

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Ecologie et Environnement
Spécialité : *Ecologie Microbienne*

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

**Caractérisation des endophytes chez les légumineuses:
la Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) et la fève (*Vicia faba* L.).**

Présenté par : BOUKELOUA Cheima
BENOUADEN Chahinez

Le 22/06/2023

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme GACI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Encadreur : Mr BENHIZIA Yacine (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur : Mr CHABBI Rabah (MAA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2022- 2023

Remerciements

Nous voudrions avant toute chose remerciée ALLAH le tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude, ainsi que notre plus grand respect au Pr. BENHIZIA Yacine qui a assuré la direction de notre mémoire. Merci de nous avoir permis de terminer nos études dans de si bonnes conditions.

Un grand merci aux membres du jury: Mr CHABBI Rabah (MAA - Université Frères Mentouri, Constantine 1). et Mme GACI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).d'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail.

Nous n'oublions pas d'adresser nos remerciements à Mme Benlahrache Nour Houda , l'ingénieur du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire pour son aide et sa patience et sa gentillesse.

Nous remercions particulièrement l'équipe du laboratoire, et surtout les doctorants Mme Souada Ibtihaje , Mlle Boutadjine Hibat Allah , Mme Tir Radja Pour leur assistance ainsi que l'expérience enrichissante qu'ils nous on fait vivre durant cette période.

Dédicaces

Je dédie ce travail:

A mes très chères parents, en témoignage de ma reconnaissance pour leur amour, soutien et encouragement. Je n'oublierai jamais leurs patiences et compréhension envers moi, et l'aide qu'ils m'ont portée pour faciliter la tâche. Que Dieu les garde et protège.

A mes chers frères : Ibrahime , Seif eldine , Abd elnoure

A mes chères sœurs Lilia et Hadjer

Egalement je dédie ce travail à mes adorables amies: Besma et Nardjese

chahinez

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A la mémoire de mon père disparu trop tôt.

A la lumière de mes jours, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers, la flamme mon coeur, ma vie et mon bonheur ; Maman que j'adore

A mon cher frère mon exemple éternel, mon soutien moral Et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir

walid

A mes chers très sœurs Assia, Hadjer pour l'amour, la tendresse et surtout leur présence dans des moments les plus difficiles.

A mes neveux Mohamed, Djoud qui me donnent l'amour et la vivacité.

A mes grands parents

A mes proches . Ilhem . Besmala

A mes adorables amies.

A tous mes enseignants que je leurs préserve beaucoup de respect et de considération.

A tous ceux qui m'ont soutenu et qui me soutient encore.

cheima

Résumé

Ce travail a été réalisé dans le but de mettre en évidence les bactéries isolées à partir des nodules racinaires de deux plantes légumineuses à savoir *Hedysarum coronarium* L. et *Vicia faba* L., poussant dans la région Est de l'Algérie dans wilaya de Constantine. Les isolats sont identifiés par une approche morphologique suivie d'une série de tests phénotypiques qui regroupe des analyses biochimiques et physiologiques. A travers les différents résultats obtenus dans cette étude et qui sont basés sur des critères morphocultureaux. Nous pouvons inclure nos isolats parmi les bactéries possédant les caractères des rhizobia nodulant les légumineuses .

Mots clés: Caractérisation, Nodule, Rhizobia, *Hedysarum coronarium* L., *Vicia faba* L.

Abstract

This work was carried out to identify bacteria isolated from root nodules of two leguminous plants, *Hedysarum coronarium* L. and *Vicia faba* L., growing in the eastern region of Algeria in the wilaya of Constantine. Isolates were identified using a morphological approach, followed by a series of phenotypic tests involving biochemical and physiological analyses. The results obtained in this study are based on morpho-cultural criteria. We can include our isolates among the bacteria possessing the characters of rhizobia nodulating legumes.

Key words: characterization, Nodule, Rhizobia, *Hedysarum coronarium* L., *Vicia faba* L.

ملخص

يتم تنفيذ هذا العمل من أجل تسليط الضوء على البكتيريا المعزولة من العقيدات الجذرية لنباتين من البقوليات *Hedysarum coronarium* L., *Vicia faba* L. اللتان تنموان في لمنطقة الشرقية من الجزائر في ولاية قسنطينة

يتم تحديد العزلات من خلال نهج مورفولوجي متبوعا بسلسلة من اختبارات النمط الظاهري التي تشمل التحليلات البيوكيميائية والقيسولوجية من خلال النتائج المختلفة التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة والتي تستند إلى المعايير المورفولوجية . يمكننا تضمين عزلتنا ضمن البكتيريا المكونة للعقد الجذرية للباقوليات

الكلمات المفتاحية : الوصف ،العقد ،الجذرية ، *Vicia faba* L., *Hedysarum coronarium* L.

Liste des abréviations

N₂ :	Diazote
NH₃ :	Ammoniac
DBF :	Données de base pour la fumure
DO :	Densité Optique
FN :	Facteur Nod
CaCl₂ :	Chlorure de Calcium
HgCl₂ :	Chlorure de mercure
HCl :	Chlorure d'hydrogène
YMA :	Yeast Mannitol Agar
YMB :	Yeast Mannitol Broth
RC :	Rouge Congo
TY :	Tryptone-Yeast
TYA :	Tryptone-Yeast Agar
KNO₃ :	Nitrate de potassium
CMC :	Carboxy-Méthyle-Cellulose
NaCl :	Chlorure de sodium
L. :	De Litardière

Liste des Figures

Figure 1. Arbre des grands groupes phylogénétiques des eubactéries basé sur les séquences d'ADNr 16S. Les groupes fixateurs d'azote sont indiqués par N.....	05
Figure 2. Phylogénie des Leguminosae d'après l'analyse des séquences du gène chloroplastique <i>rbcl</i> . Les trois sous-familles <i>Papilionoideae</i> , <i>Caesalpinioideae</i> et <i>Mimosoideae</i>	07
Figure 3. <i>Hedysarum coronarium</i>	09
Figure 4. Tige fleurie du <i>Sulla</i> de nord (<i>Hedysarum coronarium</i> L.) avec les différentes parties de la fleur et de la gousse	10
Figures 5. Caractères botaniques du <i>Vicia Faba</i>	13
Figure 6. La nodule.....	19
Figure 7. Interaction entre le <i>Rhizobium</i> et sa plante hôte	20
Figure 8. Représentation schématique des fonctions des flavonoïdes biologiquement actifs médiant diverses communications biologiques dans la rhizosphère. Les cercles roses représentent les nodules	21
Figure 9. Schéma montrant la diversité des facteurs Nods (FNs)	22
Figure 10. Les différents stades de la formation des nodosités de type déterminé (les stades de 1 à 4) et indéterminé (les stades de i à iv)	24
Figure 11. Localisation géographique de la zone de prélèvement.....	25
Figure 12. Les nodules racinaires.....	26
Figure 13. Conservation des nodules	27
Figure 14. Ensemencement par la méthode des quatre cadrans	28
Figure 15. Test de stérilisation des nodules de l'espèce <i>Vicia faba</i>	32
Figure 16. Test de stérilisation des nodules de l'espèce <i>Hedysarum coronarium</i>	33
Figure 17. Aspect macroscopique sur milieu YMA.....	34
Figure 18. Aspect macroscopique sur milieu YMA.....	34
Figure 19. Observation microscopique de la coloration de Gram (X100).....	35
Figure 20. Réduction des nitrates.....	37
Figure 21. tests de l'urée.....	38
Figure 22. Activité cellulolytique <i>Hedysarum coronarium</i> et <i>Vicia faba</i>	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie des Rhizobia.....	16
Tableau 2. Croissance sur NaCl.....	39
Tableau 3. Test de croissance sur différentes températures.....	40
Tableau 4. Test de tolérance au variations du pH.....	41

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
1. La fixation biologique de l'azote atmosphérique	3
1-1 Description du processus	3
1-2 Diversité des microorganismes fixateurs d'azotes.....	3
1-2-1 Les fixateurs symbiotiques	3
1-2-2 Les fixateurs libres	4
2. Légumineuse	5
2-1 Description.....	5
2-2 La Diversité des légumineuses	6
2-2-1 <i>Caesalpinioideae</i>	6
2-2-2 <i>Papilionoideae</i>	6
2-2-3 <i>Mimosoideae</i>	6
2-3 Intérêt des légumineuses	7
3. Le genre <i>Hedysarum coronarium</i> (Sulla)	8
3-1 Description du genre <i>Sulla</i>	8
3-2 Description morphologie	9
3-3 Description géographique.....	10
3-4 Taxonomie du genre <i>Sulla</i>	10
3-5 <i>Sulla</i> en Algérie	11
4. Le genre du <i>vicia faba</i>	12
4-1 Description du genre <i>vicia faba</i>	12
4-2 Description morphologie	12
4-3 Description géographique	13
4-4 Taxonomie du genre <i>vicia faba</i>	13
4-5 <i>Vicia faba</i> en Algérie	14
5. Rhizobia	15
5-1 Généralité	15
5-2 Classification	15
5-3 Les caractéristiques des Rhizobia.....	17
5-3-1 Les caractères morphologiques.....	17
5-3-1-1 Forme végétative.....	17

5-3-1-2 La forme bactéroïde.....	17
5-3-2Caractères biochimiques.....	17
5-3-3 Caractères physiologiques.....	18
5-3-4 Caractères cultureux.....	18
5-3-5 Caractères génétiques.....	18
6. Interaction Rhizobium légumineuses.....	18
7. Nodulations.....	19
7-1 Préinfection.....	20
7-1-1 Les flavonoïdes.....	21
7-1-2 Facteur nod.....	21
7-2 Infection.....	22
7-2-1 Infection intercellulaire.....	22
7-2-2 Infection intracellulaire.....	23

Chapitre II: Matériel et Méthodes

Objectif.....	25
1. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	25
1-1 Description de la zone d'étude.....	25
1-2 Collecte des nodules.....	25
1-3 Conservation des nodule.....	26
1-4 Isolement des bactéries à partir des nodules.....	27
1-5 Stérilisation des nodules.....	27
1-5-1 Test de sterilisation.....	28
1-5-2 Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés.....	28
2. Caractères morphologiques et cultureux.....	29
2-1 Les milieux de culture utilisés.....	29
2-2 Purification des isolats.....	29
2-3 Examens microscopiques.....	29
2-3-1 Coloration de Gram.....	29
2-4 Absorption du Rouge de Congo.....	30

3. Caractérisation phénotypique des isolats	30
3-1 Les tests biochimiques.....	30
3-1-1 Réduction des nitrates.....	30
3-1-2 Hydrolyse de l'urée.....	30
3-1-3 Activité cellulolytique.....	30
3-2 Les tests physiologiques.....	31
3-2-1 Effet de pH.....	31
3-2-2 Tolérance au NaCl.....	31
3-2-3 Effet de la température.....	31

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Test de stérilisation	32
2. Caractères morphologiques et culturaux	33
2-1 Croissance sur YMA.....	33
2-2 Croissance sur YMA+ RC.....	34
3. Coloration de Gram	35
4. Caractérisation phénotypique des isolats	35
4-1 Tests biochimiques.....	35
4-2 Réduction de nitrate.....	36
4-3 Hydrolyse de l'urée.....	37
4-4 Activité cellulolytique.....	38
5. Testes physiologiques	39
5-1 Teste de tolérance à l'NaCl.....	39
5-2 Effet de la température.....	40
5-3 Effet de PH.....	40
Conclusion	42
Références Bibliographiques	44
Annexe	53

Introduction

Introduction

L'azote est le premier élément minéral limitant la croissance des plantes, car les seules formes assimilables sont présentes en faible quantité dans les sols. La majeure partie de l'azote se trouve sous forme de diazote atmosphérique, mais seules quelques espèces de procaryotes ont la possibilité de l'utiliser pour leur nutrition azotée (Peret, 2007). La fixation de l'azote est essentielle pour le maintien de la vie et le développement de la société, cependant, l'énergie de dissociation de la liaison et la non-polarité de la triple liaison constituent un défi considérable (Liu et al., 2022).

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille botanique des Fabacées, qui représente la troisième famille de plante par le nombre d'espèces, après les Astéracées et les Orchidées (Schneider et al., 2015). Elles constituent une famille très importante de plantes à fleurs herbacées ou arborées, les Fabacées représentées par plus de 7 000 espèces dans le monde (Vertès et al., 2010), elles sont caractérisées par des fleurs papilionacées, une gousse contenant des graines (Schneider et al., 2015). Pendant des siècles les légumineuses (*Fabaceae*) ont été utilisées dans les rotations des cultures pour intégrer l'azote dans les systèmes agricoles, évitant ainsi le besoin de fertilisation azotée (Geddes et al., 2015).

La fixation symbiotique de l'azote utilise l'énergie solaire pour réduire le gaz inerte N_2 en ammoniac à une température et une pression normales (Lindström et Mousavi, 2019), les légumineuses ont la capacité unique de fixer l'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium*. Cette association symbiotique coûteuse en énergie pour la plante, n'a lieu qu'en situation de faible disponibilité en azote minéral (Guinet et al., 2019). Les rhizobia vivent alors sous une forme libre dans le sol mais ne peuvent fixer l'azote que lors d'associations symbiotiques avec une plante hôte. Au cours de l'interaction symbiotique, les rhizobiums induisent la formation de structures végétales spécialisées, appelées nodules (Sprent et al., 2017).

La fève (*Vicia faba* L.) est une légumineuse à grains largement cultivée dans les zones tempérées pour l'alimentation humaine et animale (Rubiales et al., 2022). est l'une

des premières plantes à avoir été domestiquée, au cours de la période néolithique. Il n'est donc pas surprenant que cette culture ait été largement utilisée, y compris à l'époque classique par les peuples celtes et les légions romaines dans toute l'Europe et l'Afrique du Nord (Belhadi et *al.*, 2017). Il forme généralement une association symbiotique efficace avec *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae*, qui est un symbiote spécifique aux légumineuses de la tribu des vicieuses (Allito et *al.*, 2020).

Hedysarum coronarium L. est un membre de la tribu *Hedysareae*, sous-tribu *Euhedysarinae* dont l'aire de répartition naturelle dans le bassin méditerranéen. Cette plante est connue sous les noms vernaculaires de *Sulla*, sainfoin espagnol (Razika et *al.*, 2012). C'est une fabacée fourragère bisannuelle à pérenne, endémique des sols argilo-calcaires. La *Sulla* peut bénéficier d'une fixation biologique de l'azote atmosphérique si le microsymbiote spécifique est présent dans le sol (Sana et *al.*, 2012).

Ce présent travail repose sur un isolement et une caractérisation phénotypique des bactéries isolées à partir des nodules racinaires des légumineuses. La première est une plante fourragère sauvage *Hedysarum coronarium* L. et la deuxième est une plante cultivée *Vicia faba* L.

Nous avons effectué une caractérisation morphologique des isolats, suivie d'une caractérisation phénotypique (tests biochimiques et physiologiques).

Ces derniers sont réalisés selon le plan suivant :

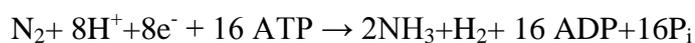
- isoler les bactéries à partir des nodules.
- étudier morphologiquement et microscopiquement les isolats.
- Caractériser phénotypiquement les isolats en réalisant une série de tests physiologiques et biochimiques.

Revue
Bibliographique

1. La fixation biologique de l'azote atmosphérique

1-1 Description du processus

La fixation biologique de l'azote représente aujourd'hui à l'échelle mondiale un apport environ 1,5 fois supérieur à celui des engrais. Elle est estimée à environ 195 millions de tonne d'azote par an (Smil, 2002). Et constitue la voie d'entrée majeure de l'azote dans la majorité des écosystèmes (Galloway et *al.*, 2004). L'azote est un élément essentiel. Tout en étant le plus contraignant dans l'écosystème et pour la production végétale malgré la contribution importante des engrais synthétiques. Les besoins en azote pour la production alimentaire augmentent d'année en année (Soumare et *al.*, 2020). C'est un élément chimique fondamental pour les organismes vivant, on le retrouve dans de nombreux biomolécules telles que les acide aminés constituent les protéines les acides nucléiques qui portent l'information génétique et dans de nombreux autres composés organiques indispensables à la vie (Alunni et *al.*, 2017). En effet la croissance des plantes dépend de la disponibilité dans le sol d'azote sous une forme utilisable qu'il soit oxydé ou réduit, minérale ou organique. C'est élément est des plus abondant sur terre constituant près de 80% de l'atmosphère présente sous forme diazote gazeux(N₂). Une forme chimiquement très stable et inutilisable par la plupart des organismes vivants (Alunni et Mergaert, 2017). L'azote est un nutriment vital pour la croissance et la productivité des plantes. Différents microorganismes de la rhizosphère assurent une fixation biologique de l'azote et le transforment en ammoniac, forme assimilable par la plante à l'aide d'un système enzymatique complexe connu sous le nom de nitrogénase (Sathya et *al.*, 2017). Le bilan de la réaction de fixation biologique de l'azote est comme suit :



1-2 Diversités des microorganismes fixateurs d'azotes

Les bactéries fixatrices d'azote sont classiquement réparties en deux groupes : les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques (Fig. 1).

