sphérique, parfois allongée ou feuillée, et leur surface est lisse.

**Tableau 4:** La nodulation des légumineuses par différentes souches.

Références	Espèces	Nodulation	Capacité de fixation d'azote
<b>Boukhatem et al. (2012)</b>	<i>Acacia</i>	+	+
<b>Chaïche et al. (2017)</b>	<i>Genista</i>	+	+
<b>Amrani et al. (2010)</b>	<i>Acacia</i>	+	+
<b>Noureddine et al. (2010)</b>	<i>Acacia</i>	+	+
<b>Bensalma et al. (2017)</b>	<i>Vicia faba</i>	+	+
<b>Djouadi et al. (2021)</b>	<i>Hippocrepis</i>	+	+
<b>Djouadi et al. (2017)</b>	<i>Lotus</i>	+	+
<b>Sebbane et al. (2004)</b>	<i>Medicago</i>	+	/
<b>Mrabet et al. (2006)</b>	<i>Medicago</i>	+	/
<b>Baba Arbi et al. (2015)</b>	<i>Medicago</i>	+	+
<b>Boukhatem et al. (2016)</b>	<i>Acacia</i>	+	/

(+) : Présence des nodules / fixation d'azote. (-) : Absence des nodules / Aucune fixation d'azote.

(/): Pas mentionnée.



**Figure 5.** Les pourcentages de nodulation de chaque article analysé.

- Les axes représentent les pourcentages des souches qui forment des nodules dans chaque article analysé.
- La majorité des articles montrent des pourcentages de nodulation très élevés, proches de 100%.

Les résultats de Chaïch *et al.* (2017) sont similaires à ceux mentionnés par Amrani *et al.* (2010), dont tous les isolats de *Sinorhizobium* ont induit la formation de nodules racinaires sur leur hôte d'origine (*Acacia*). Les nodules présentaient des sections transversales roses ou rouges résultant de la production de légghémoglobine et indiquant ainsi que les partenaires symbiotiques concernés étaient efficaces.

De même, toutes les souches testées dans les études de Benselama *et al.* (2017) ont pu noduler leur plante hôte (*Vicia faba*). L'efficacité de nodulation des souches sur *Vicia faba* après deux mois d'inoculation a varié de 50% à 90%.

Noureddine *et al.* (2010) rapportent que sur 101 plants examinés, 94 (soit près de 93%) ont révélé la présence de nodosités caractéristiques de la symbiose *rhizobia*-légumineuses sur leur système racinaire. En plus, parmi les plants nodulés, 88 sur 94 (soit près de 94%) étaient efficaces, capables de réduire l'azote moléculaire ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ).

Aussi, selon les études de Djouadi *et al.* (2021) les résultats montrent que : les 26 plants collectés (inoculés par les isolats d'*Ensifer*) dans cette étude portent tous des nodules sur leur

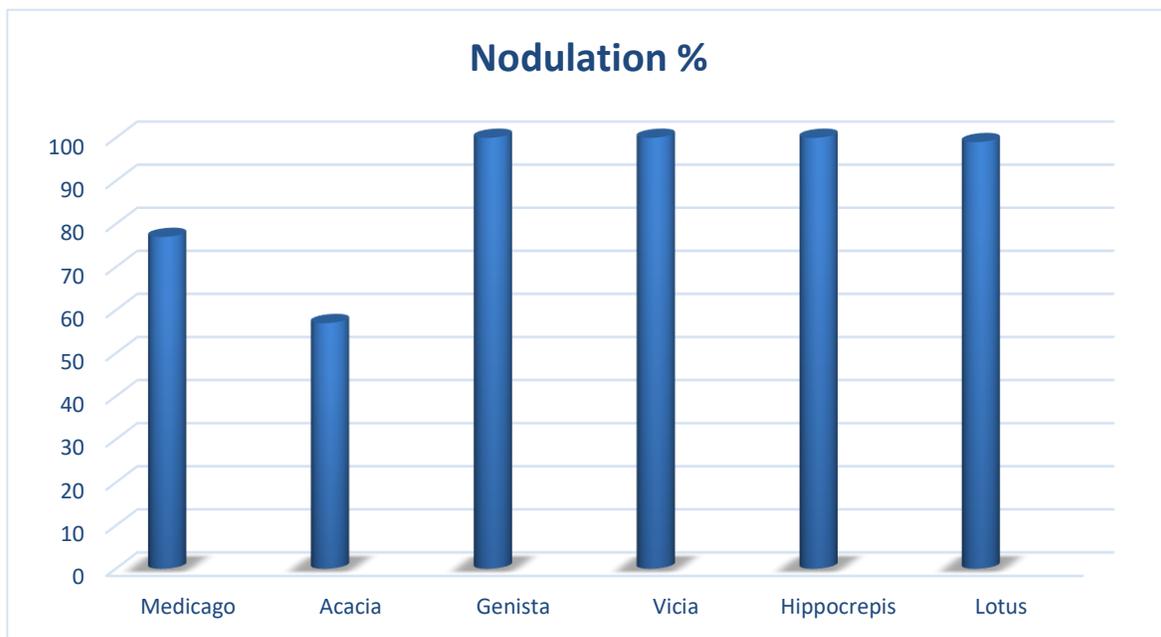
système racinaire, notamment au niveau du collet. Les coupes transversales aussi des nodules observés à l'aide d'une loupe binoculaire montrent une coloration rouge sombre dans la zone centrale, due à la présence de légghémoglobine, spécifique des nodules fixateurs d'azote. Ces résultats ont démontré que tous les plants ont présenté des nodosités de type déterminé, sphériques/globuleuses, qualifiées de nodules.

