



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 ..... /20

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité: Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :  
**MIMI Itidal /MEZROUA Amira**

Le: Mardi 25 juin 2024

## *L'effet symbiotique de bactéries Rhizobia sur les plantes légumineuses de la tribu Genisteae*

---

### Jury:

Titre	BOUKHAROUBA Khadidja	Pr	<b>Université de Biskra</b>	Président
Titre	DJOUAMA Manel	MAA	<b>Université de Biskra</b>	Rapporteur
Titre	HABEL Hakim	MCA	<b>Université de Biskra</b>	Examineur

Année universitaire : 2023/2024

## Remerciements

*Tout d'abord, nous tenons à remercier DIEU, notre créateur pour nous avoir donné de la force, le courage, la persistance et les moyens à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nos avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Je tiens à remercier M<sup>me</sup> Djouama Manel, maitre assistante classe A à l'université de Biskra, pour avoir accepté d'encadrer et de diriger ce mémoire, pour son aide et sa disponibilité.*

*Je remercie vivement, Monsieur CHKARA BOUZIANI Mohamed, chef de Département des Sciences biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mohamed Khider Biskra, pour ses encouragements et ses conseils très précieux qui ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail.*

*Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce mémoire.*

*Je tiens à remercier particulièrement M<sup>me</sup> SALEMKOUR Nora, pour son aide, ses orientations, et ses conseils.*

*Nous voulons exprimer par ces quelques lignes notre gratitude envers tous ceux qui, par leur présence, leur soutien, leur disponibilité et leurs conseils, de près ou de loin, nous ont donné le courage de réaliser ce mémoire.*

## *Dédicace*

*Louange à Dieu tout puissant, pour sa miséricorde. C'est lui qui nous a créé, c'est lui qui nous a donné les avoir, c'est grâce lui quel fruit de mon travail est entre vos mains et je le dédie à :*

*Celle qui m'a comblé de son amour, de sa tendresse et de son affection, à la source de vie et de bonheur, à celle dont les prières sont le secret de ma réussite, ma chère mère MIMI Bariza, que Dieu bénisse son âge et lui accorde une santé éclatante.*

*À celui que Dieu a couronné de dignité et de respect, à celui qui m'a appris à donner sans rien attendre en retour, à celui qui m'a soutenu dans cette vie et a inculqué en moi l'amour du travail pour réussir, mon cher père KOUIDER, que Dieu prolonges a vie.*

*Aux cœurs purs, à mes compagnons de route, à ceux avec qui j'ai grandi et partagé les joies et les peines de la vie:*

*Mes chers frères: Amir, Abdelrazak, Mohamed, Azzedine.*

*Mes chères sœurs :Mounira, Samiha, Nadhira, Ratiba, Hamida.*

*A Bennamia Hamza Pour tout l'encouragement, le respect et soutien que tu m'as offert.*

*À toutes mes amies qui m'a aide : Selma, Khawla, Nadia*

*et surtout m'a binôme Amira*

*Et aux collègues que j'ai aimés et côtoyés durant toutes mes années d'études.*

*Veillez m'excuser si j'ai oublié d'autres personnes. Merci à toutes les personnes qui ont contribué de loin comme de près à ce travail de fin d'étude.*

## *Dédicace*

*Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU*

*De m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.*

*Je tiens à dédier cet humble travail à:*

*À ma chère mère DJAHRA Saida*

*Merci pour ton amour inconditionnel, ta patience infinie et ton soutien indéfectible. Tu as toujours été mon pilier, mon guide et mon inspiration. Ce succès est autant le tien que le mien. Je te dédie cette réussite avec tout mon amour et ma gratitude.*

*À mon cher père SALEH*

*Merci pour ta sagesse, tes encouragements constants et ta foi en moi. Tu m'as appris la valeur du travail acharné et de la persévérance. Sans ton soutien, je n'aurais jamais pu atteindre ce but. Cette réussite est un hommage à tout ce que tu as fait pour moi.*

*Qu'Allah vous accorde longue vie, santé et bonheur*

*À mes chers frères*

*Fares, Taki Eldine, Bouthaina, Sabrine, Mouna,  
et Omar que Dieu ait son âme*

*Merci pour votre soutien, votre amour et vos encouragements. Je vous dédie cette réussite avec beaucoup d'affection.*

*À mes chères et proches amies*

*Nadia, Manar, Wissale, Selma, Keltoum, Halima*

*À mon très cher binôme: Itidal*

*Je tiens remercier particulièrement Ben Attia Djihad*

*Pour leurs aides précieuses, leurs conseils avisés et leurs réconforts constants.*

***Amira***

Table des matières

Liste des tableaux .....	1
Liste des Figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction générale .....	1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Partie 1

Le partenaire plante :

« Légumineuse »

1. Généralité sur légumineuse .....	6
2. Classification et taxonomie de la légumineuse .....	6
3. Intérêts scientifiques des légumineuses .....	8
4. Le genre <i>Genista</i> .....	8
4.1. Généralité .....	8
4.2. Distribution .....	9
4.3.1. <i>Genista Sahara</i> Coss. & Dur. ....	9
4.3.2. <i>Genista microcephala</i> Coss. & Dur. ....	9
5. Le genre <i>Retama</i> .....	11
5.1. <i>Retama monosperma</i> .....	11
5.2. <i>Retama raetam</i> .....	11
5.3. <i>Retama sphaerocarpa</i> .....	11

Partie 2

Le partenaire bactérien « Rhizobium »

1. Caractères généraux des rhizobiums .....	15
1.1. Caractères symbiotiques .....	15
1.2. Caractères culturaux .....	15
1.3. Caractères biochimiques .....	15

---

2.1. Cycled'azote .....	16
2.2. La fixation biologique d'azote.....	17
<b>3. Mécanisme de nodulation.....</b>	<b>19</b>
3.1. Lapré-infection.....	20
3.2. Phase d'infection et de formation des nodules .....	20
3.3. Maturitédunodule .....	21
3.4. Phase de dégénérescence.....	21

**Chapitre 02**

**Matériel et méthodes**

<b>1. Description de larégion d'étude Bouchagroune.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Matériels biologique .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Test de nodulation .....</b>	<b>24</b>
3.1. Préparation du sable de culture.....	24
3.2. Préparation des jarres –Léonard .....	24
3.3. Sélection des graines.....	26
3.4. Stérilisation des graines .....	28
3.5. Germination desgraines.....	28
3.6. Inoculation des jarres .....	29
<b>Analyse des articles scientifiques .....</b>	<b>30</b>

**Chapitre 03**

**Résultats et discussion**

<b>1. Résultats et discussion des travaux scientifiques.....</b>	<b>45</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>55</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>68</b>

**Annexes**

**Résumé**

Liste des tableaux

**Tableau 1.**Classification de la famille *Fabaceae*.....6

Liste des Figure

**Figure 1 . -A-G.saharae, -B-G.microcephala** ..... 10

**Figure 2. -A-R.raetam -B- R.sphaerocarpa**..... 13

**Figure 3. Cycle de l'azote** ..... 17

**Figure 4. Mécanismes de nodulation chez les rhizobia.** ..... 19

**Figure 5. Localisation géographique du site d'échantillonnage.**..... 23

**Figure 6. -A- Jarres utilisé dans notre étude** ..... 25

**Figure 7. Les graines de Vigna unguiculata**..... 28

**Figure 8. Germination des graines sur Coton humide** ..... 29

**Liste des abréviations**

<b>ADP:</b>	Adénosine diphosphate
<b>ATP :</b>	Adénosine triphosphate
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b>	Chlorure de calcium
<b>CH<sub>2</sub>O:</b>	Formaldéhyde
<b>Coss et Dur:</b>	Cosson et Durieux
<b>GN:</b>	Gélose nutritive
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:</b>	Sulfate d'hydrogène
<b>LNB:</b>	Bactéries Nodulant les Légumineuses
<b>MLSA:</b>	Analyse de séquence multilocus
<b>NaCl:</b>	Chlorure de sodium
<b>NaClO:</b>	Hypochlorite de sodium (eau de javel)
<b>Nod:</b>	Nodulation de plante
<b>Ph:</b>	Potentiel d'hydrogéné
<b>Pi:</b>	Phosphate inorganique
<b>TYA:</b>	Trypton-Yeast-Agar
<b>V/V:</b>	Volume/volume
<b>YMA:</b>	Yeast-Mannitol-Agar

# **Introduction**

---

## Introduction générale

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des *Fabaceae*, qui est la troisième plus grande famille de plantes en termes de nombre d'espèces, après les *Asteraceae* et les *Orchidaceae*. Elle se distinguent par leurs fleurs papilionacées, leurs gousses contenant des graines (Schneider et al., 2015). Toutefois, la préférence de nombreuses plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est liée à leur métabolisme azoté, ce qui constitue une adaptation aux variations climatiques imprévisibles de leur environnement (ALLAL, 2016). Elles constituent une source importante d'azote symbiotique pour les systèmes de production agricole.

Les *Fabacées* spontanées, en général, suscitent un intérêt particulier dans les écosystèmes sahariens. Cet intérêt est lié à la capacité de ces espèces à fixer biologiquement l'azote atmosphérique, grâce à une symbiose avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium*, (Sellami et Meddour, 2017).

*Rhizobium* est un genre de bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Ces bactéries sont principalement connues pour leur capacité à établir une relation symbiotique avec les plantes légumineuses, permettant la fixation de l'azote atmosphérique. Ce processus est crucial pour l'enrichissement des sols en azote et contribue significativement à la fertilité des terres agricoles sans l'utilisation d'engrais chimiques (Graham et Vance, 2003).

Le bon fonctionnement de la symbiose entre les rhizobiums et les légumineuses requiert une coordination entre deux partenaires : la plante hôte (légumineuse ou macro-symbionte) et la bactérie (rhizobium ou micro-symbionte) (Azib, 2020). Cette relation commence par des mécanismes complexes de reconnaissance mutuelle. Une fois cette reconnaissance effectuée, la bactérie *Rhizobium* induit la formation d'un organe spécialisé chez la plante, le nodule. L'intérieur de ce nodule, la bactérie se différencie en bactéroïde, une forme capable de fixer l'azote atmosphérique. L'établissement et le fonctionnement de cette symbiose sont contrôlés génétiquement par les deux partenaires, la plante et la bactérie (Pelmout, 1993).

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude consiste à évaluer la performance symbiotique des bactéries nodulant la légumineuse *Genista saharea* (BNL) avec certaines plantes légumineuses de la tribu *Genisteae* a pour but de l'utiliser au future pour l'enrichissement du sol en azote et la restauration des sols dégradés.

---

Ce travail est partagé en trois parties:

**Chapitre I : Synthèse bibliographique :** La partie théorique du mémoire met l'accent sur les légumineuses (la tribu *Genisteeae*) et le mécanisme de nodulation avec les bactéries de type *Rhizobia* et comprendre le principe de la fixation biologique de l'azote.

**Chapitre II : Matériel et méthode :** tester la performance symbiotique des isolats bactériens sur ces différentes *Genisteeae*. Une analyse d'un nombre important de recherches scientifiques récentes (15 articles). En basant sur les différentes méthodes utilisées pour confirmer la performance symbiotique des souches isolées de différente légumineuse.

**Chapitre III :** Analyse des résultats finaux avec leur discussion en regard des travaux scientifiques récents.

Enfin, le travail sera achevé par une conclusion générale qui englobe des suggestions et des perspectives.

# **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

# **Partie 1**

**Le partenaire plante :**

**« Légumineuse »**

### 1. Généralité sur légumineuse

Les Fabacées, ou Légumineuses, représentent la troisième plus grande famille avec plus de 730 genres et plus de 19400 espèces (Chamandy, 2021). Cette famille cosmopolite se trouve dans les régions froides, tropicales et tempérées (Gepts et *al.*, 2005). Du point de vue économique et agricole, elle se classe après les Poacées. Très diversifiée, elle comprend des arbres, des arbustes, des plantes herbacées, des plantes vivaces et des annuelles (Chamandy, 2021), souvent dotées de nodosités racinaires (Raven et *al.*, 2000).

### 2. Classification et taxonomie de la légumineuse

La famille des légumineuses est classée en trois sous-familles basées sur leur forme florale: *Papilionoideae* et *Mimosoideae* sont monophylétiques, tandis que *Caesalpinioideae* est *paraphylétique* (Guignard et Dupont, 2005). Ces plantes sont le groupe prédominant participant à la fixation de l'azote en symbiose avec des bactéries (Raven et *al.*, 2000)

**Tableau 1.** Classification de la famille *Fabacée* (Légumineuse) (APG II, 2003).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermatophyta</i>
Sousembanchement	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Eudicotyledonae</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Eurosidae I</i>
Sous-ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae (Leguminosae)</i>

**Partie 1 Le partenaire plante : « Légumineuse »**

---

Sous-famille

*Faboideae*

*Mimosoideae*

*Caesalpinoideae*

---

### 3. Intérêt scientifiques des légumineuses

Les légumineuses alimentaires jouent un rôle crucial dans de nombreux domaines de recherche tels que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie. Les principaux objectifs de recherche concernant les légumineuses à graines visent à sécuriser la nodulation, à optimiser la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote et, à améliorer la remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines (175 millions de tonnes Atmosphériques sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en Agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Sebihi, 2008)). Un avantage majeur des légumineuses est leur faible coût énergétique et leur contribution réduite aux émissions de gaz à effet de serre, ce qui est directement lié à l'absence de fertilisation azotée (Baudoin, 2001). En outre, les légumineuses sont utilisées comme cultures fourragères, engrais verts et elles génèrent une multitude de composés bénéfiques tels que des médicaments, des poisons, des teintures et des parfums (Sebihi, 2008).

### 4. Le genre *Genista*

#### 4.1. Généralité

Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753, il appartient à la famille des légumineuses (*fabales*), sous-famille des *papilionacées* (*fabacées*) et à la tribu des *génistées* (Ibraheim et Khalifa, 2000). Parmi les 700 genres de la famille des *Fabacées*, environ 53 genres et 337 espèces se trouvent en Algérie (Quezel et Santa, 1987). Il existe actuellement 25 espèces et sous-espèces en Algérie, dont 11 sont endémiques (Juddet *al.*, 2002).