1-2-1 Les fixateurs symbiotiques

La fixation symbiotique de l'azote est le processus biologique qui permet de convertir l'azote de l'aire (N₂) en azote minéral (NH₃) assimilable par les organismes vivants pour constituer leur molécules organiques (notamment les protéines), cette symbiose est effectuée chez les légumineuses grâce à des bactéries du sole (*Rhizobium*)

qui sont intégrées au sein des excroissances spécifiques des racines (les nodosités) (Vertès et *al.*, 2015). Il y'a plusieurs associations fixatrice d'azote, elles englobent principalement une association entre espèce bactériennes et les légumineuses. Dans l'association symbiotique, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérienne le symbionte (Hopkine et *al.*, 2003). Les symbioses les plus étudiées jusqu'à présent sont essentiellement celles en relation avec les légumineuses (plantes associées aux *Rhizobium*), comme les oléoprotéagineux (arachide et soja), les protéagineux (pois), Les espèces vivriers (haricote) et les plantes fourragères (trèfle et luzerne) (Dommergues et *al.*, 1999).

La fixation biologique de l'azote N_2 est un processus biologique étroitement régulé par la plante en fonction de la teneur en azote minérale du sol (Schneider et *al.*, 2015). De nombreuses espèces de légumineuse peuvent entrer dans une relation symbiotique avec les bactéries des nodules racinaire. Les légumineuses appartiennent à l'ordre des fabales, famille des légumineuse (ou fabaceae) (Franche et *al.*, 2009). Il y'a un autre type de plantes qui entrent dans une relation symbiotique, les plantes actinorhiziennes qui sont des plantes non légumineuses et appartiennent à huit familles et 24 genres d'angiospermes. Elles forment des nodules racinaires du fait de leur interaction symbiotique avec *Frankia* (Laplaze, 1999). Ces dernières sont des bactéries filamenteuses sporulantes Gram positif (Franche et *al.*, 2009).

1-2-2 Les fixateurs libres

Les bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique sans être en association symbiotique, sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ou d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de certains animaux (Hopkins, 2003). L'estimation de taux de fixation d'azote par les bactéries du sol est de l'ordre d'environ de 1 Kg par hectare (Elmerich, 1993). Comprennent des genres variés : *Azotobacter* (Becking, 2006), bactéries aérobies *Acetobacter* (Gillis et *al.*, 1989), *Azospirillum* (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000), ou bactéries anaérobies strictes *Clostridium* (Asami et Kiwamu, 2006), aérobies facultatives *Klebsiella* (Chelius et Triplett, 2000), *Pseudomonas* (Yan et *al.*, 2008), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique *Rhodobacter* (Masepohl et *al.*, 2005), et *Rhodopseudomonas* (Wang et Noren, 2006), des cyanobactéries (Algues bleuvert) comme *Anabaena* (Allen et Arnon, 1955) et *Nostoc* (Meeks et Elhai, 2002).

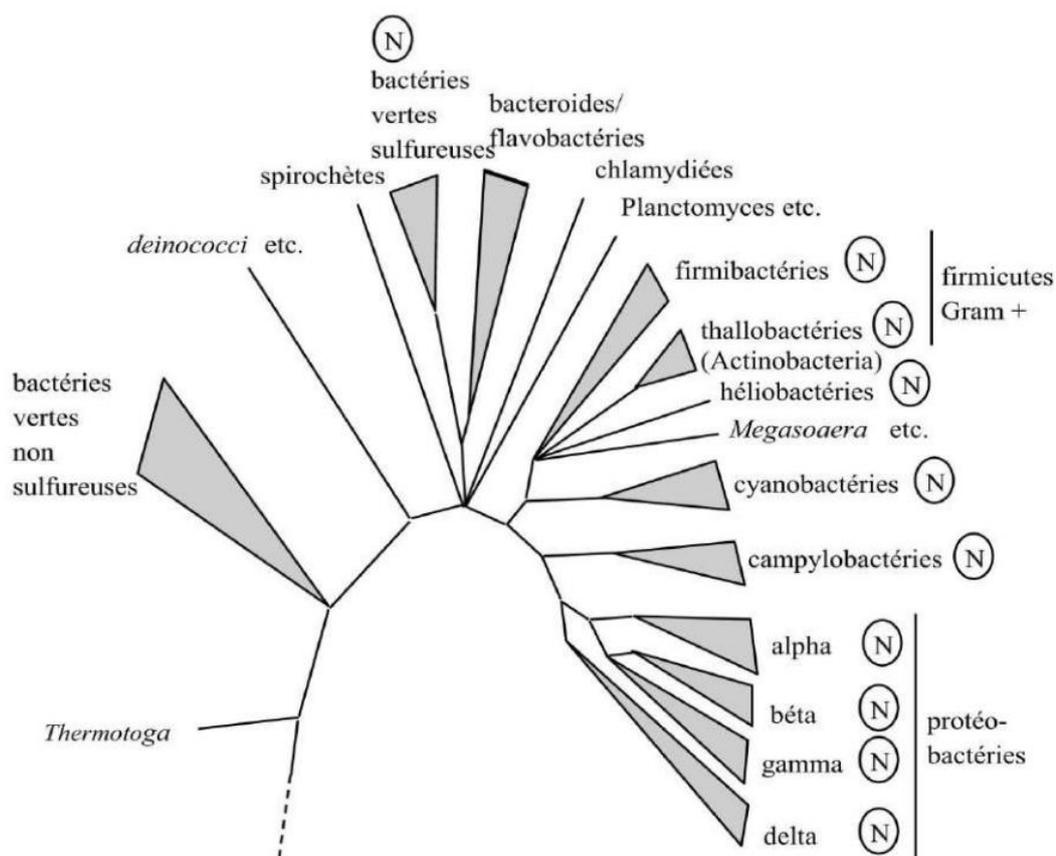


Figure 1. Arbre des grands groupes phylogénétiques des eubactéries basé sur les séquences d'ADNr 16S (d'après Young, 1992). Les groupes fixateurs d'azote sont indiqués par N.

2. Les Légumineuses

2-1 Description

Les légumineuses présentent un énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées rhizobiums. Grâce à cette association symbiotique, les légumineuses participent à la revégétalisation des écosystèmes pauvres en azote (Giraud, 2007). En effet l'azote fixé et l'azote total mobilisé par les légumineuses peuvent à la limite être des indicateurs pertinents si la biomasse des légumineuses est totalement recyclée dans le sol. Même quand elles ne sont pas exportées (Bado, 2002). Les légumineuses dans l'interculture peuvent améliorer l'efficacité du cycle de l'azote. Les données de base pour la fumure DBF indiquent une réduction de 20 à 30 kg N/ha de la fumure d'une culture suivant un engrais vert à base de légumineuses. En outre, l'efficacité de fixation d'azote varie entre les principales espèces cultivées (Gebhard, 2013) et permettent ainsi de réduire les amendements avec des engrais azotés. Au-delà de cet aspect agronomique, certaines espèces de plantes non cultivées et d'arbres de la famille

des légumineuses sont aussi d'un grand intérêt dans les écosystèmes naturels (Graham et Vance, 2003).

2-2 La Diversité des légumineuses

Les légumineuses ou *Fabaceae* sont classées parmi les angiospermes eudicotylédones à gousses (Sprent, 1995), représentent la troisième famille des Angiospermes, derrière les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* avec plus de 700 genres et près de 20 000 espèces (Lewis et al., 2005). Elle est classée en trois sous-familles en se basant principalement sur les différences morphologiques de leurs fleurs (Allen et Allen, 1981). *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae* (Doyle et Luckow, 2003)(Fig. 2).

2-2-1 *Caesalpinioideae*

Cette sous-famille contient environ 150 genres et 2250 espèces au sein de 4 tribus. Principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales d'Afrique. Actuellement seul 23 % des espèces testées sont connues pour être nodulées par les rhizobies. Ces espèces se retrouvent dans les tribus des *Caesalpinieae* et *Cassieae*. Les tribus *Cercideae*, *Detareae* et *Amherstieae* sont très peu nodulées (Fariae et al., 1989).

2-2-2 *Papilionoideae*

Cette sous-famille est très cosmopolite et compte environ 14000 espèces divisées en 476 genres de légumineuses tropicales et tempérées. Les *Papilionoideae* sont réparties en deux grands groupes de plantes cultivées : les légumineuses tempérées (ou Galegoïdes) comme les genres *Pisum* (pois), *Cicer* (pois chiche), *Melilotus* (mélilots), *Lens* (lentilles), *Medicago* (luzerne), *Lotus* (lotier), *Trifolium* (trèfle) et *Vicia* (vesce). Les légumineuses tropicales (ou *Phaseoloïdes*) comme notamment les genres *Cajanus*, *Phaseolus* (haricot) et *Glycine* (soja) (Doyle et Luckow, 2003). Elle est aussi la plus grande des trois sous-familles contenant 28 tribus (Wojciechowski et al., 2004).

2-2-3 *Mimosoideae*

Elles sont composées surtout des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux, cette sous-famille renferme 77 genres et 3000 espèces (Doyle et Luckow, 2003). Elle compte également 4 tribus et elle est présente dans les régions subtropicales d'Afrique, d'Amérique, d'Asie et d'Australie (Fariae et al., 1989). Leurs fleurs sont sous forme de pompons, les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd et al., 2001).

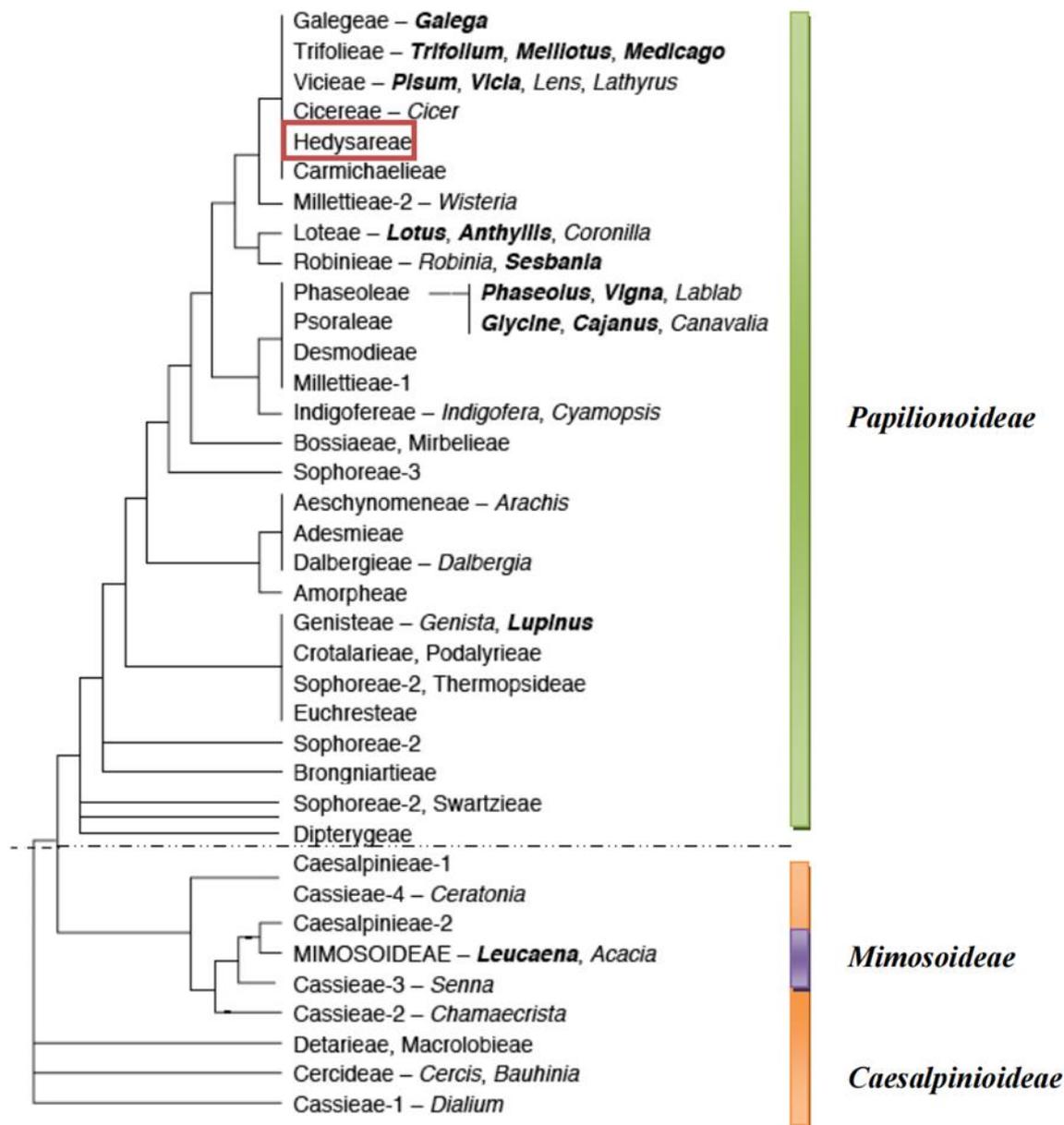


Figure 2. Phylogénie des Leguminosae d’après l’analyse des séquences du gène chloroplastique *rbcl* (Doyle et al. 1998). Les trois sous-familles *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae*.

2-3 Intérêt des légumineuses

Les légumineuses tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l’agronomie, la génétique, l’entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin et al., 2001). Compte tenu de la demande mondiale croissante en matière de production alimentaire et de la nécessité de réduire les émissions de carbone, il est prévu le recours à la fixation biologique de l’azote comme solution de remplacement des engrais azotés (Black et al., 2012). Leur intérêt agronomique provient en premier lieu

de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Lévêque et Mounoulou, 2001).

La fixation biologique de l'azote peut réduire l'utilisation de combustibles fossiles et peut être utile pour le reboisement et la restauration des terres mal exploitées afin qu'elles redeviennent productives (Reeve et *al.*, 2010). Outre leur rôle dans le cycle de l'azote, la production de légumineuses interagit avec d'autres cycles biogéochimiques. En effet, cette symbiose fournit l'azote nécessaire pour la croissance et le développement des plantes et permet, à la fois d'enrichir le sol en matière organique et d'épargner les engrais azotés par l'exploitation d'un processus naturel (Farissi et *al.*, 2014).

3. Le genre *Hedysarum coronarium* (*Sulla*)

3-1 Description du genre *Sulla*

Hedysarum coronarium L. ou « *Sulla* (Légumineuse, Papilionacée) est une plante herbacée annuelle. Elle présente un régime de reproduction préférentiellement allogame (Chriki et *al.*, 1982). La *Sulla* est légumineuse de pâturage pérenne de courte durée, qui présente une tolérance environnementale particulière, notamment à l'égard de conditions stressantes telles que l'alcalinité du sol, la salinité et la sécheresse. Les qualités de son fourrage, caractérisé par une haute teneur en protéine, ont permis à la *Sulla* d'être largement cultivée dans l'ensemble du bassin méditerranéen (Muresu et *al.*, 2019) et est l'une des plus importantes légumineuses naturelles. Elle est utilisée au sud de l'Italie et en Sicile comme foin, ensilage et fourrage vert (Issolah et *al.*, 2012)(Fig. 3).



Figure 3. *Hedysarum coronarium*.

3-2 Description morphologique

Au stade plantule, les cotylédons du *Sulla* sont ovales, arrondis, presque sessiles de dimensions 10 x 7,8 mm et glabres. Les trois ou quatre premières feuilles sont longuement pétiolées, entières, orbiculaires ou elliptiques (Ben jeddi, 2005).

Le plus souvent dressée, 30-150 cm de haut avec des tige épaisse succulent qui deviennent légèrement ligneuses après la floraison, les feuilles sont composées de 7 à 15 paires de foliole ovales (pennées) avec une seule foliole terminale des racèmes de 10 à 35 fleurons généralement pourpre vif, leur gousses segmenté brunes avec une surface rugueuse et épineuse, leur racine pivotante profonde et ramifiée (jusqu'à 2m) (Moore et *al.*, 2006).

La graine est réniforme ou discoïde avec un tégument lisse et luisant et uniformément coloré en jaune clair parfois noir; il brunit en vieillissant (Ben jeddi, 2005) (Fig. 4).

