



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE
LA VIE DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à
L'environnement « LAMAABE »

Mémoire

Présenté par

Mlle : Kaddouri Chourouk

Mme : Belbachir Khadidja

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Résistance des Rhizobiums aux insecticides

Soutenu le : 24-6-2024 Devant le jury

Présidente : Rahmoun Malika

MCB à L'université de TLEMCEN

Examinatrice : Nas Fatima

MCB à L'université de TLEMCEN

Encadreur : Rebiahi Sid Ahmed

Professeur à L'université de TLEMCEN

Année Universitaire 2023-2024

Remerciements

Merci mon Dieu le seigneur du trône de l'univers de nous éclairer le chemin tout au long de notre vie et de nous avoir aidé dans nos recherches et nous permettre de présente ce travail.

De nombreuses personnes ont contribué à la réalisation de ce travail, à qui nous aimerions présenter mes profondes gratitude.

*Nos remerciements les plus vifs et les plus sincères à monsieur **Rebiahi Sid Ahmed**, enseignant en Microbiologie, directeur de laboratoire de Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAAB), faculté SNV/STU, Département de biologie, Université de Tlemcen, pour ses judicieux encadrements, pour sa disponibilité, ses conseils précieux et ses encouragements qu'il nous a prodigués tout au long de ce mémoire. Nous le remercions d'avantage de nous avoir fait confiance pour mener à bien ce travail.*

*Un grand merci particulier à notre présidente de jury Mme **Nas Fatima** Maître assistante B, Département de Biologie faculté SNV/STU de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre mémoire.*

*Un merci particulier à l'examinatrice de ce mémoire Mme **Rahmoun Malika** Maître assistante B, Département de Biologie faculté SNV/STU pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.*

*On remercie également de tous nos cœurs tous les enseignants qui ont contribué à notre apprentissage depuis notre jeune âge à ce jour, et on leur adresse nos sentiments respectueusement reconnaissant pour tout le savoir qu'ils nous ont prodigués. Un merci exceptionnel à monsieur **Belaoui Mimoun** Doctorant, Département de physique.*

A toute la promotion «Microbiologie contrôle et qualité 2023-2024».

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin de quelque façons que ce soit, à la concrétisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A mes parents, À la lumière de mon cœur et l'éclat de mes yeux, à la source de toute tendresse, à ma chère maman **Faiza**, qui m'a encouragé, m'a toujours écouté, m'a soutenu moralement, et m'a prodigué ses précieux conseils, Aucun mot ne peut exprimer tous les sentiments que j'éprouve pour toi. Que Dieu te garde pour moi.*

*À mon cher papa **Abdelkader**, aucune dédicace ni aucun mot ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma reconnaissance pour tous les sacrifices que tu as faits pour ma formation, ma réussite et mon bien-être.*

*A mes frères : **Zakaria et Abdelmalek**.*

*A ma sœur **Tasnime** ma petite ange.*

*À mon fiancé **Abderrahmane**, merci pour votre soutien, vos précieux conseils et vos encouragements inlassables tout au long de mes études.*

À toute ma famille, à ma chère grand-mère, à mes oncles, mes tantes, mes cousines et cousins, ainsi qu'à tous ceux qui ont rendu ma vie agréable. Que Dieu te garde pour moi.

*A mes amies **Nour el Houda, Farihane, Amel, Ferial, khadidja, Hanaa**, pour tous les bons moments ainsi que pour les moments de désespoir que nous avons surmontés ensemble.*

*A mon binôme **khadidja**, je te souhaite tout le bonheur.*

Kaddouri Chourouk

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère sources de tendresse et de bonheur pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études et ma vie. Qu'elle trouve ici toute ma reconnaissance, ma gratitude et tout mon amour.

*A mes enfants **Wissal, Imed et Achraf** qui ont rendu ma vie agréable. Que Dieu les garde pour moi.*

*A mes sœurs **Amina et Asma**, ainsi qu'à leurs maris **Mehdi et Réda** et leurs enfants.*

*A toute ma famille et à toutes mes amies en particulier **Khadidja, Fadia et Faiza.***

*A monsieur **Sebaa Ghouti.***

*A ma petite ange **Sarra** la lumière de ma vie.*

*A mon binôme **Chourouk**, je te souhaite beaucoup de réussite dans ta vie.*

Enfin un grand remerciement à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à achever ce modeste travail.

Khadidja Belbachir

Résumé

Vicia faba est une légumineuse qui forme une interaction symbiotique avec les bactéries *Rhizobium*. Cette interaction provoque l'organogenèse d'un nouvel organe racinaire appelé nodosité, où un microenvironnement favorable permet aux *Rhizobiums* de se différencier en bactérie capables de fixer le diazote atmosphérique. Ces bactéries convertissent le N₂ atmosphérique en ammonium, qui est ensuite assimilé par la plante hôte.

L'étude phénotypique des souches, portant sur les caractères morphologiques et culturaux, la tolérance aux insecticides a révélé une grande diversité physiologique chez les isolats de *Vicia faba* testés. La résistance aux insecticides a été évaluée sur un milieu solide avec différentes concentrations de pesticides.

Les résultats obtenus montrent à la fois la résistance et la sensibilité des souches vis-à-vis des insecticides.

Parmi les trois molécules testées Chlorpyrifos-éthyl, semble être les moins efficace car l'ensemble des souches présentent une tolérance à au moins 1024 mg/l.

Aceplan sp 20 semble présenter une activité remarquable car même une faible concentration (0.5mg/l) de ce produit est arrivé à éliminé deux souches (p4-5 et p4-5(A)).

Ces données doivent être utilisées afin de faire un screening de nouvelles souches permettant la sélection des plus performantes en matière de tolérance aux insecticides.

Mots clés : *Rhizobium*, *Tolérance*, *insecticides*, *Vicia faba*.

Abstract

Vicia faba is a legume that forms a symbiotic interaction with bacteria *Rhizobium*. This interaction causes organogenesis of a new root organ called nodosity, where a favorable microenvironment allows the rhizobia to differentiate into bacteria capable of fixing the atmospheric nitrous. These bacteria convert atmospheric N₂ into ammonium, which is then assimilated by the host plant.

The phenotypic study of the strains, concerning morphological and cultural characteristics, tolerance to insecticides revealed a great physiological diversity in the isolates of *Vicia faba* tested. Insecticide resistance was assessed on a solid medium with different pesticide concentrations.

The results obtained show both resistance and sensitivity of the strains to insecticides. Among the three molecules tested Chlorpyrifos-ethyl, seems to be the least effective because all strains have a tolerance of at least 1024 mg/l.

Aceplan sp 20 seems to have a remarkable activity because even a low concentration (0.5mg/l) of this product arrived to eliminate two strains (p4-5 and p4-5(A)).

These data must be used in order to screen new strains allowing the selection of the most effective in terms of insecticide tolerance.

Keywords: *Rhizobium*, *Tolerance*, *insecticides*, *Vicia faba*.

ملخص

Vicia faba عبارة عن بقوليات تشكل تفاعلاً تكافلياً مع بكتيريا *Rhizobium*. يؤدي هذا التفاعل إلى تكوين عضوي لعضو جذر جديد يسمى العقيدات، حيث تسمح البيئة الدقيقة المواتية للريزوبيا بالتمايز إلى بكتيريا قادرة على تثبيت النتروجين في الغلاف الجوي. تقوم هذه البكتيريا بتحويل النيتروجين الموجود في الغلاف الجوي إلى أمونيوم، والذي يتم بعد ذلك استيعابه بواسطة النبات المضيف.

كشفت الدراسة النمطية للسلاسل، المتعلقة بالخصائص المورفولوجية والزراعة البكتيرية، والتحمل مع المبيدات الحشرية التي تم اختبارها. تم تقييم مقاومة المبيدات الحشرية على وسط صلب *Vicia faba* عن تنوع فسيولوجي كبير في عزلات بتركيزات مختلفة من مبيدات الآفات.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها مقاومة وحساسية السلالات للمبيدات الحشرية. من بين الجزيئات الثلاثة التي تم يبدو أنها الأقل فعالية لأن جميع السلالات لديها تحمل لا يقل عن 1024 ملجم/لتر Chlorpyrifos-ethyl اختبارها له نشاط ملحوظ لأنه حتى التركيز المنخفض (0.5 ملغ/لتر) من هذا المنتج وصل للتخلص من Aceptan sp 20 يبدو أن (A) p4-5 و p4-5 سلالتين.

يجب استخدام هذه البيانات من أجل فحص سلالات جديدة تسمح باختيار الأكثر فعالية من حيث تحمل المبيدات الحشرية

الكلمات المفتاحية: *Rhizobium*، التحمل، المبيدات الحشرية، *Vicia faba*.

Liste des figures

Figure 01 : Cycle de l'azote.....	05
Figure 02 : Dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuses.....	10
Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes.....	12
Figure 04 : Les étapes de la nodulation.....	19
Figure 05 : Répartition en pourcentage des pesticides.....	19
Figure 06 : Utilisation annuelle des pesticides en Algérie entre 1998 et 2017.....	20
Figure 07 : Géolocalisation de la zone d'étude.....	25
Figure 08 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans.....	28
Figure 09 : Les différentes concentrations de l'insecticides Chlorpyrifos-éthyl.....	32
Figure 10 : Croissance sur le milieu YMB.....	34
Figure 11 : Croissance des souches P3.3 et P2.3 sur le milieu YMA après 72 h d'incubation.....	35
Figure 12 : Aspect macroscopique de la souche P 2 .3 sur milieu YEM+RC après 48H d'incubation.....	36
Figure 13 : Aspect microscopique de la souche P 4.1 après coloration de Gram (Grossissement X100).....	37
Figure 14 : Observation microscopique des souches au microscope électronique à balayage.....	37
Figure 15 : Le résultat de l'oxydase de la souche p3.2.....	38
Figure 16 : Le résultat de la catalase de la souche p3.3.....	38
Figure 17 : Les résultats de l'utilisation de citrate.....	39
Figure 18 : La croissance des isolats P3.3 et P1.4 sur le milieu YMA+BTB.....	39
Figure 19 : La croissance de la souche P 2.4 sur le milieu YMA+BTB.....	40
Figure 20 : Aspect macroscopique de la souche P1.2 sur le milieu GPA+BCP.....	40
Figure 21 : Réduction des nitrates par l'isolat P3.3.....	41
Figure 22 : Réduction des nitrates après l'ajoute de poudre de zinc par l'isolat P 1.4.....	41

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Classification des Rhizobium.....	07
Tableau 02 : Classification des pesticides selon les organismes vivants visés.....	15
Tableau 03 : Conséquences des pesticides sur le Rhizobium.....	22
Tableau 04 : caractères culturaux.....	35
Tableau 05 : Croissance des souches de Rhizobium en présence de différentes Concentrations en pesticides.....	42

Liste des Abréviations

- **N** : L'azote
- **FBA** : Fixations Biologique de l'azote
- **N₂** : Azote atmosphérique
- **NH₃** : Ammoniac
- **NH₄** : Ammonium
- **EPS**: Exopolysacaride
- **PGPR** : Rhizobactéries Promotrice de la Croissance des Plantes
- **OMS** : l'Organisation Mondial de la Santé
- **FAO** : Organisations des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
- **H** : Herbicides
- **I** : Insecticides
- **F** : Fongicides
- **YMA** : Yeast-Mannitol-Agar.
- **YMB** : Yeast-Mannitol-Broth.
- **YMA+RC**: Yeast-Mannitol-Agar + Rouge Congo.
- **Nod**: Produit du gène de nodulation (facteur Nod)
- **BBT**: Bleu de bromothymol.
- **BCP** :Bromocresol purple

Table des matières

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des Abréviations

Table des matières

Introduction..... 01

Chapitre 01 : Rhizobium

1. Généralités..... 03

1.1 la fixation biologique de l'azote..... 03

1.2 Les bactéries fixatrices de l'azote03

1.2.1. Les fixateurs libres 04

1.2.2. Les fixateurs symbiotiques 04

1.3 Cycle d'azote04

1.3.1. L'ammonification 05

1.3.2. La Nitrification 05

1.3.3. La dénitrification 05

1.4. Les légumineuses 05

1.4.1. Légumineuse à graine *Vicia faba*..... 06

1.4.1.1. Description et origine 06

1.5. Rhizobium 06

1.5.1. Taxonomie de Rhizobium 07

1.5.2. Caractères généraux des Rhizobium..... 08

1.5.2.1. Caractères culturaux08

1.5.2.1.1. Les Rhizobium à croissance rapide 08

1.5.2.1.2. Les Rhizobium à croissance lente08

1.5.2.2 .Caractères biochimiques08

1.5.2.3. Caractères physiologiques09

1.5.2.4. Caractères symbiotiques 09

1.6. Symbiose Rhizobium-légumineuse09

1.6.1. Dialogue moléculaire	09
1.6.2. Les flavonoïdes	10
1.6.3. Facteurs Nod	11
1.6.4. Gènes des nodulation	11
1.6.4.1. Les gènes Nod spécifique	11
1.6.4.2. Les gènes structuraux Nod ABC	11
1.6.4.3. Les gènes Nod régulateurs	11
1.6.5. Nodulation	11
1.6.5.1. Les étapes de la formation des nodosités	12
1.7 La lutte biologique	13
Chapitre 02 : les pesticides	
2. Généralité sur les pesticides	14
2.1. Définition des pesticides	14
2.2. Historique des pesticides.....	14
2.3. Classification des pesticides.....	15
2.3.1. Selon la nature de la cible visée.....	15
2.3.2. Classification selon la nature chimique.....	16
2.3.2.1. Les pesticides organiques.....	16
2.3.2.2. Les pesticides inorganiques.....	16
2.3.2.3. Les bios pesticides.....	16
2.3.3 .Classification selon l'usage.....	16
2.4. Le mode d'action de principaux types de pesticides.....	17
2.4.1. Les herbicides.....	17
2.4.2. Les fongicides.....	17
2.4.3. Les Insecticides.....	17
2.5. Domaines d'application des pesticides.....	17
2.6. Règles essentielles d'utilisation des pesticides.....	18
2.7. Les pesticides dans le monde.....	18
2.8. Les pesticides en Algérie.....	19
2.9. Effets des pesticides sur l'environnement et la santé humaine.....	20
2.9.1 Effets sur la santé humaine.....	20
2.9.2 Effet sur l'environnement.....	21
2.9.3 Effet sur les micro-organismes bénéfiques du sol.....	21
2.10. La résistance aux pesticides.....	23