La position systématique du Genre *Genista* est la suivante:

**Règne :** *Plantae*

**Embranchement:** *Spermaphytes*

**Sous-embranchement:** *Angiospermae*

**Classe :** *Eudicotyledonae*

**Ordre:** *Fabidées*

**Sous-ordre:** *Fabales*

**Famille :** *Légumineuses (Fabacées)*

**Sous-famille:** *Papilionacées*

## Partie 1 Le partenaire plante : « Légumineuse »

---

**Genre:** *Genista* (APGIII, 2009).

### 4.2 Distribution

Le genre *Genista* est principalement répandu dans le bassin méditerranéen, en Europe et en Afrique du Nord, incluant la Libye, la Tunisie, l'Algérie et le Maroc (Mekkiou, 2005). En Algérie, il se trouve principalement dans les régions est et sud-est ainsi que dans le grand Sahara (Quezelet Santa, 1963).

#### 4.3.1. *Genista Sahara Coss.&Dur.*

*G. saharae* présente un calice composé de 5 segments: les 2 supérieurs peuvent être libres ou soudés, tandis que les 3 inférieurs forment une lèvre à 3 dents profondes. Occasionnellement, le calice peut être campanulé avec 5 dents presque égales. Elle possède 10 étamines monadelphes regroupées en un tube non fendu, comprenant 5 longues et 5 courtes. Le stigmate est oblique. La gousse est déhiscente et peut varier (Quezel et Santa, 1962).

Les graines de *G. saharae* sont de grande taille, sans arille, et présentent des teintes allant du marron au jaune clair. Le poids de 1000 graines de *G. saharae* se situe entre 8 et 9 g (Zammouri et al., 2009).

La floraison de *G. saharae* entre février et mars. Il se trouve sur les terrains sableux, dans les dépressions et les lits d'oued (Chehma, 2006).

Les noms vernaculaires de *G. saharae* sont:

-Merh, -Lmerkh /Ouchfoud (Maroc) (Zammouri et al., 2009).

-Genêt du sahara (Français local) (Zammouri et al., 2009).

-«Tellegit» nom Arabe/Berbère (Mekkiou, 2005).

#### 4.3.2. *Genista microcephala Coss.&Dur.*

Cet arbrisseau de 20 à 50 cm de hauteur est très rameux dès la base, avec des rameaux verts pubescents-soyeux et peu feuillés. Les feuilles unifoliolées, mesurant de 3 à 8 mm de long, sont denses et poilues en dessous. L'inflorescence est une petite grappe terminale de 3 à 8 fleurs jaunes d'environ 1,5 à 1,8 cm de diamètre. Le calice bilabié et les bractées sont pubescents, tandis que l'étendard et la carène sont légèrement pubescents et soyeux. Les étamines glabres sont fusionnées en une gaine fendue à l'arrière. La gousse, brune et villeuse, contient généralement une seule graine lisse et luisante.

## **Partie 1 Le partenaire plante : « Légumineuse »**

---

La floraison de *G.microcephala* entre Avril et juin. Il se trouve sur les Hauts plateaux,  
Endémique Nord Afrique (Lograda, 2018).



-A-



-B

**Figure 1** .-A-*G.saharae*, -B-*G.microcephala*  
(Original)

### 5. Le genre *Retama*

Les Légumineuses du genre *Retama* contiennent trois espèces *R.monosperma*, *R.raetam* et *R.sphaerocarpa* (Ozenda, 1977). Ce sont des plantes pérennes arbustives appartenant à la sous-famille des Papilionidé et à la tribu des *Genisteeae* et sont largement distribués dans le Nord de l'Afrique, dans les îles Canaries, dans le sud de l'Europe et dans l'Est de l'Asie (Zohary, 1959).

#### 5.1. *Retama monosperma*

C'est un arbuste érigé qui peut atteindre une hauteur de trois à quatre mètres. Il présente des tiges ligneuses avec de longs rameaux verts, flexibles et doux, allant du vert argenté au gris argenté, marqués de sillons prononcés. Les feuilles, petites et caduques, sont de forme linéaire à lancéolée et alternes. Leur durée de vie est courte, allant de quelques jours à quelques semaines, ce qui est une adaptation efficace aux conditions de sécheresse estivale.

La floraison débute souvent dès janvier et se prolonge jusqu'en avril (Beniston, 1985). Les petites fleurs papilionacées sont blanchâtres, très parfumées et regroupées en grappes. Ces grappes ressemblent à celles de la *R.raetam* mais sont souvent plus denses. Les fruits sont de petites gousses arrondies mesurant moins de 2cm, avec une extrémité pointue. Elles renferment une graine, parfois deux, de couleur brun rouge foncé (Selami, 2015).

#### 5.2. *Retama raetam*

C'est un halophyte de la famille des Fabacées (Ghani et *al.*, 2019). C'est un arbuste saharien mesurant de 1 à 3,5 m de haut, avec des rameaux veloutés et des fleurs blanches de 8-10 mm (Mahmane, 2010). Les rameaux sont dressés dès la base, verts, fortement sillonnés, effilés, souvent arqués et retombant aux extrémités. Le tronc peut avoir un diamètre jusqu'à 20cm. Les feuilles sont unifoliées avec une foliole très caduque, et les stipules sont généralement rudimentaires. Les grappes sont latérales, solitaires ou géminées, et lâches (Bokhari, 2016). La période de floraison s'étend d'avril à mai (Kassem et *al.*, 2000). Il se trouve en pieds isolés ou colonisant de très grandes surfaces dans les dépressions, les lits d'oued et les zones sableuses (Chehma, 2006)

#### 5.3. *Retama sphaerocarpa*

Arbrisseaux mesurant jusqu'à 2 mètres, avec des rameaux pubescents plus ou moins dressés. Ils se distinguent par de petites fleurs jaunes (5-6 mm) disposées en grappes latérales sur les rameaux matures. Les feuilles sont très petites et les gousses sont globuleuses,

## **Partie 1 Le partenaire plante : « Légumineuse »**

---

de couleur jaune brun et mesurent environ 7-13 × 5-7 m (Kutiel et *al.*, 1980). Il se trouve dans les pâturages rocaillieux et argileux des montagnes, les forêts claires, ainsi qu'au bord des torrents dans les steppes, selon Maire (1952-1987).



-A-



-B-



-C-

**Figure 2.**-A- *R.raetam* -B- *R.sphaerocarpa* (Original) -C- *R.monosperma* (site web)

**Partie 2**

**Le partenaire bactérien**

**« Rhizobium »**

## 1. Caractères généraux des rhizobiums

Les rhizobia sont des bactéries fixatrices d'azote qui forment une symbiose avec les légumineuses en colonisant les nodosités racinaires des plantes hôtes. Contrairement à certaines bactéries du sol qui peuvent être mobiles grâce à la présence de flagelles, les rhizobiums sont généralement non mobiles et ne possèdent pas de flagelles. Leur capacité à coloniser les racines des légumineuses dépend plutôt de la production de polysaccharides spécifiques et d'autres facteurs de surface cellulaire qui leur permettent de s'attacher aux racines et de pénétrer à l'intérieur des cellules végétales (Jones, 2007).

### 1.1. Caractères symbiotiques

Le trait distinctif majeur des rhizobia est leur infectivité, c'est-à-dire leur capacité à établir une relation symbiotique avec une ou plusieurs espèces de plantes légumineuses, se manifestant par la formation de nodules (Prin *et al.*, 1993).

L'efficacité ou l'effectivité des rhizobia se réfère à leur capacité de convertir l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante à l'intérieur des nodules. Cette capacité est identifiable par la couleur rouge ou rose des nodules, due à la présence de l'enzyme (nitrogénase) responsable de la fixation de l'azote (Sadowsky *et al.*, 1983 ; Somasgaran et Hoben 1985 ; Prin *et al.*, 1993).

### 1.2. Caractères cultureux

Sur le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar), les rhizobia forment des colonies circulaires, bombées, de texture aqueuse à translucide, parfois laiteuses ou blanches et opaques, et elles produisent de l'EPS (Somasgaran et Hoben, 1985 ; Sadowsky *et al.*, 1983).

### 1.3. Caractères biochimiques

Les rhizobia sont des bactéries chimioorganotrophes qui utilisent des glucides relativement simples, tels que le glucose, le mannitol, le saccharose et certains composés aminés. Certaines espèces nécessitent des vitamines pour leur croissance. La majorité des souches à croissance lente préfère les pentoses (Somasgaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums ne peuvent pas assimiler l'azote en dehors de la plante et nécessitent une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 2005).

## 2.1. Cycle d'azote

L'azote total se répartit généralement en trois principaux réservoirs : l'atmosphère, le sol (et l'eau associée), et la biomasse. Les échanges complexes entre ces réservoirs sont désignés sous le terme de cycle de l'azote (Hopkins, 2003).

Le cycle de l'azote comprend plusieurs processus clés: l'ammonification, la nitrification, l'assimilation, et la dénitrification. Voici une reformulation de chacun de ces processus :

### Ammonification

Un grand nombre de bactéries et de champignons peuvent transformer l'azote contenu dans la matière organique en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Ce processus, appelé ammonification, se produit aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies (Vale, 2006). L'ammonification est le processus inverse de l'assimilation de l'ammonium, c'est-à-dire la conversion de l'azote organique en ammonium sous l'action de micro-organismes hétérotrophes qui utilisent des substrats carbonés comme source d'énergie (Quéguiner, 2005).

### Nitrification

La nitrification est la conversion des ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) puis en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) par oxydation. Ce processus se déroule en deux étapes:

Des bactéries du genre *Nitrosomonas* oxydent les ions ammonium en nitrites :



Des bactéries du genre *Nitrobacter* oxydent les nitrites en nitrates :



La nitrification est effectuée par des bactéries aérobies dans les premiers centimètres du sol, là où l'oxygène est présent (Legrose, 2007).

### Dénitrification

La dénitrification est le processus par lequel l'azote retourne dans l'atmosphère sous forme de  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  (un gaz à effet de serre) et  $\text{NH}_3$ . Ce processus de réduction des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) est réalisé par des bactéries telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, et *Achromobacter* qui utilisent la

matière organique selon la réaction suivante (Soltner, 2005) :

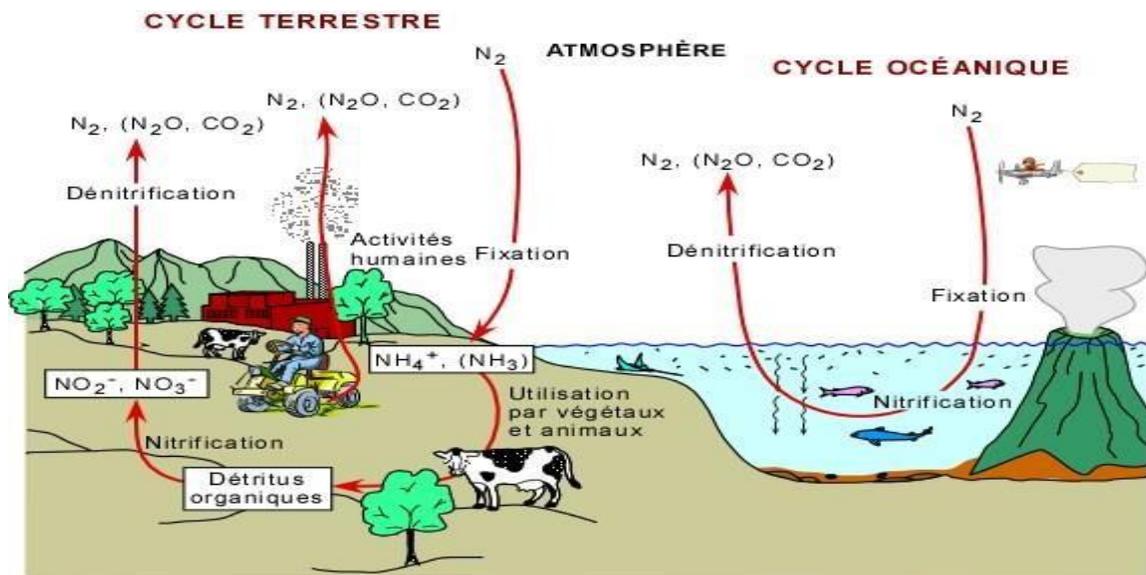
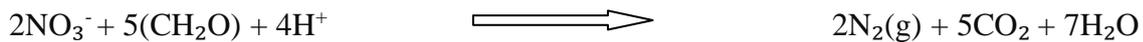


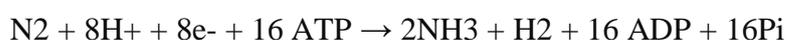
Figure 3. Cycle de l'azote (Site web).

## 2.2. La fixation biologique d'azote

L'azote atmosphérique, qui constitue la majeure partie de l'air (79%), est la principale réserve naturelle d'azote pour la biosphère. Cependant, il se trouve principalement sous forme moléculaire diatomique  $\text{N}_2$ , un gaz peu réactif, inerte et non assimilable par la plupart des organismes vivants, à l'exception de certains procaryotes appelés diazotrophes. Le processus de réduction du  $\text{N}_2$  en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) par le procédé de Haber-Bosch nécessite des températures et des pressions extrêmement élevées, ce qui en fait une méthode coûteuse.

La fixation biologique de l'azote représente actuellement une contribution environ 1,5fois supérieure à celle des engrais au niveau mondial. Elle est estimée à environ 195 millions de tonnes d'azote par an (Smil, 2002) et constitue la principale voie d'entrée de l'azote dans la plupart des écosystèmes (Galloway et *al.*, 2004).

Ce processus biologique est effectué par certains micro-organismes dotés d'un complexe enzymatique appelé nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique  $\text{N}_2$  en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Le bilan de cette réaction de fixation biologique de l'azote est le suivant:



Ce complexe enzymatique permet à ces micro-organismes procaryotes de convertir l'azote moléculaire en une forme assimilable par les plantes (ammoniac) via la "fixation biologique de l'azote", permettant ainsi aux végétaux de répondre à leurs besoins en composés azotés tels que les protéines et les acides nucléiques (Chaïch, 2018)

**-La leghémoglobine:**

Un nodule de légumineuses est un système aérobie qui, lorsqu'il fonctionne efficacement, contient toujours une concentration élevée de leghémoglobine, un pigment ayant une forte affinité pour l'oxygène (APPLERBY, 1974 in BOUABOUB K, 1991).