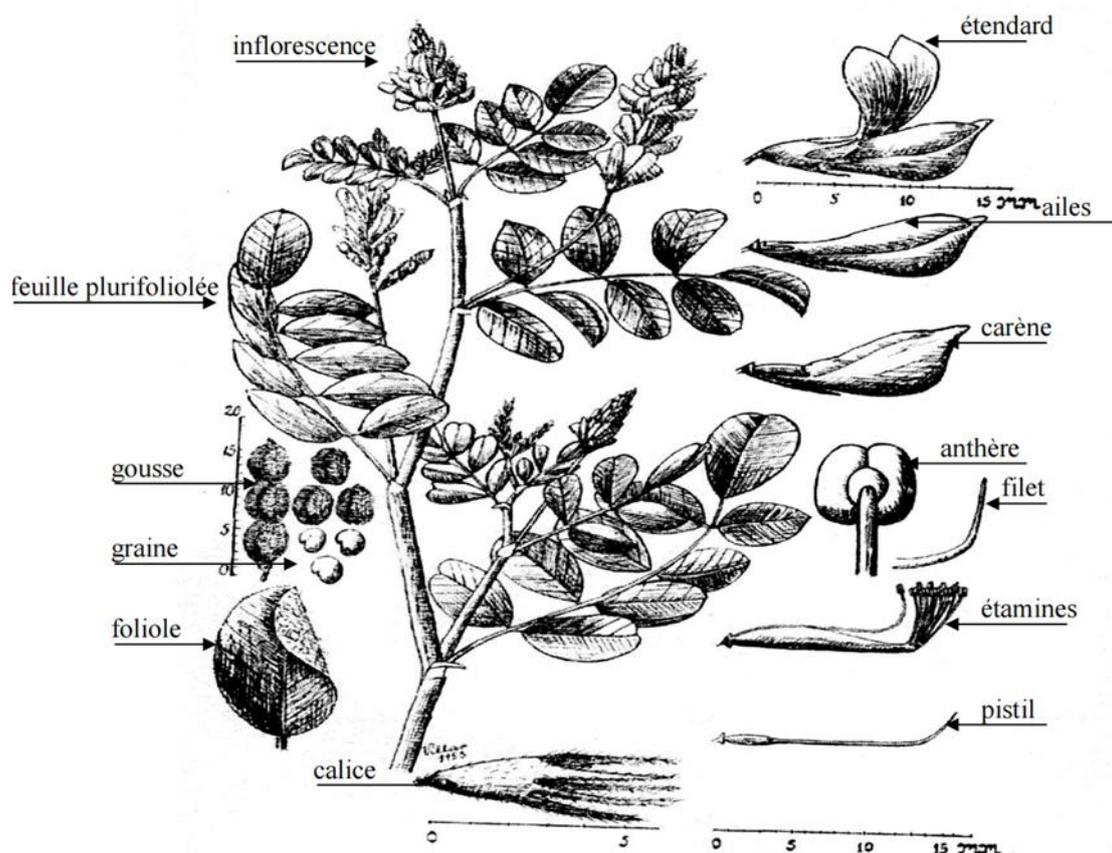


Figure 4. Tige fleurie du *Sulla* de nord (*Hedysarum coronarium* L.) avec les différentes parties de la fleur et de la gousse (Villax, 1963).

3-3 Description Géographique

Hedysarum coronarium L. ($2n = 16$), légumineuse connue sous le nom vulgaire de Sulla ou sainfoin d'Espagne, est une espèce fourragère. Dans les endroits où la *Sulla* pousse spontanément, les plantes, malgré des caractéristiques agronomiques limitées (port rampant, rendement fourragère faible...) (Trifi-Farah et al., 1989), à l'état spontané cette espèce présente une large aire de répartition géographique; Elle est distribuée du nord de l'Afrique au sud de l'Espagne en passant par l'Italie du sud (Squartini et al., 2002), en Algérie aussi le Sulla est présente à l'état spontané en région nord-est (Abdellguerfi-Berrekia, 1985). En Tunisie d'après l'étude écogéographique réalisée par Zoghلامي et Hassen (2004) la Sulla occupe une aire de répartition assez large qui s'étend de l'humide jusqu'à l'étage semi-aride (250-450).

3-4 Taxonomie du genre *Sulla*

L'espèce *Hedysarum coronarium* L. appartient au genre *Hedysarum* appelée généralement " *Sulla* ", ce dernier fait partie de la tribu des *Hedysarées* de la sous famille des *Papilionacées* et de la famille des *Fabacées*. (Abdelguerfi-Laouar et al., 2002).

Chapitre I : Revue bibliographique

Selon Quezel et Santa (1962), Abdellaoui (2014), la position systématique de l'espèce *Hedysarum coronarium* L. est :

Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Rosales
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous famille	<i>Papillonaceae</i>
Tribu	<i>Hedysareae</i>
Genre	<i>Hedysarum</i>
Espèce	<i>Hedysarum coronarium</i> L.

3-5 *Sulla* en Algérie

L'Algérie renferme un réservoir génétiques à la fois diversifié et très intéressant en matière de ressources phylogénétiques d'intérêt fourrager et pastoral. Les premiers travaux d'autoécologie sur le genre *Hedysarum* en Algérie remontent à 1985 (Issolah, 2012) *Sulla coronaria* (L.) autrefois connu sous le nom d'*Hedysarum coronarium* L. est la fabacée pastorale naturelle la plus répandue dans le nord-est algérien et le bassin méditerranéen, notamment en France, au Portugal, en Espagne, en Italie et au Maghreb (Achichi et al., 2018). En Algérie, le genre *Hedysarum* L. présente neuf espèces dont *Hedysarum coronarium* L. Cette espèce est commune dans le Tell constantinois, très rare ailleurs (El Kantara, Alger, Oran) (Issolah et al., 2012).

Des prospections réalisées en 1998 ont permis de constater la large répartition du *Sulla* (*Hedysarum coronarium* L.) à travers le Nord Est algérien et ce, en termes de localisation biogéographique (littoral, atlas tellien, hautes plaines telliennes) et bioclimatique (humide chaud, sub-humide frais et chaud, à la limite inférieure du sub-

humide doux et la limite supérieure du semi-aride doux, à la limite inférieure du subhumide frais) (Issolah, 2012).

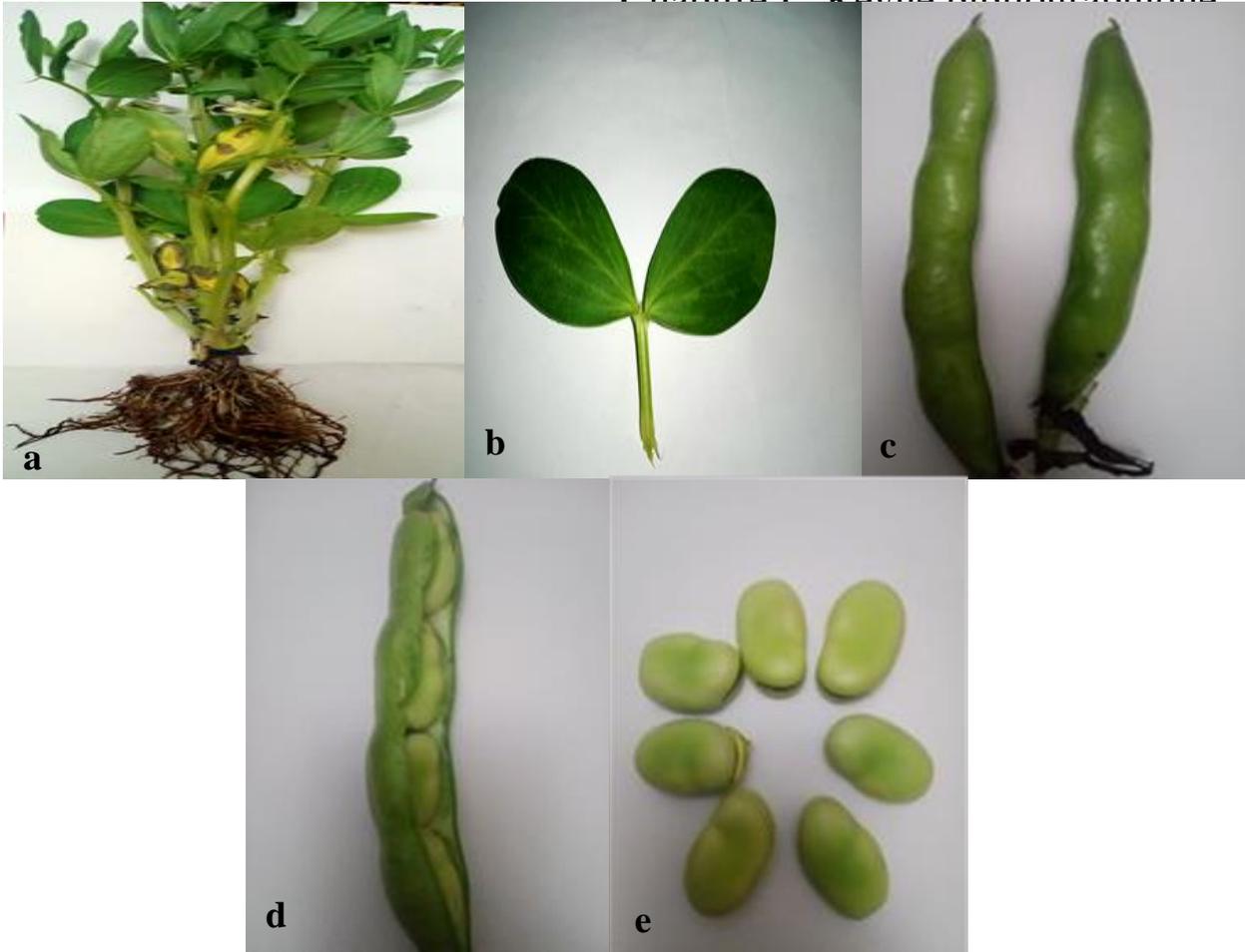
4. Le genre *Vicia faba*

4-1 Description du genre *Vicia faba*

La féverole (*Vicia faba* L.) membre de la famille des fabacées (khazaei et *al.*, 2021) est une plante dicotylédone cultivée (Jarso et Keneni, 2006). Une légumineuse nutritive tolérante à la fraîcheur, est largement cultivée dans le monde. L'intérêt s'est accru pour les avantages pour la santé et la nutrition des fèves et développement de différents aliments enrichis de biomolécules avec une fonctionnalité, une valeur nutritionnelle et des avantages pour la santé (Dhull et *al.*, 2022). La féverole est cultivée dans de nombreuses régions du monde en raison de sa valeur nutritionnelle élevée et de sa fixation biologique efficace de l'azote (Etemadi et *al.*, 2019).

4-2 Description Morphologie

Vicia faba L. est une plante annuelle d'une hauteur allant jusqu'à 1 mètre. Ses tiges sont dressées, quadrangulaires, assez robustes et ramifiées, elles atteignent 30 à 80 centimètres de haut. Ses feuilles sont épaisses (Jarso et Keneni, 2006). Les feuilles sont de couleur vert clair, ovales, entières. Elles sont composées et possèdent 2 à 8 folioles (Dominique, 2010). Cette plante produit des fleurs blanches, des gousses volumineuses et elle est plus ou moins dressées. Ces gousses sont vertes pendant leur formation et deviennent noires à maturité. En fonction des variétés, chaque gousse peut contenir de 4 à 8 grains (Bouard et *al.*, 1992). Elle porte des nodosités renfermant des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique (*Rhizobium leguminosarum*) (Leguen et Duc, 1992). D'après toujours les mêmes auteurs, les feuilles comportent deux folioles à la base de la tige puis 3 ou 4 par la suite. Les tiges présentent un nombre variable (de 5 à 10) de nœuds végétatifs à la base, puis un nombre également variable (de 7 à 25) de nœuds reproducteurs. Le bourgeon terminal est végétatif, plante à croissance indéterminée. (Leguen et Duc, 1992). Le fruit est une gousse large peut contenir un nombre assez variable de grains (4 à 9). La graine; large, aplaties, en forme de rognon, de couleur verte ou jaunâtre (Chaux et Foury, 1994)(Fig. 5).



Figures 5. Caractères botaniques du *Vicia Faba* (Boukeloua et Benouaden, 2023).
a- plante. b- feuille. c- gousse fermer. d- gousse ouverte et graine. e- graine.

4-3 Description Géographique

La féverole (*Vicia faba* L.) est l'une des cultures les plus anciennes au monde. A l'échelle mondiale c'est la troisième légumineuse fourragère la plus importante actuellement 58 pays produisent ce haricot (Singh, 2013). Elle est répartie principalement dans les régions de l'Asie occidentale aussi répandue en Europe, en Afrique et en Asie centrale, de plus elle a décentré de diversité secondaire en Éthiopie et en Afghanistan (Jarso et Keneni, 2006). Sa culture dans les pays du bassin méditerranée représente presque 25% de la surface totale cultivée et de la production mondiale de fèves (Saxena, 1991).

4-4 Taxonomie du genre *Vicia faba*

Vicia faba L. est une plante potagère de la famille des *Papilionacées* cultivée depuis la plus haute antiquité (Zaidi et Mahiout, 2012).

Selon Dajoz (2000), la classification de *Vicia faba* L. :

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Dialypétale
Série	Caliciflores
Ordre	Rosales
Famille	<i>Fabacées</i>
Sous-famille	<i>Papilionacées</i>
Genre	<i>Vicia</i>
Espèce	<i>Vicia faba</i> L.

4-5 *Vicia faba* en Algérie

La fève occupe la première place parmi les légumineuses en Algérie car elle a une valeur nutritionnelle élevée et des utilisations diverses. Elle est principalement cultivée dans les plaines et les régions sublittorales et joue un rôle important dans l'économie nationale et la production agricole. (Aouar-sadli, 2008). Mais la culture de la fève n'a bénéficié d'aucune amélioration dans sa conduite, ce qui explique en partie sa faible productivité. Dans certaines régions, en particulier, dans les plaines côtières et les plaines de l'intérieur (Bengouga, 2018). Occupe 43 000 hectares, soit 44,3 % de la superficie réservée aux légumineuses durant l'année 1994 (Bengouga, 2018). D'après toujours cet auteur, la production durant cette année était de 15 500 tonnes en grains secs, soit un rendement de 0,3 tonne par hectare. Comparativement au rendement moyen international, qui est 3 à 4 tonnes par hectare (Chaux et Foury, 1994).

Durant la période allant de 2005 à 2016 (MADR-DSASI), la culture des fèves n'a pas évolué en termes de superficie en occupant annuellement une moyenne de 35 163 ha.

Cependant, sa culture occupe la plus grande part des légumineuses alimentaires soit 46.21% des superficies qui lui y sont réservées. Par ailleurs, la production demeure insuffisante avec en moyenne 350 765 quintaux où les niveaux de rendement sont très faibles avec 9,92 q/ha en moyenne (Houassine, 2019).

5. Rhizobia

5-1 Généralité

Le terme «*Rhizobia* » est un terme générique donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les racines ou les tiges des Légumineuses hôtes, y compris la non légumineuse *Parasponia* (Trinick MJ et al. 1988). Qui possède la capacité de fixer L'azote atmosphérique lorsqu'il se retrouve en symbiose intracellulaire avec une plante compatible de la famille des légumineuses (Drouin, 1996).

Ces bactéries peuvent infecter les racines des légumineuses, entraînant la formation de grumeaux ou de nodules où la fixation de l'azote a lieu (Black et al., 2012). Sont des bactéries du sol en forme de bâtonnet à Gram négatif mobiles et non sporulantes (Jordan, 1984), et se différencient en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue à l'intérieur du nodule pour fixer l'azote (Perry et al., 2004)

Les rhizobia représentent une proportion relativement faible de l'ensemble des bactéries du sol. On estime que *Rhizobium* représentent entre 0,1 à 8,0 % de la population bactérienne totale du sol (Sadowsky et Graham, 1998).

5-2 Classification

Les rhizobia sont diversifié au cours des dernières années, leur classification a subi de grands changements en raison de l'apparition de nouvelles variétés de *Rhizobia*. Leur classification a subi de grands changements en raison de nouvelles données phylogénétiques et polyphasiques qui ont conduit à la description de nouveaux taxons (Zakhia et al., 2001).

Des études récentes ont montré l'existence d'une grande diversité parmi les bactéries fixatrices d'azote isolées de différentes légumineuses. Actuellement, plus de 98 espèces appartenant à 14 genres de α - et β - protéobactéries ont été décrites comme étant des rhizobia ((Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014). Ces espèces se répartissent également en sept familles (*Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Brucellaceae* et *Burkholderiaceae*) (Rao et al., 2018).(Tab1)

Tableau 1 : Taxonomie des *Rhizobia* (Rao et al., 2018).