2.11 Mécanismes d'action (inhibition de la symbiose légumineuse Rhizobium).....	23
---	----

Chapitre 03 : Matériel & Méthodes

1. Description des zones étudiées.....	25
2. Matériel.....	26
2.1. Matériel biologiques.....	26
2.2. Milieux de culture.....	26
2.3. Matériel.....	26
2.3.1. Principaux appareils et matériel utilisés.....	26
2.3.2. Colorants réactifs et autres.....	27
3. Méthodes.....	27
3.1 Collecte des nodules.....	27
3.2. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	27
3.2.1. Stérilisation des nodules.....	27
3.2.2. Écrasement des nodules et ensemencement des boites.....	28
3.2.3. Incubation.....	28
3.3. Purification des isolats.....	29
3.4. Examen microscopique des isolats.....	29
3.4.1 .Coloration de Gram.....	29
3.4.2. L'état frais.....	29
3.5. Caractères cultureux des isolats.....	29
3.5.1. Test au Rouge Congo.....	30
3.5.2. Test au bleu de Bromothymol (BTB).....	30
3.5.3. Test de croissance sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA).....	30
3.6. Caractères biochimiques.....	31
3.6.1. Test de la catalase.....	31
3.6.2. Test de l'oxydase.....	31
3.6.3. Test de citrate.....	31
3.6.4. Réduction des nitrates.....	31
3.6.5. Conservation des isolats.....	32
3.6.5.1. Conservation à court terme.....	32
3.6.5.2. Conservation à long terme.....	32
3.6.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	32
3.6.6.1. Technique de la dilution sur milieu gélosé.....	32
3.6.6.2. Préparation des boites de pétri.....	32

3.6.6.3. Préparation de l'inoculum.....	32
---	----

Chapitre 04 : Résultats & discussions

1. Isolement du Rhizobium.....	34
2. Caractérisation culturale et morphologique des isolats.....	34
2.1. Caractères macroscopiques.....	34
2.1.1. Croissance sur milieu YMB.....	34
2.1.2. Croissance sur milieu YMA.....	34
2.1.3. Croissance sur YEM+ Rouge Congo.....	36
2.2. Caractéristique microscopique.....	37
2.2.1. Coloration de Gram.....	37
2.2.2. État frais.....	38
3. Caractère biochimique.....	38
3.1. Test des catalase et oxydase.....	38
3.2. Test de citrate.....	39
3.3. Test au bleu de Bromothymol (BTB).....	39
3.4. Croissance sur milieu GPA + BCP.....	40
3.5. Réduction des nitrates.....	40
4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	41
Conclusion	44
Référence bibliographique	45
Annexe	61

INTRODUCTION

Introduction

L'azote (N), un constituant vital pour les êtres vivants, est indispensable à la production de plusieurs molécules cellulaires essentielles, comme les protéines et les acides nucléiques **(Hu et al., 2024)**. Ce composé conditionné par la présence dans le sol d'azote sous forme utilisable, qu'il soit oxydé ou réduit, minéral ou organique. C'est l'un des plus abondants de la planète, il représentant près de 80 % de l'atmosphère, où il se trouve sous la forme de diazote gazeux (N₂), une forme chimiquement très stable et inexploitable par la majorité des organismes vivants **(Alunni, Mergaert, 2017)**.

La production de légumineuses fourragères et alimentaires représente, en Algérie, l'un des principaux défis de l'agriculture, à côté des céréales. Les légumineuses présentent un intérêt dans un sol à faible teneur en azote, car elles peuvent établir une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec les bactéries Rhizobiums existantes dans le sol **(Riah, 2014)**.

Vicia faba est une légumineuse qui a la capacité de fixer l'azote en symbiose avec Rhizobium, est connue pour capter le pourcentage le plus élevé d'azote atmosphérique. La quantité d'azote fixée par la *Vicia faba* varie entre 240 et 325 kg/ha. Cette capacité à fixer l'azote dépend de nombreux facteurs, notamment de l'efficacité de la souche symbiotique **(Benselama et al., 2018)**.

Les bactéries Rhizobium ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes, pouvant se développer soit dans le sol soit dans les nodules racinaires des légumineuses hôtes **(Pranita et al., 2015)**.

La fixation biologique de l'azote est un processus ancien où le dinitrogène atmosphérique est converti en une forme réduite, exclusivement réalisée par les bactéries et les Archées. C'est l'un des services écologiques les plus importants que les microbes fournissent aux eucaryotes. Divers organismes tels que les animaux, les plantes, les champignons et les protistes établissent des interactions symbiotiques avec les bactéries fixatrices de N₂. Ces symbioses se traduisent souvent par la formation de nodules racinaires spécialisés, parfois même sur les tiges. La capacité de fixer l'azote a été observée chez certaines espèces appartenant aux Alphaprotéobactéries et aux Bétaprotéobactéries, notamment les Rhizobiums en association avec les légumineuses **(Masson-Boivin et Sachs, 2018)**.

Les pesticides sont une classe de substances chimiques employées à travers le monde telles que les herbicides, les insecticides, les fongicides (**Ortiz-Hernández et al., 2013**). Leur utilisation est essentielle pour une production agricole optimale. En effet, ils garantissent un bon rendement des cultures. Avec l'extension des surfaces cultivées en Algérie, l'usage des pesticides à usage agricole est de plus en plus courant. Environ 400 substances actives de pesticides, représentant près de 7000 spécialités, sont commercialisées chaque année (**Zamoum et al., 2023**).

Cependant, il a été démontré que certains pesticides peuvent rester dans le sol pendant de longues périodes, affectant ainsi le développement d'organismes dans la rhizosphère ainsi que la santé humaine, qui sont deux des effets secondaires les plus remarquables. (**Mayo-Prieto et al., 2022**)

Certains pesticides utilisés en agriculture peuvent être nocifs pour les bactéries fixatrices d'azote, non seulement en inhibant le processus de fixation de l'azote chez les bactéries, mais aussi en réduisant le taux de respiration de la bactérie et donc en empêchant ses effets positifs (**Pranita et al., 2015**). Malgré que ces obstacles, certains *Rhizobium* ont montré une grande résistance aux effets toxiques des pesticides. Il est possible que cette résistance soit causée par divers mécanismes, tels que la dégradation des pesticides (**Bipte et al., 2012**).

L'objectif de notre travail consiste à isoler *Rhizobium* et étudier la résistance aux insecticides. En vue de réaliser un criblage des souches adaptées au facteur bioclimatique de l'Algérie, ces souches performantes en matière de résistance aux insecticides doivent avoir un grand pouvoir compétitif pour les réintroduire en agriculture.

Chapitre 01 :

Rhizobium

1. Généralités

1.1. la fixation biologique de l'azote

Le plus besoin de l'azote (N) après l'eau sont les plantes (**White et Brown, 2010**). Sa disponibilité affecte la croissance et le développement des plantes, ainsi que le rendement des cultures (**Gutiérrez, 2012**). Même si l'azote est présent en grande quantité dans la biosphère, la plupart de l'azote se trouve sous la forme de gaz atmosphérique qui ne peut pas être accessible biologiquement (**Canfield et al., 2010**).

La fixation biologique de l'azote (FBA) est un processus clé dans le cycle de l'azote et la principale source d'azote disponible dans le sol (**Li et al., 2022**). La FBA est une méthode naturelle de transformation de l'azote atmosphérique (N₂) en une forme soluble simple et non toxique, principalement le NH₄⁺ (ammonium), exploitée par les cellules végétales pour la production de différentes biomolécules. Elle est exclusivement effectuée par des procaryotes (Archées et bactéries). Les bactéries sont représentées par divers groupes, tels que les bactéries libres comme *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* ou *Clostridium* et les bactéries symbiotiques comme *Rhizobium* associé aux légumineuses; *Frankia* associé aux plantes actinorhizales et les cyanobactéries associées aux cycas (**Soumare et al., 2020**).

La fixation biologique de l'azote est estimée à plus de 170 millions de tonnes par an dans la biosphère, dont 80 % est due à la symbiose entre les bactéries *Rhizobium* et les légumineuses (**Purwaningsih et al., 2021**).

La fixation de l'azote représente un coût énergétique élevé et la réduction du dinitrogène en ammoniac nécessitant au moins 16 ATP par dinitrogène fixe. Toutefois, le coût réel est estimé à 20 à 30 ATP, en prenant en considération la production du complexe nitrogénase (**Pankievicz et al., 2019**). Le complexe de nitrogénase largement conservé chez les diazotrophes libres et symbiotiques, leur confère la capacité de participer à divers types d'associations ou d'interactions avec leurs plantes hôtes, La voie de réduction biologique du N₂ inerte en ammoniac (NH₃) sous des conditions micro-aérobies est représentée comme suit (**Mahmud et al., 2020**) :



1.2. Les bactéries fixatrices de l'azote

Les procaryotes fixateurs d'azote également appelés diazotrophes, peuvent se présenter sous une forme libre ou établir des associations symbiotiques (**Pankievicz et al., 2019**).

1.2.1. Les fixateurs libres

Les diazotrophes libres constituent une petite fraction de l'écosystème des rhizosphères végétales et appartiennent à divers groupes bactériens, tels que les alphaprotéobactéries (les Rhizobia, Bradyrhizobia, Rhodobacteria), les bêtaprotéobactéries (Burkholderia, Nitrosospira), les gammaproteobactéries (Pseudomonas, Xanthosomas), les firmicutes, et les cyanobactéries **(Mahmud et al., 2020)**.

1.2.2. Les fixateurs symbiotiques

Les diazotrophes, lorsqu'ils sont en symbiose avec les plantes, sont appelés symbiotes, les diazotrophes hétérotrophes et les phototrophes s'associent pour fixer le N₂. Parmi eux, les Rhizobium, qui forment des associations symbiotiques avec la famille des légumineuses **(Ladha et al., 2022)**.

Frankia est une bactérie filamenteuses sporulantes appartenant à la classe des actinomycètes, établissent des associations avec des arbres et des arbustes tels que les Casuarina, les Myrica et les Alnus **(Rabah, 2009)**.

Le processus symbiotique conduit à la formation de nodosités, sous le nom de nodules actinorhiziens ou actinorhizes, sur le système racinaire lesquels servent de lieu d'hébergement au microorganisme. À l'intérieur de ces structures, la plante hôte fournit des substrats carbonés à Frankia, qui en retour, convertit l'azote atmosphérique en ammoniac indispensable à la croissance du partenaire végétal. La symbiose actinorhizienne, moins étudiée que celle entre Rhizobium et les légumineuses, favorise une fixation d'azote similaire et joue un rôle écologique essentiel **(Benabdoun et al., 2012)**.

1.3. Cycle d'azote

Le processus FBA est à l'origine de la bio géochimie de la Terre, grâce auquel l'azote est libéré de l'atmosphère vers les écosystèmes terrestres et marins. L'azote moléculaire réactif est réduit lors de la FBA pour se transformer en composés d'ammonium. Ces formes fixées d'azote se transforment ensuite en une large gamme d'acides aminés et de composés oxydés par des microorganismes, puis sont réintroduites dans l'atmosphère sous forme d'azote moléculaire. La dénitrification microbienne dans les sols est responsable de ce processus **(Fowler et al., 2013)**.

Les différentes étapes du cycle de l'azote :

1.3.1. L'ammonification

L'ammonification est la création d'ammonium (NH_4^+) ou d'ammoniac (NH_3) par la décomposition de la matière organique d'origine végétale ou animale présente dans le sol, cette transformation est effectuée par divers microorganismes présents dans les sols et les eaux (Figure 1) (Machefert *et al.*, 2002).

1.3.2. La Nitrification

La nitrification est un processus strictement aérobie, réalisé par les bactéries : Nitrosomonas et Nitrobacter (Machefert *et al.*, 2002). Il implique une série d'oxydations visant à convertir l'ammoniac (NH_3) en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-) (Pashaei *et al.*, 2022).

1.3.3. La dénitrification

Se déroule en anaérobiose, au cours duquel le nitrate (NO_3^-) et le nitrite (NO_2^-) sont convertis en azote gazeux, principalement sous forme d'oxyde nitreux (N_2O) et d'azote (N_2) (Pashaei *et al.*, 2022).

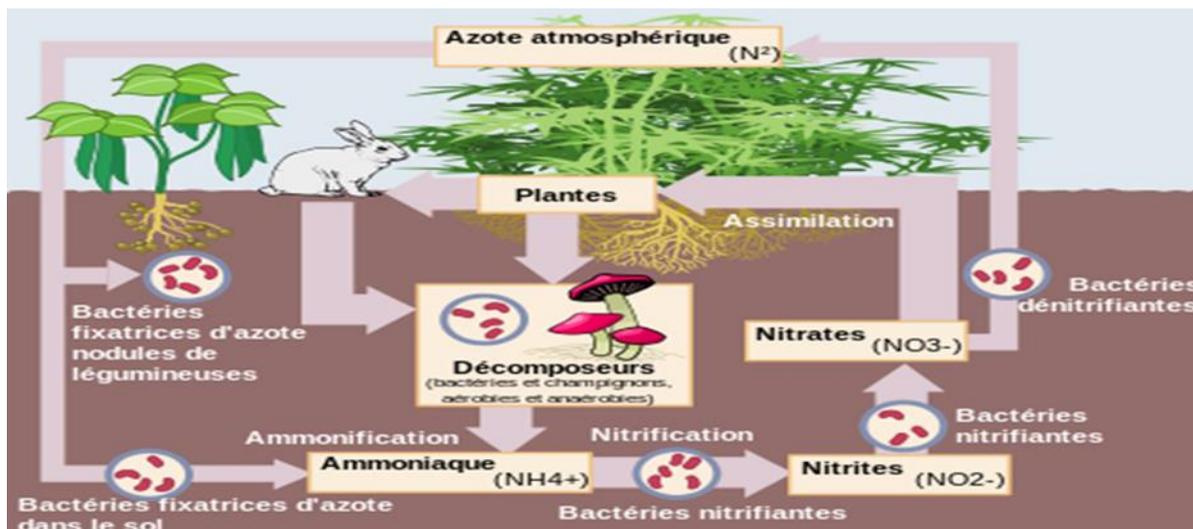


Figure 01 : Cycle de l'azote (Baba Arbi, 2016).