La leghémoglobine est une hémoprotéine qui n'est présente que dans les nodules des légumineuses et n'a pas été détectée dans d'autres organes végétaux (APPLEBY, 1974 in LABASSIM, 1991). La leghémoglobine, similaire à l'hémoglobine sanguine, donne une coloration rose ou rouge aux nodosités. Produite à partir de la plante hôte, elle demeure dissoute dans le cytoplasme des cellules nodulaires. Alors que dans le sang, l'hémoglobine transporte l'oxygène, son rôle est similaire chez les plantes fixatrices: elle fournit aux bactéries l'oxygène nécessaire à leur survie (Soltner, 2007).

**-La nitrogénase et son fonctionnement:**

La fixation de  $N_2$  est catalysée par un complexe enzymatique nommé nitrogénase, composé de deux éléments principaux :

- La protéine molybd-ferrique ou dinitrogénase; qui est le site actif de la réduction de  $N_2$  et se présente sous forme d'un tétramère avec un poids moléculaire de 245 KD.
- La ferri-protéine ou dinitrogénase-réductase; qui fournit les électrons à la dinitrogénase et est un homodimère pesant 64 KD.

Ces deux protéines sont présentes chez tous les organismes fixateurs de  $N_2$ . Les électrons nécessaires à la réaction proviennent d'un donneur d'électrons puissant. La dinitrogénase-réductase accepte un électron, se lie à deux molécules de Mg-ATP, puis forme un complexe actif avec la dinitrogénase. Lors de ce processus, un électron est transféré de la dinitrogénase-réductase à la dinitrogénase, libérant simultanément deux molécules de Mg-ADP et de phosphate.

Ensuite, les deux composants de la nitrogénase se séparent et la dinitrogénase-réductase est prête à recommencer le transfert d'électron. Une fois que la dinitrogénase a été suffisamment réduite, le  $N_2$  est converti en  $NH_3$ .

La réduction des protons en H<sub>2</sub> se déroule en parallèle avec la réduction de N<sub>2</sub> et nécessite autant de protons que d'électrons impliqués dans la réduction de N<sub>2</sub>.

L'ammoniac formé est ensuite incorporé dans le glutamate et suit diverses voies métaboliques (Dommergues et Duhoux et Diem, 1999).

### 3. Mécanisme de nodulation

L'établissement de la symbiose entre les rhizobia et les plantes légumineuses est un processus complexe. Cette interaction conduit à la formation de nodules ou noduleux spécifiques où les bactéries, sous leur forme différenciée, fixent et réduisent l'azote moléculaire en ammoniac

(Perry et al., 2004). À l'intérieur du nodule, le Rhizobium s'élargit et se transforme pour devenir un bactéroïde (Bouaboub, 1991). Le processus de nodulation implique quatre étapes cruciales pour établir la symbiose entre les rhizobium et les plantes hôtes, nécessitant une communication moléculaire entre les deux partenaires (figure4).

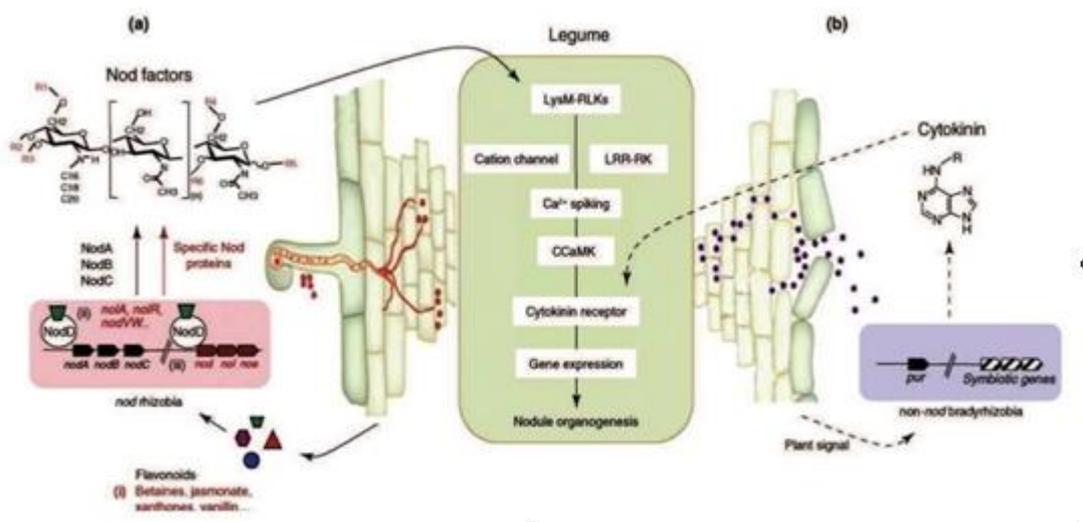


Figure 4. Mécanismes de nodulation chez les rhizobia.

Les rhizobia induisent la formation de nodules sur des légumineuses utilisant un processus NF-dépendant (a), ou un processus NF-indépendant (b) (Masson-Boivin et al. 2009)

### 3.1. La pré-infection

Au stade de la pré-infection, les bactéries sont attirées par des composés flavonoïdes ou isoflavonoïdes émis par les racines, agissant comme des signaux moléculaires. Ces substances sont reconnues par les rhizobiums, qui détectent également d'autres molécules sécrétées par la plante hôte. Cette reconnaissance induit la production des facteurs Nod par les rhizobiums, amorçant ainsi le processus de nodulation chez la plante hôte (Margaret et *al.*, 2001; Subramanian et *al.*, 2007; Cooper, 2007).

Les rhizobiums présents dans la rhizosphère se déplacent vers les racines des plantes hôtes grâce au phénomène de chimiotactisme (Franche et *al.*, 2009).

Le processus d'infection commence par une augmentation de la population bactérienne au niveau de la racine (Mergaert et *al.*, 2001 ; Cooper, 2007).

La reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante impliquent des facteurs de surface tels que la protéine rhicadhésine, les polysaccharides capsulaires (CPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) du côté bactérien, ainsi que des lectines et d'autres adhésines du côté de la plante (Long 1996 ;Cohen et *al.*, 2001).

Par la suite, le poil racinaire subit une torsion caractéristique, enveloppant ainsi les bactéries présentes dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi, et un filament d'infection se forme (Hirsch et *al.*, 2001).

### 3.2. Phase d'infection et de formation des nodules

L'infection se produit lorsque les rhizobiums pénètrent à différents endroits du système racinaire.

Une fois à l'intérieur des poils absorbants, les bactéries sont enveloppées par un filament d'infection. Pendant ce temps, un méristème nodulaire commence à se former dans la racine, facilitant ainsi l'entrée des rhizobiums dans les couches les plus profondes via le filament formé. Le cordon d'infection, en continuant sa progression tout en se ramifiant, libère les bactéries dans les cellules du méristème nodulaire (Franche et *al.*, 2009).

### 3.3. Maturité du nodule

Le dernier stade du processus infectieux survient lors que les bactéries sont relâchées dans la cellule hôte.

Les rhizobiums se détachent du filament d'infection et sont enveloppés par une membrane dérivée de la plante, appelée symbiosome (Franche et *al.*, 2009).

Les bactéries cessent alors de se diviser et se transforment en bactéroïdes, entourés par une membrane appelée membrane pér bactéroïdienne, qui joue un rôle crucial dans la

stabilisation du système hôte/bactéroïde ; si cette membrane est endommagée, les bactéries seront libérées dans le cytoplasme et perçues comme des agents étrangers, conduisant à leur destruction par la cellule hôte (Jordan, 1962; Franche et *al.*, 2009; Masson-Boivin et *al.*, 2009)

### 3.4. Phase de dégénérescence

Dans les nodosités matures, les cellules végétales subissent une dégénérescence. Les membranes des symbiosomes se désintègrent, transformant ainsi les bactéroïdes en bactéries qui sont ensuite libérées dans le sol. La plante absorbe ensuite les produits de cette dégradation (Mergaert et *al.*, 2001).

# **Chapitre 02**

## **Matériel et méthodes**

## 1. Description de la région d'étude Bouchagroune

Le genre *Genista* est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Europe et en Afrique du Nord (Libye, Tunisie, Algérie, Maroc et Égypte). En Algérie, il se trouve principalement dans les régions Est et Sud-Est ainsi que dans le grand Sahara (Mekkiou, 2005).

Les nodules étudiés ont été collectés sur les racines de l'espèce *Genista saharae* Coss et *Dur*, qui pousse dans la région de Bouchagroun, située dans la wilaya de Biskra. La zone d'étude est localisée dans la commune de Bouchagroun (latitude 34°44'0"N et longitude 8°28'0"E), à 20 km du chef-lieu de la wilaya de Biskra (figure:05).



**Figure 5.** Localisation géographique du site d'échantillonnage : la région de Bouchagroun, wilaya de Biskra (C.R.S.T.R.A).

## 2. Matériels biologique

### Collecte des nodules et isolement des souches

Les nodules ont été obtenus à partir de l'espèce *Genista saharae* et *Dur*, qui pousse spontanément dans la région Bouchagroune (Biskra). Cette étape a été réalisée par les étudiants du master des années 2017 et 2018. Les souches nodulant la plante *G. saharea* ont été isolés, purifiés et conservés à -20°C. On a les utilisées directement après une étape de enrichissement pour but d'effectuer un test d'authentification des isolats. Les plantes

*G.microcephala* (Ain Zaatout), la plante original (la plante hôte) *G.saharea* (Bouchagroune), *Retama retam*( Hassi Zrari), *Retama sphaerocarpa* ( chaiba) et *Vigna unguiculata* (nibié) ont été choisie pour montrer la capacité de nodulation et la performance symbiotique des souches isolées de *G.saharea*.

Pour sélectionner les graines avant leur stérilisation, il faut s'assurer qu'elles soient intactes, propres et de taille un informe et soient sèchent.

### 3. Test de nodulation

L'objectif de ce test est d'évaluer la capacité des souches nodulant la plante *Genista saharea* à former des nodules avec la plante testé et fixer l'azote

#### 3.1. Préparation du sable de culture

Une quantité de sable prélevée dans la région autour des plantes de *Genista saharea* (Rhizosphère), est lavée plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau devienne claire, ensuite rincée 2 à 3 fois à l'eau distillée, puis humidifiée avec la solution nutritive de Fährus (Annexe 1) et stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

#### 3.2. Préparation des jarres –Léonard

Des bouteilles d'eau minérale en plastique de 1,5L sont sélectionnées secouée horizontalement en deux parties. Ces récipients sont d'abord lavés avec un détergent courant, puis désinfectés l'eau de Javel pour éliminer tout etrace de bactéries.

Les bouchons percés à l'aide d'une pince et les cordons sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

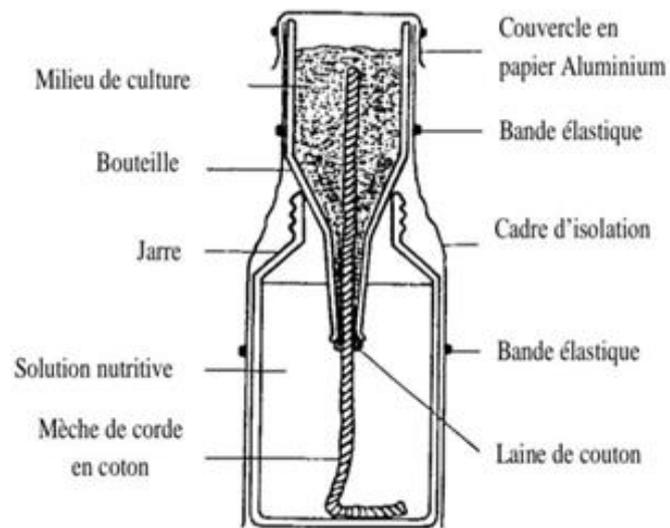
Le tout étant préparé, les jarres sont remplies (figure 06). La partie inférieure contient la solution nutritive de Fährus alors que la partie supérieure est remplie par le sable stérile mélangé avec la tourbe.

Les deux parties de chaque récipient sont ensuite reliées par un cordon de compresse stérile, permettant une alimentation continue de la partie supérieure en solution nutritive par capillarité.

A la fin de la préparation les jarres son recouverts pour éviter toute contamination.



-A-



**Figure 6.** -A- Jarres utilisé dans notre étude (Originale), (Vincent,1970)

### 3.3. Sélection des graines

Avant la stérilisation des graines, il est nécessaire de les sélectionner en veillant à ce qu'elles soient non endommagées, propres et de taille homogène, ainsi que qu'elles soient sèches pour s'assurer d'effectuer l'étape de germination.

En raison de la croissance lente *in vivo* des graines des plantes, le choix se porte sur : *Genista saharae* Coss et Dur, *Genista microcephala* Coss et Dur, *Retama sphaerocarpa* Coss et Dur, et *Retama reatma* Coss et Dur. Jusqu'à la fin de mai 2024, les graines restent vertes sur l'arbuste, ce qui empêche leur germination réussie.

Pour qu'elles atteignent le stade de séchage, il faudra en core du temps, ce qui dépasse la durée de notre étude expérimentale, nous les avons remplacées par les graines de niébé (*Vigna unguiculata*). Ces dernières sont disponibles toute l'année, se caractérisent par une croissance rapide *in vitro* et possèdent la capacité de fixation de l'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec plusieurs type des bactéries nodulantes des légumineuses. Donc elle est connue pour être très promiscuité (Pongslip, 2012).