Souches de <i>Rhizobium</i>	Plantes hôtes
Classe α-Proteobacteria	
I Ordre Rhizobiales	
I Famille Rhizobiaceae	
Genre <i>Rhizobium</i> (98)	<i>Lotus, Phaseolus, Astragalus, Sesbania, Medicago, Mimosa, Indigofera, Hedysarum, Medicago, Populus, Vicia, Lespedeza, Oryza, Albizzia, Kummerowia, Dalbergia, Caragana, Trigonella, Sphaerophysa, Oxytropis, Mung bean, Vigna, Rosa, Leucaena, Dalea, Clitoria, Siratro, Cowpea, Lemna, Calliandra, Pongamia, Arachis, Pueraria</i>
Genre <i>Ensifer</i> (anciennement <i>Sinorhizobium</i>) (18)	<i>Glycine, Sesbania, Acacia, Medicago, Prosopis, Kummerowia, Leucaena, Abrus, Lotus, Argyrolobium, Psoralea</i>
Genre <i>Allorhizobium</i> (1)	<i>Neptunia</i>
Genre <i>Shinella</i> (1)	<i>Kummerowia</i>
Genre <i>Pararhizobium</i> (1)	Tumeur des fruits (non-symbiotique)
II Famille Phyllobacteriaceae	
Genre <i>Mesorhizobium</i> (40)	<i>Lotus, Astragalus, Leucaena, Sesbania, Amorpha, Prosopis, Albizzia, Biserrula, Caragana, Anthyllis, Robinia, Alhagi, Anagyris, Acacia, Sophora</i>
Genre <i>Phyllobacterium</i> (8)	<i>Lathyrus, Argyrolobium, Astragalus, Brassica, Phaseolus, Lotus, Sophora</i>
Genre <i>Aminobacter</i> (1)	<i>Anthyllis</i>
III Famille Bradyrhizobiaceae	
Genre <i>Bradyrhizobium</i> (36)	<i>Glycine, Vigna, Lespedeza, Beta, Entada, Pachyrhizus, Lablab, Arachis, Cytisus, Retama, Aeshynomene, Acacia, Inga, Lupin, Phaesolus, Cowpea, Centrolobium, Erythrophleum, Neonotonia, Desmodium, Lupinus</i>
Genre <i>Blastobacter</i> (1)	<i>Aeschynomene</i>
Genre <i>Photorhizobium</i> (1)	<i>Aeschynomene</i>
IV Famille Hyphomicrobiaceae	
Genre <i>Devosia</i> (1)	<i>Neptunia</i>
Genre <i>Azorhizobium</i> (3)	<i>Sesbania</i>
V Famille Methylobacteriaceae	
Genre <i>Methylobacterium</i> (3)	<i>Crotalaria, Trifolium phyllosphere</i>
Genre <i>Microvirga</i> (4)	<i>Lupinus, Listia, Cowpea</i>

VI Famille Brucellaceae	
Genre <i>Ochrobacterium</i> (2)	<i>Lupinus, Cytisi</i>
II Ordre Burkholderiales	
Famille Burkholderiales	
Genre <i>Burkholderia</i> (17)	<i>Dalbergia, Machaerium, Mimosa, Lebeckia, Aspalathus, Papilionoid legumes</i>
Genre <i>Cupriavidus</i> (ancien <i>Ralstonia</i>) (2)	<i>Mimosa, Phaselous, Leucaena</i>

5-3 Les caractéristiques des Rhizobia

5-3-1 Les caractères morphologiques

Les Rhizobia sont bactéries en forme bâtonnet Gram-négatives aérobies et non sporulantes qui peuvent infecter les racines et parfois les tiges des Légumineuses pour former des nodules (Dommergues et *al.*, 1999). On distingue deux formes :

5-3-1-1 Forme végétative

Les bactéries apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,6 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3µm de longueur et sont mobiles par un flagelle polaire ou un flagelle subpolaire pour les Rhizobia à croissance lente ou par deux à six flagelles péritriches pour les Rhizobia à croissance rapide (Somasegaran et Hoben, 1994).

5-3-1-2 La forme bactéroïde

A l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les Rhizobia se différencient en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry et *al.*, 2004). Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que celle de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

5-3-2 Caractères biochimiques

Les rhizobiums sont des bactéries hétérotrophes, utilisent des carbohydrates simples tels que le glucose, le saccharose, le mannitol et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines. Généralement les Rhizobia à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ont une croissance meilleure en présence de glucose, de mannitol ou de saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose (Somasegaran et Hoben, 1994)

5-3-3 Caractères physiologiques

Les Rhizobia sont des aérobies ou microaérophiles et peuvent croître à une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de croissance se situe entre 6 et 7 plus exactement 6,8 mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *R.japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

5-3-4 Caractères cultureux

Les rhizobiums à croissance rapide développent une turbidité dans les milieux liquides en 2-3 jours. Le *Bradyrhizobium* à croissance lente produit de la turbidité dans les milieux liquides. Le Yeast Mannitol Agar (YMA) est l'un des milieux solides les plus couramment utilisés pour la culture des rhizobiums (Somasegaran et Hoben, 1994).

Dans ce milieu les colonies sont rondes, blanches, opaques ou blanc laiteux, humides, translucides, lisses et brillantes ou rugueuses et des colonies jaune pâle, en particulier dans les cultures plus anciennes (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Vincent, 1970).

5-3-5 Caractères génétiques

La génétique des rhizobiums n'est pas facile, car un grand nombre de gènes sont impliqués dans la symbiose, et de nombreuses propriétés sont transférées d'une souche à l'autre (Pelmont, 1995).

Les génomes rhizobiens sont particulièrement intéressants, selon les espèces, il peut y avoir trois types de réplicons pour les chromosomes supérieurs à 4 Mb, les grands plasmides (1-2 Mb) et les plasmides inférieurs à 1 Mb (Laranjo et *al.*, 2002).

Le génome des Rhizobia a une longueur de 6 872 702 pb avec une teneur en GC de 61,18% et comprend 5 réplicons, un chromosome circulaire de taille 4 537 948 pb et 4 plasmides circulaires de taille 4 537 948 pb. Parmi 6 643 gènes prévus, 6 581 sont des gènes codant pour des protéines et 62 gènes codent pour un ARN. La majorité (72,44%) ont reçu une fonction putative, tandis que les autres ont été annotés sous forme de protéines hypothétiques (Reeve et *al.*, 2010).

6- Interaction *Rhizobium* légumineuses

Les rhizobia sont des bactéries du sol qui peuvent entrer en symbiose avec des plantes légumineuses et produire des nodules racinaires fixant l'azote. Cette symbiose repose sur la reconnaissance spécifique de molécules de signalisation produites à la fois

par la bactérie et par la plante (Spaink et *al.*, 2000). Du fait de leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et le transfèrent aux plantes sous forme combinée assimilable. En retour les plantes fournissent des nutriments qui assurent la croissance des bactéries. (Giraud et *al.*, 2007).

7- Nodulations

La nodulation est considérée comme la première caractérisation de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Nouar et Riabi, 2014)(Fig. 6).



Figure 6. Le nodule.

Le développement de la relation symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses est un processus fortement interactif qui inclue la communication moléculaire entre les organismes, une phase d'infection où les rhizobia entrent dans les nodules et une phase symbiotique finale où les rhizobia qui occupent les nodules fixent l' N_2 (Torche, 2006)(Fig. 7).

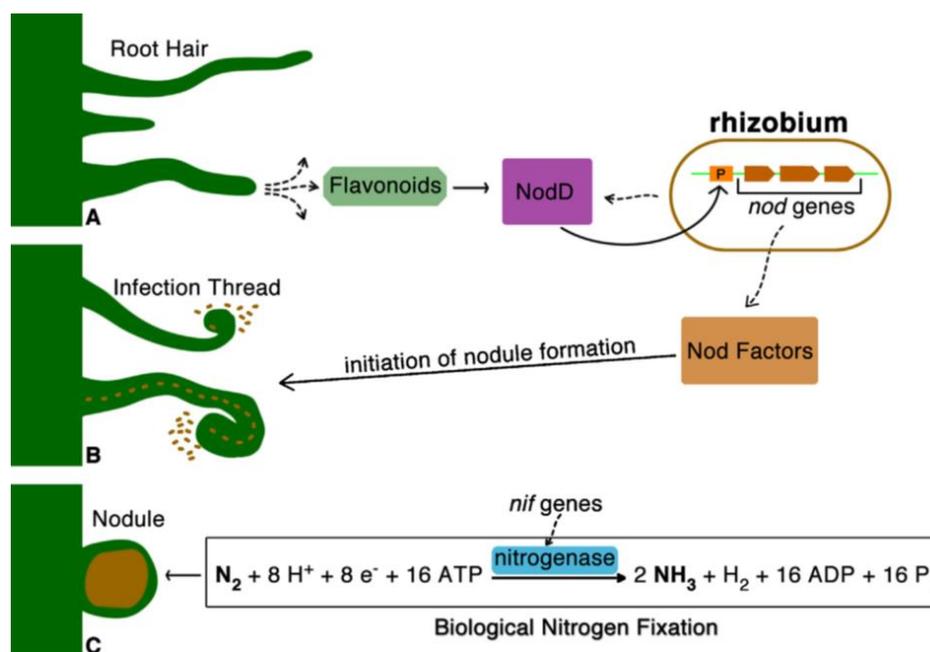


Figure 7. Interaction entre le *Rhizobium* et sa plante hôte (Laranjo et al., 2014).

La mise en place de la symbiose fixatrice d'azote entre les rhizobia et leurs plantes-hôtes requiert un certain nombre de mécanismes, au cours desquels les bactéries doivent mener en parallèle deux processus : l'infection des racines de la plante hôte et l'induction d'une organogenèse, qui conduit à la différenciation d'un nouvel organe, le nodule. (Chaich, 2018).

7-1 Préinfection

L'établissement de la symbiose entre légumineuses et *Rhizobia* nécessite une reconnaissance mutuelle des deux partenaires (Skorupska et al., 2017). L'étape préliminaire de l'interaction entre les rhizobiums et leurs plantes hôtes commence par un échange de signaux moléculaires entre les deux symbiotes. Les microsymbiotes présents dans les sols se multiplient dans la rhizosphère au niveau de la racine en catabolisant les métabolites exsudés par les racines les produits flavonoïdes ou isoflavonoïdes et d'autres molécules qui peuvent jouer le rôle de chimioattractants (Cooper, 2007).

La plante sécrète dans le sol des flavonoïdes qui sont perçus par le *Rhizobium* via une protéine régulatrice (NodD). Celle-ci déclenche l'expression des gènes *nod* (*nod* pour nodulation) aboutissant à la synthèse d'une molécule signal : le facteur Nod (FN). Les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* sont requis pour la synthèse du squelette de base du FN, consistant en un dérivé lipochito-oligosaccharidique. Selon la bactérie, des décorations variées sont greffées sur ce squelette (sulfate, acétate, méthyle...). La perception du FN par

la plante va déclencher un enchaînement d'événements aboutissant à la formation du nodule (Giraud, 2007).

7-1-1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont de faible poids moléculaire produits par les plantes. Plus de 10 000 variants structuraux de flavonoïdes ont été décrits. Les flavonoïdes sécrétés sous forme d'aglycones et de glycosides constituent une grande partie des exsudats racinaires. (Harborne et Williams, 2000).

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes qui sont synthétisés par la voie centrale des phénylpropanoïdes et la voie acétate-malonate la voie acétate-malonate. Lorsqu'ils sont libérés par les téguments ou les racines ils agissent comme des inducteurs des gènes structurels nod des rhizobia qui sont nécessaires à la synthèse du facteur Nod (Cooper, 2007)(Fig. 8).

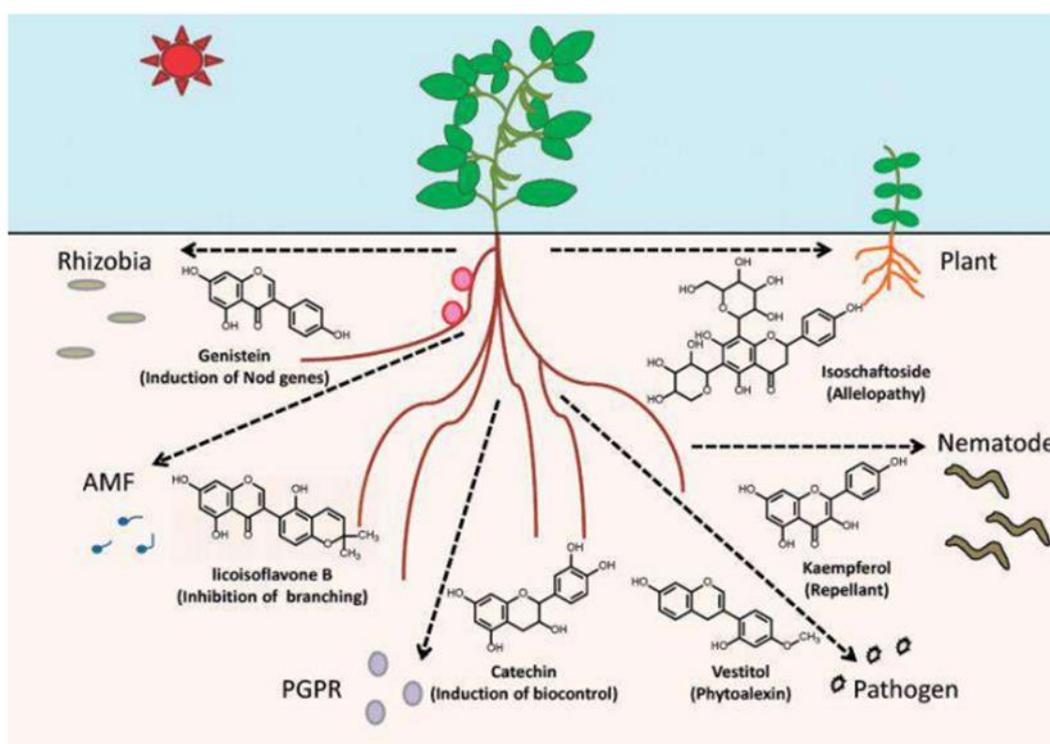


Figure 8. Représentation schématique des fonctions des flavonoïdes biologiquement actifs médiant diverses communications biologiques dans la rhizosphère. Les cercles roses représentent les nodules (Sugiyama et Yazaki, 2014).

7-1-2 Facteur nod

Les FN ont un squelette oligosaccharidique d'unités N-acétyl-D-glucosamine avec un groupe acyl gras attaché au sucre non réducteur. Un déterminant majeur de la spécificité

hôte-symbiose est attribué aux différents substituants FN liés au squelette de l'oligosaccharide (Streng et al., 2011).

Les facteurs Nod sont les produits résultant de l'action concertée d'une série d'enzymes codées par des plantes essentiellement flavonoïdes. Les facteurs Nod sont des signaux essentiels dans le développement symbiotique; Sans eux, les rhizobia ne peuvent pas pénétrer dans les racines des légumineuses (Cooper, 2007). Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Masson-Boivin et al., 2006)(Fig. 9).

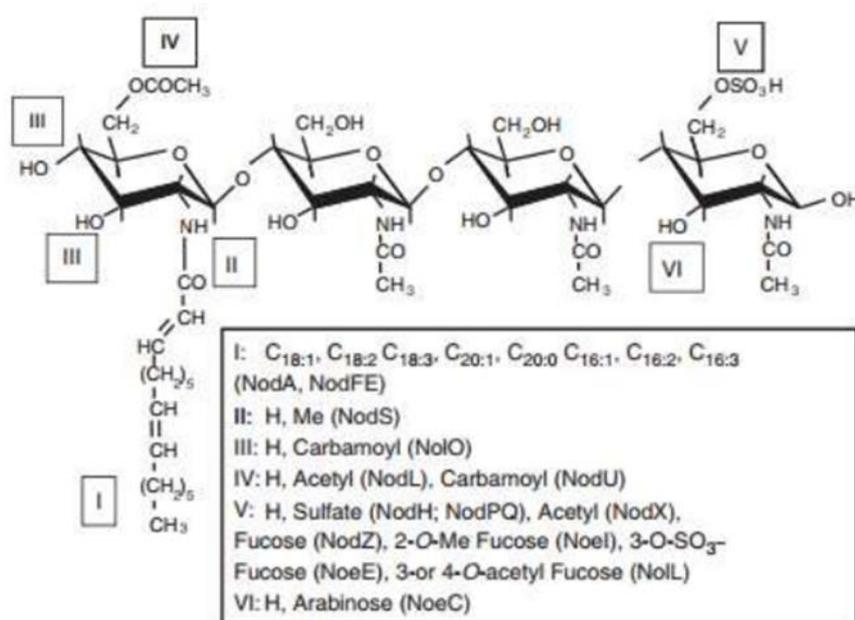


Figure 9. Schéma montrant la diversité des facteurs Nods (FNs) (Downie, 2010).