1.4. Les légumineuses

Les plantes légumineuses sont des plantes dont le fruit est une gousse (Magrini et Bedoussac, 2017). La présence des légumineuses dans la plupart des systèmes de culture à l'échelle mondiale est due à leur aptitude à établir une symbiose fixatrice d'azote avec les Rhizobiums. Toutefois, les trois principales cultures céréalières du monde, le riz, le blé et le maïs, ne sont pas associées aux Rhizobium (Pankiewicz *et al.*, 2019). Malgré leur rendement potentiellement plus faible et leur rentabilité moindre par rapport aux céréales, les légumineuses sont souvent intégrées aux rotations de cultures en raison de cette capacité unique (Murray *et al.*, 2017).

Les légumineuses appartiennent à la famille des Fabacées, sont la troisième famille des Angiospermes après les Orchidaceae et les Asteraceae, avec plus de 700 genres et près de 20 000 espèces (Lewis et al., 2005).

1.4.1. Légumineuse à graine *Vicia faba*

1.4.1.1. Description et origine

La fève, connue sous le nom botanique de *Vicia faba* L., fait partie de la famille des Fabaceae, appartenant à la sous-famille des Papilionaceae selon (Mezani et al., 2016). C'est une légumineuse annuelle qui donne des graines, mesurant de 60 à 200 cm. Elle possède une tige creuse et rigide, avec une feuille de 2 à 6 folioles. Les fleurs sont groupées en grappes. Le fruit est une gousse à la peau épaisse (Daoui, 2007).

Vicia faba est considérée comme l'une des premières plantes domestiquées au Néolithique. Cette culture, principalement cultivée pour l'alimentation animale et humaine sous forme de graines fraîches ou sèches, est présente dans les plaines côtières et sous-littorales en Algérie. Elle est aussi importante dans les montagnes, notamment en Kabylie, où elle sert à la fois de nourriture humaine et animale. En 2013, *Vicia faba* a été la culture légumineuse la plus importante en Algérie, avec une superficie de 37 000 hectares et une production totale de 42 000 tonnes, bien que cela demeure modeste comparé à la production mondiale totale (Belhadi et al., 2018).

1.5. Rhizobium

Rhizobium est un nom générique pour un certain groupe Gram négatif, qui peuvent former des nodules sur la racine, ou dans certains cas sur les tiges, de leurs hôtes et fixer l'azote en symbiose avec les légumineuses comme leurs plantes hôtes (Lindström et Mousavi, 2020).

Les Rhizobiums, ou Rhizobia, sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des Rhizobiaceae. Les rhizobiums sont des bâtonnets, mobiles (Duhoux et Nicole, 2004). Non sporulées (Zakhia et Lajudie, 2001). 0.5 à 0.9 μm de largeur et de 1.2 à 3 μm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Ces bactéries capable de former une symbiose avec des plantes de la famille des Fabacées, établissant un échange de signaux moléculaires avec la plante hôte qui lui fournit des sucres. Le partenaire bactérien convertit l'azote atmosphérique en ammoniac (Yaw Boakye et al., 2016).

Les Rhizobiums libres peuvent infecter les racines des plantes et créer des structures morphologiques spécifiques appelées nodules racinaires (Shumilina et al., 2023).

1.5.1. Taxonomie de Rhizobium

Les Rhizobiums sont des bactéries qui font partie de deux sous classes phylogénétiques différentes : les α -protéobactéries et les β -protéobactéries. Avec plus de 100 espèces réparties en 13 genres différents : (i) 11 représentant la sous-classe α -Protéobactéries et qui englobe les genres suivants : Rhizobium, Mesorhizobium, Ensifer, actuellement Sinorhizobium, Bradyrhizobium, Phyllobacterium, Microvirga, Azorhizobium, Ochrobactrum, Methylobacterium, Devosia et Shinella. (ii) Deux types de bactéries de la sous-classe β -Protéobactéries, l'ordre des Burkholderiales, comprenant Burkholderia et Cupriavidus, anciennement appelés Ralstonia (Zakhia, de Lajudie, 2001) (Rüberg et al., 2003) (Velázquez et al., 2017) (Tableau1).

Tableau 01 : Classification des Rhizobium (Noel, 2009).

Protéobactéries		Espèces		
Division	Genre	Nombre	Représentatives	Hôtes représentatives
Alpha	Rhizobium	16	<i>R.leguminosarum</i> <i>R.etli</i> <i>R.tropici</i>	P.sativum, Trifolium etc. Phaseolus Leucaena
	Bradyrhizobium	7	<i>B.japonicum</i> <i>B.elkanii</i>	Glycine, Vigna Glycine
	Sinorhizobium(Ensifer)	11	<i>S.eliloti</i> <i>S.fredii</i>	Medicago Glycine, Vigna
	Azorhizobium	2	<i>A.caulinodans</i>	Sesbania
	Mesorhizobium	11	<i>M.loti</i>	Lotus spp.
	Allorhizobium	1	<i>A.undicola</i>	Neptunia
	Methylobacterim	1	<i>M.Nodulans</i>	Crotalaria Spp.
	Devosia	1	<i>D.neptuniaae</i>	Neptunia
	Ochrobacterim	1	<i>O.lupinus</i>	Lupinus
	Phyllobacterim	1	<i>P.lupinii</i>	Trifolium et Lupinus
Beta	Burkholderia	5	<i>B.phymatum</i>	Mimosa
	Cupriavidus (Ralstonia)	2	<i>C.taiwanensis</i>	Mimosa

1.5.2. Caractères généraux des Rhizobiums

Plusieurs recherches de microbiologistes ont été réalisées afin d'évaluer la variété des Rhizobiums. Ces études ont permis d'étudier plusieurs caractéristiques phénotypiques et génétiques, qui ont été de base pour la définition de l'espèce (**Dahbia ,2016**).

1.5.2.1. Caractères cultureux

Les Rhizobiums cultivés nécessitent un milieu de culture contenant du carbone, de l'azote et des sels minéraux (**Somasegaran et Hoben, 1994**). Le yeast mannitol agar (YMA) est un milieu solide qui favorise la culture de Rhizobiums. Les colonies sont de forme circulaire, de teinte blanche opalescente ou laiteuse, exhibant une texture humide et translucide. Elles peuvent aussi présenter des variations de surface, pouvant être lisses, brillantes ou au contraire, rugueuses. Les colonies jaunes ont tendance à être plus pâles, surtout dans le cas de cultures plus anciennes (**Somasegaran et Hoben, 1994**).

Les Rhizobiums sont classés en deux grands groupes :

1.5.2.1.1. Les Rhizobiums à croissance rapide :

Après 2 à 3 jours dans un milieu de culture liquide, elles développent une turbidité remarquable, avec un temps de génération de 2 à 4 heures. Elles peuvent utiliser différents hydrates de carbone (mais elles sont généralement plus développées sur le glucose, le mannitol et le saccharose), ce qui entraîne souvent une production d'acide. Les Rhizobiums de ce groupe sont souvent présents sur les légumineuses des régions modérées et chaudes (**Sadowsky et al., 1983**) (**Somasegaran et Hoben, 1985**) (**Bala et al., 2004**).

1.5.2.1.2. Les Rhizobiums à croissance lente :

Ils nécessitent 3 à 5 jours pour produire une turbidité modérée dans un milieu liquide , avec un temps de génération de 6 à 7 heures. Ce groupe de Rhizobium produit des alcalis et se développe sur une variété moins large de sources de carbones (**Sadowsky et al., 1983**) (**Somasegaran et Hoben, 1985**) (**Bala et al., 2004**).

1.5.2.2 .Caractères biochimiques :

Les Rhizobiums produisent de nombreux éléments extracellulaires (EPS) et des lipopolysaccharides de la membrane externe, qui jouent également un rôle essentiel à différents stades de l'infection (**Baba Arbi, 2016**).

1.5.2.3. Caractères physiologiques :

La température optimale pour la croissance est de 28 degrés Celsius et le pH optimal est de 6 à 7, plus précisément de 6,8. Toutefois, certaines souches, comme *Rhizobium japonicum*, peuvent être viables dans des milieux acides (pH = 4) (Somasegaran et Hoben, 1994).

1.5.2.4. Caractères symbiotiques :

Il existe plusieurs types de symbioses fixateurs d'azote, certaines impliquant des cyanobactéries et d'autres des bactéries gram-négatives photosynthétiques et diazotrophes qui vivent en colonies filamenteuses et peuvent interagir avec des plantes aquatiques telles que les ptéridophytes (symbiose entre *Azolla*, fougère aquatique, et *Anabaena*) (Djouadi, 2018).

1.6. Symbiose Rhizobium-légumineuse

La relation symbiotique entre les légumineuses et les bactéries Rhizobium initialement décrite par Frank en 1889, représente un modèle d'étude pour l'interaction entre un organisme eucaryote et un procaryote. Cette association revêt une importance considérable du point de vue écologique et agronomique (Rajaonarimany, 2010).

Les plantes appartenant à la famille des légumineuses établissent une symbiose avec les bactéries Rhizobium, cette interaction entraîne la création de nodosités sur les racines où l'azote est fixé. Chaque variété de légumineuse a généralement une compatibilité exclusive avec un type particulier de symbiote Rhizobium (Wakeford, 2004).

Les plantes légumineuses et les bactéries de type Rhizobium sont en symbiose pour transformer l'azote atmosphérique en formes assimilables par les plantes. Les interactions complexes entre les deux partenaires sont le résultat de cette association mutuellement bénéfique (Fossou, 2011).

1.6.1. Dialogue moléculaire

L'interaction symbiotique entre les légumineuses et les Rhizobiums commence lorsque les bactéries reconnaissent les flavonoïdes. Cette interaction se produit à travers un échange de signaux complexe initié par la sécrétion de flavonoïdes d'origine végétale, cette reconnaissance des flavonoïdes induit la production d'un lipo-chito-oligosaccharide appelé le facteur Nod (NF), qui peut être détecté par la plante hôte légumineuse (Hawkins et Oresnik, 2022). Grâce à ce dialogue moléculaire, il est possible de reconnaître, d'infecter, de différencier les cellules ciliées des racines et de développer des nodules. Les bactéries symbiotiques, qui se manifestent sous

la forme de bactéroïdes, fixent l'azote à l'intérieur de ces nodules (**Figure 2**) (**Soumare et al., 2020**).

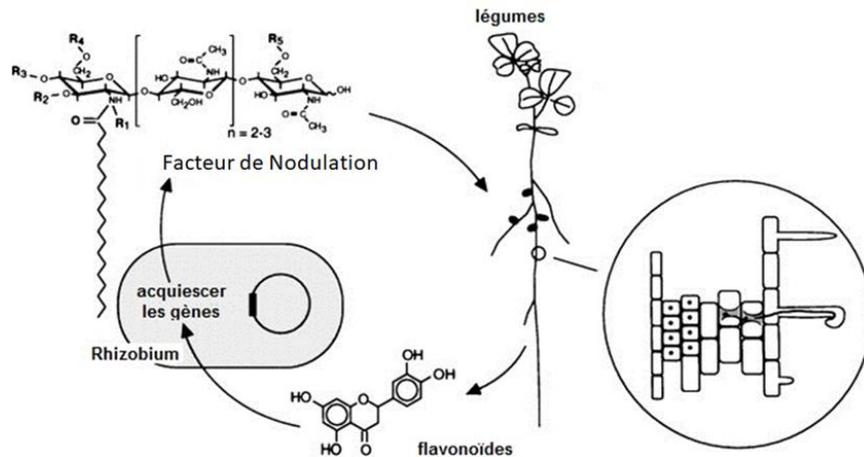


Figure 02 : Dialogue moléculaire Rhizobium-Légumineuses (**Lindström et al., 2010**).

1.6.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés photochimiques essentiels ayant leur origine dans le métabolisme secondaire des plantes, libérés dans la rhizosphère (**Figure 3**) (**Suty, 2015**).

Les flavonoïdes sont des composés issus des phénylpropanoïdes, sécrétés par les racines de la plante hôte. (**Schultze et al., 1992**) (**Foret ,2004**). Ils jouent le rôle d'activateurs des gènes de nodulation structurels des Rhizobiums, qui sont essentiels pour la synthèse du facteur Nod .Les Flavonoïdes, reconnus comme des agents antimicrobiens bien établis, représentent l'un des premiers moyens par lesquels la plante cible les bactéries (**Hawkins et Oresnik, 2022**).

Les graines de chaque légumineuse contiennent des iso flavonoïdes qui sont des inducteurs des gènes Nod de leur micro symbiote. Cette caractéristique permet aux Rhizobium de distinguer leurs hôtes parmi les autres légumineuses (**Hirsch et al., 2001**).