La majorité des souches ont efficacement nodulé leur plante hôte d'isolation, *Medicago ciliaris* ou *M. Polymorpha* selon Mrabet *et al.* (2006).

Des résultats similaires sont enregistrés par Baba Arbi *et al.* (2015) rapportant que 93% des isolats d'*Ensifer* ont induit la formation des nodules racinaires chez les plantes testées de *Medicago* et *Melilotus*, et tous les nodules formés étaient de couleur rosée.

Ainsi, Boukhatem *et al.* (2016) montrent que les nodules obtenus sur les plantules d'*Acacia* avaient une forme déterminée et indéterminée, quelle que soit l'espèce hôte et le site prospecté. Tous les isolats purifiés des nodules montraient une croissance rapide.

Par contre, les résultats de test de nodulation appliquée par Sebbane *et al.* (2004), des souches isolées de *Medicago* provenant des régions humides, montrent que seuls 10 des 25 isolats ont formé des nodules et 15 isolats ne sont pas inactifs sur leurs plantes-hôtes, ce qui pourrait être lié à l'inadéquation de la technique de nodulation utilisée.



**Figure 6.** Résultats de nodulation pour chaque plante étudiée.

- Les axes représentent les pourcentages des souches qui ont induit la formation des nodules sur les plantes étudiées.

Selon la figure 6, chez les genres *Genista*, *Vicia*, et *Hippocrepis*, les souches montrent les taux de nodulation les plus élevés, atteignant 100%. Également, *Lotus* a présenté un taux de nodulation élevé, d'environ 100%. Les souches inoculées chez les plantes de genre *Medicago* présentent un bon taux de nodulation, légèrement inférieur à 90%. Alors que les souches testées avec *Acacia* montrent le taux de nodulation le plus bas parmi les espèces étudiées, avec environ 60%.

#### 4. Caractérisations phylogénétique

##### 4.1. Séquençage et l'analyse phylogénétique des gènes de l'ARNr 16S

L'analyse des séquences d'ADNr 16S est largement utilisée pour définir la position taxonomique et retracer l'histoire évolutive des bactéries nodulaires (Shamseldin *et al.*, 2013 ; Gnat *et al.*, 2014).

Le tableau 4 résume les espèces du genre *Sinorhizobium* (*Ensifer*) identifiées dans les travaux étudiés.

**Tableau 5:** Analyse des résultats du séquençage des gènes d'ARNr 16S.

Références	Espèces (plante hôte)	Nombre d'isolats	La souche de références
<b>Boukhatem <i>et al.</i></b> <b>(2012)</b>	- <i>A. karroo</i> - <i>A. saligna</i> - <i>A. ehrenbergiana</i>	13	- <i>Ensifer meliloti</i>
<b>Chaiche <i>et al.</i></b> <b>(2017)</b>	- <i>G. saharae</i>	46	- <i>E. meliloti</i>
<b>Amrani <i>et al.</i></b> <b>(2010)</b>	- <i>A. saligna</i>	13	- <i>Sinorhizobium meliloti</i>
<b>Noureddine <i>et al.</i></b> <b>(2010)</b>	- <i>Acacia tortilis</i> subsp - <i>A. raddiana</i>	36	- <i>E. meliloti</i> - <i>E. fredii</i> - <i>E. saheli</i> - <i>E. teranga</i>