7-2 Infection

L'infection débute par l'adhésion bactérienne à l'extrémité des racines dans les couches de cellules épidermiques (Gage, 2004). Les Rhizobia ont deux voies principales pour pénétrer dans la racine de la plante : la voie intracellulaire et la voie intercellulaire.

7-2-1 Infection intercellulaire

Au cours de l'infection intercellulaire, les rhizobia peuvent pénétrer à travers les interstices de l'épiderme qui peuvent se former là où les racines latérales ou adventives émergent de la racine principale ou de la tige, où des racines adventives émergent de la

racine principale ou de la tige, respectivement. Cette voie d'infection est toujours empruntée par les rhizobia qui forment des nodules de tige (Pawlowski et Bisseling, 1996).

7-2-2 Infection intracellulaire

Le mode d'infection le plus étudié et le plus courant est l'infection intracellulaire où l'entrée des bactéries dans la plante a lieu à travers des poils absorbants. Dans ce cas, l'interaction se manifeste très rapidement en conditions limitantes en azote : de quelques minutes à quelques heures après la mise en contact des deux partenaires des déformations ont lieu au niveau des poils absorbants (svistoonoff, 2003). La pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire (Root Hair Curling : RHC) en forme de « crosse de berger » qui crée une zone confinée dans laquelle la bactérie est entourée par la paroi végétale. Un cordon d'infection est initié à partir de ce point par hydrolyse de la paroi (Mateos et al., 2001). Invagination de la membrane végétale et production de matériel pariétal par la plante, Le cordon d'infection est une structure tubulaire qui croît à l'intérieur de la cellule et dans laquelle la bactérie prolifère (Gage, 2004)(Fig. 9).

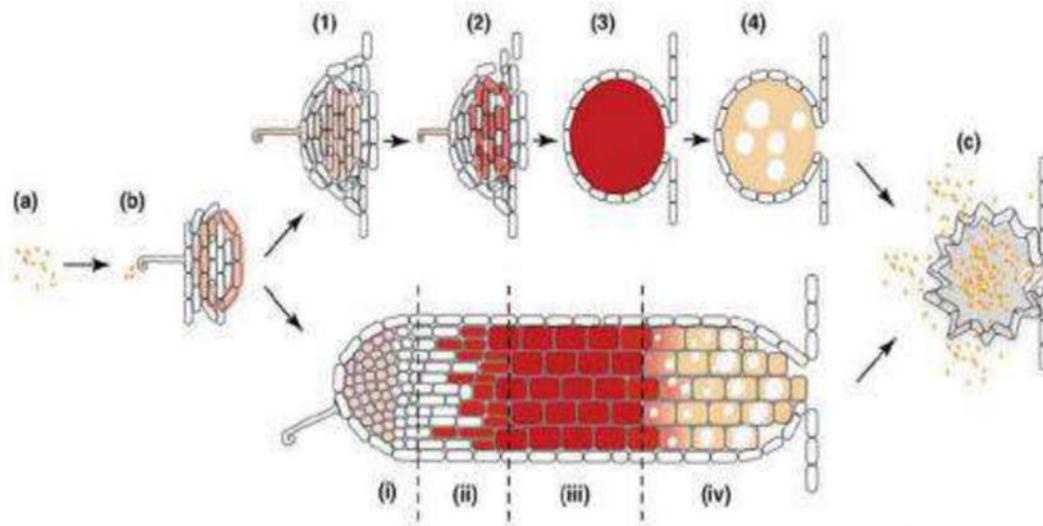


Figure 10. Les différents stades de la formation des nodosités de type déterminé (les stades de 1 à 4) et indéterminé (les stades de i à iv) (Schumpp et Deakin, 2010).

A travers la figure, on peut voir: (a) les rhizobia peuvent être présents en tant que saprophytes. (b)

Rapprochement du rhizobium et déformation du poil racinaire pour permettre aux bactéries de pénétrer dans la plante puis provoquer la différenciation des cellules corticales dans les primordia de méristème. Ensuite, les membranes plasmiques des poils racinaires s'invaginent, formant le cordon d'infection (stade 1 et i). Quand le cordon d'infection arrive au centre de la future nodosité, il se ramifie et les rhizobia sont libérés et se développent dans une membrane cellulaire au sein de la cellule végétale (symbiosome) et se dispersent dans le cytosol de cellules végétales (le stade de l'infection, 2 et ii). Les rhizobia, ensuite, s'agrandissent et se différencient en bactéroïdes qui fixent l'azote. Formation de grandes cellules polyploïdes hébergeant des milliers de symbiosomes (stade 3 et iii). Après une période de fixation active, les nodosités vieillissent (stade 4 et iv). (c) Une fraction des rhizobia dédifférenciés à l'intérieur de la nodosité est capable de se diviser et revenir à un mode de vie saprophyte lorsqu'ils sont libérés dans la rhizosphère.

Matériel
Et
Méthodes

Objectif

L'objectif de ce travail est d'isoler des Rhizobia à partir des nodules racinaires d'une plante de légumineuse cultivé (*Vicia faba* L.) et d'une autre légumineuse sauvage (*Hedysarum coronarium* L.), puis faire une caractérisation phénotypique des isolats avec une éventuelle comparaison entre les deux contenus.

1. Isolement des bactéries à partir des nodules

1-1 Description de la zone d'étude

Le premier échantillonnage pour le genre végétale *Hedysarum*. Les nodules ont été obtenus à partir des racines de la plante (*Hedysarum coronarium* L.) se développant dans la région de Taferent (latitude 6°24'38" N et longitude 6°38'47" E). Wilaya de Constantine. Le deuxième échantillonnage pour le genre végétale (*Vicia faba* L.) obtenu à partir d'un champ de fève cultivée dans la même région (Fig.11).

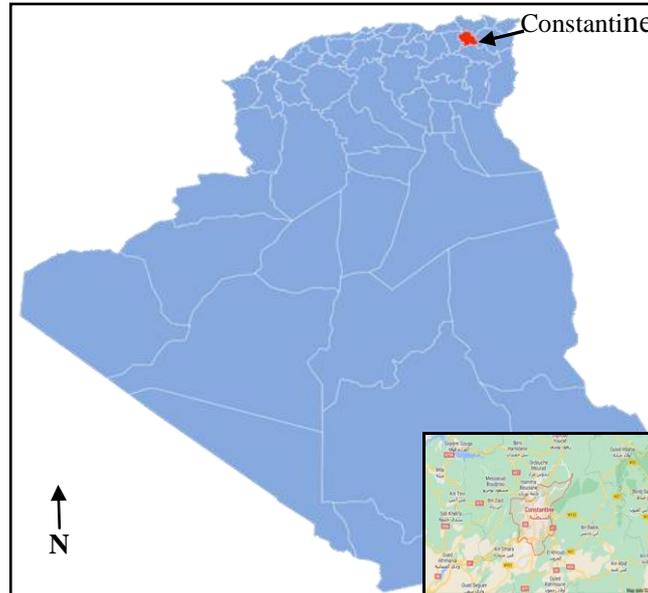


Figure 11. localisation géographique de la zone de prélèvement.

1-2 Collecte des nodules

L'échantillonnage des nodules doit être réalisé durant une période bien précise, où la plante est en pleine activité, la récolte est effectuée au printemps durant le mois de Mars et Avril quand la terre est plus ou moins sèche. A cette période de l'année les nodules sont

bien développés et sont visibles au niveau des racines. Ils sont d'une couleur rougeâtre, et peuvent être un indicateur de la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote.

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran (Hoben., 1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont placées dans des sacs en plastique stériles et transportées immédiatement au laboratoire (Fig.12).



Figure 12. Les nodules racinaires.

a- *Vicia vaba* L. b- *Hydesarum coronarium* L.

1-3 Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont mis immédiatement dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h pour un usage immédiat.

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). La conservation et la dessiccation des nodules est réalisée dans des flacons en contenant le chlorure de calcium CaCl_2 et une couche de coton sur laquelle mettre les nodules et fermés avec un bouchon.

Le chlorure de calcium (CaCl_2) permet de lutter efficacement contre l'humidité. Sur chaque flacon sont mentionnés le nom de la plante, la date et le lieu de collecte, et la date de conservation

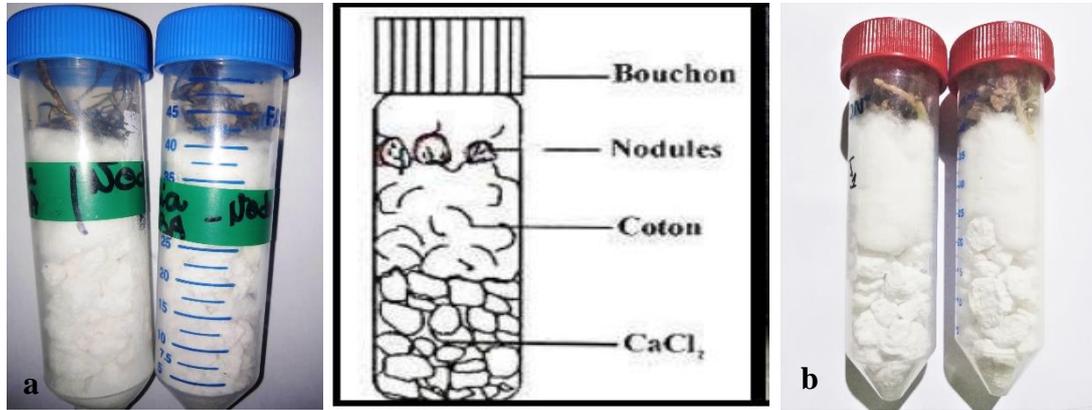


Figure 13. Conservation des nodules (Vincent, 1970).

a- *Vicia faba* L.

b- *Hedysarum coronarium* L.

1-4 Isolement des bactéries à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de (Vincent, 1970) et (Somasegaran et Hoben, 1994). Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que les nodules qui sont déjà conservés précédemment dans CaCl_2 sont placés dans un tube qui contient l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C , puis 1 heure à une température ambiante.

1-5 Stérilisation des nodules

Sous la hotte à flux laminaire les nodules intacts sont immergés dans l'éthanol 95° pendant 5 à 10 secondes, puis transférés immédiatement dans une solution de chlorure de mercure (HgCl_2) acidifié à 0.1% (1g HgCl_2 + 5 ml HCl + 11 d'eau distillée) pendant 3 minutes, ensuite rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile pour éliminer les résidus de mercure. Le but de cette stérilisation superficielle est de limiter la contamination superficielle des milieux de culture par d'autres macro-organismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules, et ceci se manifestera par l'absence de croissance de bactéries sur le milieu YMA.

1-5-1 Test de stérilisation

Prendre les nodules stérile et l'ensemencer en le faisant passer sur le milieu YMA (Annex 1), puis l'incubation à 28°C. Pendant 24 heures afin de confirmer la stérilisation.

1-5-2 Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

L'isolement est réalisé selon la méthode préconisée par Vincent (1970). Dans une boîte de pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile. Dans chacune d'elles est déposé un nodule stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...). Les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par flambage.

Le broyat obtenu à partir de cette méthode est ensemencé à l'aide d'une anse de platine sur des boîtes de Pétri contenant les milieux YMA et YMA + Rouge de Congo et sur le milieu liquide YMB (Annexe1). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans (Fig.14). Et avec flambage d'anse de platine de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser. Les boîtes sont incubées à 28°C. Pendant 48 à 72 heures.

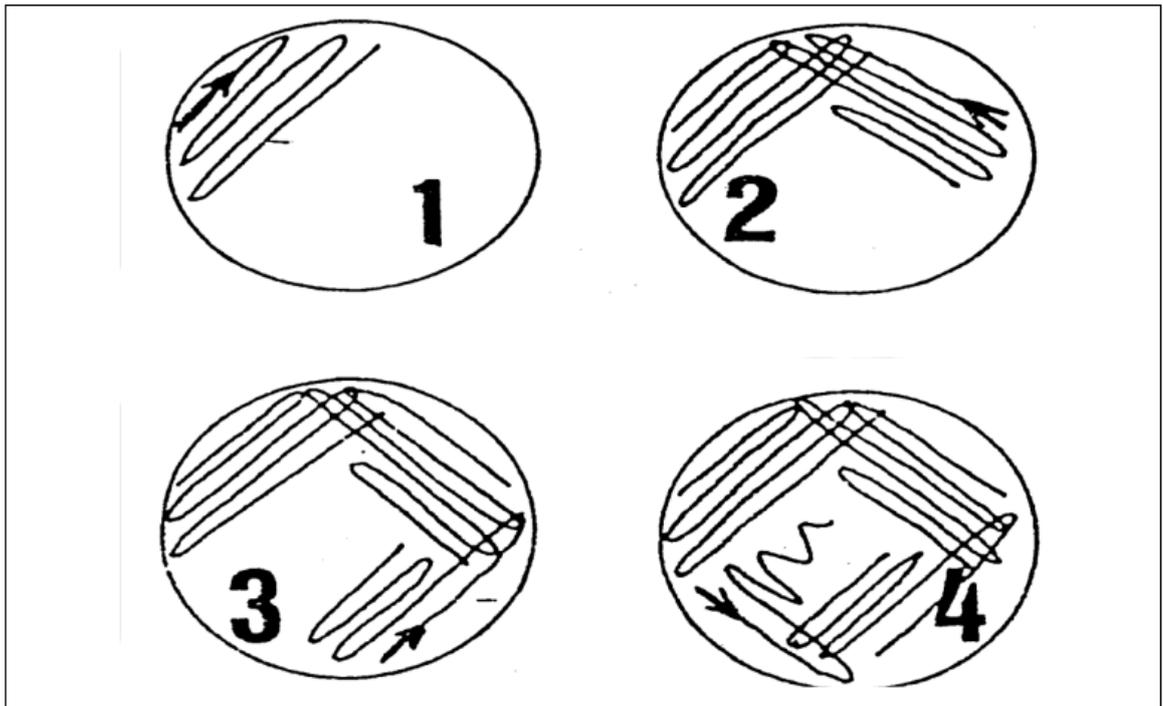


Figure 14. Ensemencement par la méthode des quatre cadrans (Vincent, 1970).

2. Caractères morphologiques et cultureux

2-1 Les milieux de culture utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée. Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries, pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants:

- Milieu liquide: YMB (Yeast Mannitol Broth).
- Milieu solide: YMA (Yeast Mannitol Agar).
- YMA+RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo).

2-2 Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (Vincent, 1970; Somasegaran et Hoben, 1994), des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification.

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis les tubes sont vortexés et incubée à 28°C, pendant 72 heures.

Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC et YMA. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologique sont enfin réalisés.

2-3 Examens microscopiques

2-3-1Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de les classer les bactéries en deux grands groupes: bactéries dites Gram⁺ et bactéries dites Gram⁻.

Cette coloration se fait à partir de milieu culture YMA de chaque souche, la préparation d'un frottis est étalée une couche mince sur une lame, séchée et fixée (Annexe2).

2-4 Absorption du Rouge de Congo

Dans cette test permet à cultiver les isola dans le milieu YMA contenant 0,0025 de Rouge de Congo et incubée à 28°C pendant 48 à 72 heures. Selon (Somasegaran et Hoben, 1994) les colonie typique aux rhizobia absorbant faiblement le Rouge de Congo.

3. Caractérisation phénotypique des isolats

3-1 Les tests biochimiques

3-1-1 Réduction des nitrates

Les bactéries sont mise en culture sur milieu liquide TY Tryptone-Yeast contenant 0,1% de KNO_3 (p/v) pendant 8jours à 28°C. Après incubation on ajoute dans chaque tube le réactif nitrate réductase 1 et le réactif nitrate réductase 2.

L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites un résultat négatif nécessite l'addition de la poudre de zinc pour vérifier la présence des ions nitrate dans le milieu donc le résultat est négatif Si on n'observe pas une coloration rouge l'absence des ions nitrate dans le milieu indique un résultat positif .

3-1-2 Hydrolyse de l'urée

Les isolat sont cultivé sur milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 % de rouge de phénol comme indicateur de pH. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 min puis refroidi On rajoute la solution d'urée stérilisé par filtration. Incubée les boites à 28°C pendant 8jours. Les résultats sont évalués par changement de la coloration du milieu.

Une coloration rouge indique l'hydrolyse de l'urée et donc l'alcalinisation du milieu, une coloration jaunâtre indique une réaction négative

3-1-3 Activité cellulolytique

Les isolats sont ensemencés sur le milieu YMA contenant 0.25% de (CMC)

Carboxy-Méthyle-Cellulose et incubée à 28°C pendant 8 jours, rincé les boîtes délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) puis Incubée pendant 30 mn 28°C.

Remplacée la solution de rouge de Congo par une solution de NaCl 1 M à une température ambiante pendant 30 min.