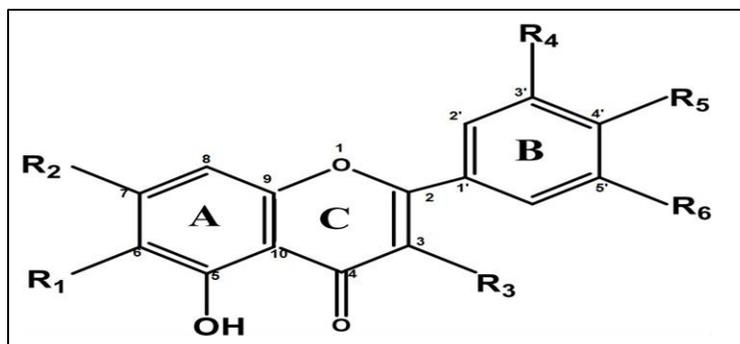


Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes (**Hernández, 2009**)

1.6.3. Facteurs Nod

La communication entre les plantes hôtes et les Rhizobiums symbiotiques est basée sur un sous-ensemble de gènes commun et suit une voie similaire. Le facteur Nod (NF) est composé de résidus de N-acétylglucosamine liés à 3-5 β (1-4), avec une queue d'acide gras attachée au premier résidu, et peut être modifié de différentes manières au niveau des résidus de N-acétylglucosamine (**Hawkins et Oresnik, 2022**). Sans ces signaux, les Rhizobiums ne peuvent pas pénétrer les racines des légumineuses, ce qui constitue un élément essentiel du développement symbiotique. (**Cooper, 2007**).

1.6.4. Gènes des nodulations

La majorité de ces gènes est située sur un plasmide (**John et al., 1985**) (**Franche et al., 2009**).

Ces gènes ont un rôle essentiel dans le dialogue moléculaire en permettant de détecter les signaux émis par la plante, principalement composés de flavonoïdes. Ces signaux entraînent l'activation du programme symbiotique précoce de la bactérie, influençant ainsi la production et la libération des signaux bactériens, à savoir les facteurs Nod (**Steinkellner et al., 2007**).

1.6.4.1. Les gènes Nod spécifique : Ils jouent un rôle actif dans les substitutions variables qui modifient la structure de base du facteur Nod, ce qui leur permet de jouer un rôle crucial dans la spécificité entre la bactérie et la plante. (**Perret et al., 2000**).

1.6.4.2. Les gènes structuraux Nod ABC : Ils sont également appelés gènes communs (*nodA*, *nodB* et *nodC*) et jouent un rôle essentiel dans la nodulation. Ils jouent un rôle essentiel dans la codification des enzymes impliquées dans la production du lipochitoooligosaccharide, ce qui entraîne la création du cadre essentiel des facteurs Nod (**Bladergroen et Spaink, 1998**) ; (**Roche et al., 1996**) ; (**Masson-Boivin et al., 2006**).

1.6.4.3. Les gènes Nod régulateurs : Le premier gène transcrit lors du processus de nodulation est le gène Nod D, qui fait partie de ces gènes. Ils sont responsables de la codification de protéines, qui en présence de signaux émis par la plante (flavonoïdes), induire l'expression d'autres gènes Nod, également connus sous le nom de gènes Nod locaux (**Spaink, 2000**).

1.6.5. Nodulation

Les nodules sont considérés comme le premier signe de l'association symbiotique, étroitement contrôlée par les mécanismes d'autorégulation internes de la plante hôte (**Journet, 2004**).

1.6.5.1. Les étapes de la formation des nodosités

- La plante légumineuse émet des flavonoïdes, des substances spécifiquement détectées par les Rhizobiums, impliquant un processus de chimio-tactisme où une souche bactérienne répond de manière sélective à ces signaux.
- Les bactéries se fixent aux poils absorbants de la plante, ce qui stimule la production de nombreux poils absorbants courts.
- Les bactéries perforeront ensuite la paroi cellulaire du poil absorbant. La membrane du poil absorbant subit une invagination pour former un tube connu sous le nom de cordon d'infection, qui s'enfonce dans la cellule.
- Le cordon d'infection se propage vers les cellules du cortex de la racine, où il se ramifie.
- Les cellules du cortex, en phase de division, commencent à former un nodule, un processus qui devient visiblement apparent.
- Le nodule continue à se développer, marquant le stade visible du processus de formation des nodosités (Figure 4) (Perrin, 2019).

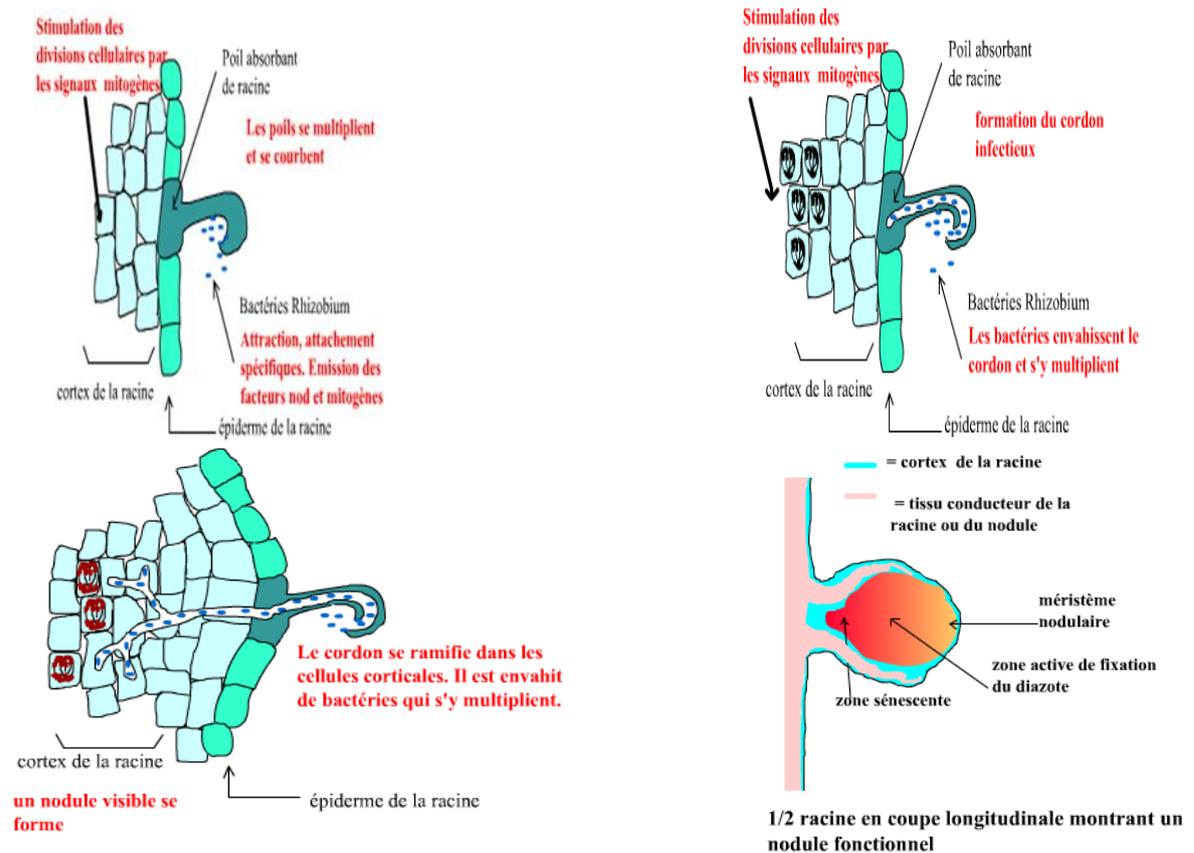


Figure 04 : Les étapes de la nodulation (Perrin, 2019).

1.7 La lutte biologique

Des composés tels que des vitamines, des acides aminés, des sidérophores et des auxines sont produits par Rhizobium. Il met en évidence également sa capacité à produire de l'acide acétique indole (IAA) et de l'acide gibbérellique (GA), ces deux derniers étant des hormones de croissance qui favorisent la germination et la croissance des plantes. De plus, le Rhizobium possède la capacité d'augmenter l'assimilation du phosphate, un élément nutritif indispensable pour le développement des racines (**Purwaningsih et al., 2021**). Les bactéries bénéfiques pour la croissance des plantes (PGPR) ont la capacité d'atténuer la toxicité des métaux lourds chez les plantes, notamment dans des environnements pollués (**Fatnassi et al., 2015**). La croissance des plantes est favorisée par les bactéries Rhizobium et les rhizobactéries (PGPR) (**Requena et al., 1997**). Stimuler la croissance des plantes implique l'enrichissement du sol par la fixation de l'azote, renforcer la protection des plantes en influençant la production de cellulase, protéase, lipase et β -1,3-glucanase. De plus, améliorer la défense des plantes se réalise en déclenchant une résistance systémique induite par des éléments tels que les lipopolysaccharides, les flagelles, les lactones homosérines, l'acétoïne et le butane diol, agissant ainsi contre les ravageurs et les agents pathogènes (**Gopalakrishnan et al., 2015**).

Chapitre 02 : les Pesticides

2. Généralité sur les pesticides

2.1. Définition des pesticides

Le terme pesticide dérive du mot anglais Pest qui englobent tout organisme vivant (virus, bactérie, champignon, ver, mollusque, insecte, rongeur, oiseau et mammifère) potentiellement nuisible pour l'homme et son environnement. Il est formé également à partir du mot latin cide signifiant frapper, abattre, tuer (**Gatignol et Etienne, 2010**).

Les pesticides peuvent aussi être définis comme des substances chimiques et des agents naturels utilisés pour gérer ou éliminer les ravageurs tels que les animaux, les organismes qui causent des maladies aux plantes et les mauvaises herbes. Il est aussi employé afin de maîtriser d'autres êtres vivants, comme les nématodes, les arthropodes qui attaquent des insectes et des vertébrés qui détruisent nos sources de nourriture et engendrent de nombreux problèmes de santé (**Rani et al., 2021**). Ces produits peuvent présenter des dangers pour l'environnement et la santé humaine (**Berrah, 2011**).

2.2. Historique des pesticides

La première utilisation enregistrée de pesticides remonte à environ 4500 ans, par les Sumériens qui ont employé des produits soufrés pour combattre les insectes et les acariens. Les pesticides ont évolué en cinq phases distinctes à savoir, avant l'an 1000 : la lutte antiparasitaire précoce; 1000-1850 : l'utilisation de dérivés végétaux, animaux ou minéraux ; 1850-1940 : la mise en œuvre de produits inorganiques et de déchets industriels; 1940-1970 : l'emploi de substances synthétiques organiques; Utilisation de composés organiques synthétiques à faible risque depuis 1970. À l'arrivée de la chimie organique dans le domaine de la science des pesticides après la Seconde Guerre mondiale, la science des pesticides industriels a été ouverte (**Umetsu et Shirai, 2020**).

Depuis la publication de Rachel Carson, le Printemps silencieux en 1962, et la persistance des conséquences néfastes directes et indirectes des pesticides sur les écosystèmes agricoles, les pesticides n'ont généralement pas été bien accueillis (**Matthews, 2018**).

Au cours du siècle dernier, de nombreuses sociétés spécialisées dans les pesticides ont été créées en Europe et aux États-Unis, dont la majorité ont été fusionnées au XXI^e siècle, et différents types de pesticides ont été introduits à travers le monde. La science des pesticides est venue au Japon, et les pesticides japonais ont été développés successivement de la fin du XX^e

au début du XXI^e siècle. De nos jours, le Japon occupe la première place mondiale en termes de capacité de production de pesticides (Umetsu et Shirai, 2020).

2.3. Classification des pesticides

Les industriels et les scientifiques ont divisé ces produits en différents groupes (Arkoub, 2012). Au départ, cette classification reposait sur la sélection des cibles, puis elle a été spécifiquement adaptée à la nature chimique de la principale substance active (Ayad-Mokhtari, 2012).

2.3.1. Selon la nature de la cible visée

Différentes catégories de pesticides sont utilisées en fonction des organismes vivants visés, dont les principales sont représentées dans le tableau suivant (Tableau 2) (INSERM, 2013) :

Tableau 02 : Classification des pesticides selon les organismes vivants visés.

Les pesticides	L'utilisation	exemple
Les herbicides	tuent les plantes parasites des cultures et, de manière plus générale, toute végétation considérée comme nuisibles.	2-4D, glyphosate
Les insecticides	appliqués contre les insectes nuisibles	Dichlorodiphénylrichloroéthane, déltaméthrine
Les fongicides	appliqués à la lutte contre les champignons phytopathogènes ou vecteurs de maladies animales ou humaines.	
Les rodenticides	tuent les rongeurs comme les rats	Warfarine, phosphore de zinc
Les molluscicides	qui détruisent les gastéropodes.	Methiocarbe, mercaptodiméthur
Les avicides	destinés à éliminer les oiseaux ravageurs	strychnine
Les nématocides	utilisés contre les nématodes phytoparasites	Bromomthane, chloropicrine
Les acaricides	qui détruisent les acariens	Abamectine, nicotine

2.3.2. Classification selon la nature chimique

Cette classification, repose sur la nature chimique de la substance active (**Ayad-Mokhtari, 2012**).

2.3.2.1. Les pesticides organiques

Il s'agit de produits carbonés synthétiques qui se transforment en laboratoire ou en milieu naturel. Les composés sont issus de sources animales, végétales ou microbiennes, tels que les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les triazines et l'urée dérivée (**Agoussar, 2017**).

2.3.2.2. Les pesticides inorganiques

Il s'agit de composés non dégradables provenant principalement de minéraux tels que le cuivre, l'arsenic, le cyanure et le soufre (**Agoussar, 2017**).

2.3.2.3. Les biopesticides

Les biopesticides sont des substances provenant de plantes ou d'animaux, qui sont à base d'organismes vivants tels que les moisissures, les bactéries, les virus et certains nématodes bénéfiques (**Ayad-Mokhtari, 2012**).

2.3.3 .Classification selon l'usage

Il existe six catégorie de pesticides classés selon leurs usages, c'est à dire, selon la destination des traitements (**Calvet et al., 2005**).

- Les cultures : ce sont les pesticides utilisés en agricultures pour maintenir un bon état sanitaires des sols et des végétaux. Ils sont les plus nombreux, principalement des insecticides-acaricides, des fongicides et des herbicides.
- Les bâtiments d'élevage : il s'agit surtout d'insecticides et des bactéricides.
- les locaux de stockage des produits végétaux: ce sont des insecticides et des fongicides.
- Les zones non agricoles : il s'agit principalement d'herbicides utilisés pour désherber les voies de circulation routières et ferrées, les aires d'aéroport et les aires industrielles.
- Les bâtiments d'habitudes: ce sont des insecticides, des rodenticides, des bactéricides et des fongicides.
- L'homme et les animaux; il s'agit d'insecticides et des fongicides utilisés pour l'hygiène humaine et vétérinaire (**Calvet et al., 2005**).