	Description
Généralité	<p>Le niébé est une légumineuse essentielle dans la plupart des communautés africaines où il est cultivé (Ndiaye, 2007). Le niébé, <i>Vigna unguiculata</i>, ou Tadellagh selon la nomenclature de la région d'Adrar, fait partie des légumineuses souvent cultivées à des fins alimentaires et fourragères. En effet, les grains de cette plante, de petite taille et de forme réniforme caractéristique semblable à celle des haricots, sont récoltés le plus souvent à l'état sec, au stade de maturité totale. La culture de <i>Vigna unguiculata</i> est valorisée pour sa capacité à tolérer la sécheresse et à fixer l'azote atmosphérique grâce aux bactéries <i>rhizobium</i>, ce qui lui permet de bien croître et d'améliorer les sols pauvres (Mahalakshmi et al., 2006).</p> <p>En Algérie, le niébé est traditionnellement cultivé dans la région de Kabylie, la zone d'El Kala et les oasis du Sahara. Cependant, de nos jours, sa culture est réduite à des superficies</p>

	Très restreintes, souvent limitées au jardinage (Ghalmi et al.2010).
<b>Classification botanique</b>	D'après Baudoin (2001), la taxonomie du niébé est la suivante: <b>Embranchement:</b> <i>Angiosperme</i> <b>Classe:</b> <i>Dicotylédone</i> <b>Ordre :</b> <i>Léguminosales</i> ou <i>Fabales</i> <b>Famille :</b> <i>Papilionacea</i> ou ( <i>Fabacea</i> ) <b>Tribu:</b> <i>Phaseoleae</i> <b>Soustribu:</b> <i>Phaseolinae</i> <b>Genre:</b> <i>Vigna</i> <b>Sous genre :</b> <i>Vigna</i> <b>Section:</b> <i>Catiang</i> <b>Espèce:</b> <i>Vigna unguiculata (L.) Welpers</i> <b>Sous-espèce:</b> <i>Unguiculata</i>



**Figure 7.** Les graines de *Vigna unguiculata* (original)

### **3.4. Stérilisation des graines**

La stérilisation se fait dans un bécher stérile, placez les graines dans l'eau de javel pendant 10 min après rincé avec l'eau distillé stérile

### **3.5. Germination des graines**

Les graines ont été placées dans des boîtes de Pétri stériles contenant du coton imbibé d'eau distillée stérile. L'incubation s'est déroulée dans l'obscurité (enveloppées avec du papier aluminium) à 28°C pendant 3 jours, jusqu'à l'apparition des radicelles (Figure08) (Lamrani et *al.*, 2013).



**Figure 8.** Germination des graines sur Coton humide (Originale)

### 3.6. Inoculation des jarres

Les graines sont plantées dans des bouteilles en plastique contenant du sable préalablement déminéralisé et stérilisé la tourbe (2 :1 V/V) (Amrani, 2010) à raison de 3 graines par jarre. La profondeur de semis est égale au double dégraine.

Les bouteilles sont inoculées avec 2 ml à 3 ml de culture bactérienne fraîchement récoltée. Trois bouteilles ne sont pas inoculées et serviront de témoins. Des pépètes stériles sont utilisées pour l'inoculation afin de garantir un maximum d'asepsie.

La partie extérieure des bouteilles est recouverte de plastique noir pour éviter l'exposition des racines et de la solution nutritive à la lumière. Enfin, pendant les premières 24 heures suivant l'inoculation, les bouteilles sont couvertes de papier aluminium et placées dans une chambre de culture.

L'irrigation des bouteilles est effectuée de manière aseptique chaque fois que le niveau de la solution nutritive diminue, afin d'éviter que le sable ne se dessèche (Abdelnaby et *al.*, 2015).

#### Remarque

Nous avons procédé à la plantation, mais... mais nous avons de nouveau rencontré le défi du temps. La durée nécessaire pour que la plante pousse et que les nodosités bactériennes apparaissent au niveau des racines prend de 5 à 6 semaines avant que nous puissions lire les résultats, surtout étant donné que la date limite de soumission des mémoires

Le 20 juin 2024. En tant qu'étudiants, nous envisageons de mettre en œuvre ce qui suit comme solution. Une partie de synthèse des articles est basée principalement sur une analyse d'un nombre important de recherche scientifique récentes (15 articles). En basant sur les différentes méthodes utilisées pour confirmer la performance symbiotique et les résultats finals avec une discussion, et la lecture de nos résultats reste en cours et suit par notre enseignante cadrant.

**Analyse des articles scientifiques**

## 1. Collecte des nodules

Le tableau ci-dessous (tab 3) présente la région, l'année/période de collecte des nodules de chaque recherche :

**Tableau 3.** L'année et la région correspondante à chaque étude

Article	Région et/ou endroit	Années/période de collecte
(Chaich, 2017)	Sahara septentrional la région naturelle "Chebkas" (Ghardaïa, daïra de Metlili) à la région de l'Erg oriental (Ouargla, daïra de Taïbet) 11 sites (01 Sebka, 01 Reg, 04 Erg, 04 lits d'Oueds)	En février 2017
(Ahnia, 2014)	Nord-Est de l'Algérie, région de Bejaia, plus précisément à Oued Dass et Saket Altitude : 100 mètres au - dessus du niveau de la mer.	
(Boukhatem, 2012)	13 sites répartis dans 7 wilayas en Algérie, réparties dans le nord et le centre du Sahara 1- Es-Senia , Messerghine Farm ,Sebka Messerhine, Bomo-plage dunes, Msila forest, (Oran) 2- El Mactaa dunes(Mosta ganem) 3- Khemaïssa (Reliane) 4- Ain Defla 5- Labiod Sidi El Cheikh (El Bayadh) 6-Ain Belbel (Adrar) 7- Oued In Dalagd, Oued Tassena, Oued Tin Amezzegin (Tamanrasset)	
(Boukhatem, 2016)	Tamanrasset (Algérie) Des espèces d' <i>acacias</i> ont été rencontrées dans o sur les côtés des rivières asséchées (oueds).	En novembre
(Merabet, 2010)	Neuf souches isolées du sud de la Tunisie et du Sénégal	En 2009
(Amrani, 2010)	Dans le nord et le sud de l'Algérie	
(Beukes, 2016)	Les légumineuses prélevées sur le terrain, trouvées le long du Grand Escarpement dans la province de Mpumalanga en Afrique du Sud, dans les régions de Badplaas, Barberton et Dullstroom, Les sites d'échantillonnage de Barberton et de Badplaas étaient situés dans le Lowveld où l'altitude varie d'environ 835 à 1104	

	mètres audessus du niveau de la mer (MAS), tandis que le site de Dullstroom était situé sur l'escarpement à une altitude d'environ 2100 MAS.	
(Soufiane, 2021)	Le district minier abandonné de (Pb) et (Zn) de Zaida, situé aux coordonnées 32°53'41.8"N et 5°00'8.010" W. Ce site se trouve à une altitude de 1603 mètres dans la province de Midelt, au sein de la chaîne de montagnes du Moyen Atlas au Maroc. Cette région caractérisée par des sécheresses estivales prolongées et une faible précipitation annuelle, environ 200 mm par an.	
(Boudehouche, 2020)	Région du nord-est de l'Algérie, particulièrement le long de la côte méditerranéenne, incluant des sites où les espèces <i>Genista</i> sont présentes. BEJAIA (Cap-Carbon, Gouraya, Boulimat, Tighrmet) Hote : <i>G.ferox</i> , <i>G.tricuspidata</i> TIZIOUZOU (Semouane, Azzefoune)Hote: <i>G.ferox</i> <i>G.tricuspidata</i> BOUIRA (Yakouren, Tikdjda, Tazmalt) Hote : <i>G. tricuspidata</i> SETIF (Sétif,Djemila) Hote : <i>G. tricuspidata</i> JIJEL (Jijel, Taza, El Laouana, Le Grand Phare) Hote : <i>G.tricuspidata</i> , <i>G. numidica</i>	
(Belhadi, 2017)	La région de Bejaia, située à l'est de l'Algérie Akbou Amizour Aokas Barbacha Béjaïa Chemini El Kseur Feraoun Kherrata Semaoun Tichy	
(Farida, 2009)	L'étude a été menée dans sept zones écologiques et climatiques du nord-est de l'Algérie Sidi Abdelaziz Souk El Tenine Souk El Tenine Hammam El Biban Amizour Seddouk Toudja	
(Bourebaba , 2016)	une large région du bassin méditerranéen occidental, spécifiquement dans le nord de l'Algérie et le sud-ouest de	

	l'Espagne.	
(Ahnia, 2018)	Régions méditerranée, notamment en Espagne, au Maroc et en Algérie du Nord	
(Chahboune ,2011)	Le lieu de l'étude est la région centro-occidentale du Rif marocain, à environ 1600 m d'altitude, près des villages de Fifi (34°57' N, 5°14' W) et Aoudal (35°08' N, 5°20' W). Les plantes étaient situées près des villages de Fifi et Aoudal, avec 20 plantes échantillonnées par emplacement	
(Siallagan, 2020)	La région affectée par l'éruption du Mont Merapi, Indonésie	
(Sakrouhi, 2016)	Le désert de Merzouga au Maroc, avec des références supplémentaires à des analyses phylogénétiques indiquant une présence similaire dans un désert en Inde.	

## 2. Paramètre de sol

D'après Chaich (2017), Le prélèvement de sol ont été effectués au niveau des rhizosphères de fabacées spontanées, à une profondeur de variant de 10 à 20 cm ont été évalués selon plusieurs méthodes

Selon Boukhatem 2012 et 2016, Les échantillons de sol ont été prélevés à trois profondeurs (20, 40 et 60 cm) dans un diamètre maximal de 1 mètre autour des troncs d'arbres.

Les études qui ont mesuré le pH de sol après l'agitation avec l'eau distillé (Chaich, 2017 ; Ahnia, 2014 ; Boukhatem, 2012 et 2016 ; Belhadi, 2017 ; Bourebaba, 2016).

## 3. Isolement des souches

### Chaich, 2017 :

Réhydratation des nodosités dans l'eau distillée stérile (30 min), désinfection en surface avec hypochlorite de calcium (3%, 3 min) Les nodosités broyées etensemencées sur milieu YEM agar modifié, Incubation à 28°C en aérobiose.

Repiquage et purification des colonies isolées (au moins 2 cycles de purification) pour obtenir de cultures pures

### Ahnia, 2014 :

Les nodules collectés ont été désinfectés en surface avec de l'éthanol à 95 % pendant 20 secondes, puis transférés à 4 % de NaClO pendant 2 à 3 minutes et rincés 10 fois avec de l'eau distillée stérile.

Chaque nodule a été écrasé individuellement et étalé sur des boîtes de Pétri contenant de l'agar YEM. Les plaques ont été incubées à 28 °C pendant 4 à 7 jours jusqu'à visualisation des colonies. Les isolats ont été maintenus à 4°C, puis conservés à long terme dans du milieu YME avec 20 % de glycérol à -80°C.

**Boukhatem, 2012 :**

Les nodules lavés à l'éthanol (70% v/v) 30 sec, rincés, réhydratés, stérilisés par immersion dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) pendant 15 s à 2 min selon leur taille.

Les nodules écrasés et homogénéisés, suspension étalée sur des plaques YMA contenant du rouge Congo (0,00125% w/v).

Les colonies pures obtenues ont été cryogénisées à -80 °C dans un milieu YEM ajusté à 30% de glycérol.

**Boukhatem, 2016 :**

Les nodules racinaires ont été lavés à l'éthanol à 70%, rincés puis réhydratés 1h, puis stérilisés en surface avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35%. Après rinçage, les nodules écrasés ont été étalés sur des plaques (YMA). Les colonies isolées ont été vérifiées par microscopie et coloration de Gram pour leur pureté et nature membranaire. La forme et la couleur des colonies ont été déterminées, et les cultures pures ont été conservées cryogéniquement à -80°C dans un milieu YEM avec 30% de glycérol.

**Merabet, 2010 :**

Les souches étudiées sont: *E.numidicu* sp. nov. ORS1444 (=LMG24691=CIP109850<sup>T</sup>)

ORS1410 (=LMG24736=CIP109858)

ORS 1407<sup>T</sup> (=LMG 24690<sup>T</sup>=CIP109850<sup>T</sup>)

*E. garamanticus* sp. nov. ORS1400<sup>T</sup> (=LMG 24692<sup>T</sup>= CIP109916<sup>T</sup>)

ORS 1401 (=LMG24693=CIP109848)

STM354 (=LMG24694=CIP109849)

*E. adhaerens* genomovar A

ORS2154, ORS2133, ORS529

Toutes les souches ont été cultivées sur gélose levure-mannitol (YMA) à 28 °C.

Les isolats ont été conservés à -80°C dans du glycérol à 50% (v/v).

**Amrani, 2010 :**

Un nodule stérilisé a été placé dans une boîte de Pétri et écrasé en présence d'une solution stérile de NaCl (0,85%). Une boucle de la suspension résultante a été ensuite étalée sur la surface d'une boîte de Pétri contenant des plaques (YMA) et incubée à  $28 \pm 1$  °C.

Les isolats bactériens ont été purifiés par des passages répétés d'une seule colonie sur un milieu YMA et ont été vérifiés pour leur pureté par examen microscopique à contraste de phase et coloration de Gram.

Les souches bactériennes isolées ont été stockées à  $4 \pm 1$ °C sur des pentes YMA et à  $-80 \pm 1$  °C dans des aliquotes de culture liquide TY en présence de 25% de glycérol (v/v).

**Boudehouche, 2020 :**

Écrasement et Suspension: Écraser les nodules stérilisés pour libérer les bactéries et Prélevez une quantité de la suspension bactérienne et stocker-la sur une plaque de gélose (YM).

Incubation: Incuber les plaques à 28-30°C jusqu'à l'apparition des colonies bactériennes.

Purification des Souches: Sélectionnez et re-stocké des colonies distinctes sur de nouvelles plaques YM pour obtenir des cultures pures.

Stockage: Cultiver les souches pures dans un bouillon YM et stockez les cultures avec 20% de glycérol à -80°C.

**Belhadi, 2017 :**

Les rhizobia ont été isolés à partir de nodules de *Vicia faba* cultivées dans des pots avec un sol test. Après 8 semaines, les nodules ont été récoltés, les rhizobia isolés en utilisant le milieu YMA avec colorant rouge Congo, purifiés et conservés à 4 °C pour des études ultérieures.

Les souches de rhizobiums sont conservées à long terme comme cultures en bouillon YM ajustées à 25 % de glycérine à -80 °C.

**Farida, 2009 :**

Les rhizobia ont été isolés à partir de ces nodules, puis purifiés en utilisant de l'agar (YMA) selon le protocole standard décrit par Vincent.

Les souches ont ensuite été cultivées sur YMA à 28°C, stockées à 4°C et conservées à long terme dans glycérol à 20% à -80°C.

**Bourebaba, 2016 :**

Les nodules de *Lupinus micranthus* ont été stérilisés avec de l'éthanol à 96 % suivi d'hypochlorite de sodium, puis écrasés pour libérer les bactéries symbiotiques. Les rhizobia ainsi obtenus ont été cultivés sur des plaques d'agar (YMA) à 28 °C selon la méthode standard de Vincent.

**Ahnia, 2018 :**

Les nodules stérilisés ont été utilisés pour isoler les souches bactériennes sur le milieu de culture YMA à une température de 28°C.

**Beukes, 2016 :**

Les rhizobiums ont été isolés dans les 3 à 5 jours suivant le prélèvement de tissus végétaux portant des nodules.

Chaque nodule est stérilisé en surface par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium 3,5 % (p/v) ,12 min.