Un halo jaune-orangé entoure les colonies qui montrent une activité d'une endoglucanase indique la présence d'une cellulase.

3-2 Les tests physiologiques

3-2-1 Effet de pH

Les bactéries sont culture sur le milieu de culture YMB ajusté à différents pH 4,5,6,8,7,8 et 9, après incubée à 28°C pendant 8 jours.

Estimée la croissance bactérienne par la mesure de la DO à 630 nm.

3-2-2 Tolérance au NaCl

Les isolats sont cultivés sur le milieu YMB à différentes concentrations de NaCl 0.25% (43mM), 0.5% (85.5mM), 1% (171mM), 1.5% (256.5mM) et 2% (342mM). incubé à 28°C pendant 8 jours.

En a mesuré la densité optique à 630 nm.

3-2-3 Effet de la température

Les isolats sont cultivés sur le milieu YMB et incubés à différentes températures 4, 28 et 37°C pendant 8 jours.

Mesuré la densité optique de chaque culture a été fait à une longueur d'onde de 630 nm.

Résultats
et
Discussion

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées (Vandamme et *al.*, 1996). Elle constitue chez les rhizobiums la base de la description formelle. Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (Baldani et Baldani, 2005). La caractérisation phénotypique des Rhizobia se base principalement sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques (Graham et *al.*, 1991).

Dans ce chapitre, nous résumerons les principaux résultats obtenus qui caractérisent les rhizobia isolées à partir des nodules racinaires de *Hedysarum coronarium* L. et de *Vicia faba* L.

Notre modèle de protocole a été choisi selon les méthodes préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

1. Test de stérilisation

Ce test permet de vérifier l'efficacité de la technique utilisée pour la stérilisation des nodules, et ceci se manifestera par l'absence de croissance des bactéries sur le milieu YMA (Fig.15)(Fig.16).

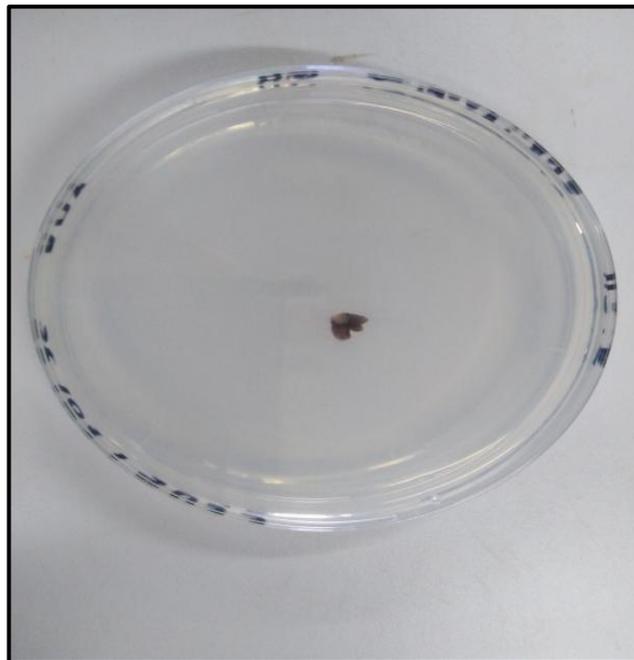


Figure 15. Test de stérilisation des nodules de l'espèce *Vicia faba* L.



Figure 16. Test de stérilisation des nodules de l'espèce *Hedysarum coronarium* L.

2. Caractères morphologiques et cultureux

2-1 Croissance sur YMA

Selon (Vincent, 1970). La croissance dans le milieu YMA parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des Rhizobia.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec des isolats de *Hedysarum coronarium* L. et *Vicia faba* L. Après trois jours (72 heures d'incubation à 28°C), une croissance très importante est détectable sur milieu YMA, les colonies formées sont de couleur blanchâtre ou crème et translucide, d'un diamètre variable (2 à 4 mm), d'une forme circulaire, convexe d'un contour régulier et d'une surface lisse , brillante avec une texture homogène.

Cette description est en accord avec celles déjà faites pour les rhizobia dans la littérature (Vincent, 1970 ; Jordan, 1982) (Fig.17).

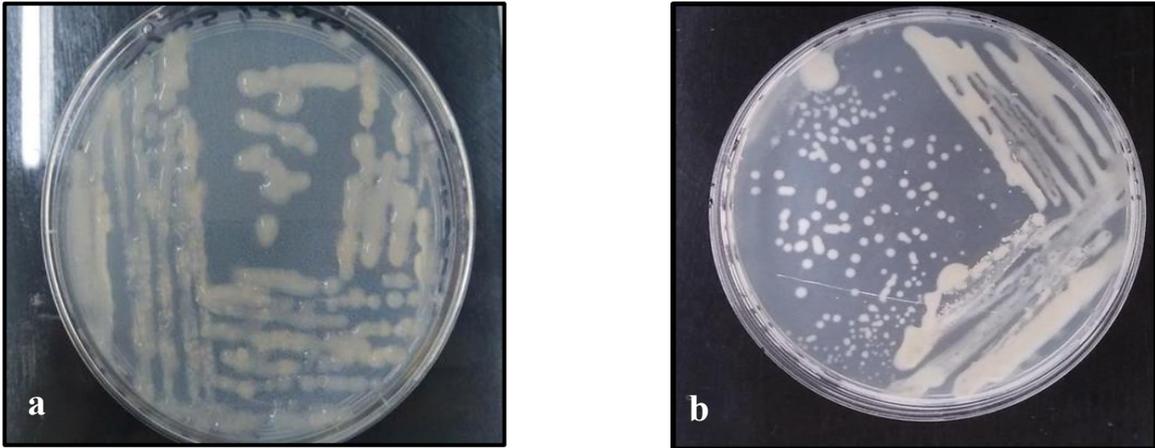


Figure 17. Aspect macroscopique sur milieu YMA.

a- *Hedysarum coronarium* L. ; b- *Vicia faba* L.

2-2 Croissance sur YMA+ RC

Selon (Torche, 2006), les rhizobia produisent des colonies blanches ou absorbent faiblement le Rouge Congo. Malgré que ce dernier soit souvent rajouté au milieu de culture pour isoler les rhizobia ou pour tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être un agent sélectif pour distinguer les rhizobia des autres bactéries.

Le Rouge Congo est un indicateur qui peut être très utile pour différencier les Rhizobia des contaminants, en particulier des bactéries Gram-positives, car les bactéries nodulaires n'ont pas tendance à absorber le colorant (Howieson et *al.*, 2016).

La mise en culture du broyat nodulaire sur milieu YMA + rouge Congo a donné des colonies qui ont absorbé faiblement le Rouge Congo (Fig.18).

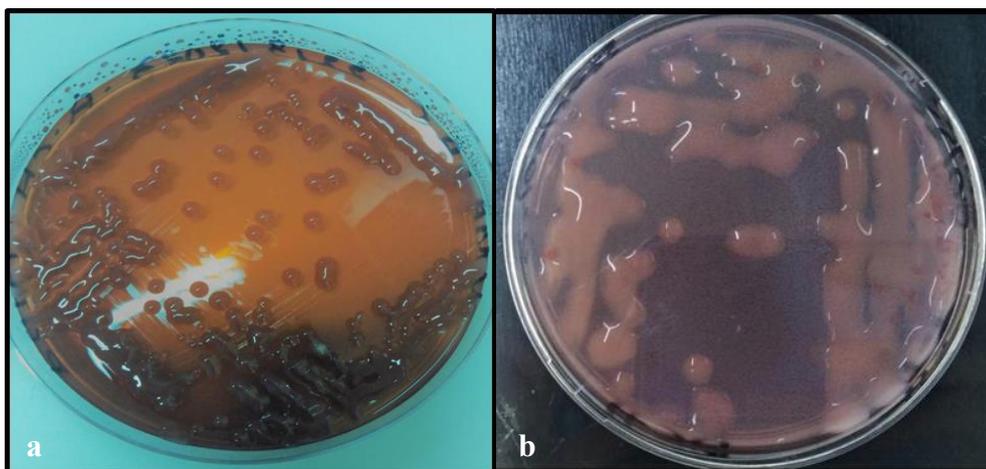


Figure 18. Aspect macroscopique sur milieu YMA

a-*Hedysarum coronarium* L. ; b- *Vicia faba* L.

3. Coloration de Gram

D'après Gage, 2004, les rhizobiums sont des bactéries du sol Gram négatif possédant une forme bâtonnet de 0,6 à 0,9 μm de largeur et de 1,2 à 3 μm de longueur avec un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches.

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures et que des motifs de regroupement peuvent même être observés, une coloration de Gram a été réalisée pour visualiser les bactéries au microscope optique. L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets de taille différente et des cocobacilles roses à Gram négatif compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (Fig.19).

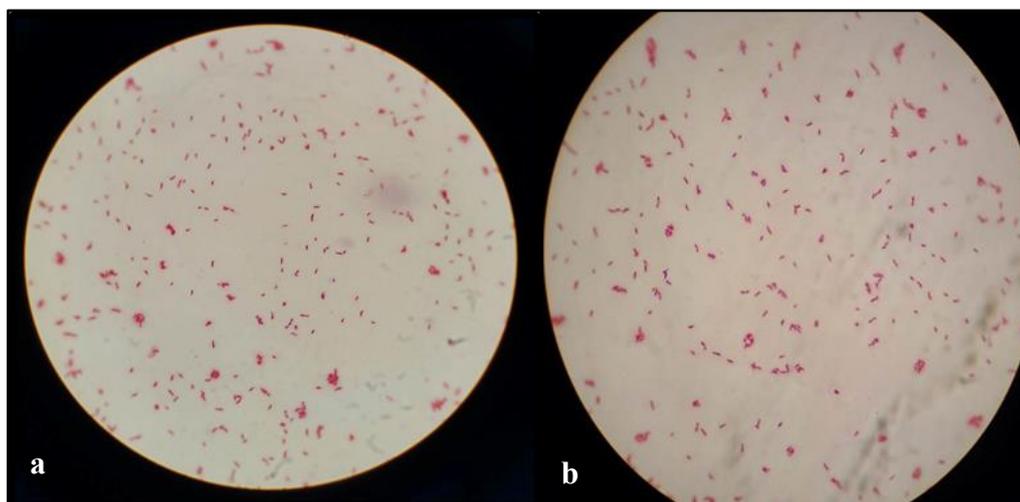


Figure 19. Observation microscopique de la coloration de Gram (X100).
a- *Hedysarum coronarium* L. ; b- *Vicia faba* L.

4. Caractérisation phénotypique des isolats

4-1 Tests biochimiques

L'objectif était de rechercher la présence de certaines enzymes jouant un rôle dans le processus d'infection bactérienne (nodulation) des racines, notamment la cellulase, la nitrate réductase et l'uréase.

4-2 Réduction de nitrate

Ce test est utilisé pour la réduction des nitrates dans les milieux nitrés afin de déterminer si les bactéries contiennent du nitrate et/ou de la nitrite réductase.

Dans le sol, l'azote existe principalement sous forme d'ions ammonium (NH₄⁺) et d'oxydes d'azote, d'ions nitrate (NO₃⁻) ou d'ions nitrite (NO₂⁻). La réduction du nitrate par la nitrate réductase conduit à la production de nitrite, qui produit une réaction rouge en présence des deux réactifs. Après l'addition de 2 à 4 gouttes des réactifs I et II de la nitrate réductase, tous nos isolats réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge. La coloration rouge ou rose traduit la présence de l'enzyme qui décompose les nitrates en nitrites.

La coloration rouge ou rose traduit la décomposition de nitrate en nitrite selon la réaction suivante:



La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade diazote (gazeux) selon :



Lucinski et al. (2002) montrent que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia dont 97% de cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes.

Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par Struffi et al.(1998) et Mc Neil, (1982) (Fig.20).

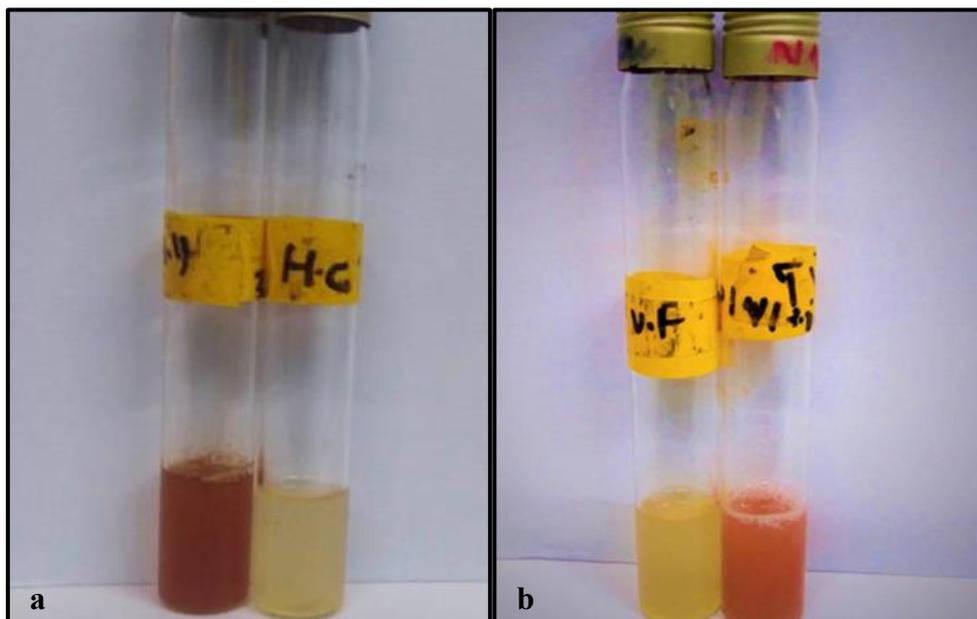


Figure 20. Réduction des nitrates.

a- *Hedysarum coronarium* L. ; b- *Vicia faba* L.

4-3 Hydrolyse de l'urée

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries d'hydrolyser l'urée grâce à l'uréase.

La mise en évidence de la capacité des Rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis et al (1977), en utilisant le Rouge de Phénol comme indicateur de pH. Lorsque les souches augmentent le pH suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par changement de la couleur vers le rouge foncé ou le rouge indigo.

Après 8 jours d'incubation, une résultat positive. Toutes les isolats ont une activité uréasique positive et alcalinisent le milieu de culture en observant un virage de la couleur de l'orange vers le rose fuchsia (Fig.21). Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998). Comme s'est montré dans l'équation suivante :



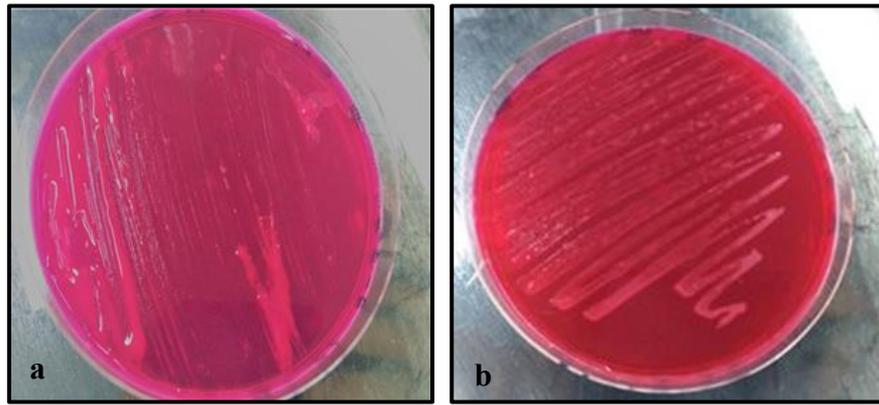


Figure 21. tests de l'urée.

a-*Hedysarum coronarium* L.; b- *Vicia faba* L.

4-4 Activité cellulolytique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries d'hydrolyser la cellulose. L'apparition d'un halo jaune orangé autour des colonies des isolats révèle la présence d'une endoglucanase (cellulase). Après 8 jours d'incubation les isolats donnent une réaction positive.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Mateos et al (1992) et Robledo et al (2008) qui considère que le Rhizobium produit l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, et facilite aux Rhizobium de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Fig.22).

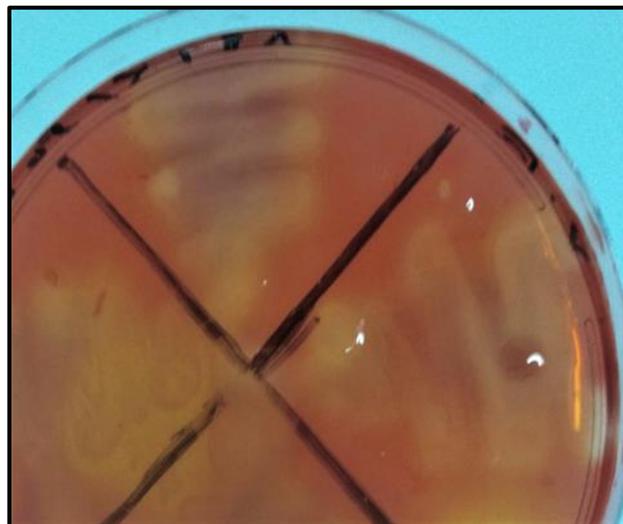


Figure 22. Activité cellulolytique *Hedysarum coronarium* L. et *Vicia faba* L.