2.4. Le mode d'action de principaux types de pesticides

2.4.1. Les herbicides

Les herbicides, en fonction de leur mécanisme d'action, de leur dose et de leur durée d'utilisation, peuvent être sélectifs ou non sélectifs, en ayant différentes actions sur les plantes (Louchahi, 2015) :

- Des agents qui perturbent la photosynthèse.
- Des inhibiteurs de la synthèse des lipides et de la cellulose.
- Composés qui empêchent la production d'acides aminés.
- Substances inhibitrices de la division cellulaire (Louchahi, 2015).

2.4.2. Les fongicides :

La lutte contre la propagation des maladies des plantes causées par les champignons ou les bactéries est facilitée. Ils peuvent agir de différentes manières sur les plantes, telles que :

- Des substances toxiques qui impactent les fonctions respiratoires.
- Des agents inhibiteurs de la division cellulaire.
- Des agents qui perturbent la production d'acides aminés ou de protéines.
- Des substances qui perturbent le métabolisme des glucides (Batsch, 2011).

2.4.3. Les Insecticides :

Les insecticides sont des substances chimiques utilisées pour éliminer les insectes dans le but de préserver les cultures (Testud et Grillet, 2007).

Leurs effets sur le système nerveux, qui sont des produits neurotoxiques, se traduisent par le retentissement de la transmission de l'influx nerveux au niveau des neurones et des synapses, à la fois au niveau du système nerveux central et périphérique. Alors que certains insecticides inhibent la production de chitine, un élément essentiel de l'exosquelette des insectes, d'autres perturbent la physiologie de la reproduction des insectes. Les larves et les œufs des insectes peuvent également être ciblés par les insecticides (Batsch, 2011).

2.5. Domaines d'application des pesticides

Durant longtemps, l'agriculture a été considérée comme un patrimoine qui se transmet d'une génération à l'autre, en combinant la main-d'œuvre, le savoir-faire et l'accès aux ressources naturelles (Boutemedjet et *al.*, 2015).

En raison de leur grande importance, en particulier dans la préservation des cultures contre toute menace potentielle (**Vaudano, 2018**),

Le domaine industriel, qui englobe l'utilisation de pesticides, favorise un stockage et une conservation optimale de différentes céréales et fruits, ce qui améliore la qualité des produits en termes de santé, de goût et d'odeur (**Magdelaine, 2013**). Les fongicides et les insecticides jouent un rôle crucial dans le stockage du bois en sylviculture afin d'éviter qu'il ne soit altéré par les espèces indésirables (**Boland et Florijn, 2004**). En médecine, ces produits sont aussi employés afin de restreindre la prolifération de certains microorganismes dans les matériaux vétérinaires et de préserver la santé humaine contre certains vecteurs de maladies tels que la maladie de Lyme, le typhus et le paludisme, ce qui restreint la propagation des épidémies. D'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS), un seul insecticide Dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) a permis de protéger 25 millions de personnes infectées par le paludisme (**Boland et Florijn, 2004**).

2.6. Règles essentielles d'utilisation des pesticides

Leur utilisation respecte des critères rigoureux et ne se fait pas au hasard. Les agriculteurs doivent être conscients de la quantité appropriée et les caractéristiques chimiques et physiques de la molécule active de lutte antiparasitaire à utiliser contre les ravageurs cibles. Cette dose est utilisée en fonction de divers paramètres tels que l'intensité et la nature des organismes nuisibles, l'étendue des dommages aux cultures, l'estimation de la perte de production agricole, ainsi que le coût des dépenses économiques par rapport aux rendements et aux bénéfices réels des pesticides sur les cultures (**Agoussar, 2017**).

La productivité agricole est directement liée à la quantité de pesticides utilisée, ce qui a engendré une relation entre eux. Lorsque la quantité à utiliser dépasse un seuil donné, différents facteurs limitant interviennent, ce qui entraîne une baisse des performances. Les fortes doses utilisées pour lutter contre les organismes nuisibles peuvent entraîner une diminution du contrôle et même infecter les organismes non visés qui sont bénéfiques pour les plantes. Par contre, lorsque la quantité est augmentée, il est possible d'obtenir une stabilité du rendement (**Arkoub, 2012**).

2.7. Les pesticides dans le monde

Au cours de ces dernières années, l'emploi des pesticides est devenu essentiel dans la majorité des pratiques agricoles, peu importe le niveau de développement économique des pays. De 1945

à la fin du siècle, les besoins en pesticides ont connu une augmentation à l'échelle mondiale dans tous les pays du monde (**Bouziati, 2007**).

La consommation mondiale de pesticides est estimée à environ 4,19 millions de tonnes en 2019, avec la Chine en tête avec 1,76 million de tonnes. Avec 408 000 tonnes, les États-Unis suivaient, suivis du Brésil avec 377 000 tonnes et de l'Argentine avec 204 000 tonnes. Dans l'Asie du Sud-Est, l'usage des pesticides a augmenté chaque année, avec 20 % des pays en développement consommateurs, dont le Cambodge, le Laos et le Vietnam comme consommateurs. Avec une production annuelle de 90 000 tonnes de pesticides organochlorés, l'Inde est l'un des principaux producteurs de pesticides en Asie (**Figure 5**) (**Pathak et al., 2022**).

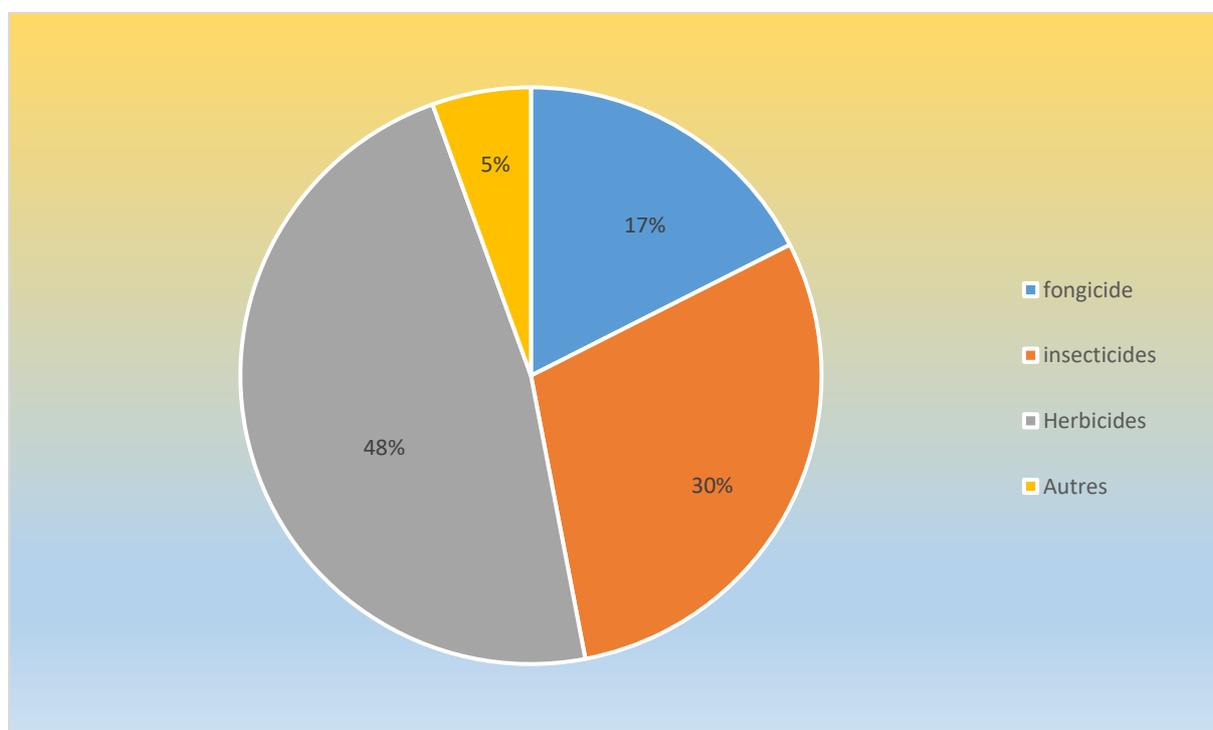


Figure 05 : Répartition en pourcentage des pesticides (**Pathak et al., 2022**).

2.8. Les pesticides en Algérie

En 2009, la situation sur le marché algérien a connu une évolution significative, avec des importations qui atteignent les 67 millions de Dinars (**Ayad-Mokhtari, 2012**).

Des centaines de tonnes de pesticides sont consommées chaque année dans le domaine agricole, principalement pour traiter les cultures, combattre les rongeurs et accroître la production agricole. Le domaine agricole est le principal utilisateur des pesticides. De plus, par rapport à l'agriculture d'autres pays comme les États-Unis, la France et le Japon, l'agriculture en Algérie

n'utilise pas beaucoup de pesticides. D'après l'Union des industries de la protection des plantes (UIPP, 2009) ; FOASTAT, (2014) .La vente des pesticides en Algérie représente 14 % du marché mondial (Figure 6) (Bouziani, 2007).

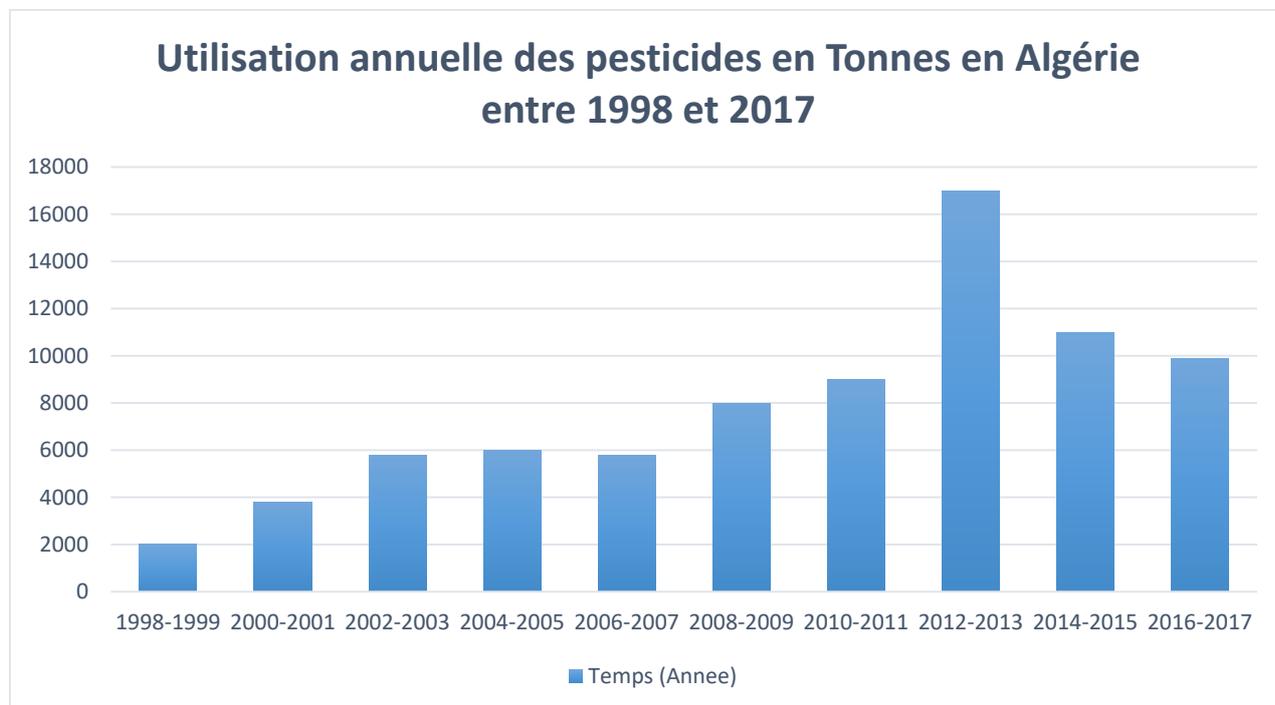


Figure 06 : Utilisation annuelle des pesticides en Algérie entre 1998 et 2017 (FAO, 2020).

2.9. Effets des pesticides sur l'environnement et la santé humaine

Les pesticides ont été utilisés pour éliminer les insectes, les champignons, les rongeurs et les plantes indésirables. Puisque ces substances peuvent être potentiellement toxiques pour les organismes visés, elles comportent également des dangers pour la santé humaine et l'environnement (Martins *et al.*, 2022).

2.9.1 Effets sur la santé humaine

L'exposition aux pesticides peut se faire directement à partir de l'usage professionnel, agricole et domestique, mais aussi indirectement par l'alimentation, la chaîne alimentaire, l'air, l'eau, le sol, la flore et la faune sont les principales sources d'exposition humaine aux pesticides. Des maladies telles que les cancers, la leucémie et l'asthme peuvent être associées aux pesticides. La toxicité des ingrédients et le niveau d'exposition sont des facteurs qui influencent les risques pour la santé liés à l'exposition aux pesticides. Par ailleurs, il est possible que certaines personnes telles que les enfants, les femmes enceintes ou les populations vieillissantes soient plus vulnérables aux effets des pesticides que d'autres (Kim *et al.*, 2017).

Les pesticides organochlorés comportent plusieurs dangers pour la santé, pouvant causer des maladies aiguës et chroniques. Ces produits peuvent entrer dans le système humain à travers les voies cutanées, orales, oculaires et respiratoires. Les pesticides présentent une toxicité variable selon les différentes voies d'exposition, telles que la peau, l'estomac et les voies respiratoires. Une présence excessive de résidus peut entraîner une absorption (**Islam et al., 2022**).