Les nodules sont ensuite soigneusement rincés avec 5 changements d'eau stérile, puis écrasés à l'aide de pinces stériles sur des plaques (YMA) Les plaques inoculées ont été incubées à 28°C jusqu'à ce que la croissance bactérienne soit observée.

Une fois la croissance observée, les colonies bactériennes sontensemencées sur de nouvelles plaques YMA pour obtenir des colonies pures.

Les cultures préparées à partir des colonies pures sont conservées à -70°C en utilisant du glycérol (20%) comme cryoprotecteur.

Tous les isolats sont également déposés dans la Collection de Cultures de Rhizobium de l'Institut de Recherche pour la Protection des Plantes du Conseil de Recherche Agricole (ARC-PPRI) en Afrique du Sud.

**Soufiane, 2021 :**

Les nodules stérilisés en surface ont été placés individuellement dans des boîtes de Pétri, écrasés dans une goutte d'eau stérile à l'aide d'une tige de verre stérile, et la suspension obtenue a été étalée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture (YEM) supplémenté avec 0,0025% de rouge Congo. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 15 jours.

Les colonies ont été sélectionnées en fonction de leurs caractéristiques morphologiques distinctes observées au microscope. Les isolats identifiés ont ensuite été cultivés de manière routinière dans un milieu de culture à base d'extrait de levure-tryptone (TY) pour éviter la surproduction d'exopolysaccharides, courante sur le milieu YEM.

**Chahboune, 2011 :**

Les nodules ont été stérilisés en surface avec une solution de HgCl<sub>2</sub> à 0,25 % pendant 5 minutes.

Ils ont ensuite été soigneusement rincés avec de l'eau distillée stérile. Les nodules stérilisés ont été placés individuellement dans des boîtes de Pétri. Chaque nodule a été écrasé dans une goutte d'eau stérile à l'aide d'une tige de verre stérile. La suspension résultante a été étalée sur des boîtes de Pétri contenant l'un des milieux de culture suivants : tryptone soja agar

(TSA), extrait de levure-manitol (YEM), ou peptone-sels minéraux-extrait de levure (PSY). Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 15 jours.

Sélection des colonies : Les unités formant des colonies- qui représentaient tous les types de colonies pouvant être distinguées par observation microscopique- ont été choisies. Toutes les souches de *Bradyrhizobium* utilisées dans cette étude ont ensuite été cultivées de manière routinière sur du milieu YEM.

**Siallagan, 2020 :**

Vingt-sept isolats de LNB, obtenus à partir des nodules racinaires de siratro (*M.atropurpureum*) dans la zone affectée par l'éruption du Mont Merapi, ont été utilisés.

Un isolat de *Bradyrhizobium japonicum* THA7, provenant du Département de microbiologie agricole, Faculté d'agriculture, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, a également été utilisé comme isolat de type.

Tous les isolats bactériens ont été préparés et cultivés dans (YMA).

**Sakrouhi, 2016 :**

Les nodules ont été coupés avec une lame de rasoir stérile, prélevés au centre et étalés directement sur un milieu solide YEM.

Les petits nodules ont été écrasés dans une goutte d'eau distillée stérile et transférés sur milieu solide YEM.

Les colonies pures ont été obtenues par des étalements répétés sur les milieux YEM et/ou TY et conservées dans du glycérol à 20% (V/V) à -80°C.

Une fois purifiés, les isolats ont été testés pour leur capacité à reformer des nodules sur leurs hôtes d'origine.

#### 4. Test nodulation

**Chaich, 2017 :**

Les représentants des nouveaux isolats ainsi que la souche de référence *Ensifer garamanticus* ORS1400T ont été testés pour la nodulation sur leur plante hôte *G. saharae*. Les graines de *G. saharae* ont été scarifiées et stérilisées, puis placées sur une gélose à 10%. Les plantules ont été transplantées dans de l'attapulгите calcinée stérile, arrosées avec une solution nutritive sans azote et inoculées avec 1 ml de suspension rhizobienne. La croissance a eu lieu sous une photopériode de 14 heures de jour et 10 heures de nuit, avec une récolte après 42 jours.

La nodulation a été évaluée en comptant le nombre de nodosités par plant et en

mesurant le poids de la matière sèche nodulaire. Les paramètres de croissance mesurés incluaient le poids de la matière sèche et la hauteur des plants. Les paramètres symbiotiques ont été soumis à une analyse ANOVA et à un test de Student-Newman-Keuls (5%) à l'aide de XLSTAT 2012.

**Ahnia, 2014 :**

Les graines de *C. villosus* ont été stérilisées (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%, 30 min), rincées et mises en eau stérile toute la nuit, puis germées sur milieu solide de Jensen (28°C, 3 jours).

Les semis ont été plantés dans des pots avec vermiculite stérile et solution de Jensen, et inoculés avec 4 ml de suspension rhizobienne (10<sup>9</sup> cellules/ml).

Les plants ont été maintenus en serre pendant 8 semaines, arrosés avec la solution liquide de Jensen. La même procédure a été suivie pour *Spartiumjunceum*, tandis que les graines de *Lupinus angustifolius*, *L. luteus*, et *Glycine max* ont été stérilisées (éthanol 95%, 1 min; NaClO 4%, 3 min), rincées et mises en eau stérile pendant 1 h avant germination sur gélose (28°C, 3j).

**Boukhatem, 2012 :**

Inoculation de plantules d'*Acacia* avec des suspensions bactériennes (10<sup>9</sup> cellules/mL) une semaine après la germination. Contrôles non inoculés inclus.

Les plantes transférées en serre et nourries avec une solution nutritive stérilisée sans azote une fois par semaine.

Récolte des plantes 5 semaines après l'inoculation pour évaluer l'infectivité et l'efficacité des isolats bactériens (présence de nodules, couleur des nodules, vigueur des plantes, couleur du feuillage).

**Boukhatem, 2016 :**

La capacité de nodulation des isolats bactériens a été évaluée en inoculant des plantes d'*Acacia* correspondantes en culture hydroponique. Les tubes remplis de solution nutritive de Broughton et Dilworth sans azote ont été scellés et stérilisés. Après introduction des plantes, ont été inoculées avec des suspensions bactériennes spécifiques. Des plantes témoins non inoculées ont également été incluses. 5 semaines après l'inoculation, les plantes ont été récoltées pour estimer l'infectivité et l'efficacité des isolats bactériens en fonction de la présence de nodules, de leur couleur, de l'observation visuelle de la vigueur des plantes et de la couleur du feuillage. Les isolats bactériens ont été notés comme nodulants ou non nodulants.

**Merabet, 2010 :**

Les isolats ont été testés pour la nodulation sur leur plante hôte d'origine. Les graines de

*Medicago sativa* et de *Lotus arabicus* ont été stérilisées dans de l'hypochlorite de calcium à 3% et scarifiées par immersion dans de l'acide sulfurique à 96 % 20 min. Les graines ont ensuite été lavées 5 fois avec de l'eau stérile et placées dans de l'eau de gélose à 1 % à 24-25 °C pour la germination. Après 3 à 4 jours, les plantules ont été transférées dans des tubes inclinés en gélose pour des essais de nodulation racinaire (5 plants par souche). Les plantes ont été cultivées sous une lumière continue (20 W m<sup>2</sup>) à 24 °C et inoculées avec 1 ml de suspension bactérienne YM en phase de croissance exponentielle. Des racines ont été observées pour la formation de nodules au cours des 4 premières semaines après l'inoculation.

L'infectivité des souches isolées d'*Argyrolobium uniflorum* déjà été signalée par Zakhia (2004).

#### **Amrani, 2010 :**

Les isolats ont été testés pour la nodulation et la capacité de fixation de l'azote sur de jeunes plantules d'*A. saligna*, *A. longifolia*, *A. melanoxydon*, *A. ehrenbergiana*, *A. nilotica* et *A. tortilis* subsp. *raddiana*. Les graines ont été obtenues à l'Arboretum de l'Institut national de recherche forestière, Baïnem-Alger et ont été scarifiées et stérilisées, sauf que l'immersion dans l'hypochlorite de sodium 10 min. La stérilisation de surface des nodules et des graines a été confirmée en les roulant sur (GN) suivie d'une incubation ultérieure à 28 °C. ont ensuite été prégermées sur de la gélose à l'eau Bacto (0,75 % p/v) 3 jours à 25 °C et plantées à raison de 3 semis dans des pots en plastique d'un mélange stérilisé de sable noir de rivière et de tourbe. Les plantes ont été inoculées d'une culture rhizobiale en phase stationnaire précoce cultivée à 28 °C dans un bouillon TY. 5 répétitions ont été effectuées pour des plantes inoculées et non inoculées (témoins négatifs). Les plantules ont été récoltées 2 mois après l'inoculation et ont été vérifiées pour la présence de nodules racinaires. L'efficacité des couples symbiotiques a été déterminée par la couleur vert foncé des feuilles, la vigueur des plantules et par l'apparition d'une couleur rouge ou rose dans les coupes transversales des nodules résultant de l'accumulation de lég'hémoglobine.

#### **Boudehouche, 2020 :**

Stérilisation des Graines: Utilisation d'acide sulfurique à 98 % pendant 2 heures.

Germination: Germination dans des conditions stériles à 20 °C dans l'obscurité.

Inoculation: Inoculation des plants germés avec une suspension de 1 mL d'une suspension de rhizobium contenant (10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup>) cellules par mL.

Contrôles: Inclusion de contrôles négatifs (représente le groupe sans traitement spécifique pour évaluer les résultats de l'expérience) et positifs (le groupe soumis à un traitement connu pour produire un résultat spécifique) . Croissance en Serre: Culture des

plants en serre à 23-25 °C pendant 60 jours.

Observation: Confirmation de la formation des nodules.

**Belhadi, 2017 :**

Les isolats rhizobiaux ont été testés pour la nodulation sur leurs plantes hôtes d'origine et en cross-nodulation sur *Vicia faba* cv. Equina et Minor, *Pisum sativum*, et *Vicia sativa*. Les graines ont été désinfectées avec de l'éthanol à 95% pendant 1 minute, puis dans de l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 10 minutes, Les graines étaient laissées dans de l'eau stérile pendant 2 heures, puis placées sur du vermiculite stérile à 20°C pour germer, puis inoculées avec une 1ml d'une suspension rhizobiale contenant environ  $10^8$  cellules par ml.

Les plantes étaient cultivées dans des chambres de croissance à 23°C avec une photopériode de 10 heures de lumière par jour et 14 heures d'obscurité.

Le développement des nodules a été observé sur une période de 45 jours, avec des contrôles positifs et négatifs.

**Farida, 2009 :**

Les isolats de rhizobia ont été inoculés sur les graines de *R. raetam* et *R.sphaerocarpa* pour vérifier leur capacité à former des nodules avec leur hôte d'origine et à effectuer une nodulation croisée.

Les graines ont été scarifiées et stérilisées en surface dans de l'acide sulfurique à 96% pendant 2 heures. Ensuite ont été rincées plusieurs fois à l'eau stérile et humidifiées dans de l'eau stérile pendant la nuit. Enfin, les graines ont été placées sur des vermiculites stérilisés à 20°C pour la germination, germées, puis placées dans un milieu de culture liquide et inoculées avec avec 1 ml de suspension rhizobienne ( $\sim 10^9$  cellules/ml) en triplicata.

L'apparition des nodules a été suivie régulièrement pour évaluer la nodulation.

**Bourebaba, 2016 :**

Des tests de nodulation ont été effectués sur des isolats purifiés de rhizobia obtenus à partir de *Lupinus micranthus*. Les graines de la plante ont été stérilisées, scarifiées, germées et inoculées avec les souches bactériennes. Les plantes ont été cultivées en conditions contrôlées pour évaluer la capacité des isolats à former des nodosités. Les isolats efficaces ont été identifiés et stockés pour des analyses ultérieures.

**Ahnia, 2018 :**

Les nodulations ont été testées en ajoutant des cultures de *B. algeriense* sur des jeunes plantes de légumineuses dans des pots de Leonard avec vermiculite et solution de Jensen. Après une culture en serre, les nodosités, leur nombre, taille et aspect, ainsi que le poids et l'aspect de la partie aérienne, ont été évalués. Les résultats ont été comparés avec des

contrôles non inoculés et inoculés avec des symbiotes connus.

**Beukes, 2016 :**

Les capacités de nodulation des isolats représentatifs de rhizobium sont testées en utilisant le niébé et le siratro, car les graines des hôtes originaux ne sont pas disponibles.

Les tests sont effectués en utilisant des pots de Leonard remplis de solution de croissance végétale sans azote.

Après la nodulation réussie, l'identité de la bactérie isolée à partir de nodules stérilisés en surface a été vérifiée à l'aide de la similarité de séquence *rpoB* (analyse phylogénétique).

**Soufiane, 2021 :**

Des souches sélectionnées ont été testées pour leur capacité de nodulation sur plusieurs espèces de plantes : *R. sphaerocarpa*, *R. dasycarpa*, *R. monosperma*, *Lupinus luteus*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris*, *Lens culinaris*, *Medicago truncatula*, *Vachelliatortilis* var. *raddiana* et *Glycine max*.

Après la stérilisation des graines et leur germination, les plantules ont été transférées dans des tubes de Gibson contenant de l'agar nutritif sans azote stérile. Les plantules ont été inoculées avec 1 ml de suspension bactérienne (environ  $10^8$  cellules/ml) et maintenues à 26°C pendant 60 jours sous une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

**Chahboune, 2011 :**

Graines stérilisées avec 2,5 % de HgCl<sub>2</sub> pendant 5 minutes, suivies d'un lavage à l'eau distillée stérile. Trempage dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes, conservation à - 20°C pendant une nuit, puis germination sur des plaques de 0,9 % d'agar à 30°C dans l'obscurité.

Semis (trois par pot) plantés dans des pots de 1 kg contenant un mélange stérile de sable et de vermiculite (1:1, v), puis inoculés séparément avec chacune des 19 souches bactériennes.

Cultivation sous lumière naturelle complétée par un éclairage artificiel et alimentation avec une solution minérale sans azote.

Récolte des plantes chaque mois pendant quatre mois pour vérifier la formation des nodules.

**Siallagan, 2020 :**

Préparation des Germes : Les germes de légumineuses âgés de 3-4 jours sont placés dans des sachets en plastique stériles contenant un carton épais et du milieu de Fahreus.