5. Testes physiologiques

5-1 Teste de tolérance à l'NaCl

La croissance des isolats obtenus à partir de *Hedysarum coronarium* L. et de *Vicia faba* L. à des concentrations de NaCl allant de 0.25% à 2 % révèle une bonne tolérance de plus de 0.25% chez les isolats d' *Hedysarum coronarium* L. et de 2% chez les isolats de *Vicia faba* L. (tableau 2).

La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah et al., 2001).

Miller et Wood (1996) ont rapportés que le Rhizobium est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées ; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet du stress salin. Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter aux conditions de forte salinité par l'accumulation intracellulaires des solutés organiques de faible poids moléculaire appelés osmoprotecteurs (Csonka et Hanson 1991). Certains auteurs ont rapporté que les rhizobies sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (Zahran 1999, Swaraj et Bishnoi, 1999).

Tableau 2. Croissance sur NaCl

	2%	1.5%	1%	0.5%	0.25%
HC (1)	0.118	0.115	0.113	0.101	0.140
HC (2)	0.114	0.110	0.104	0.100	0.133
VF (1)	0.184	0.105	0.124	0.100	0.130
VF (2)	0.188	0.117	0.122	0.110	0.134

HC- *Hedysarum coronarium* L. ; VF- *Vicia faba* L.

5-2 Effet de la température

La plupart des isolats sont capables de croître à une température de 4°C jusqu'à 37°C pour les isolats d'*Hedysarum coronarium* L. et de *vicia faba* L. , et montrent une croissance optimale à 28°C. (Tableau 3).

Tableau 3. Test de croissance sur différentes températures

	04°C	28°C	37°C
HC (1)	0.150	0.280	0.250
HC (2)	0.160	0.270	0.260
VF (1)	0.120	0.165	0.109
VF (2)	0.129	0.150	0.106

HC- *Hedysarum coronarium* L. ; VF- *Vicia faba* L.

5-3 Effet de PH

Les résultats de la tolérance aux pH acides et alcalins des isolats d'*Hedysarum coronarium* L. et de *Vicia faba* L., présentent un optimum à un pH de 6,8 (Tableau. 4).

Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Maatallah et al .(2002) qui ont détecté la croissance de leur isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4.0 et un pH supérieur à 7.5. Ainsi que Raza et al .(2001) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10).

Tableau 4. Test de tolérance au variations du pH

	4	5	6.8	9
HC (1)	0.163	0.220	0.635	0.407
HC (2)	0.129	0.278	0.561	0.479
VF (1)	0.151	0.229	0.253	0.211
VF (2)	0.131	0.216	0.260	0.224

HC- Hedysarum coronarium L. ; *VF- Vicia faba L.*

Conclusion

Conclusion

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui valorisent l'utilisation de ressources naturelles écologiquement saines et permettent de réduire l'utilisation d'engrais chimiques, notamment ceux riches en azote, permet de focaliser l'attention sur le potentiel biologique de fixation fonctionnelle de l'azote.

Les relations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diverses et responsable de près de la moitié de la fixation biologique d'azote moléculaire du globe. La plus connue et la plus étudiée est celle qui est établie entre les bactéries du sol de type rhizobium et les légumineuses.

Dans ce travail, nous avons isolé et caractérisé les bactéries nodulant la plante légumineuse spontanée *Hedysarum coronarium* L. et de la légumineuse cultivée *Vicia faba* L., en suivant la méthode classique appliquée par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Il s'agit d'identifier des bactéries endophytes contenues dans les nodosités de ces légumineuses. Cette étude est basée sur la mise en évidence de caractères phénotypiques et morphologiques des isolats.

A travers les résultats obtenus, notamment les caractères phénotypiques, ont montré que les bactéries isolées de *Vicia faba* L. et de *Hedysarum coronarium* L. ont presque les mêmes caractéristiques et qui sont proche des bactéries de la famille *Rhizobiaceae*.

Tous les isolats ont une faible absorption de rouge de Congo et ont une croissance très importante est détectable sur milieu YMA après 3 jours de culture.

En effet, les aspects microscopiques et morphologiques des colonies des isolats étudiées sont en accord avec la description faite par les auteurs (Vincent, 1970., Somasegaran et Hoben, 1994., Jordan, 1984). Notre étude microscopique montre des bacilles de différentes tailles ainsi que des coccobacilles à Gram négatif.

L'examen biochimique, basé sur la recherche des enzymes spécifiques tel que la nitrate réductase, l'uréase et la cellulase, démontre que la majorité des isolats possèdent les trois enzymes spécifiques.

Dans l'évaluation de la tolérance de nos isolats aux facteurs abiotiques principalement NaCl, pH et températures. Nos isolats sont également capables de pousser sur des pH très variables allant de 4 à 9, avec un optimum de croissance à pH 6.8. La présence d'une tolérance au stress salin allant de 0,25% jusqu'à 2% de NaCl est aussi observée. Concernant la température, la tolérance varie de 4°C à 37°C, avec une température de croissance optimale de 28°C.

A travers les différents résultats obtenus dans cette étude et qui sont basés sur des critères morpho-cultureux, physiologiques et biochimiques. Nous pouvons inclure nos isolats parmi les bactéries possédant les caractères des rhizobia nodulant les légumineuses.

En perspectives, il serait intéressant de compléter la caractérisation par une étude génétique, en l'occurrence la détermination du GC%, l'hybridation ADN/ADN, séquençage des gènes, ainsi que le recours à des techniques plus avancées telles que la métagénomique pour mettre en évidence les rhizobiums non cultivables.

Références
Bibliographiques

- Abdelguerfi-Berrekia, R. (1985).** Contribution à l'étude du genre *Hedysarum* L., en Algérie. Thèse de magister. Option phytotechnie. I. N. A. 131 p.
- Abdelguerfi-Laouar, M. Belarbi, N. Mebarkia, A. Abdelguerfi, A. (2002).** Etude du comportement de quelques populations Algériennes de *Hedysarum Coronarium* dans la région de Sétif Institut National de la Recherche Agronomique Algérie. (10) 33-44 p.
- Abdellaoui, Z. (2014).** Contribution à l'étude de la germination et des premiers stades de développement de *Hedysarum* sp.
- Achichi, I. Chaker-Houd, K. Ghamri, A. Semmar, M. & Slimani A. (2018).** Agromorphological variability within natural populations of *Sulla coronaria* (L.) Medik in northeastern Algeria. *Fourrages*, (236), 275-279.
- Allen, M. B, Arnon. D. I. (1955).** Studies on Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol.* 30, 366-372.
- Allen, O. N. Allen, E. K. (1981).** The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. The University of Wisconsin in Press, Madison, 806 p.
- Allito, Bayou Bunkura; Ewusi-Mensah, Nana; Logah, Vincent (2020).** La spécificité de la souche légumineuse-*Rhizobium* améliore la nutrition et la fixation de l'azote dans la fève (*Vicia faba* L.). *Agronomy*. 10(6), 826. doi:10.3390/agronomie10060826
- Alunni, B. & Mergaert, P. (2017).** Défis et perspectives pour l'utilisation de la fixation biologique de l'azote en agriculture. *Les sols et la vie souterraine: Des enjeux majeurs en agroécologie*, 285.
- Aouar-sadli, M. Louadi, K. Doumandji, S .D. (2008).** Pollination of the broad bean (*Vicia faba* L.var. major) (Fabaceae) by wild bees and honey bees (*Hymenoptera: Apoidea*) and its impact on the seed production in the Tizi-Ouzou area (Algeria). *African Journal of Agricultural Research* Vol. 3 (4), 266-272.
- Asami, S. Kiwamu, M. (2006).** Evaluation of the Nitrogen-fixing Ability of Endophytic Clostridia based on Acetylene Reduction and Reverse Transcription-PCR Targeting the nifH Transcript and Ribosomal RNA. *Microb. Environ.* 21, 23-35.
- Bado, B. V. (2002).** Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso.
- Baldani, J. I. and Baldani, V. L. D. (2005).** History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Brass. Sci.* 77, 549 - 579.
- Baudoin, J. P. (2001).** Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale delégumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (4) 221- 230.
- Becking, J. (2006).** The family *Azotobacteraceae*. *Prokar.* 6, 759-783.
- Belhadi, D. de Lajudie, P. Ramdani, N. Le Roux, C. Boulila, F. Tisseyre, P. Boulila, A. Benguedouar, A. Kaci, Y. 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. *Systematic and Applied Microbiology.* 41(2), 122-130. doi:10.1016/j.syapm.2017.10.004
- Ben Jeddi, F. (2005).** *Hedysarum coronarium* L.: variation génétique, création variétale et utilisation des rotations tunisiennes/par F. Ben Jeddi (Doctoral dissertation, Ghent University).

- Bengouga, k. (2018).** Evaluation de la résistance naturelle de quelques cultivars de fève (*Vicia faba* L.) propres à la région de Biskra à l'égard des thrips (*Thysanoptera* : *Thripidae*). Thèse Présentée en vue de l'obtention du Diplôme De Doctorat en Sciences Agronomiques. Sciences Agronomique. Université Mohamed Khider Biskra. 55p.
- Berrada, H. & Fikri-Benbrahim, K. (2014).** Taxonomy of the *Rhizobia*: current perspectives. *British Microbiology Research Journal*. 4(6), 616.
- Black, M. Paula, M. Brett, C. Roberto, B. John Howieson, H. Mariangela, H. et Matthew, B. (2012).** The genetics of symbiotic nitrogen fixation: Comparative genomics of 14 *Rhizobia* strains by resolution of protein clusters. *Genes*. 3, 138-166.
- Black, M. Paula, M. Brett, C. Roberto, B. John Howieson, H. Mariangela, H. et Matthew, B. (2012).** The genetics of symbiotic nitrogen fixation: Comparative genomics of 14 *Rhizobia* strains by resolution of protein clusters. *Genes*. 3, 138-166.
- Bouard, P. Charon, Y. Corbin, D. Michaut, L. Ruetschmann, C. Vade, S. Veron, G. (1992).** Traité pratique de jardinage. Ed. Clause jardin, France. 854p.
- Chaich, K. (2018).** Diversité des associations *Rhizobium*-Légumineuses de quelques espèces spontanées du Sahara septentrional. Thèse Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat ès. Sciences. Sciences Agronomiques. 145p.
- Chaux, C. et Foury C. L. (1994).** Production légumière : légumineuses potagères, légumes fruits. Ed. TEC et DOC. Lavoisier. 563p.
- Chelius, M. K. Triplett, E.W. (2000).** Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 783-787.
- Chriki, A. Combes, D. Marrakechi, M. (1982).** Hérité et analyse chromatographique de la pigmentation des fleurs chez l'espèce *Hedysarum coronarium* L. *Agronomie*, 2 (10), pp.915-922. fihal-00884330
- Cooper, J. E. (2007).** Early interactions between legumes and *Rhizobia*: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1355-1365.
- Csonka, L. N. et Hanson, A. D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation : genetics and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 45: 569-606.
- Dajoz, R. (2000).** Eléments d'écologie. Ed. Bordas. Paris, 5ème édition. In : Mémoire de master. Université sidi mohemed ben abdellah. 114p, Maroc. 631p.
- Dhull, S. B., Kidwai, M. K., Noor, R., Chawla, P., & Rose, P. K. (2022).** A review of nutritional profile and processing of faba bean (*Vicia faba* L.). *Legume Science*. 4(3), e129.
- Dominique, M. (2010).** Les productions légumières. Educagri. Dijon. 163 p.
- Dommergues, Y. R. Duhoux, E. Diem, H. G. (1999).** Les arbres fixateur d'azote: caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides. *Espaces*. France. 489p.
- Downie, J. A. (2010).** The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of *Rhizobia* with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 150-170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x>
- Doyle, J. J. & Luckow, M. A. (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant physiology*, 131(3), 900-910

- Doyle, J. J. (1998).** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sciences* 3 p: 473-78.
- Drouin, P. (1996).** Caractérisation phénotypique et génotypique et étude des mécanismes d'adaptation aux basses températures de souches de *Rhizobium* isolées de *Lathyrus japonicus* et *Lathyrus pratensis*. éditeur non identifié.
- Elmerich, C. (1993).** Fixation biologique de l'azote. *Ann. Inst. pasteur/Actualités.* (4) 133-153.
- Etemadi, F. Hashemi, M. Barker, A. V. Zandvakili, O. R. & Liu, X. (2019).** Agronomy, nutritional value, and medicinal application of faba bean (*Vicia faba* L.). *Horticultural Plant Journal*, 5(4), 170-182.
- Faria, S. M. Lewis, G. P. Sprent, J. Sutherland, J. M. (1989).** Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist* 111, 607-619.
- Farissi, M. Aziz, F. Bouizgaren, A. Ghouiam, C. (2014).** La symbiose Légumineuses-*Rhizobia* sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *Int. J. Innov. Sci. Res.*, 11 (1): 97-99.
- Franche, C. Lindström, K. Elmerich, C. (2009).** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant. Soil.* 321, 35–59
- Gage, D. J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2): 280-300.
- Gage, D. J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during Acclimation of white lupine to phosphorus deficiency involved enhanced expression of genes *advances* 24:pp 382-388.
- Galloway, J. Dentener, F. Capone, D. et al. (2004).** Nitrogen Cycles: Past, Present and Future. *Biogeochem Nitrogen Cycle* 153.
- Gebhard, C. A. Büchi, L. Liebisch, F. Sinaj, S. Ramseier, H. & Charles, R. (2013).** Screening de légumineuses pour couverts végétaux: azote et adventices. *Recherche Agronomique Suisse*, 4(9).
- Geddes, B. A. Ryu, M. Mus, F. Garcia Costas, A. Peters, J. W. Voigt, C. A. & Poole, P. (2015).** Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.004>
- Gillis, M. Kersters, K. H. ost, B. Janssens, D. Kroppenstedt, R. M. Stephan, M. P. Teixeira, K. R. S. Döbereiner, J. De Ley, J. (1989).** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. syst. Bacteriol.* 39, 361–364.
- Guiraud, J. P. (1998).** *Microbiologie Alimentaire.* DUNOD. Paris. France.
- Giraud, E. (2007).** Symbiose *Rhizobium*/légumineuse: un nouveau sésame. *médecine/sciences*, 23(6-7), 663-666.
- Giraud, E. L. Moulin, D. Vallenet, V. Barbe, E. Cytryn et al. (2007).** Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic *Bradyrhizobia*. *Science*, 316 (5829):1307–1312.
- Graham, P. H. and Vance, C. P. (2003).** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* (131) 872- 877.
- Graham, P. H. Sadowsky, M. J. Keyser, H. H. Barnet, Y. M. Bradley, R. S. Cooper, J. E. De Ley D.J. Jarvis B.D.W. Roslycky E.B. Strijdom B.W. Young, J. P. W. (1991).** Proposed

Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(4), 582-587. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-4-582>.

Guinet, M. Nicolardot, B. Durey, V. Revellin, C. Lombard, F. Pimet, E. ... & Voisin, A. S. (2019). Fixation symbiotique de l'azote et effet précédent: toutes les légumineuses à graines se valent-elles?. *Innovations Agronomiques*. 74, 55-68.

Harborne, J. B. et C. A. Williams (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6): 481–504.

Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur. 495 p.

Howieson, J. G. Dilworth, M. J. (2016). Working with *Rhizobia* ; Canberra Centre australien pour la recherche agricole internationale. 312 p.

Houassine, D. j. (2019). Etude de l'effet de l'association féverole (*Vicia faba* L.) – Avoine (*Avena sativa* L.) sur la biodisponibilité du phosphore dans la rhizosphère. Thèse En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques. Amélioration des productions végétales. Ecole Nationale Supérieure Agronomique-El Harrach-Alger 102 p.

Issalah, R. (2012). Synthèse de traveau réalisés sur certaines espèces appartenant aux genres trifoliuml . Et *Hedysarum* L (*Fabaceae*) en Algérie. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. N° (25), 8-23.

Issolah, R. Tahar, A. Derbal, N. Zidoun, F. Meziane, M. Z. A. Oussadi, A.... & Djellal, L. (2012). Caractérisation écologique de l'habitat naturel du *Sulla* (*Fabaceae*) dans le nord-est de l'Algérie. *Revue d'Ecologie, Terre et Vie*, 67(3), 295-304.