2.9.2 Effet sur l'environnement

Les pesticides, une fois appliqués à la surface des cibles, s'écoulent très profondément dans l'environnement, provoquant une grave contamination du sol, de l'eau et de l'air. Environ 90 % des pesticides ont été rapportés contaminés par des phénomènes tels que la dérive de pulvérisation, le lessivage et la volatilisation. Ensuite, ces substances peuvent être soumises à différentes étapes telles que le transfert, la dégradation ou l'absorption, ce qui entraîne une contamination continue de l'environnement (**He et al., 2023**).

2.9.3 Effet sur les microorganismes bénéfiques du sol

Les pesticides utilisés de manière excessive sur le sol peuvent causer une réduction des populations de microorganismes positifs dans le sol. Les organismes du sol sont affectés par une surutilisation d'engrais chimiques et de pesticides, ce qui est similaire à la surutilisation d'antibiotiques chez les humains. Si l'usage in discriminant de produits chimiques peut être efficace pendant quelques années, il entraîne à long terme une réduction des organismes bénéfiques dans le sol (**Aktar et al., 2009**).

Il cause des dégâts à différents degrés à tous les êtres vivants, plantes et animaux, qu'ils soient terrestres ou aquatiques. Les micro-organismes présents dans le sol, qui font partie des micro-organismes, sont les premiers à être affectés de manière spécifique par les pesticides (**Tableau 03**) (**Maldani et al., 2021**)

Tableau 03 : Conséquences des pesticides sur le Rhizobium (Munees et Saghir Khan, 2013).

Pesticides	Effets
Thiram (F)	Un accroissement progressif de la dose du thiram a montré un très fort négatif effet sur <i>Rhizobium meliloti</i>
Metribuzine (H), glyphosate (H), imidaclopride (I), thiaméthoxame (I), hexaconazole (F), métaaxyle (F), kitazine (F)	Sidérophores et acide acétique indole (acide salicylique et acide 2, 3 dihydroxybenzoïque) Progressivement, la production de Rhizobium sp. spécifique aux lentilles a diminué en fonction de la concentration des pesticides.
2,4-D (H), arrondi (H), atrazine (H)	Les nodules diminuent en nombre et en poids sec dans les racines de niébé, sans développer de nodules sur le côté du système racinaire.
Metribuzine (H), glyphosate (H), Imidaclopride (I), thiaméthoxame (I), Hexaconazole (F), métaaxyle (F), kitazine (F)	La dose recommandée et plus élevée a réduit la croissance des plantes, ce qui a entraîné une diminution de la promotion des caractéristiques (acide indole-3-acétique et sidérophores) de <i>Rhizobium sp.</i> Le glyphosate, l'imidaclopride et l'hexaconazole ont montré une toxicité maximale.
Pivot 100SL (H)	La réduction de l'activité nitrogénase de <i>Rhizobium leguminosarumin. Trifolii</i> , <i>Sinorhizobiuni melilotii</i> et <i>Badyrhizobium sp.</i>
Lindane (I), chlorpyrifos (I), thiram (F)	Inhibe de manière significative le développement de <i>Rhizobium japonicum</i> .
Hexaconazole (F)	Le système de déshydrogénase dans Rhizobium a été fortement inhibé.

2.10. La résistance aux pesticides

La résistance aux pesticides est un exemple de l'évolution rapide de notre époque qui représente d'importants défis pour l'agriculture. En général, il évolue en raison de la sélection directionnelle importante que les traitements antiparasitaires impliquent. Toutefois, des études récentes indiquent que certaines espèces ont une plus grande probabilité de développer une résistance aux pesticides que d'autres en raison de leur évolution passée et de leur diversité génétique (**Bras et al., 2022**).

Parmi les pesticides, certains ne sont pas toxiques pour la croissance des rhizobiums lorsqu'ils sont utilisés sur le terrain, tandis que d'autres ont été toxiques pour les rhizobiums lorsqu'ils sont utilisés à des taux faibles et élevés. Par adaptation, certaines souches de rhizobiums pourraient résister à des niveaux élevés de pesticides, mais ces rhizobiums adaptés aux pesticides peuvent être altérés génétiquement (**Zahran, 1999**).

Les pesticides sont utilisés pour éliminer les parasites en s'attaquant à leurs sites cibles. Les sites cibles comprennent des enzymes, des protéines ou d'autres voies où les pesticides peuvent se fixer et les fonctions physiologiques normales (**Vidal et al., 1992**). Certains microbes bénéfiques, tels que les rhizobia, partagent également des sites cibles potentiels de manière spectaculaire. Par exemple, chez les plantes et les rhizobia, l'acétolactate synthase joue un rôle dans la production d'acides aminés à chaîne ramifiée. Certains herbicides inhibent cette enzyme, ce qui diminue la production d'acides aminés, qui sont indispensables à la production de protéines. Par la suite, ils ont constaté une forte inhibition de la signalisation flavonoïde-récepteur Nod et de l'activation des gènes du nodule lors de la symbiose par les pesticides (**Munees et Saghir Khan, 2013**).

2.11 Mécanismes d'action (inhibition de la symbiose légumineuse Rhizobium)

Les pesticides peuvent affecter l'association légumineuses-Rhizobium de la manière suivante :

- En affectant de la plante hôte : En diminuant la biomasse racinaire, il y a moins de sites disponibles sur les racines pour l'infection Rhizobienne.
- En diminuant l'approvisionnement en hydrates de carbone des nodules existants.
- En réduisant la survie et la croissance des Rhizobiums : Cela diminue le potentiel d'infection des Rhizobiums sur les racines des légumineuses.
- En inactivant ou inhibant la signalisation entre les Rhizobiums et les plantes : Cela empêche la nodulation.

- En affectant le développement des nodules : En diminuant la division cellulaire (**Anderson et al., 2004**).

Les pesticides non seulement inhibent la signalisation biochimique entre les hôtes et les Rhizobiums apparentés, mais bloquent également l'attachement initial des Rhizobiums, ce qui empêche la reconnaissance des sites en les protégeant ((**Musarrat et Haseeb, 2000**)).

Chapitre 03 :

Matériel & Méthodes

1. Description des zones étudiées

Notre étude sur les nodules racinaires de la plante *Vicia faba* dans trois régions différentes de la wilaya de Tlemcen, caractérisées par des conditions climatiques et pédologiques différentes. Le premier échantillon a été prélevé dans la région de Bordj Arima, le deuxième a été récolté à Remchi, tandis que le troisième échantillon provient de Boukiou (**Figure 07**).

- Bordj Arima : est une commune située dans la wilaya de Tlemcen, à l'ouest de l'Algérie. Elle se trouve dans la daïra de Remchi, avec des coordonnées GPS de latitude $35,07941^\circ$ (ou $35^\circ 4' 46''$ nord) et de longitude $-1,54822^\circ$ (ou $1^\circ 32' 54''$ ouest). Le climat de cette région est généralement semi-aride, sec et froid.
- Remchi : est une daïra située au nord de la wilaya de Tlemcen, en Algérie. Ses coordonnées GPS sont les suivantes : latitude $35^\circ 3' 51.37''$ nord et longitude $1^\circ 25' 45.00''$ ouest. Le climat de cette région est caractérisé par des conditions semi-arides, sèches et froides
- Boukiou : est une commune située dans la wilaya de Tlemcen, à l'ouest de l'Algérie. Elle se trouve dans la daïra de Remchi, avec des coordonnées GPS de latitude $35,05167^\circ$ (Ou $35^\circ 3' 6''$ nord) et de longitude $-1,53947^\circ$ (ou $1^\circ 32' 22''$ ouest).

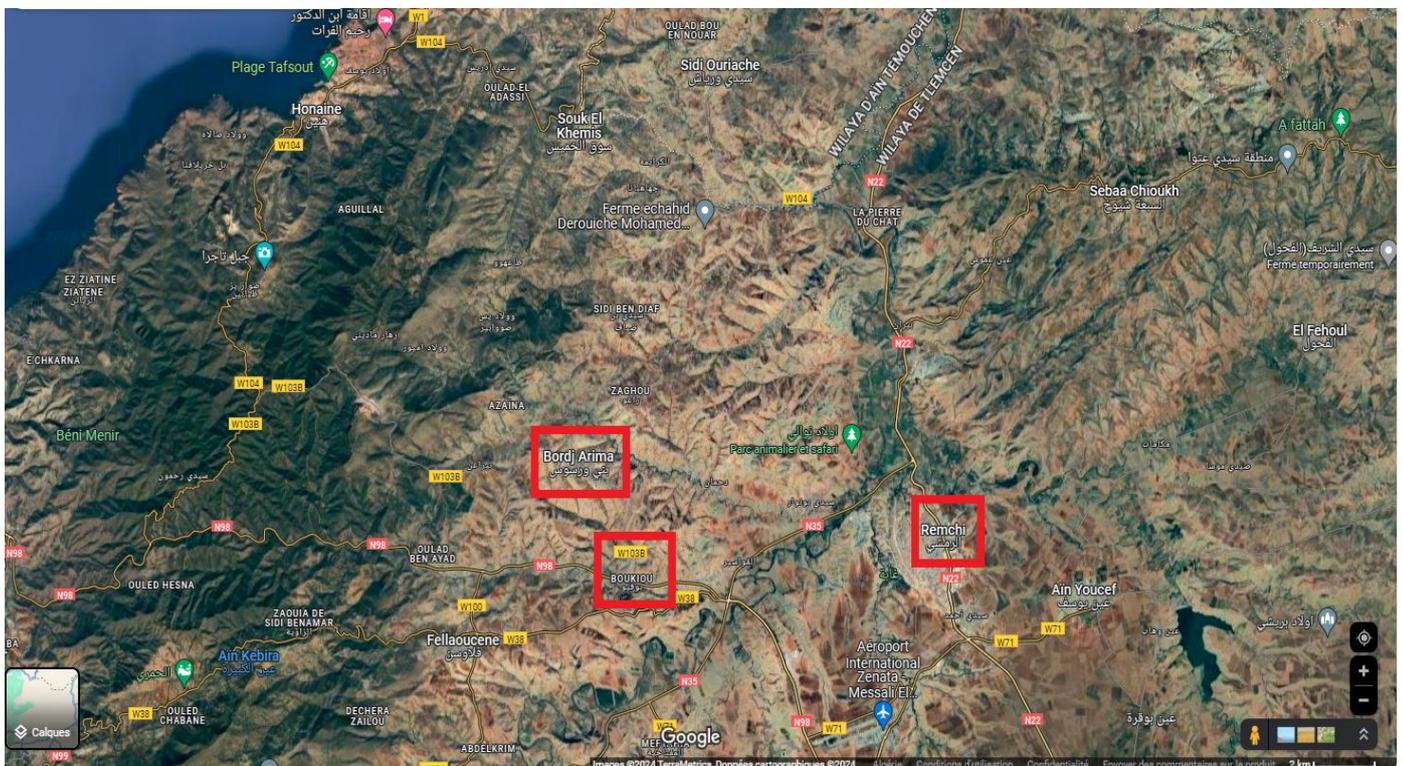


Figure 07 : Géolocalisation de la zone d'étude (Google Maps).

2. Matériel :

Cette étude a été effectuée dans le laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université AbouBakr Belkaid-Tlemcen, du début mars à la fin mai.

2.1. Matériel biologiques

Des nodules de légumineuses (*Vicia faba*) ont été récoltés dans les sols de la région étudiée.

2.2. Milieux de culture

- le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA)
- Yeast Mannitol Broth (YMB)
- Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo (YMA + RC)
- Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue (YMA + BTB)
- Citrate de simones
- Milieu GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre)

2.3. Matériel

2.3.1. Principaux appareils et matériel utilisés

- Réfrigérateur.
- Autoclave.
- Distillateur.
- pH mètre.
- Agitateur.
- vortex.
- Bain-marie.
- Microscope optique.
- Étuves bactériologiques.
- Boîte de Pétrie.
- Lames et lamelles.
- tubes à hémolyses.
- Bandelette d'oxydase.
- Disque de papier filtre.

2.3.2. Colorants réactifs et autres

- Bleu de Bromothymol (BBT).
- Solution de rouge Congo (RC).
- Pourpre de Bromocrésol.
- Violet de Gentiane
- Lugol
- Fuschine.
- Alcool.
- Les pesticides (provenant du marché Algérien)
- Déltamethrine,
- Chlorpyriphos-éthyl,
- Aceplan 20 sp).
- Eau oxygénée, eau physiologique.

3. Méthodes

3.1 Collecte des nodules

Les nodules, collectés à partir des racines de la légumineuse *Vicia faba*, l'échantillonnage a été réalisé au niveau de la daïra de Remchi, dans la wilaya de Tlemcen, apportée de trois régions différentes (P1 : Boukiou ; P2 : Remchi ; P3 : Bordj Arima) pendant la période de début de mars fin de mai, quatrième prélèvement a été effectué dans la station P1 au début de mars fin de mai.

Les racines ont été rincées à l'eau courante afin de retirer toute trace de terre. Environ 10 nodules de chaque plante ont été prélevés. Ces nodules coupés à 0,5 cm de chaque côté, ont été transférée en utilisant une pince au niveau des appendices racinaires pour minimiser les risques de dommages, les nodules sont laissés à sécher à l'abri de la lumière directe dans un environnement aéré, puis stockés dans des récipients appropriés pour leur conservation (Somasegaran et Hoben ,1985).

3.2. Isolement des bactéries à partir des nodules

3.2.1. Stérilisation des nodules

Les nodules ont été immergés pendant 3 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5 %, puis rincés soigneusement 5 fois à l'eau distillée stérile (Idrissi et al., 2020).

3.2.2. Écrasement des nodules et ensemencement des boîtes

- Les nodules stérilisés ont été placés dans des tubes stériles (à hémolyse ou à essai), avec un volume de 0.5 ml d'eau distillée stérile (1 nodule par tube) (Benidire *et al.*, 2018) ; (Ouslim *et al.*, 2019).

- En utilisant un mortier stérile, les nodules ont été écrasés pour obtenir une suspension bactérienne (Somasegaran *et Hoben*, 1994).