<b>Djouadi et al. (2021)</b>	- <i>Hippocrepis</i>	14	- <i>E. medicae</i> - <i>E. meliloti</i> - <i>E. fredii</i> - <i>E. numidicus</i> - <i>E. garamanticus</i>
<b>Djouadi et al. (2017)</b>	- <i>Lotus arabicus</i>	02	- <i>E. fredii</i> - <i>E. numidicus.</i>
<b>Mrabet et al. (2006)</b>	- <i>M. ciliaris</i> - <i>M. polymorpha</i> - <i>M. sativa</i>	14	- <i>S. meliloti</i> - <i>S. medicae</i>
<b>Azib et al. (2021)</b>	- <i>Medicago sativa</i>	48	- <i>S. meliloti</i> - <i>S. kummerowiae</i> - <i>S. medicae</i>
<b>Boukhatem et al. (2016)</b>	- <i>A. ehrenbergiana</i> - <i>A. tortilis</i>	02	- <i>E. terangaie</i> - <i>Ensifer sp</i>
<b>Baba Arbi et al. (2015)</b>	- <i>Medicago littoralis</i> - <i>Melilotus indicus</i>	06	- <i>E. meliloti</i>

D'après le tableau 4, on peut remarquer que les souches du genre *Sinorhizobium* sont identifiées dans tous les travaux étudiés qui réalisent la caractérisation phylogénétique à partir des différentes régions et différentes plantes hôtes, ce qu'indique que ce genre est très répandu dans les différents sols et représente un spectre d'hôte très important.

Parmi les 48 nouvelles souches étudiées, 10 groupes phylogénétiques ont été observés selon les études de Boukhatem *et al.* (2012) des séquences du gène ARNr 16S, provenant de sept espèces d'*Acacia* et de 13 sites différents en Algérie.

Les isolats étudiés par Azib *et al.* (2021) montrent des similarités élevées (91%-100%) avec des espèces types telles que *Ensifer meliloti* (*Sinorhizobium*) et *S. kummerowiae*, de même que Chaïch *et al.* (2017) ont observé que les isolats de *Genista saharae* se regroupaient principalement dans le genre *Ensifer*.

Djouadi *et al.* (2021) rapportent des résultats similaires, dont ont trouvé les isolats de *Hippocrepis* appartenant à cinq genres différents de *rhizobium*, avec une dominance d'*Ensifer*.

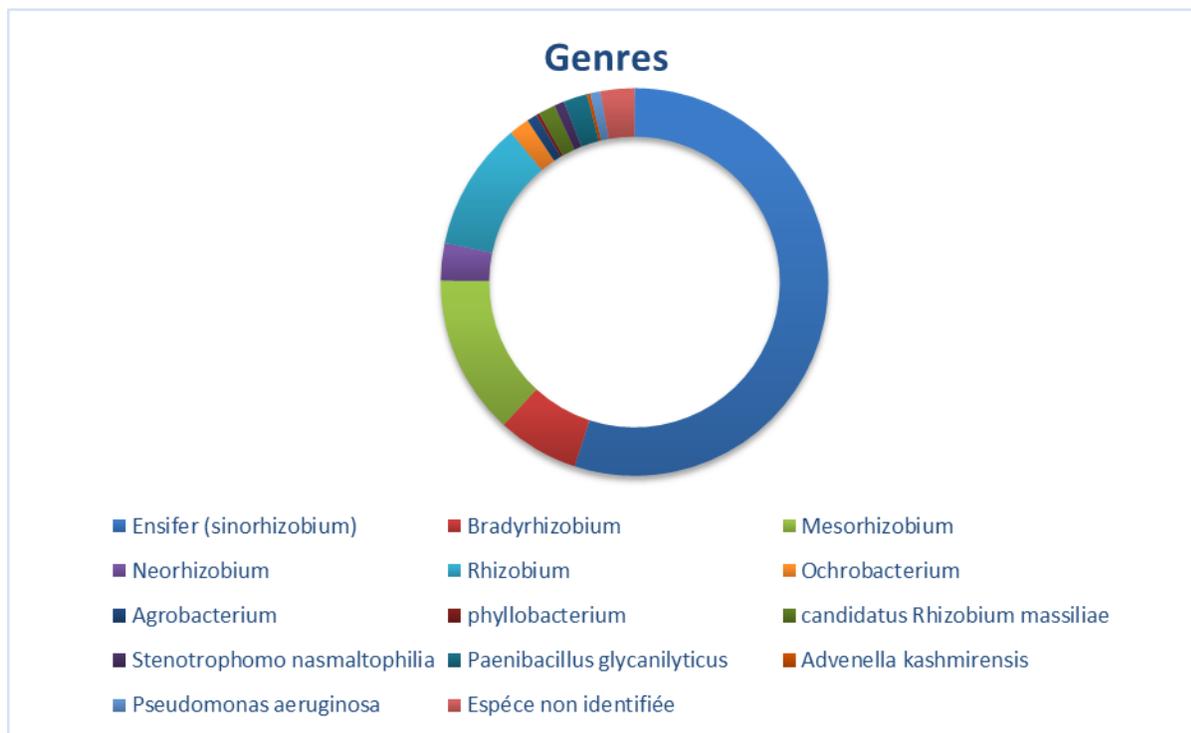
Aussi, les études d'Amrani *et al.* (2010) résultent que 13 souches sur 27 (48%) étaient liées à *Sinorhizobium meliloti*, et démontrant une présence significative de cette espèce parmi les souches étudiées.