Les germes sont laissés à pousser pendant 3 jours supplémentaires. Inoculation : Les germes sont inoculés avec 1 ml de culture de 48 heures d'isolat LNB en utilisant une micropipette aseptique.

Après l'inoculation, les sachets en plastique sont placés dans un rack spécial.

Conditions de Croissance: Les plantes inoculées sont maintenues en serre pour garantir une exposition adéquate au soleil et une protection contre les parasites et les maladies. Pendant la croissance, du milieu de Fahreus est ajoutée périodiquement (10-25 ml) pour maintenir l'humidité.

Récolte et Analyse: Les racines sont récoltées 50-60 jours après l'inoculation.

Les caractéristiques des nodules racinaires (formés par chaque isolat LNB) sont évaluées pour:

Fréquence d'apparition

Distribution sur les racines

Nombre de nodules

Poids des nodules (frais et sec)

Diamètre des nodules

Forme et couleur des nodules

### **Sakrouhi, 2016 :**

Identification et caractérisation : Isoler des colonies distinctes de rhizobia pour des analyses ultérieures.

Confirmer l'identité des rhizobia par des tests microbiologiques et des analyses génétiques, comme l'analyse de l'ADN 16S et l'analyse de séquence multi-locus (MLSA)

Les études mentionnées présentent à la fois des similitudes et des différences dans leurs méthodes d'évaluation de la nodulation :

Les similitudes :

1. Utilisation des souches bactériennes isolées : Toutes les études utilisent des souches de rhizobium isolées à partir des racines des légumineuses.

2. Stérilisation et préparation des graines : Les études consistent à stériliser les graines avec des agents tels que l'acide sulfurique et l'hypochlorite pour éliminer les micro-organismes superficiels susceptibles d'affecter les résultats des expériences.

3. Culture des plantes et préparation environnementale : Toutes les études impliquent la culture des plantes dans des récipients stériles, des tubes ou d'autres milieux de culture, sous des conditions climatiques contrôlées dans des environnements simulés ou dans des serres.

4. Évaluation symbiotique : Toutes les études comprennent une évaluation de la capacité des souches bactériennes isolées à former des nodosités racinaires, en utilisant des critères tels que le nombre de nodosités et le poids sec du matériel nodulaire.

Les différences :

1. Types de plantes utilisées : Les études diffèrent dans les types de légumineuses utilisées comme plantes hôtes pour les tests de nodulation.

2. Méthodes d'inoculation et d'isolement bactérien : Les méthodes varient dans les techniques d'inoculation et d'isolement des bactéries rhizobiales.

3. Conditions environnementales et installations : Les études peuvent différer dans les conditions environnementales telles que la température, l'éclairage et l'humidité utilisées.

4. Analyse statistique et traitement des données : Les études peuvent utiliser différentes méthodes statistiques pour analyser les données accumulées à partir des expériences, telles que l'ANOVA et le test de Student-Newman-Keuls.

# **Chapitre 03**

## **Résultats et discussion**

Les résultats de notre expérimentation restent en cours et suivent par notre encadrant.

### 1. Résultats et discussion des travaux scientifiques

#### 1.1. Isolement des Souches et condition de culture

Article	Nombre des souches	Type de nodule
(Chaich, 2017)	106 isolats  57 isolats de <i>G. saharae</i> ;  22 isolats d' <i>A. gombo</i> ;  15 isolats de <i>R. raetam</i> ;  12 isolats d' <i>A. maureoticus</i> .	Cultivées
(Ahnia, 2014)	51 isolats symbiotiques efficaces obtenus des nodules de plantes natives de <i>C. villosus</i> .  37 isolats d'Oued Dass (CTO)  14 isolats de Saket (CTS)	Collectés du terrain
(Boukhatem, 2012)	288 isolats	Collectés du terrain
(Boukhatem, 2016)	81 isolats obtenus à partir des nodules de 5 espèces d' <i>Acacia</i> .	Collectés du terrain
(Merabet, 2010)	Les souches ORS 1400T, ORS 1401, ORS 1407T, ORS 1444 isolées d' <i>Argyrolobium uniflorum</i> et la souche ORS 1410 isolées de <i>Medicago sativa</i> . Nouvelles Souches Testées : ORS 2154, ORS 2133, ORS 529, isolées de <i>Lotus arabicus</i>	Collectés du terrain
(Amrani, 2010)	27 souches ont été isolées à partir des nodules racinaires de plants d' <i>A. saligna</i> provenant	Cultivées

## Chapitre 03 Résultats et discussion

(Beukes, 2016)	32 isolats bactériens Genre <i>Bradyrhizobium</i> : 21 isolats (98-100% similarité avec les séquences de GenBank) Autres Genres: <i>Methylobacterium</i> : 6 isolats (hôtes : <i>Crotalarialotoides</i> et <i>R. sphaerocarpa</i> ) <i>Mesorhizobium</i> : 4 isolats (hôtes : <i>Argyrobiumtuberosum</i> , <i>A. rupestre</i> et <i>Dichilusreflectus</i> ) <i>Burkholderia</i> : 1 isolat (hôte : <i>Pearsonia aristata</i> ) Origine des Isolats de <i>Bradyrhizobium</i> : Plantes hôtes: <i>Argyrobium</i> : 3 plantes <i>Leobordea</i> : 12 plantes <i>Pearsonia</i> : 4 plantes <i>Chamaecrista</i> : 2 plantes	Collectés du terrain
(Soufiane, 2021)	51 isolats obtenus à partir des nodules de <i>R. sphaerocarpa</i> .	Cultivées
(Boudehouche, 2020)	46 isolats	Collectés du terrain
(Farida, 2009)	125 isolats	Collectés du terrain
(Ahnia, 2018)		Cultivées
(Chahboune, 2011)	Sur un total de 73 souches bactériennes isolées des nodosités racinaires de <i>Cytisus villosus</i> cultivés dans les sols de la région centre-ouest du Rif marocain, 68 souches ont été regroupées en 19 groupes répétitifs extragéniques palindromiques par PCR.	Collectés du terrain
(Siallagan, 2020)	27 isolats	Collectés du terrain
(Sakrouhi, 2016)	21 isolats  Nombre total de nodules récupérés: 21 Échantillon de sable N° 4 ( <i>A. gummifera</i> ): 1	Cultivées

	nodule Échantillons de sable du site N° 2 ( <i>A. tortilis</i> ): 20 nodules 20 souches pures ont été isolées à partir des nodules collectés et conservées pour des études ultérieures.	
(Belhadi, 2017)	58 souches isolées des nodules de : <i>Vicia faba</i> . <i>V. faba</i> cv. Minor : 27  <i>V. faba</i> cv. Equina : 33	Cultivées
(Bourebaba, 2016)	101 souches de rhizobia ont été isolées à partir de nodules racinaires de <i>Lupinus micranthus</i>	Collectés du terrain

### 1.2. Test de nodulation

#### Chaich, 2018 :

Infectivité des souches :

Formation des nodosités : Après 6 semaines d'inoculation, toutes les souches testées ont initié la formation de nodosités sur les racines de *G. saharae*, indépendamment de leur position phylogénétique.

Nombre de nodosités: Genre *Ensifer*: Classement en tête avec un effet très significatif ( $P < 0,0001$ ) sur le nombre de nodosités par plante.

Souche Gs6615 : Nombre le plus élevé de nodules, avec une moyenne de  $11,8 \pm 0,75$  nodules par plante.

*Ensifer garamanticus* ORS1400T : Deuxième position, regroupée avec d'autres souches du genre *Ensifer* (Gs6718, Gs6516) et *Neorhizobium* (Gs6514, Gs675).

Souche Gs663 (*Mesorhizobium*) : Troisième position, formant un groupe avec des souches d'*Ensifer* (Gs6522, Gs6713, Gs616).

Témoin non inoculé : Aucun nodule formé, confirmant l'infectivité des souches testées.

Poids sec des nodosités : Souche Gs675 (*Neorhizobium*) : Valeur la plus élevée de biomasse sèche des nodosités, avec  $0,71 \pm 0,31$  mg par plante, produisant moins de nodules par plante ( $6,4 \pm 0,8$ ) mais des nodosités de grande taille, unilobées et plurilobées.

Efficiéce des souches :

## Chapitre 03 Résultats et discussion

---

Poids sec des parties aériennes (PSPA) et hauteur des plantes: Analyse ANOVA : Effet très significatif ( $P < 0,0001$ ) pour le poids sec et la hauteur des parties aériennes de *G.saharae*. Souche Gs656 (*Ensifer*) : La plus efficace, avec  $4,94 \pm 1,00$  mg de PSPA,  $22,92 \pm 1,46$  cm de hauteur des plants, et une biomasse totale de 9,12 mg.

Plantes témoins non inoculées : Biomasse relativement très faible, indiquant l'absence de fixation biologique de l'azote comparativement aux plantes inoculées.

### **Ahnia, 2014 :**

Tests d'inoculation croisé: Espèces testées : *Lupinus luteus*, *L. angustifolius* et *S. junceum*. Les souches ont nodulés *L.angustifolius*, *L. luteus*, et *S. junceum* (tribu *Genisteeae*), mais pas le soja *G.max* (tribu *Phaseoleae*). Les bactéries endosymbiotiques *Bradyrhizobium nodulans* *C.villosus* en Afrique du Nord montrent une diversité complexe et un statut taxonomique varié.

### **Boukhatem, 2012 :**

Nombre de souches infectives : Seulement 84 isolats, soit 29%, ont été capables de renoduler leur plante hôte d'origine. Efficacité des souches : Sur les 48 isolats testés, 25 ont été jugés efficaces. Pourcentage d'efficacité variable selon les espèces d'*Acacia*: *Acacia seyal* : Tous les 10 isolats testés étaient efficaces. *Acacia karroo* : 6 sur 11 isolats étaient efficaces (55%). *Acacia saligna* : 7 sur 21 isolats étaient efficaces (33%).

### **Boukhatem, 2016 :**

Nodulation par Espèce d'*Acacia* et Origine du Sol *A. albida* : Pas de nodulation avec la suspension de sol d'Oued Tassena. Nodulation avec la suspension de sol d'Oued in Daladg.

*A. laeta* : Faible nodulation avec le sol d'Oued Tan Assennane. Meilleure nodulation avec le sol d'Oued Tassena.

*A. nilotica* : Faible nodulation, quelle que soit l'origine du sol. Cela pourrait être dû à une faible population de rhizobiums compatibles. *A.ehrenbergiana* et *A.tortilis*: Taux de nodulation le plus élevé, *A.ehrenbergiana* étant la plus nodulée, suivie par *A. tortilis*. Ces espèces étaient numériquement dominantes sur les sites prospectés, ce qui pourrait indiquer une corrélation entre la population de rhizobiums et la densité des arbres.

Symbiotes Véritables : Seulement 4 bactéries endophytes capables de noduler les espèces d'*Acacia*. Aucune différence marquée entre les plantes inoculées et non inoculées, suggérant l'absence d'effet promoteur de croissance des plantes (PGP) par ces endophytes non nodulants. Spécificité de l'Hôte Végétal *A.nilotica* : Plus grande diversité endophytique avec huit isolats. Ne contenait pas les genres dominants *Paenibacillus* ou *Ochrobactrum*.

## Chapitre 03 Résultats et discussion

---

*A. ehrenbergiana* et *A. nilotica*: Partage de plus d'un genre (*Stenotrophomonas* et *Pseudomonas*). Enfin les chercheurs discutent de la biodiversité des *Acacias* indigènes à Tamanrasset, notant leur résilience face à la sécheresse et aux conditions difficiles. Il souligne l'intérêt de découvrir la diversité bactérienne associée à leurs nodosités, tant symbiotiques que non symbiotiques, dans cet écosystème fragile et préservé. La faible récupération des bactéries non nodulantes suscite des interrogations sur les interactions spécifiques entre les bactéries. En outre, il pose la question de savoir si la taille des populations endophytiques ou la production de métabolites inhibe la croissance rhizobiale. Même les endophytes non symbiotiques n'ont pas montré d'effets promoteurs de la croissance des plantes, mais d'autres effets bénéfiques tels que leur impact sur l'émergence des semis, leur capacité de biocontrôle et la production de métabolites à des fins biotechnologiques doivent être explorés.

### **Merabet, 2010 :**

Efficacité de Nodulation : Toutes les souches étudiées ont induit une nodulation efficace sur leur plante hôte d'isolation.

Efficacité : Toutes nouvelles souches testées et se sont avérées efficaces sur leur plante hôte.

### **Amrani, 2010 :**

Test d'infectivité des Plantes: Conditions des tests: Conditions contrôlées de température et d'humidité en laboratoire. Espèces d'*Acacia* testées: *A. saligna*, *A. longifolia*, *A. melanoxydon*, *A. ehrenbergiana*, *A. nilotica*, *A. tortilis* ssp. *raddiana*.

Formation des nodules: Tous les isolats ont induit la formation de nodules sur *A. saligna*. La plupart des rhizobiums à croissance rapide (16 souches) ont nodulé aussi bien les espèces introduites (*A. saligna*, *A. longifolia*, *A. melanoxydon*) que les espèces indigènes (*A. ehrenbergiana*, *A. nilotica*, *A. tortilis* ssp. *raddiana*). Les rhizobiums à croissance lente (11 souches) ont induit la nodulation uniquement avec les 3 espèces d'*Acacia* introduites.

Efficacité symbiotique: Les nodules montrent généralement des sections transversales roses ou rouges, indiquant la production de leghémoglobine et une symbiose efficace.

Exceptions : Souches à croissance rapide inefficace : ADR2, BEC1, BEC3, DJA2 et TAM1 (pour certaines associations avec *A. melanoxydon*, *A. ehrenbergiana* et *A. longifolia*).

Souches à croissance lente induisant des pseudo nodules: ALG1, BEJ1 et BEJ2 (pour certaines espèces indigènes).

### **Beukes, 2016 :**

Capacités de Nodulation : Tous les isolats représentant les trois clades nodA identifiés

## Chapitre 03 Résultats et discussion

---

(détaillés dans une analyse ultérieure) étaient capables d'induire des nodules sur le niébé (*Vigna unguiculata*) ou le siratro (*Macroptilium atropurpureum*).

### **Soufiane, 2021 :**

Caractéristiques des Souches Rs4, Rs9, Rs19, Rs27: Croissance en Présence de Métaux Lourds : Toutes les souches ont bien poussé en présence de différentes concentrations de métaux lourds, incluant 300 µg/ml d'acétate de plomb. Amélioration de la Croissance : Les souches Rs4, Rs9, et Rs19 ont significativement amélioré le poids sec des parties aériennes et racinaires par rapport au contrôle non inoculé. La souche Rs27 n'a montré aucune amélioration significative.