Jarso, M. Keneni, G. (2006). *Vicia faba* L. In: Brink M, Belay G. (eds). Ressources végétales de l'Afrique tropicale, Céréales et légumes secs. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas. P 220–225.

Jarvis, B. D. W. Mc lean, T. S. Robertson, I. G. C. et Fanning, G. R. (1977). Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* 20 : 42-52.

Jordan D.C., 1982 : Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen .nov. a genus of slow-growing , root nodule bactria from leguminous lants, *Int.J.Syst. Bacteriol.* 32:136-139.

Jordan, D. C. (1984). Family III. *Rhizobiaceae*. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. P: 234–242.

Judd, W. S. Campbell, C. S. Jules Bouharmont., Kellogg E. A. et Stevens, P. (2001). Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.

Khzaei, H. O'Sullivan, D. M. Stoddard, F. L. Adhikari, K. N. Paull, J. G. Schulman, A. H. ... & Vandenberg, A. (2021). Recent advances in faba bean genetic and genomic tools for crop improvement. *Legume Science*. 3(3), e75

Laplaze, L. (1999). Approche moléculaire de la mise en place de la symbiose actinorhizienne (Doctoral dissertation, Montpellier 2).

- Laranjo, M. Branco, C. Soares, R. Alho, L. Carvalho, M. D. E. Oliveira, S. (2002).** Comparison of chickpea *Rhizobia* isolates from diverse Portuguese natural populations <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01615.x>
- Laranjo, M. Alexandra, A. Oliveiraa, S. (2014).** Legume growth-promoting *Rhizobia*: An overview on the Mesorhizobium genus Marta. *Microbiol.Res.* 169 (1), 2-17.
- Leguen, J. Duc, G. (1992).** La Fèverole, amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et variétés de sélection. Ed. INRA, Paris, 203p.
- Léveque, C. Mounolou, J. C. (2001).** Biodiversité : Dynamique biologique et conservation. Ed. Dunod. Paris. 248p.
- Lewis, G. Schrire, B. MacKinder, B. Lock, M. (2005).** Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
- Lindström, K. Mousavi, S. A. (2019).** Effectiveness of nitrogen fixation in *Rhizobia*. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. doi:10.1111/1751-7915.13517
- Liu, T. T. Zhai, D. D. Guan, B. T. & Shi, Z. J. (2022).** Nitrogen fixation and transformation with main group elements. *Chemical Society Reviews*. 23, 51(10), 3846-3861.
- Lucinski, R. Polcyn, W. et Rotayczak, L. (2002).** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimia Polonia*. 49 (2): 537-546.
- Masepohl, B. Drepper, T. Klipp, W. (2005).** Nitrogen Fixation in the Photosynthetic Purple Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free Living Bacteria*, vol. II (Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J. R. and Newton, W. E., eds.), pp.141-173.
- Masson-Boivin, C., Bontemps, C., Golfier, G., Gris-Liebe, C., Talini, L. (2006).** Détection et typage du gène nodC à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG*, 6, 97-110.
- Mateos, P. F. Jiménez-Zurdo, J. L., Chen, J. A. S. Squartini, S. K. Haack, E. M. Molina, D. H. Hubbell, F. et Dazzo, B. (1992).** Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii . *Appl Environ Microbiol.* 58 (6) : 1816- 1822.
- Maatallah, J. Berraho, E. Sanjuan, J. Lluch, C. (2002).** Phenotypic characterization of *Rhizobia* isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*. 22, 321–329.
- Mc Neil, D. L. (1982).** Variations in Ability of *Rhizobium japonicum* Strains To nodulate Soybeans and Maintain Fixation in the Presence of Nitrate . *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 647-652.
- Meeks, J. C. Elhai, J. (2002).** Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free living and plant associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 94 – 121.
- Miller, K. J. Wood, J. M. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Ann. Review. Microbiol.* 50, 101-136.
- Moore, G. Sanford, P. Wiley, T. (2006).** perennial pastures for western Australia. *Sulla* (*Hedysarum coronarium*). Herbaceous perennial legumes. Department of agriculture and food Western Australia, Perth. Bulletin 4690.
- M.P. (1998).** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of *Rhizobia* nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.* 84, 81-89.

- Muresu, R. Porceddu, A. Sulas, L. Squartini, A. (2019).** Nodule-associated microbiome diversity in wild populations of *Sulla coronaria* reveals clues on the relative importance of culturable rhizobial symbionts and co-infecting endophytes. *Microbiological research*. 221, 10-14.
- Nouar, M. Riabi, K. (2014).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse *Hedysarum pallidum* Desf. ,pousant dans deux sites différents. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de master de microbiologie. *Ecologie Microbienne* p 83.
- Pawlowski, K. Bisseling, T. (1996).** Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the SharedFeatures?. *Plant .Cell*. 8, 1899-1913.
- Pelmont, J. (1995).** Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. *Office des Publications Universitaires* 2: 541 -572.
- Peret, B. (2007).** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier III (France) .
- Perry, J. J. Staley, J. T. Lory, S. (2004).** *Microbiologie*. Edition Dunod, Paris. *Phytolo*. 147, 449–481
- Quezel, P. Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Tome I.PP : 1170.
- Rao, D. L. N. Mohanty, S. R. Chinmayee, A. Nagvanti, A. (2018).** Rhizobial Taxonomy-Current Status.IUNFC Newsletter. 3, 1- 4.
- Raza, S. Jørnsgård, B. Abou-Taleb, H. Christiansen, J. L. (2001).** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* 32 (6), 379-383.
- Razika, G. Amira, B. Yacine, B. & Ammar, B. (2012).** Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sultae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. *African Journal of Microbiology Research*. 6(30), 5940-5946
- Reeve, W. Chain, P. O'Hara, G. Ardley, J. Nandesena, K. Bräu, L... Howieson, J. (2010).** Complete genome sequence of the Medicago microsymbiont Ensifer (*Sinorhizobium*) medicae strain WSM419. *Standards in Genomic Sci*. 2(1), 77–86.
- Robledo, M. Jiménez-Zurdo, J. I. Velázquez, E. Trujillo, M. E. Zurdo-Piñeiro, J. L. Ramírez-Bahena, M. H. ... & Mateos, P. F. (2008).** *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(19), 7064-7069.
- Rubiales, D. Khazaei, H. (2022).** Progrès dans la résistance aux maladies et aux ravageurs chez les fèves. *Theoretical and Applied Genetics*. 135(11), 3735-3756.
- Saadallah, K. Drevon, J. J. Abdelly, C. (2001).** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie*. 21 , 627–634.
- Sadowsky, M. J. Graham, P. H. (1998).** Soil biology of the *Rhizobiaceae*. 155-172 p
- Saidi, I. (2021).** Contribution à l'étude de l'effet de la contrainte saline sur deux espèces d *Hedysarum* (*H.flexuosum* et *H.coronarium*) au stade plein croissance . En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Agronomie. *Production Végétale et Agriculture Durable*. 52 p.
- Sana, F. D. Faysal, B. J. Kais, Z. Salah, R. & Ridha, M. (2012).** Effet de l'inoculation par une souche osmotolerante de *Rhizobium sultae* sur la croissance et la production en protéine du *sulla* (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique. *Journal of Applied Biosciences*, 51, 3642-3651.

- Sathya, A. R. Vijayabharathi, Gopalakrishnan, S. (2017).** Plant growth-promoting Actinobacteria: A new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *Biotech.*, 7(102): 1-10.
- Saxena, M. C. (1991).** Status and scope for production of faba bean in the Mediterranean countries. *Options Méditerranéennes*. 10: 15–20. Série Séminaires.
- Schneider, A. Huyghe, C. (2015).** Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables . éditions Quae. 512 p.
- Schumpp, O. Deakin, W. J. (2010).** How inefficient *Rhizobia* prolong their existence within nodules. *Trends in Plant Science*, 15(4), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.001>
- Singh, A. K. Bharati, R. C. Manibhushan, N. C. Pedpati, A. (2013).** An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect. *African Journal of Agricultural Research*, 8(50), 6634–6641.
- Smil, V. (2002).** Biofixation and nitrogène in the biosphere and in global food production. Dep Geogr Univ Manitoba, Winnipeg, MB, R3T 2N2 Canada.
- Somasegaran, P. Hoben, H. (1994).** Handbook for *Rhizobia*: Methods in Legume? *Rhizobium* Technology. Springer-Verlag, Berlin. 511p.
- Soumare, A. Diedhiou, A. G. Thuita, M. Hafidi, M. Ouhdouch, Y. Gopalakrishnan, S. Kouisni, L. (2020).** Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. *Plants*. 9(8), 1011.
- Skorupska, A., D. Kidaj et J. Wielbo (2017).** Flavonoids and Nod Factors: Importance in legume-microbe interactions and legume improvement. pp: 75–94. In: *Microbes for Legume Improvement*. Zaidi et al. (Eds.). Springer International Publishing.
- Spaink, H. P. (2000).** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 54(1), 257-288.
- Sprent, J. I. (1995).** Legume trees and shrubs in the tropics N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem.* (27) 401–407.
- Sprent, J. I. Ardley, J. James, E. K. (2017).** Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol.* 215, 40–56. <https://doi.10.1111/nph.14474>
- Squartini, A. Struffi, P. Do-ring, H. Selleska -Pobell, S. Tola, E. Giacomini, A. Vendramin, E. Velazquez, E. Mateos, P. F. Martinez-Monila, E. Dazzo, F. B. Caszlla, S. Nuti, M. P. (2002).** *Rhizobium sullae* Sp. nov. (Formely *Rhizobium hedysari*); The root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J, Syst EVol Microbiol.* 52, 1267-1276.
- Steenhoudt, O. Vanderleyde, J. (2000).** Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS. Microbiol. Rev.* 24, 487–506.
- Streng, A., R. Op Den Camp, T. Bisseling et R. Geurts (2011).** Evolutionary origin of *Rhizobium* Nod factor signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 6(10): 1510–1514.
- Struffi, P. Corich, V. Giacomini, A. Benguedouar, A. Squartini, A. Casella, S et Nuti, M.P. (1998).** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of *Rhizobia* nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.* 84 , 81-89.

- Sugiyama, A, Yazaki, K. (2014).** Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication. *Plant Biotechnology*. 31(5), 431-443. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0917a>
- Svistoonoff, S. (2003).** Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de L'université Montpellier II – Sciences et techniques du languedoc UFR des Sciences. *Physiologie Végétale*. 68 p.
- Swaraj, K. Bishnoi, N. R. (1999).** Effet of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 37 (9) ,843-848.
- Torche, A. (2006).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, Algérie. 166 p.
- Trinick, M. J. Hadobas, P. A. (1988).** Biology of the *Parasponia - Bradyrhizobium* symbiosis. *Plant and Soil* (110) 177-185.
- Trifi-Farah, N., Chatti, W. S., Marrakchi, M., & Pernèst, J. (1989).** Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium* L. en Tunisie. *Agronomie*. 9(6), 591-598.
- Vandamme, P. B. Grillis, P. D.V. Kersters, K. Swing, J. (1996)** . Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.* 60, 407-438.
- Vertès, F. Jeuffroy, M. H. Justes, E. Thiebeau, P. Corson, M. S. (2010).** Connaître et maximiser les bénéfices environnementaux liés à l'azote chez les légumineuses, à l'échelle de la culture, de la rotation et de l'exploitation. *Innovations agronomiques*, 11, 25-44.
- Vertès, F. Jeuffroy, M. H. Louarn, G. Voisin, A. S. Justes, E. (2015).** Légumineuses et prairies temporaires: des fournitures d'azote pour les rotations. *Fourrages*. 223, 221-232.
- Villax, E. J. (1963).** La culture des plantes fourragères dans la région méditerranéenne occidentale". In. *Les cahiers de la recherche agronomique*. (INRA Rabat, Maroc, ed.). (17), 641p.
- Vincent, J. M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. In: *IBP Handbook*, Blackwell, Oxford, UK.
- Wang, H. Noren, A. (2006).** Metabolic regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 160-161.
- Wojciechowski, M. F. Lavin, M. Sanderson, M. J. (2004).** A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analyses of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*. 91(11), 1846–1862.
- Yan, Y. Yang, J. Dou, Y. Chen, M. Ping, S. Peng, J. Lu, W. Zhang, W. Yao, Z. Li, H. Liu, W. He, S. Geng, L. Zhang, X. Yang, F. Yu, H. Zhan, Y. Li, D. Lin, Z. Wang, Y. Elmerich, C. Lin, M. Jin, Q. (2008).** Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the Nat. Acad. of Sci. U. S. A.* 105, 7564 – 7569.
- Young, J. P. W. (1992).** Phylogenetic classification of nitrogen fixing-organisms. *Biological Nitrogen Fixation*. eds. G Stacey, RH Burris, and HJ Evans. Chapman & Hall: New York. 43-86.
- Zahran, H. H. Ahmad, M. S. Abdel-Fatteh, M. Zaki, A. Y. (1999).** Phenotypic characteristics, cross nodulation and nitrogen fixation of root nodule bacteria isolated from wild leguminous plants in Egypt. *Proc. Int. Symp. Biol. Nit. Fix. and Crop Prod.* 77-90.

Zaidi, A. Mahiout, B. (2012). Voyage au coeur des aliments. 200p.

Zakhia, F. de Lajudie, P. (2001). Taxonomy of *Rhizobia*. Mini-review. *Agronomie*, (21) 569–576.

Zoghalmi, A. Hassen, H. (2004). Ressources génétiques des espèces spontanées de légumineuses fourragères et pastorales en Tunisie. Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza (Spain) : 11ème Réunion du Sous réseau Ressources Fourragères Méditerranéennes du Réseau Coopératif Interrégional FAO-CIHEAM de Recherche et Développement sur les Pâturages et les Cultures Fourragères, 2002/10/29-2002/11/01, Djerba (Tunisia). Cahiers Options Méditerranéennes. Vol.62 : 375-377.

Annexes

Annexe I Milieux de culture et solutions utilisés

1. Milieux de culture bactérienne

Milieu liquide YMB (Yeast Mannitol Broth)

Mannitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20g
NaCl	0.10 g
Extrait de levure	0.50 g
H ₂ O distillée	1.0 litre

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Milieu gélosé YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMB	1.0 litre
Agar	18 g

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Milieu YMA au rouge Congo (YMA+RC)

YMA	990ml
Solution stock de Rouge Congo*	10 ml

* (0.25g de Rouge Congo dissous dans 100 ml d'eau distillée)

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Milieu de culture TYA

Tryptone	5.00 g
Extrait de levure	3.00 g
CaCl ₂ H ₂ O	0.87 g
Agar	15 g

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

2. Les solutions utilisées**Solution de chlorure de mercure acidifié**

La composition chimique de cette solution en g/l d'eau distillée est :

HgCl ₂	1.00 g
HCl 1N	5 ml

Annexe II**Coloration de Gram**

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50 – 60 °C (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Violet de Gentiane pendant 1 min.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 min.
- Rincer à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool-acétone en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée jusqu'à ce que l'alcool-acétone s'écoule non teinté ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- Rincer abondamment à l'eau.
- Recouvrir la lame d'eau et verser quelques gouttes de fuchsine à chaque extrémité du frottis. Ne jamais verser la fuchsine directement sur le frottis (risques de dépôts, de

coloration trop intense). On peut préparer, juste avant l'emploi, une dilution de fuchsine au 1/10 et verser le colorant ainsi dilué sur la lame et laisser agir une minute.

- Rincer à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50 °C. Les lames doivent être parfaitement sèches.

- Observer au microscope optique à l'objectif x 1000 (WILL), en immersion avec de l'huile à immersion.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Ecologie et Environnement

Spécialité : Ecologie Microbienne

Titre

**Caractérisation des endophytes chez les légumineuses:
la Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) et la fève (*Vicia faba* L.).**

Ce travail a été réalisé dans le but de mettre en évidence les bactéries isolées à partir des nodules racinaires de deux plantes légumineuses à savoir *Hedysarum coronarium* L. et *Vicia faba* L., poussant dans la région Est de l'Algérie dans wilaya de Constantine. Les isolats sont identifiés par une approche morphologique suivie d'une série de tests phénotypiques qui regroupe des analyses biochimiques et physiologiques. A travers les différents résultats obtenus dans cette étude et qui sont basés sur des critères morfo-cultureux. Nous pouvons inclure nos isolats parmi les bactéries possédant les caractères des rhizobia nodulant les légumineuses.

Mot clés : Caractérisation, Nodule, Rhizobia, *Hedysarum coronarium* L., *Vicia faba* L.

Membre du jury :

Présidente : Mme GACI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : Mr BENHIZIA Yacine (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Mr CHABBI Rabah (MAA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Présentée par :

BOUKELOUA Cheima

BENOUADEN Chahinez

Année universitaire : 2022 -2023