Noureddine *et al.* (2012) montrent que 36 des 51 souches de *rhizobia* (70.6%) associées à *l'Acacia tortilis* appartenaient au 5 genres *Ensifer*.

Ainsi, Mrabet *et al.* (2006) rapportent que 13 isolats de 27 isolats de *rhizobia* étudiés sont étroitement liés à *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium medicae* (48%).

Des résultats similaires sont rapportés par l'étude de Baba Arbi *et al.* (2015) dont toutes les souches isolées appartiennent au groupe *Ensifer*, avec une similarité de 100 %.

En revanche, l'étude de Djouadi *et al.* (2017) montre que le genre *Ensifer* représente une petite fraction (5.3%) des souches étudiées, mais il inclut des espèces importantes telles que *E. fredii* et *E. numidicus*. Et de même, 2 isolates seulement liées à *Ensifer terangae* et *Ensifer sp* parmi 28 isolats étudiés selon les résultats de Boukhatem *et al.* (2016).



**Figure 7.** Pourcentage de genre *Ensifer (Sinorhizobium)* dans les souches des *rhizobia* analysées.

De façon générale, les résultats des analyses des séquences d'ADNr 16S, illustré dans la figure 7, représente qu'une large proportion des souches isolées à partir des différentes des

légumineuses des régions étudiées appartenant au genre *Ensifer* (*Sinorhizobium*), estimée par 60% des souches alors que les 40% restant représentent les autres genres principalement *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*.

D'après les travaux étudiés, 9 espèces du genre *Sinorhizobium* sont fréquemment isolées qui sont en premier position *Ensifer meliloti* qui a été identifié dans la majorité des études, suivi par les autres espèces *E. fredii*, *E. saheli*, *E. terangae*, *E. medicae*, *E. numidicus*, *E. garamanticus*, *S. kummerowiae*, *Ensifer sp.*

# **Conclusion**

---

## Conclusion

Dans cette étude nous avons essayées d'identifier les différentes souches de *Sinorhizobium* présentes dans les sols arides et semi-arides en Algérie et comprendre l'influence des écosystèmes des zones arides sur la diversité des espèces du genre étudié. Évaluer de la symbiose entre ces souches et les légumineuses locales à travers un inventaire et une analyse des articles scientifiques réalisés sur le sujet.

Les caractérisations sont basées sur les critères morphologiques, ainsi la réalisation d'analyse des séquences de l'ADN ribosomal 16S, une méthode couramment utilisée pour déterminer la position taxonomique des *rhizobia*. La morphologie des isolats dans le milieu de culture YMA montre qu'ils se développent rapidement et présentent une texture visqueuse. La croissance sur YMA+ rouge Congo montre une différence dans l'absorption du rouge Congo.

Les cellules bactériennes des isolats présentent une forme coccobacille Gram négatif lors de l'analyse microscopique.

Dans les études analysées, vu que les souches ont été isolées à partir de six espèces de légumineuses différentes (*Genista Saharae*, *Hippocrepis*, *Lotus*, *Medicago*, *Acacia*, *Vicia*).

Concernant les génotypes, 60% des isolats sont divers et affiliés à *Ensifer* (*sinorhizobium*). Ce résultat peut indiquer que les *Ensifer* soit une composante importante des symbiotes des légumineuses.

Les souches d'*Ensifer* isolées à partir des régions arides et semi-arides montrent une tolérance des concentrations de NaCl et pH élevés et développent une tolérance jusqu'à 50 °C avec plus de 90% d'efficacité de fixation d'azote.