Formation de Nodules : Les quatre souches ont induit des nodules fonctionnels sous conditions de stress métallique.

Efficacité Symbiotique (SE): Les valeurs de SE variaient de 51-80%, indiquant que les souches étaient efficaces. Les valeurs de SE pour Rs4, Rs9, et Rs19 étaient entre 67.04 et 74.47%, tandis que pour Rs27, elle était de 59.94%.

Nombre et Poids des Nodules: nombre des nodules environ 18 nodules par plante La souche Rs27 produisait un grand nombre de petits nodules avec un poids sec faible. La souche Rs19 produisait un nombre moindre de nodules mais de plus grande taille et avec un poids sec élevé.

### **Boudehouche, 2020 :**

Fixation de l'Azote: Les plantes formaient en moyenne 13 à 25 nodules racinaires rouges 60 jours après l'inoculation et avaient des feuilles vert foncé, suggérant une fixation efficace de l'azote Tests d'inoculation croisé: Tous les isolats étaient capables de noduler les trois espèces de *Genista* testées, démontrant une capacité de nodulation et une polyvalence symbiotique.

### **Belhadi, 2017 :**

Tests de Nodulation croisé : Toutes les souches isolées pouvaient noduler les deux cultivars de *Vicia faba* (Minor et Equina). De plus, ces souches pouvaient également noduler *Pisumsativum* (pois) / *Vicia sativa* (vesce commune) Les tests de nodulation croisée montrent que les souches isolées sont polyvalentes et efficaces pour la fixation de l'azote avec diverses légumineuses comme *Pisumsativum* et *Vicia sativa*.

### **Farida, 2009 :**

Les isolats nodulants ont réussi à re-noduler leur hôte d'origine ainsi que d'autres espèces de *Retama*, indiquant une capacité de nodulation croisée. La couleur rouge-brun des

nodules suggérait une efficacité de fixation de l'azote pour tous les isolats. L'analyse par PCR-RFLP du gène de l'ARNr 16S a montré que les isolats de croissances rapides étaient similaires aux souches d'*Agrobacterium sp.* Provenant de nodules de *Phaseolus*.

Les résultats des tests de nodulation ont montré que les isolats de *Retama* étaient capables de noduler les deux espèces de *Retama*, avec une similitude élevée entre les gènes de nodulation des isolats, soutenant ainsi leur capacité à noduler croisé ces espèces sans différenciation génétique importante en fonction de l'espèce hôte.

### **Bourebaba, 2016 :**

Tous les souches isolées ont été capables de noduler efficacement les plantes de *L. micranthus* dans des conditions contrôlées sur le plan bactériologique. Cela indique que ces souches de rhizobia étaient compétentes pour former des nodules symbiotiques avec les plantes hôtes de *L. micranthus*, ce qui est un indicateur de leur capacité à fixer l'azote et à établir une symbiose efficace avec la plante.

### **Ahnia ,201 8 :**

Symbiose efficace : Les trois souches de *R.sphaerocarpa*, RST89T, RST91 et RST88bis, ont réussi à établir des symbioses efficaces avec plusieurs espèces végétales.ces espèces comprennent *R.raetam*, *Lupinus micranthus*, *L.albus* et *Genista numidica*, qui sont toutes des arbustes appartenant à la tribu des *Genisteeae*. Cette symbiose efficace a été observée dans des régions géographiques avec des distributions qui se chevauchent.

Symbiose inefficace: Aucune symbiose efficace n'a été établie avec le soja (*Glycine max*). Une symbiose ineffic, caractérisée par des nodules blancs, a été établie avec le pois cowpea (*Vigna unguiculata*).

### **Sakrouhi, 2016 :**

La majorité des souches (17 sur 20) ont montré une capacité à re-noduler les semis d'*Acacia*, indiquant leur potentiel pour une utilisation en inoculation de plantes. Quatre isolats du génotype dominant comprenant 15 souches ainsi que 2 souches divergentes ont été caractérisés plus en détail par MLSA. Les analyses phylogénétiques ont indiqué que le type génétique dominant appartenait à une espèce nouvelle et non encore définie dans le genre *Ensifer*. Les phylogénies des gènes de ménage ont montré que cette espèce potentiellement nouvelle est également présente dans un autre désert en Inde. Les analyses phylogénétiques des séquences de *nifH* et *nodC* ont montré une forte conservation des séquences parmi les souches marocaines appartenant au génotype dominant mais une forte divergence avec les séquences des isolats indiens, suggérant l'acquisition des gènes symbiotiques par transfert

## Chapitre 03 Résultats et discussion

---

horizontal de gènes. Ces rhizobies désertiques étaient capables de croître dans des milieux contenant des concentrations élevées de sel, à un pH élevé et la plupart des souches ont montré une croissance à 45°C.

### **Siallagan, 2020 :**

Efficacité de Nodulation: MPB9 et MPB27 ont montré une capacité supérieure à former des nodules efficaces sur les racines de *G.max*, tandis que MPB25 a été plus efficace sur *M.atropurpureum*. Quantitativement, MPB27 a formé plus de nodules que MPB9, alors que MPB8 et MPB25 ont formé entre un et dix nodules par plante hôte.

Indicateurs de Fonctionnement: Les nodules montraient une couleur rouge, indiquant la présence de leghémoglobine et donc une activité de fixation de l'azote active.

Compatibilité Hôte-Souche: Parmi les isolats testés, seuls MPB8, MPB9, MPB25 et MPB27 ont pu former des nodules sur *G. max*. MPB25 était le seul à former des nodules sur *M. atropurpureum*. Aucun des isolats LNB n'a été capable de former des nodules sur d'autres plantes testées comme *A.hypogeal*, *P.sativum*, *M.sativa* et *P.vulgaris*. Ces résultats montrent que les isolats MPB25, MPB9 et MPB27 ont une capacité plus large de nodulation sur différentes plantes, tandis que MPB8 a une spécificité d'hôte plus étroite. Ces observations soulignent l'importance de comprendre les interactions spécifiques entre les souches de rhizobium et les plantes hôtes pour optimiser la nodulation et la fixation de l'azote dans les cultures légumineuses

### **Chahboune ,2011 :**

11 souches de *B.canariense* et 3 souches de *B.japonicum* ont formé une symbiose efficace avec leur hôte d'origine, sans former de nodules sur le soja. Les souches représentatives de *Mesorhizobium*, CTAW51, CTAW162 et CTAW202, ont également formé des nodosités sur *C.villosus*. Aucune nodulation n'a été détectée lorsque la souche CTAW64, représentant le groupe *Rhizobium/Agrobacterium*, a été utilisée pour l'inoculation.

Les tests de nodulation ont confirmé leur capacité à former une symbiose efficace avec *C.villosus*. Les analyses ont révélé une diversité de genres bactériens dans les nodules, soulignant l'importance de comprendre ces interactions pour différentes espèces de *Genisteae*

### Discussion général

Les différents tests de nodulation menés sur diverses espèces de légumineuses montrent des résultats souvent similaires concernant l'efficacité de certaines souches bactériennes.

Dans l'ensemble, toutes les études s'accordent sur la capacité des souches testées à induire la formation de nodosités sur leurs plantes hôtes, confirmant ainsi leur infectivité. Par exemple, l'étude de Chaich (2018) et Merabet (2010) démontrent que toutes les nouvelles souches testées ont montré une nodulation efficace sur leurs plantes hôtes respectives, Selon Chaich (2017), les résultats obtenus font ressortir que les BNL indigènes sont bien capables d'établir une relation de symbiose fixatrice d'azote qui aboutit à la formation des nodules sur les racines des 04 espèces étudiées (*A. gombo*, *A. mareoticus*, *G. saharæ* et *R. retam*).

De même, les tests de nodulation croisée de Boudehouche (2020) et Belhadi (2017) révèlent que les souches isolées pouvaient noduler plusieurs espèces de légumineuses (*G. ferox*, *G. numidica*, *G. tricuspidata*, *V. faba*, *P. sativum* et *V. sativa*) indiquant leur polyvalence symbiotique.

En termes de biomasse des nodosités, les résultats montrent une variation significative entre les souches et les espèces hôtes. Par exemple, Soufiane (2021) observe que certaines souches produisent un grand nombre de petits nodules tandis que d'autres, comme la souche Gs675 de *Neorhizobium*, produisent moins de nodules mais de plus grande taille. Cette tendance est également confirmée par les résultats de Boukhatem (2012) qui montrent des variations dans l'efficacité des souches en fonction des espèces d'*Acacia* testées.

Les études de Sakrouhi (2016) et Siallagan (2020) montrent également que certaines souches de rhizobium ont une capacité plus large de nodulation sur différentes plantes, tandis que d'autres présentent une spécificité d'hôte plus étroite. Cela souligne l'importance de la compatibilité hôte-souche dans l'optimisation de la nodulation et de la fixation de l'azote.

Enfin, les résultats montrent une corrélation entre la population de rhizobiums compatibles et la densité des arbres, comme observé par Boukhatem (2012) et Farida (2009). Cela suggère que les interactions spécifiques entre les bactéries et les plantes hôtes sont cruciales pour le succès de la symbiose et la fixation de l'azote.

En somme, les études comparées montrent que malgré les variations entre les souches et les espèces hôtes, les résultats sont cohérents dans leur démonstration de l'efficacité des souches de rhizobium à induire la nodulation et à fixer l'azote dans les légumineuses, avec des variations notables en termes de biomasse des nodosités et de compatibilité hôte.

# **Conclusion**

### Conclusion

Le test de nodulation que nous avons utilisé pour évaluer la capacité des *rhizobiums* à induire la formation de nodules racinaires s'appuie sur des recherches scientifiques ayant étudié ce procédé. Nous avons sélectionné 15 articles de recherche, qui ont conclu que les bactéries isolées de diverses légumineuses possèdent la capacité d'infecter les plantes de types légumineuses et de provoquer la formation de nodosités , ces études montrent une grande diversité dans la capacité des rhizobiums à noduler et à établir des symbioses efficaces avec différentes légumineuses, soulignant l'importance de la compatibilité hôte-souche et des conditions environnementales pour le succès de ces interactions symbiotiques .

# **Références Bibliographiques**

Références bibliographiques

1. **Abdelnaby, M., Elnesairy, N. N. B., Mohamed, S. H., & Alkhayali, Y. A. A. 2015.** Symbiotic and phenotypic characteristics of rhizobia nodulating cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) grown in arid region of Libya (Fezzan). *J Environ Sci Eng*, 4, 227-239.
2. **ALLAL, A. 2016.** Etude phytochimique et activités anti oxydantes de quelques extraits d'une plante de la région de Tlemcen: *Psoralea bituminosa* L
3. **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.
4. **APG III. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2): Pp. 105– 121.
5. **AZIB, S. 2020.** *La symbiose rhizobium-luzerne: étude de la diversité rhizobienne et essais d'inoculation en vue d'améliorer les rendements en fourrage dans le Sahara septentrional est-algérien* (Doctoral dissertation, Université Kasdi Merbah Ouargla).
6. **Baudoin, J. P. 2001.** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Base*.
7. **Beniston N.T.W.S. 1985.** Fleurs d'Algérie. Entreprise nationale du livre, Alger, 359 p
8. **Bokhari H. 2016.** Extraction, dosage et analyse des polysaccharides pariétaux des racines de *Retama raetam*. Thèse de doctorat d'état, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, 128 p.
9. **Bouaboub, K. 1991.** L'influence des nitrates sur la fixation symbiotique de l'azote chez le pois chiche. *Mémoire d'ingénieur, INA Alger*, 55.
10. **Boukhatem, Z.F., Domergue, O., Bekki, A., Merabet, C., Sekkour, S., Bouazza, F.,... & Galiana, A. 2012.** Symbiotic characterization and diversity of

11. rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. *FEMS microbiology ecology*, 80(3), 534-547.
12. **Boukhatem, Z.F., Merabet, C., Bekki, A., Sekkour, S., Domergue, O., Dupponois, R., & Galiana, A. 2016.** Nodular bacterial endophyte diversity associated with native *Acacia spp.* in desert region of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 10(18), 634-645.
13. **Chamandy, A. 2021.** *Etude des molécules bioactives et de leurs activités chez deux espèces d'astragales utilisées dans la médecine traditionnelle: Astragalus emarginatus Labill. Et Astragalus coluteoides Will* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
14. **Chehma, A. 2006.** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. In L. d. semi-aride». Université Kasdi Merbah Ouargla.
15. **Cohen, M. F., Sakihama, Y., & Yamasaki, H. 2001.** Roles of plant flavonoids in interactions with microbes: from protection against pathogens to the mediation of mutualism.
16. **Cooper, J. E. 2007.** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1355-1365.
17. **Dommergues, Y., Duhoux, E., & Diem, H.G. 1999.** Les arbres fixateurs d'azote. *Edition Espace*, 34, 499.
18. **Fåhraeus, G. 1957.** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Microbiology*, 16(2), 374-381.
19. **Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. 2009.** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants.
20. **Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., ... & Vöös, C. J. 2004.** Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70, 153-226.
21. **Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F., & Young, N. D. 2005.** Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference.