- Ensuite, avec une anse de platine, une goutte de la suspension a été prélevée et étalée sur une boîte de Pétri contenant le milieu YEMA au rouge Congo (Annexe 1) dont la composition a été déterminée par (Somasegaran *et Hoben*, 1985).

- La technique de l'ensemencement est celle des cadrans pour obtenir des colonies bien isolées (Figure 08).

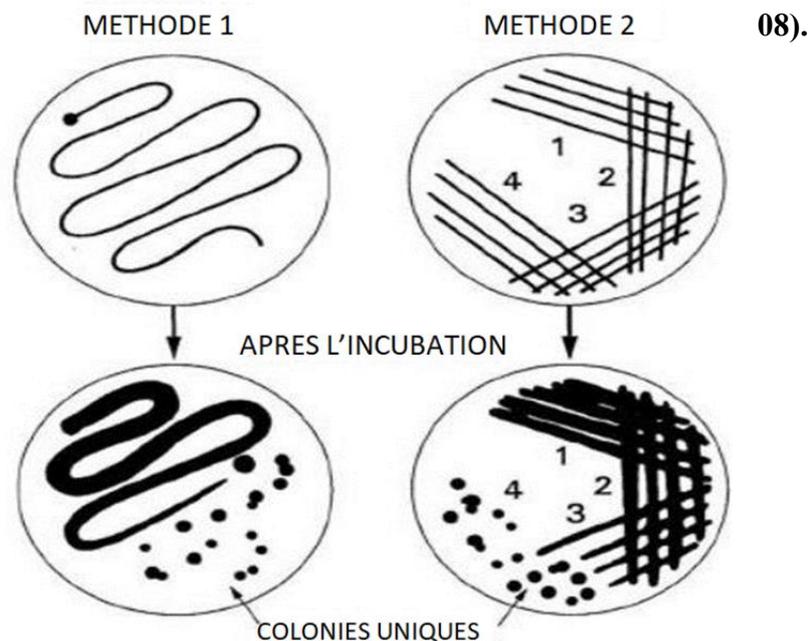


Figure 08 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Somasegaran *et Hoben*, 1994).

3.2.3. Incubation

Les boîtes de Pétri ensemencées ont été placées dans un incubateur à une température de 28°C pendant 3 à 5 jours (Idrissi *et al.*, 2020).

3.3. Purification des isolats

- Il est nécessaire d'effectuer des repiquages réguliers lors de la purification afin d'obtenir des isolats homogènes. Inoculer des tubes contenant du bouillon YMB, puis les incubés à 28 °C pendant 24 heures. Ensuite, après l'incubation, les tubes présentant un trouble ont été pris en considération.

- Une deuxième inoculation sur le milieu YEMA +0,0025% RC, après des examens microscopiques et morphologiques a été effectuée jusqu'à l'obtention d'isolats purs (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.4. Examen microscopique des isolats

3.4.1 .Coloration de Gram

Un examen complémentaire à l'aide de la coloration de Gram permet de différencier les bactéries Gram négatif (**Annexe 02**), comme les Rhizobiums, qui apparaissent avec une couleur rose et une forme de bacilles.

3.4.2. Le microscope électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage (MEB) est un appareil d'analyse pouvant fournir rapidement des informations sur la morphologie et la composition chimique d'un objet solide (**MECHERI ,2014**).

Cet examen microscopique est réalisé au niveau de département de physique par le doctorant **Belaoui Mimoun**.

3.4.3. L'examen à l'état frais

Grâce à ce test, il est possible de déterminer la mobilité des bactéries (**Annexe 02**).

3.5. Caractères cultureux des isolats

Dans l'identification, les souches ont été placées sur différents milieux.

La présence des sources d'énergie nécessaires à la croissance des bactéries est essentielle dans les milieux de culture :

- Les milieux solides :

- YMA (Yeast Mannitol Agar).
- YMA+RC (Yeast Mannitol Agar avec Rouge Congo).
- YMA+BTB (Yeast Mannitol Agar avec Bleu de Bromothymol).
- Milieu GPA + BCP (Glucose Peptone Agar +Bromocrésol Pourpre).
- Milieu liquid:
 - YMB (Yeast Mannitol Broth).

3.5.1. Test au Rouge Congo

Le test au rouge Congo est utilisé pour distinguer les Rhizobiums des contaminants. Les colonies typiques de Rhizobium montrent une faible absorption de rouge Congo par rapport aux contaminants (**Somasegaran et Hoben ,1994**).

3.5.2. Test au bleu de Bromothymol (BTB)

Ce test met en évidence la capacité des isolats à acidifier ou alcaliniser le milieu YEMA (**Somasegaran et Hoben 1985**).

Chaque souche testée a été développée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YEMA additionnées du bleu de Bromothymol, un indicateur de pH coloré. Après cinq jours d'incubation à une température de 28 °C, la souche Rhizobium donne une couleur jaune acidifiante ou bleue alcalinisant (**Ouslim et al ., 2019**).

Si une acidification se produit, la souche de Rhizobium est dite à croissance rapide, tandis que si une alcalinisation se produit, on parle de Bradyrhizobium (Rhizobiums à croissance lente) (**Ouslim, 2015**).

3.5.3. Test de croissance sur milieu Glucose Peptone Agar (GPA)

Le milieu a été employé afin de distinguer les rhizobiums, qui présentent généralement une faible ou aucune croissance sur le milieu sans modifier le pH (**Benselama et al ., 2018**).

-une lecture effectuée à partir de 24 heures.

-Si le milieu de culture vire au jaune pendant la période de croissance, cela indique la présence de bactéries qui n'appartiennent pas au genre Rhizobium.

-En revanche, s'il n'y a pas de virage au jaune ou si la croissance est faible sans ce changement de couleur, il est probable que la bactérie appartienne aux rhizobium (**Baba Arbi, 2016**).

3.6. Caractères biochimiques

3.6.1. Test de la catalase

L'objectif est de chercher la catalase, une enzyme indispensable à la décomposition du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (**Marchal et al., 1991**) :



Le principe implique de prélever une colonie, à partir du milieu solide et de la placer sur une lame stérile, puis d'ajouter une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 à 10 volumes. La présence de catalase est confirmée par une libération immédiate de bulles gazeuses (**Marchal et al., 1991**).

3.6.2. Test de l'oxydase

La recherche du cytochrome oxydase, qui est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire et qui facilite le transfert des électrons vers l'oxygène ou un autre oxydant minéral (**Marchal et al., 1991**).

Le processus implique d'immerger une bandelette dans l'eau physiologique, puis, en utilisant une anse de platine, on prélève une colonie et on la dépose sur la bandelette. L'oxydase est mise en évidence par une coloration qui apparaît dans un délai de 30 secondes. Une réaction positive se manifeste par une coloration allant du bleu foncé au violet (**Marchal et al., 1991**).

3.6.3. Test de citrate

Les isolats ont été testés pour leur capacité à utiliser le citrate, en cultivant sur des pentes de gélose au citrate de Simmons, incubés à 28 °C pendant 4 jours. Après l'incubation, une couleur verte qui vire au bleu indique un résultat positif (**Küçük et Kıvanç, 2018**).

3.6.4. Réduction des nitrates

Un bouillon de nitrate a été préparé, 5 ml ont été répartis dans des tubes stériles. Chaque tube a été inoculé avec une boucle de culture d'isolats de Rhizobium et incubée à 28 °C pendant 4

jours. Après l'incubation, 3 gouttes des réactifs nitrate réductase I et II ont été ajoutées. Une couleur rouge indique un résultat positif (**Küçük et Kıvanç, 2018**).

En absence de coloration, une pincé de la poudre de zinc est ajoutée au milieu. Si les nitrates sont toujours présents dans le milieu, ils vont être réduits sous l'effet du zinc et la coloration rouge apparaîtra, la réaction est donc réellement négative. Et si les nitrates ont été réduits par les souches en azote gazeux (N₂), le milieu ne contient plus les nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la couleur n'est pas modifiée (**Nair et Bendaira, 2015**).

3.6.5. Conservation des isolats

Deux méthodes de conservation ont été employées :

3.6.5.1. Conservation à court terme :

Les souches purifiées et supposées être des Rhizobiums ont été conservées sur une gélose inclinée (YEMA sans RC) en tubes à essais au réfrigérateur à une température de 4°C (**Baba Arbi, 2016**).

3.6.5.2. Conservation à long terme : Pour une durée de conservation allant jusqu'à un an, les souches ont été conservées à -80 °C dans YEBensemencé et additionné de glycérol (50%) (**Baba Arbi, 2016**).

3.6.6. Détermination de la concentration minimale bactéricide

3.6.6.1. Technique de la dilution sur milieu gélosé

La technique utilisée a été inspirée de celle utilisée dans la technique de sensibilité aux antibiotiques sur milieu gélosé cité par (**Janssen et al.,1987**)

L'étude de la résistance des Rhizobiums aux insecticides (Chlorpyriphos-éthyl, Aceplan 20 sp, Deltaméthrine) a été réalisée sur un milieu YMA, avec des concentrations préparées à partir de 1024 mg/l jusqu'à 0.5 mg/l (**figure 09**).

Figure 09 : Les différentes concentrations de l'insecticides Chlorpyriphos-éthyl (**Photo personnelle**).

Cette technique consiste à déposer des suspensions bactériennes calibrées sur des milieux contenant des concentrations décroissantes des pesticides.

La CMI est la plus faible concentration de pesticides capable d'inhiber la croissance bactérienne.

3.6.6.2. Préparation des boîtes de pétri

Dans
boîtes
Pétri
même



des
de
de

dimension, nous avons coulé des volumes égaux (20 ml) de milieu stérile YMA préalablement liquéfié.

3.6.6.3. Préparation de l'inoculum

Dans des tubes à essai contenant 5ml d'eau physiologique (0.9%), on ajoute une colonie bactérienne.

Les souches ont étéensemencées par écouvillonnage, (une souche par boite).

- Des disques de papier filtre stérile ont été déposés aseptiquement sur les boites de pétri.
- Ces disques ont été de diamètre de 0,6 cm et ont été imprégnés de différentes concentrations de pesticides de 1024 mg/l jusqu'à 0.5 mg/l. Les boites ont été incubées à 28° pendant 72h, la croissance est observée pour chaque souche et chaque concentration de pesticide. De cette manière, les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Une boite témoin est préparée sans pesticide.

Chapitre 04 :

Résultat & Discussion

1. Isolement du Rhizobium

Les bactéries proviennent à partir des nodules racinaires récoltés. 18 isolats de *Vicia faba* ont été isolée pendant la période du début mars à la fin mai. Des échantillons de plantes provenant de la wilaya de Tlemcen ont été disposés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YMA, conformément à la composition donnée par **Somasegaran et Hoben, (1985)**. Les boîtes de Pétriensemencées ont été incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours, dans l'obscurité.

2. Caractéristiques culturaux et morphologique

2.1. Caractères macroscopiques

2.1.1. Croissance sur milieu YMB

La croissance des isolats sur le milieu liquide YMB pendant 24 h à 28 °C se manifeste par la formation d'un trouble dans le milieu (**Figure 09**).

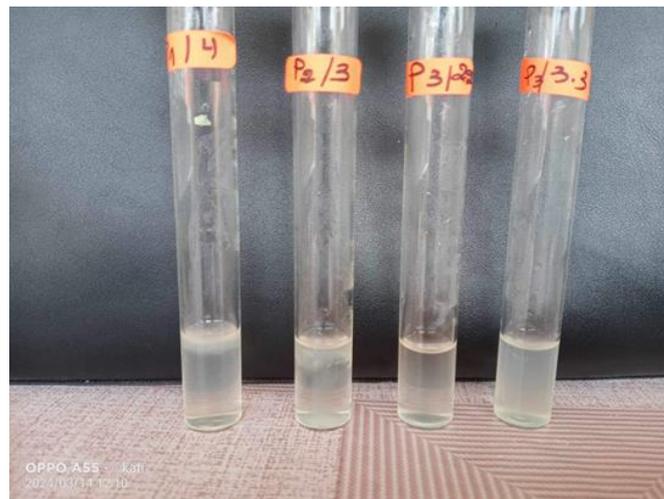


Figure 10 : Croissance sur le milieu YMB (**Photo personnelle**).

2.1.2. Croissance sur milieu YMA

Les souches purifiées ont présenté toutes les caractéristiques morphologiques des Rhizobiums (**Tableau 04**). Sur le milieu YMA, les colonies présentent une teinte blanche laiteuse à crème et étaient caractérisées par une mucosité très importante qui augmente avec le temps d'incubation. Elles étaient translucides, brillantes et présentent une surface circulaire lisse et bombée (**Figure 10**), nos résultats observés ont été d'accord avec celles décrites de **Benselama et al., (2018)** et **Ouslim et al., (2019)**.

Tableau 04 : caractères cultureux

Caractère Station	Période de prélèvement	Nodule	Couleur et aspect des colonies	Temps D'apparitions	Mode de croissance
P1 BOUKIOU	Mars	Grande couleur claire	Blanche muqueuse Opaque	5 – 7 jours	Lente Rapide
P2 REMCHI	Mars	Grande oncocytaires couleur claire	Translucide	5 – 7 jours	Lente rapide
P3 BORDJ ARIMA	Fin février	Grande couleur claire	Blanche	3 -5 jours	Rapide
P4 BORDJ ARIMA	Mai	Petite couleur Noir	Blanche	Plus de 7 jours	Lente

En prenant en compte la durée d'apparition des colonies, nous avons observé que certaines apparaissent après 2 à 3 jours d'incubation à 28°C (P3.3, P3.2, P3.5, P3.1, P3.4), tandis que d'autres apparaissent après 4 à 7 jours (P2.1, P3.2 (B), P3.2 (A), P2.4, P2.3, P1.4, P1.3). Les souches P4.1, P4.5 et P4.5(A) sont apparues après plus d'une semaine, alors que les souches P4.2, P4.3 et P4.4 n'ont montré aucune croissance.