L'identification de *Sinorhizobium* dans les écosystèmes arides peut être exploitée pour améliorer la productivité des légumineuses dans ces régions, ce qui est essentiel au développement de pratiques agricoles durables.

À terme de cette étude, on peut dire que ces études apportent des solutions pour restaurer les sols dégradés et renforcer la résilience au changement climatique.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Abdel-Ghafar A S. (1989).** Aspect of Microbial Activities and Dinitrogen Fixation in Egyptian Desert Soils. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 3 (2): 281-294.
- Allen O. N., Allen E.K. (1950).** Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia, RESEARCH ARTICLE , (12) 335-347.
- Amrani S., Noureddine N. E., Bhatnagar T., Argandona M., Nieto J. J., & Vargas, C. (2010).** Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 33 (1), 44-51.
- Andrews, Mitchell, Morag E., Andrews (2017).** Specificity in legume-rhizobia symbiosis. *International journal of molecular sciences*, :39.
- Aouaouch M., Sahnoun S., Douma,dji, . (2010).** A check-list of Ensifera from Algeria (Insecta: Orthoptera). *Zootaxa* , 1–44.
- Arley, R. C. (2011).** Mercado de datos: conceptos y metodologías de desarrollo. *Tecnología en marcha*, 24 (3), 55-66.
- Azib S. (2019).** Improvement of alfalfa growth under water stress by inoculation with sinorhizonium melilotistrains from the algerian sahara. *International Journal of Sciences and Research* , 36-43.
- Azib S, Attab S, Bouras N, DHoltz M. (2021).** Phenotypic and Genotypic Diversity of Microsymbionts Nodulating *Medicago sativa* (L.) in the Algerian Sahara. *Jordan Journal of Biological Sciences* , 227 – 238.
- Baba Arbi S, Chekireb D, QuatriniP, Catania V, Cheriet D, Ouarts A.(2015).** Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis* Rhode andgrowing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara. *Symbiosis* (66), 75–87.
- Badouin H., Gouzy J., Grassa C. (2017).** The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature* 546, 148–152.
- Baudoin J. P. (2001).** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *BASE*.

- Bensaïd A. (2006).** Sig et télédétection pour L'étude de L'ensablement dans une zone aride : Le cas de la wilaya de Naâma (ALGÉRIE). Géographie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 879-888.
- Benselama A, Tellah S, Ourem F, Ounane S. (2017).** Characterization of rhizobia from root nodule and rhizosphere of *Vicia faba* in Algeria. *Legume Research* , (4) 624-628.
- Boukhatem Z, O. D. (2012).** Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. *RESEARCH ARTICLE* , (12) 335-347.
- Boukhatem Z, Merabet C, Bekki A, Sekkour S, Domergue O. (2016).** Nodular bacterial endophyte diversity associated with native *Acacia* spp. in desert region of Algeria. *African Journal of Microbiology Research* , 634-645.
- Bogusz D, F. C. (1985).** La Fixation Biologique de L'azote. L'Orstom et Les Recherches Fondamentales Microbiologie. *Dakar L'OSTRON, N°23059* .
- Chabbi R. (2008).** *Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre Trigonella L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystème de l'est algérien. Biotechnologie végétale.* Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister (École Doctorale), Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie.
- Chen W, Sun L, Lu J, Bi L, Wang E, Wei G. (2013).** Diverse nodule bacteria were associated with *Astragalus* species in arid region of northwestern China. *J Basic Microbiol*, 55, 121–128.
- Cheriet D., Ouarts A., Chekireb D., Baba Arbi S.(2015).** Phenotypic and symbiotic characterisation of rhizobia isolated from *Medicago ciliaris* L. from Algeria. *Biology and Environment : Proceedings of the Royal Irish Academy*, 115 (1), 29-43.
- Chaïch K, Bekki A, Bouras N, Mi D. Holtz, Soussou S, Mauré L, Brunel B, P de Lajudie, Jean-Claude Cleyet-Marel. (2016).** Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis* , (08)112-120.
- Dekak A.2018.** Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotypiques et électrophorétiques isolés à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des Ginesteae (Fabaceae). THESE de DOCTORAT EN SCIENCE, Université des Frères MENTOURI Constantine 1, 44-46.