22. **Ghalmi, N., Malice, M., Jacquemin, J. M., Ounane, S. M., Mekliche, L., & Baudoin, J. P. 2010.** Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. *Genetic resources and crop evolution*, 57, 371-386.
23. **Ghani, U., Nur-e-Alam, M., Yousaf, M., Ul-Haq, Z., Noman, O. M., & Al-Rehaily, A. J. 2019.** Natural flavonoid  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Retama raetam*: Enzyme inhibition and molecular docking reveal important interactions with the enzyme active site. *Bioorganic chemistry*, 87, 736-742.
24. **Graham, P. H., & Vance, C. P. 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.
25. **Guignard J.L and Dupont F. 2005.** Botanique. 13<sup>ème</sup> Edition Masson. Sprent : pp. 164.
26. **Hirsch, A. M. 2001.** Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) legume nodulation. *Biotic interaction* 19:320-326.
27. **Hopkins W G. 2003.** Physiologie végétale. Université des Sciences de Lille. Edition de boeck. P99-120. 1.2.1.
28. **Ibraheim Z.Z, Khalifa A.A. 2000.** Bull. Pharm. Sci, 23, p177-186.
29. **Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. 2007.** How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619-633.
30. **Jordan, D. C. 1962.** The bacteroids of the genus *Rhizobium*. *Bacteriological reviews*, 26(2\_pt\_1-2), 119-141.
31. **Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P. 2002.** *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. De Boeck Supérieur.
32. **Kassem, M., Mosharafa, S. A., Saleh, N. A. M., & Abdel-Wahab, S. M. 2000.** Two new flavonoids from *Retama raetam*. *Fitoterapia*, 71(6), 649-654.
33. **Kutiél, P., et al. 1980.** Ecology and Habitat of *Retama sphaerocarpa*. *Journal of Mediterranean Botany*, 15(4), 200-215.
34. **Lamrani N., ElabdellAaoui F., Touhami A.O., Benkiran R., Douira A. 2013.**

35. padwickii (Ganguly) M.B. Ellis sur les grains pré-germés. Section Sciences de la Vie. 35:1-7
36. **Lograda,T.(2018).** *Etude caryologique et phytochimique de six espèces endémiques du genre genista L.enalgérie* (Doctoral dissertation).
37. **Long, S. R. 1996.** Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *The PlantCell*, 8(10), 1885.
38. **MahalakshmiV, NgQ, LawsonM, OrtizR (2006).** Cowpea (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.) core collection defined by geographical, agronomical and botanical descriptors. *Plant Genet. Res. Charact.Util.* 5(3):113-119
39. **Mahnane W. 2010.** Appréciation de la diversité génétique du genre Rétama par les marqueurs biochimiques. Thèse de magistère, Université Mentouri Constantine, 64 pages.
40. **Maire, R. 1952.** Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara).
41. **Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. 2009.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends in microbiology*, 17(10), 458-466.
42. **MEKKIOU R. 2005.** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae): *G.saharae*, *G.ferox*, Thèse de Doctorat en Chimie Organique, Option : Phytochimie, Univ. Mentouri–Constantine, Département de chimie, 19-31pp.
43. **MergaertP, VaubertD, Györgyey J, Jahni G, Maunoury N, Chaparro Egaña C, Villarroel R,Kelemen Z, Kelemen K, Vinardell J M, Kondorosi A, Kondorosi E (2001)** Utilisations d'arrays d'ADNc pour l'étude du développement des nodosités symbiotiques chez *Medicago truncatula*. *Ecoéthématique Biologie végétale*: 1-7
44. **MulderK. F., 2009.**L'ingénieur et le développement durable, pressesdel'université du Québec. Ecole de technologie supérieure. P18-19.
45. **Nawel, S. 2015.** *Etude des Associations Symbiotiques de Retama monosperma: Approches Morphologique, Anatomique et Ultra structurale, Caractérisation*

46. *Moléculaire des Isolats* (Doctoral dissertation, University of sciences and technology in Oran).
47. **Ndiaye, M.2007.** *Ecology and management of charcoal rot (Macrophomina phaseolina) on cowpeain the Sahel.* Wageningen Universityand Research.
48. **Ozenda, P.1977.** *Flore du Sahara.* Seconde édition revue et complétée, 626 p. dont 176 planches,1 carte du Sahara. Edition du C.N.R.S.
49. **Pelmont J. (2005).** Biodégradation et métabolisme. Édition EDP; France. P798.
50. **Perry J.J., Staley J.T., LoryS., 2004.** Microbiology. Ed. Dunod, Paris.889p.
51. **Pongslip, N. 2012.** *Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia.* Bentham Science Publishers.
52. **Prin, Y., Galiana, A., Ducouso, M., Dupuy, N., De Lajudie, P., & Neyra, M.1993.** Les rhizobiums d'acacia. Biodiversité et taxonomie. *BOIS & FORETS DES TROPIQUES*, 238, 5-20.
53. **Quézel, P., & Santa, S.1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
54. **Quézel, P., & Santa, S. 1987.** *Nouvelle Flore de l'Algérieet des Régions Désertiques Méridionales.* Éditions duCentre National de la Recherche Scientifique, Paris.
55. **Quezel, P., Santa, S.,1963.** *Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales .* Editions du C.N.R.S., Paris.
56. **Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 2000.** Biologie végétale. 2<sup>e</sup> édition. Edition .De boeck. Paris France. pp. 653-660.
57. **Sadowsky, M. J., Keyser, H.H., & Bohlool, B. B. 1983.** Biochemical characterization of fast-and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(4), 716-722.
58. **Schneider, A., & Huyghe, C. 2015.** *Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables* (p.512). éditions Quae.
59. **Sebihi, F. Z. 2008.** *Les Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL): caractérisation des bactéries associées aux nodules da légumineuse fourragère.*

60. **SELAMI, F.Z., & MEDDOUR, Z. (2016).** *Effet du stress salin sur la germination des graines de quelques plantes spontanées sahariennes (Retama retam, Genista saharae Asphodelus tenuifolius et Oudneya africana)* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA).
61. **Smil, V. 2002.** Biofixation and nitrogen in the biosphere and in global food production. *Nitrogen fixation: global perspectives. CAB International, UK*,7-9.
62. **Soltner, D. 2007** .Les bases de la production végétale, biologie végétale et amélioration des plantes, TOME III, 5ème Ed, p 373.
63. **Somasegaran,P.,&Hoben,H.J.1985.**Methods in legume-Rhizobium technology.
64. **Somasegaran, P., Hoben, H. J., Somasegaran, P., & Hoben, H. J. 1994.** Testing For Genetic Compatibility between Rhizobia and Legumes. *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology*, 171-176.
65. **Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O.2007.** Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science*, 12(7), 282-285.
66. **Torche, A. 2006.** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre Hedysarum.
67. **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*.
68. **Zammouri, J., Arbi, G., & Mohamed, N. (2010).** Germination responses of *Spartidium saharae* (Coss.&Dur.) Pomel (Fabaceae) to temperature and salinity. *African journal of ecology*, 48 (1), 37-44.
69. **Zohary, M. 1959.** A revision of the genus *Retama* (Boiss). *Bull. Res. Council. Isr*7(D),1–2.

**Référence des travaux scientifique:**

Articles	Références
(Ahnia, 2014)	Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., ... & Rey, L. (2014). <i>Cytisus villosus</i> from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse

	<p>Bradyrhizobium strains. <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i>, 105, 1121-1129.  <a href="https://doi.org/10.1007/s10482-014-0173-9">https://doi.org/10.1007/s10482-014-0173-9</a></p>
<b>(Ahnia, 2018)</b>	<p>Ahnia, H., Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Palacios, J. M., Rey, L., ... &amp; Imperial, J. (2018). Bradyrhizobium algeriense sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of Retama sphaerocarpa from Northeastern Algeria. <i>Systematic and applied microbiology</i>, 41(4), 333-339.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.03.004">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.03.004</a></p>
<b>(Amrani, 2010)</b>	<p>Amrani, S., Nouredine, N. E., Bhatnagar, T., Argandona, M., Nieto, J. J., &amp; Vargas, C. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with Acacia saligna (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. <i>Systematic and Applied Microbiology</i>, 33(1), 44-51.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.09.003">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.09.003</a></p>
<b>(Belhadi, 2018)</b>	<p>Belhadi, D., De Lajudie, P., Ramdani, N., Le Roux, C., Boulila, F., Tisseyre, P., ... &amp; Laguerre, G. (2018). Vicia faba L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by Rhizobium leguminosarum sv. viciae, Rhizobium laguerreae and two new genospecies. <i>Systematic and applied microbiology</i>, 41(2), 122-130.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.10.004">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.10.004</a></p>
<b>(Beukes, 2016)</b>	<p>Beukes, C. W., Stępkowski, T., Venter, S. N., Cłapa, T., Phalane, F. L., le Roux, M. M., &amp; Steenkamp, E. T. (2016). Crotalariaeae and Genisteae of the South African Great Escarpment are nodulated by novel Bradyrhizobium species with unique and diverse symbiotic loci. <i>Molecular Phylogenetics and Evolution</i>, 100, 206-218.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.011">https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.011</a></p>
<b>(Boudehouche, 2020)</b>	<p>Boudehouche, W., Parker, M. A., &amp; Boulila,</p>

	<p>F. (2020). Relationships of Bradyrhizobium strains nodulating three Algerian Genista species. <i>Systematic and applied microbiology</i>, 43(3), 126074.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126074">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126074</a></p>
<b>(Boukhatem, 2012)</b>	<p>Boukhatem, Z. F., Domergue, O., Bekki, A., Merabet, C., Sekkour, S., Bouazza, F., ... &amp; Galiana, A. (2012). Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. <i>FEMS microbiology ecology</i>, 80(3), 534-547.  <a href="https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01315.x">https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01315.x</a></p>
<b>(Boukhatem, 2016)</b>	<p>Boukhatem, Z. F., Merabet, C., Bekki, A., Sekkour, S., Domergue, O., Dupponois, R., &amp; Galiana, A. (2016). Nodular bacterial endophyte diversity associated with native Acacia spp. in desert region of Algeria. <i>African Journal of Microbiology Research</i>, 10(18), 634-645.  <a href="https://dx.doi.org/10.5897/AJMR2015.7678">https://dx.doi.org/10.5897/AJMR2015.7678</a></p>
<b>(Bourebaba, 2016)</b>	<p>Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Ahnia, H., Boulila, A., Temprano, F., ... &amp; Rey, L. (2016). Diversity of Bradyrhizobium strains nodulating Lupinus micranthus on both sides of the Western Mediterranean: Algeria and Spain. <i>Systematic and applied microbiology</i>, 39(4), 266-274.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.04.006">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.04.006</a></p>
<b>(Chahboune, 2011)</b>	<p>Chahboune, R., Barrijal, S., Moreno, S., &amp; Bedmar, E. J. (2011). Characterization of Bradyrhizobium species isolated from root nodules of Cytisus villosus grown in Morocco. <i>Systematic and Applied Microbiology</i>, 34(6), 440-445.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.04.008">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.04.008</a></p>
<b>(CHAÏCH, 2018)</b>	<p>CHAÏCH, K. (2018). <i>Diversité des</i></p>

	<p><i>associations Rhizobium-Légumineuses de quelques espèces spontanées du Sahara septentrional</i> (Doctoral dissertation).  <a href="http://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/handle/123456789/17779">http://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/handle/123456789/17779</a></p>
<b>(Farida, 2009)</b>	<p>Farida, B., Géraldine, D., Abdelghani, B., Djellali, B., Said, B., &amp; Gisèle, L. (2009). Retama species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the Bradyrhizobium genus. <i>Systematic and Applied Microbiology</i>, 32(4), 245-255.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.01.005">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.01.005</a></p>
<b>(Mérabet, 2010)</b>	<p>Mérabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., ... &amp; De Lajudie, P. (2010). Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from Lotus arabicus (Senegal), Lotus creticus, Argyrolobium uniflorum and Medicago sativa (Tunisia) and description of Ensifer numidicus sp. nov. and Ensifer garamanticus sp. nov. <i>International journal of systematic and evolutionary microbiology</i>, 60(3), 664-674.  <a href="https://doi.org/10.1099/ijs.0.012088-0">https://doi.org/10.1099/ijs.0.012088-0</a></p>
<b>(Sakrouhi, 2016)</b>	<p>Sakrouhi, I., Belfquih, M., Sbabou, L., Moulin, P., Bena, G., Filali-Maltouf, A., &amp; Le Quéré, A. (2016). Recovery of symbiotic nitrogen fixing acacia rhizobia from Merzouga Desert sand dunes in South East Morocco—Identification of a probable new species of Ensifer adapted to stressed environments. <i>Systematic and applied microbiology</i>, 39(2), 122-131.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.01.001">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.01.001</a></p>
<b>(Siallagan, 2020)</b>	<p>Siallagan, Z. L., Retnaningrum, E., &amp; Prijambada, I. D. (2020, September). Symbiotic performance of several leguminous plants with legume nodule bacteria isolated from siratro (<i>Macroptilium atropurpureum</i>) at</p>

	<p>Mount Merapi Eruption, Indonesia. In <i>AIP Conference Proceedings</i> (Vol. 2260, No. 1). AIP Publishing.  <a href="https://doi.org/10.1063/5.0015969">https://doi.org/10.1063/5.0015969</a></p>
<p><b>(Soufiane, 2021)</b></p>	<p>Soufiane, A., Lamin, H., Bennis, M., Bouhnik, O., Lamrabet, M., El Hachimi, M. L., ... &amp; El Idrissi, M. M. (2021). Characterization of <i>Retama sphaerocarpa</i> microsymbionts in Zaida lead mine tailings in the Moroccan middle Atlas. <i>Systematic and Applied Microbiology</i>, 44(3), 126207.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126207">https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126207</a></p>



## Annexes

## ❖ Solution nutritive en g/l (Fâhraeus, 1957):

CaCl <sub>2</sub> 0.10		
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.12	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.15	
Citratede fer	0.005	
Microéléments	1ml	

## ❖ Solution micro éléments g/l:

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86	
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	2.03	
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.22	
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.08	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.14	

Le Ph ajusté à 6.8 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20

### Résumé

*Dans cette étude, nous avons examiné plusieurs travaux de recherche pour étudier l'importance des rhizobiums symbiotiques des légumineuses spontanées.*

*Tests de nodulation ont révélé que les rhizobiums présentent une forte capacité à infecter leurs plantes hôtes ainsi que d'autres plantes par conséquent on peut l'utiliser comme biofertilisant pour l'enrichissement du sol en azote et la restauration des sols dégradés.*

**Mots-clés:** *Genista, légumineuses, rhizobium, nodulation*

### Abstract

*In this study, we examined several research works to study the importance of symbiotic rhizobia of wild legumes. Nodulation tests revealed that rhizobia have a strong ability to infect their host plants as well as other plants. Consequently, they can be used as biofertilizers for soil nitrogen enrichment and the restoration of degraded soils. **Keywords:** Genista, legumes, rhizobia nodulation*

### ملخص

في هذه الدراسة، قمنا بفحص العديد من الأبحاث لدراسة أهمية العقدين التكافليين للبقوليات البرية. كشفت اختبارات تكوين العقد أن العقدين لديهم قدرة قوية على إصابة نباتاتهم المضيفة وكذلك النباتات الأخرى. وبالتالي، يمكن استخدامها كأسمدة حيوية لاثراء التربة بالنيتروجين واستعادة التربة المتدهورة.

**الكلمات المفتاحية:** *Genista, rhizobia, nodulation*