- Djouadi S, Amrani S, Bouherama A, Nazhat-Ezzaman N, F Aïd. (2017).** Nature des rhizobia associés à 15 espèces du genre *Lotus* en Algérie. *NRC Research press* , 879-888.
- Djouadi S, Bouherama A, Aïd F, Amrani S. (2021).** Diversité des rhizobia associés au genre *Hippocrepis* en Algérie. *Canadian Science Publishing* , 639 - 650.
- Franche C, Lindström K. and Elmerich C. (2009).** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321 (1), 35–59.
- Gough, C. (2009).** *Medicago truncatula*, un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires  
Clare Cough. *Biofutur*, 294, 30-33.
- K Chaïch, A Bekki, N Bouras, M D. Holtz, S Soussou, L Mauré, B Brunel, P de Lajudie, Jean-Claude Cleyet-Marel. (2016).** Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis* , (08)112-120.
- Lin, D. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T. X., He, Y. R., Guan, S. H., & Chen, W. X. (2008).** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (6), 1409-1413.
- Merabet C, Bekki A, Benrabah N, Baba-Hamed Bey M, Bouchentouf L, Ameziane H, Rezki M. A, Domergue O, Cleyet-Marel J. C, Avarre J. C, Béna G, Bailly X. and de Lajudie P. (2006).** Distribution of *Medicago* Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria, Arid Land. *Research and Management*, 20 (3), 219-231.
- Michiels, J., Verreth, C., & Vanderleyden, J. (1994).** Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. *Applied and environmental microbiology*, 60 (4), 1206-1212.
- Mouafek A. (2010).** .La symbiose à rhizobia chez la fève (*Vicia faba* L.) et La luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Biskra. *Mémoire de magister ,Sciences Agronomiques ,Université de Mohamed khider Biskra* , p 6 et 37.
- Moulin, L. (2002).** Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène nod A à l'identification de rhizobia au sein des bêta-protéobactéries. *Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I p* , 289.
- Murray N. (2004).** *Biologie végétale, 6<sup>e</sup> édition*, p520.

**Murugesan S, Manoharan C, Vijayakumar R, Panneerselvam A. (2010).** Isolation and Characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the Root Nodules of Some Leguminous Plants. *Int J Microbiol Res*, 1 (3), 92-96.

**Mustapha M. I ., Hanane L ., Omar B ., Mouad L ., Soufiane A ., Youssef J ., Meryeme B ., Eulogio J.B. (2020).** Characterization of *Pisum sativum* and *Vicia faba* microsymbionts in Morocco and definition of symbiovar *viciae* in *Rhizobium acidisoli*. *Systematic and Applied Microbiology*, 43 (3), 126084.

**Noureddine N, S. A. (2010).** Statut symbiotique et souches de rhizobia associées à l'Acacia tortilis subsp. raddiana [Acacia raddiana s. s.], mimosoïdée des régions désertiques de l'Algérie. Presses scientifiques du CNRC , (13) 40-53.

**Noureddine, N. E., Bendifallah N., Tarek H., Ouled Amrane S., Sahki R., Amrani S.. (2021).** Prévalence de la symbiose chez *Acacia raddiana* (*A. tortilis* subsp. *raddiana*) et spectre d'hôte des souches de Rhizobia associées. Institut National de Recherche Forestière , (11) 42-53.

**Prin Y, Galiana A, Ducouso M, Dupuy N, De Lajudie P, Neyra M. (1993).** Les rhizobiums d'Acaciabiodiversité et taxonomie. Bois et Forêts des Tropiques. 05-16 (238).

**Perry J. J., Staley J. T., lory S.2004.** Microbiologie: cours et questions de revision. Edition Dunod, France, P.891.

**Revellin, Cécile. (2012).** Les symbioses fixatrices d'azote. UMR Agroécologie, p, 5

**Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (1996).** *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46 (4), 972-980.

**Rose M.R. et Mueller L.D. (2006).** Evolution and ecology of the organism. Ed. Pearson. P 693.

**Saadallah, K., Abdelly, C., & Drevon, J. J. (2003).** Fixation biologique de l'azote en conditions de salinité et de déficience en phosphore chez deux variétés de haricot: Coco blanc sensible et BAT 477 tolérante. *COLLOQUES-INRA* , 203-216.

**Sadowsky M J, Keyser H H, Ben Bohlool B. (1983).** Biochemical Characterization of fastand. *Int J Syst Bacteriol* , 716-722.

**Sebbane N. A. B. (2004).** Caractérisation phénotypique des souches de rhizobies isolées de quatre espèces de Medicago dans la vallée de la Soummam (ALGERIE). *Sciences & Technologie*, 5-10.

**Serraj R, Adu-Gyamfi J, Rupela O P, Drevon J J. (2004).** Symbiotic Nitrogen Fixation: Prospects for Enhanced Application in Tropical Agriculture. In: Serraj R (ed) International. *Oxford and IBH Publishing*, pp 67–97.

**Sobti S., Belhadj H. A., & Djaghoubi A. (2015).** Isolation and Characterization of the Native Rhizobia Under Hyper-Salt Edaphic Conditions in Ouargla (southeast Algeria). *Energy Procedia*, 74 (1), 1434-1439.

**Somasegaran, P., et Hoben, H. J. (1985).** *Methods in legume-Rhizobium technology*. Paia, Maui: University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources.

**Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994).** Quantifying the growth of rhizobia. *In Handbook for rhizobia*, pp. 47-57.

**Sy A., Giraud É., Samba R., De Lajudie P., Gillis M., & Dreyfus B. (2001).** Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47 (6), 503-508.

**Thami-Alami I, Elboutahiri N, Udupa SM. (2010).** Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. *he contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Zaragoza, CIHEAM/CIBIO/FAO/SEEP*, 92, 265-269.

**Vincent, J. M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*.

**Willems, A. (2006).** The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and soil*, 287(1), 3-14.

**Zahran, H. H. (1999).** Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63 (4), 968-989.

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

**Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel J C, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. (2004).**Characterisation of Wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the Infra-arid Zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* , 27, 380–395.

**Zribi, K., Jeidi, N., Mhamdi, R., Huguet, T., & Aouani, M. E. (2014).** Diversité génétique et polymorphisme symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* nodulant *Medicago truncatula* en sols tunisiens des régions arides. *Options Méditerr Sér A Mediterr Semin*, 62, 149-152.

**Zurdo-Pineiro, J. L., Rivas, R., Trujillo, M. E., Vizcaino. (2007).** *Orchobacterium cytisisp.nov.* Isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain, 57(4), 784-788.

# **Annexe**

## Annexe

### Les articles analysés:

**Amrani, S., Nouredine, N. E., Bhatnagar, T., Argandona, M., Nieto, J. J., & Vargas, C.(2010).**Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 33 (1), 44-51.

**Azib S. (2019).**Improvement of alfalfa growth under water stress by inoculation with sinorhizonium melilotistrains from the algerian sahara. *International Journal of Sciences and Research* , 36-43.

**Azib S, Attab S, Bouras N, DHoltz M. (2021).** Phenotypic and Genotypic Diversity of Microsymbionts Nodulating *Medicago sativa* (L.) in the Algerian Sahara. *Jordan Journal of Biological Sciences* , 227 – 238.

**BabaArbi S, Chekireb D, QuatriniP,Catania V, Cheriet D, Ouarts A.(2015).** Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis* Rhode andgrowing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara. *Symbiosis* (66), 75–87.

**Benselama A, Tellah S, Ourem F, Ounane S. (2017).** Characterization of rhizobia from root nodule and rhizosphere of *Vicia faba* in Algeria. *Legume Research* , (4) 624-628.

**Boukhatem Z, Merabet C, Bekki A, Sekkour S, Domergue O. (2016).** Nodular bacterial endophyte diversity associated with native *Acacia* spp. in desert region of Algeria. *African Journal of Microbiology Research* , 634-645.

**Boukhatem Z, O. D. (2012).** Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. *RESEARCH ARTICLE* , (12) 335-347.

**Chaïch K, Bekki A, Bouras N, MI D. Holtz, Soussou S, Mauré L, Brunel B, P de Lajudie, Jean-Claude Cleyet-Marel. (2016).** Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis* , (08)112-120.

**Cheriet D., Ouarts A., Chekireb D., Baba Arbi S.(2015).** Phenotypic and symbiotic characterisation of rhizobia isolated from *Medicago ciliaris* L. from Algeria. *Biology and Environment : Proceedings of the Royal Irish Academy*, 115 (1), 29-43.

**Merabet C, Bekki A, Benrabah N, Baba-Hamed Bey M, Bouchentouf L, Ameziane H, Rezki M. A, Domergue O, Cleyet-Marel J. C, Avarre J. C, Béna G, Bailly X. and de Lajudie P. (2006).** Distribution of *Medicago* Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria, Arid Land. *Research and Management*, 20 (3), 219-231.

**Noureddine, N. E., Bendifallah N., Tarek H., Ouled Amrane S., Sahki R., Amrani S.. (2021).** Prévalence de la symbiose chez *Acacia raddiana* (*A. tortilis* subsp. *raddiana*) et spectre d'hôte des souches de Rhizobia associées. *Institut National de Recherche Forestière*, 42-53.

**Sebbane N. A. B. (2004).** Caractérisation phénotypique des souches de rhizobia isolées de quatre espèces de *Medicago* dans la vallée de la Soummam (ALGERIE). *Sciences & Technologie*, 5-10.

**Noureddine N, S. A. (2010).** Statut symbiotique et souches de rhizobia associées à l'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* [*Acacia raddiana* s. s.], mimosa indigène des régions désertiques de l'Algérie. *Presses scientifiques du CNRC*, (13) 40-53.

**Djouadi S, Bouherama A, Aïd F, Amrani S. (2021).** Diversité des rhizobia associés au genre *Hippocrepis* en Algérie. *Canadian Science Publishing*, 639 - 650.

**Djouadi S, Amrani S, Bouherama A, Nazhat-Ezzaman N, F Aïd. (2017).** Nature des rhizobia associés à 15 espèces du genre *Lotus* en Algérie. *NRC Research press*, 879-888.

**Sobti S, Ai Belhadj H, Djaghoubi A. (2015).** Isolation and Characterization of The Native Rhizobia Under Hyper-Salt Edaphic Conditions in Ouargla (southeast Algeria). *International Conference on Technologies and Materials for Renewable Energy, Environment and Sustainability, TMREES15*, 1434 – 1439.

# Résumés

## ملخص

أجري هذا البحث لدراسة بكتيريا من جنس *Sinorhizobium* المعزولة من البقوليات في المناطق القاحلة وشبه القاحلة في الجزائر من خلال جرد و تحليل المقالات العلمية المنجزة في الموضوع. وركزت الدراسة على الخصائص المورفولوجية لهذه السلالات، فضلاً عن تحديد درجة تحملها للملوحة و الحرارة المرتفعة ومستويات الأسيدي الهيدروجيني الحمضي والقلوي بالإضافة التي التعريف الجيني من خلال دراسة شفرة 16S ADNr. و أظهرت نتائج الدراسات أن هذه السلالات هي سلالات ريزوبية سريعة النمو، وقادرة على البقاء على قيد الحياة في درجات حرارة تصل إلى 45 درجة مئوية، وتركيزات عالية من كلوريد الصوديوم ومستويات حموضة عالية. كما كشفت هذه الدراسات عن تنوع فسيولوجي كبير بين العزلات المختبرة. وأظهر التحليل الوراثي للسلالات 16SrRNA للمختارة، استناداً إلى التسلسل الجيني، أن غالبية السلالات تنتمي إلى *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*

**الكلمات المفتاحية:** التكافل، *Rhizobia*، *Sinorhizobium*، النمط الظاهري، النمط الجيني

## Résumé

Cette recherche a été menée pour étudier les bactéries du genre *Sinorhizobium* isolées des légumineuses des régions arides et semi-arides d'Algérie à travers un inventaire et une analyse des articles scientifiques réalisés sur le sujet. L'étude s'est concentrée sur les caractéristiques morphologiques de ces souches, ainsi que sur la détermination de leur degré de tolérance à la salinité, aux températures élevées, aux niveaux de pH acides et alcalins, en plus de la définition génétique à travers l'étude du code ADNr 16S. Les résultats des études ont montré que ces souches sont des souches rhizobiennes à croissance rapide, capables de survivre à des températures allant jusqu'à 45 degrés Celsius, à des concentrations élevées de chlorure de sodium et à des niveaux d'acidité élevés. Ces études ont également révélé une grande diversité physiologique parmi les isolats testés. L'analyse génétique de l'ARNr 16S des souches sélectionnées, basée sur les séquences génétiques, a montré que la majorité des souches appartiennent à *Ensifer (sinorhizobium) meliloti*.

**Mots clés :** Symbiose, *Rhizobia*, *Sinorhizobium*, phénotype, génotype

## Summary

This research was conducted to study bacteria of the genus *Sinorhizobium* isolated from legumes in arid and semi-arid regions in Algeria through an inventory and analysis of scientific articles completed on the subject. The study focused on the morphological characteristics of these strains, as well as determining their degree of tolerance to salinity, high temperature, acidic and alkaline pH levels, in addition to the genetic definition through studying the 16S ADNr code. The results of studies showed that these strains are fast-growing rhizobial strains, able to survive at temperatures up to 45 degrees Celsius, high concentrations of sodium chloride and high levels of acidity. These studies also revealed great physiological diversity among the tested isolates. 16S rRNA genetic analysis of the selected strains, based on genetic sequences, showed that the majority of strains belong to *Ensifer (sinorhizobium) meliloti*.

**Key words:** Symbiosis, *Rhizobia*, *Sinorhizobium*, Phenotype, Genotype