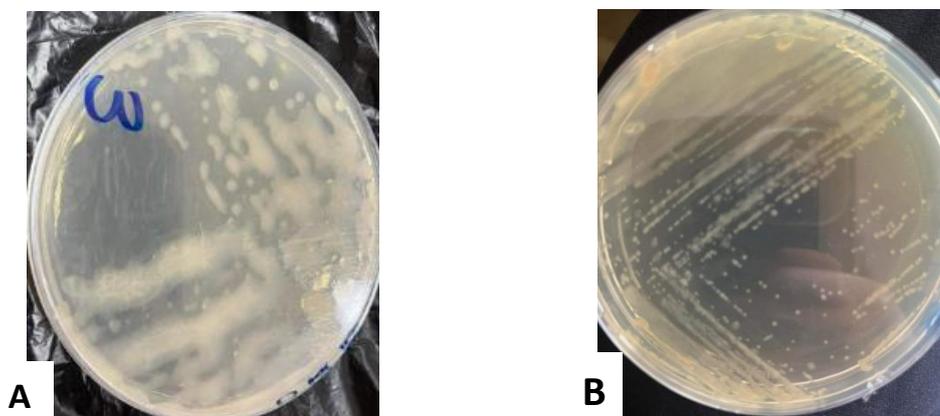


Figure 11 : Croissance des souches P3.3 et P2.3 sur le milieu YMA après 72 h d'incubation (Photos personnelles).

A : souche à croissance rapide ; **B** : souche à croissance lente

D'après **El hillali, (2006)**, les souches du genre *Rhizobium*, à croissance rapide, forment des colonies circulaires et convexes, habituellement translucides, avec un diamètre de 2 à 4 mm après 3 à 5 jours d'incubation dans des conditions optimales. En revanche, les souches du genre *Bradyrhizobium*, à croissance lente, produisent des colonies circulaires et convexes, rarement translucides, avec un diamètre de 1 à 2 mm après 5 à 7 jours d'incubation.

2.1.3. Croissance sur YEM+ Rouge Congo

Après 72 heures d'incubation, les colonies de *Rhizobium* se manifestent par une couleur rosâtre car n'ont pas absorbé le rouge Congo (pures), mais certaines souches ont absorbé peu le rouge Congo (**Figure 12**).

Les résultats que nous avons obtenus sont similaires à ceux décrits par **Hajjam et al.,(2016)**. Selon **Howieson et Dilworth, (2016)**, certaines bactéries nodulaires comme *Sinorhizobium* peuvent absorber le Rouge Congo.

La plupart des souches n'ont pas absorbé pas le rouge Congo comme il a été décrit Par **Benselama et al., (2018)** pour *Rhizobium*, cela indique que tous les isolats de *Vicia faba* détectés sur un milieu YEM ont présenté une réaction négative au rouge Congo et les résultats que nous avons obtenus sont similaires à dans l'étude d'**Ouslim et al., (2019)**.



Figure 12 : Aspect macroscopique de la souche P 2 .3 sur milieu YEM+RC après 48H d'incubation (**Photo personnelle**).

2.2. Caractéristique microscopique

2.2.1. Coloration de Gram

La technique de coloration de Gram a révélé une forme de bacille Gram négatif avec une extrémité bien arrondie, couleur rose (**figure 13**). Les caractéristiques morphologiques observées ont été d'accord avec celles décrites pour les Rhizobiums dans l'étude d'**Hussein et al., (2016)** et **Benselama et al., (2018)**.

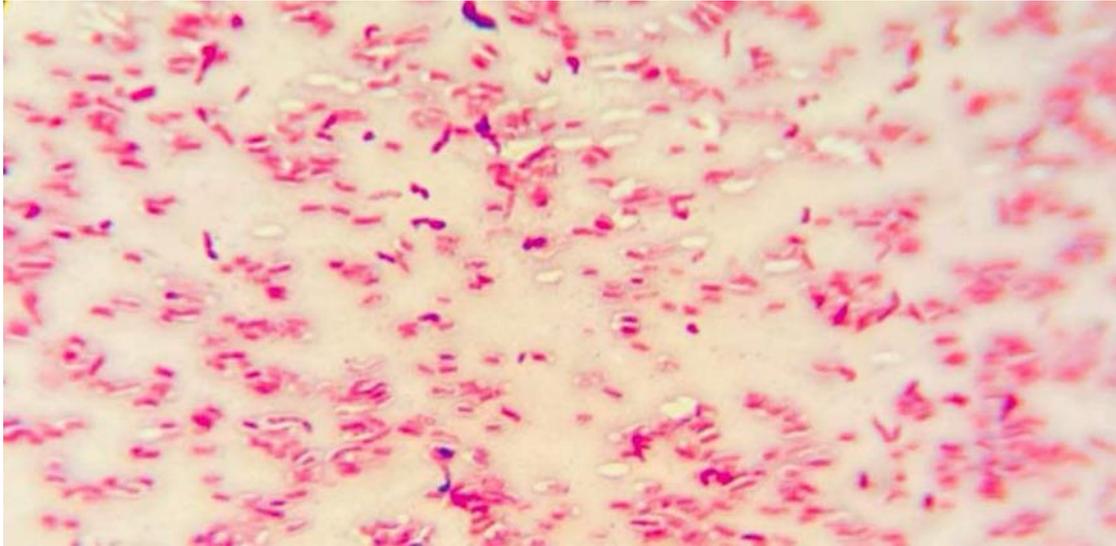


Figure 13 : Aspect microscopique de la souche P 4.1 après coloration de Gram (Grossissement X100) (**Photo personnelle**).

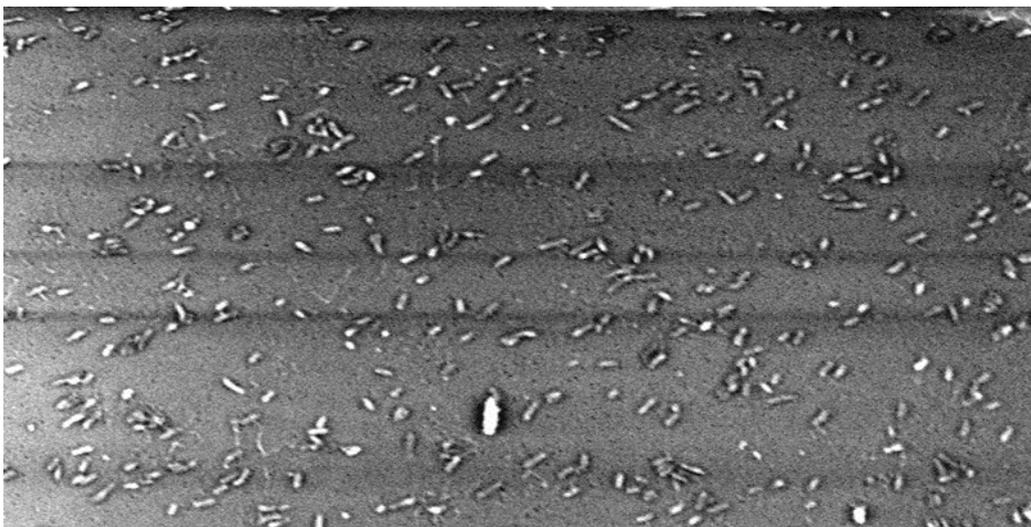


Figure 14 : Observation microscopique 0.au microscope électronique à balayage (Grossissement X3000) (**Photo personnelle**).

2.2.2. État frais

L'examen des isolats à l'état frais a révélé des bacilles mobiles ce qui concorde avec les résultats d'Hussein *et al.*, (2016).

3. Caractère biochimique

3.1. Test des catalase et oxydase

Toutes les souches étudiées ont présenté une catalase positive, ce qui entraîne un dégagement d'oxygène lors de la dégradation de l'eau oxygénée (**Figure 16**) (Marchal *et al.*, 1991).

Les résultats de l'oxydase ont montré que les isolats testés ont présenté une oxydase positive, ce qui signifie que ces bactéries ont une enzyme dans la chaîne respiratoire cytochromique (**Figure 15**) (Marchal *et al.*, 1991).

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les rhizobiums sont des bactéries aérobies (Marchal *et al.*, 1991).

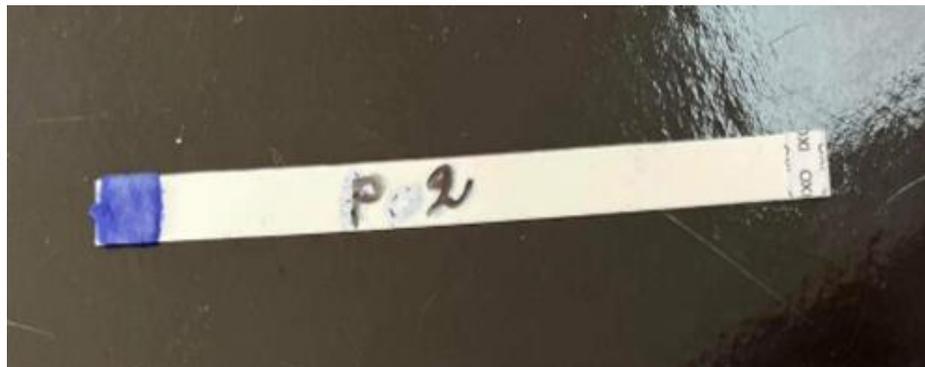


Figure 15 : Le résultat de l'oxydase de la souche p3.2 (Photo personnelle).



Figure 16 : Résultat de la catalase de la souche p3.3 (Photo personnelle).

3.2. Test de citrate

Les souches de Rhizobium testées n'ont pas utilisé le citrate comme source de carbone (**Figure 17**). Ce qui a été décrit par **Benslama et al., (2018)**.

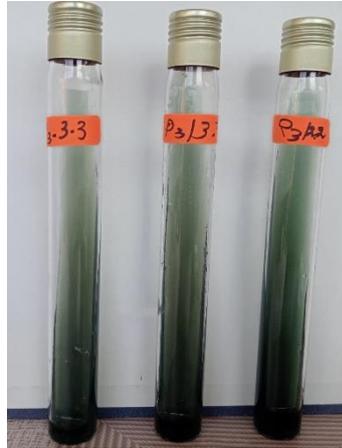


Figure 17 : Résultats de l'utilisation de citrate (**Photo personnelle**).

3.3. Test au bleu de Bromothymol (BTB)

La plus part des souches testées sur milieu YMA+BTB ont viré le milieu vers le jaune (des souches a croissance rapides) (**Figure 18**), le cas de la souche P2.4 présente une couleur bleu (Alcalinisation complète) (souche a croissance lente) (**Figure 19**).

Des souches à croissance rapides indiquant aussi qu'ils produisent de l'acide en utilisant préférentiellement le sucre composante du milieu pour leur croissance (**Belay et Assefa ,2010**). La majorité des isolats testés sont acidifiantes ce qui a été décrit par **Baba Arbi, (2016)**.

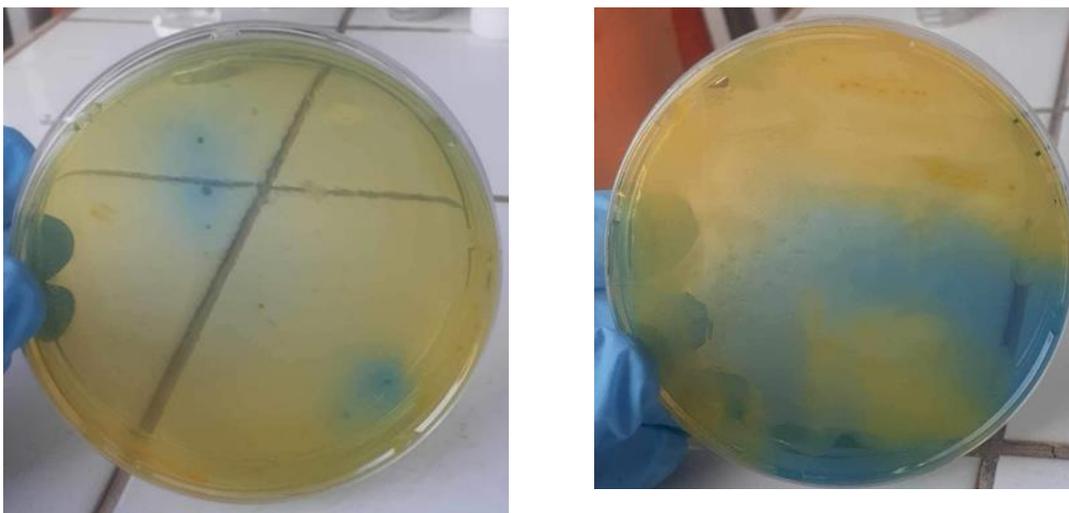


Figure 18 : croissance des isolats P3.3 et P1.4 sur le milieu YMA+BTB (**Photo personnelle**).



Figure 19 : La croissance de la souche P 2.4 sur le milieu YMA+BTB (Photo personnelle).

3.4. Croissance sur milieu GPA + BCP

Sur le milieu GPA, il y avait une absence de croissance pour la plupart des isolats à l'exception des souches qui ont présenté une faible croissance (P 1.2 ; P 2.5 ; P3.5 ; P 3.3) (**Figure 20**). ce qui a été confirmé par **Somasegaran et Hoben,(1985)**. Cependant, certaines espèces ont présenté une faible croissance sur ce milieu. **Benslama et al., (2018)**, ont observé qu'il y avait peu ou pas de croissance sur les milieux de GPA sans altération du pH. Cette mauvaise croissance sur GPA peut s'expliquer par le fait que les Rhizobiums ne préfèrent pas la peptone en tant que source d'azote, de vitamine, de facteur de croissance ou d'acides aminés (**Benslama et al., 2018**).



Figure 20 : Aspect macroscopique de la souche P1.2 sur le milieu GPA+BCP (Photo personnelle).

3.5. Réduction des nitrates

un changement de couleur du milieu en rouge chez la souche P3.3 indiquant que le nitrate a été réduit en nitrite (**Figure 21**), les souches P1.4 ; P3.2 ; P3.2.(B), le milieu est inchangé. Après quelques minutes suivant l'ajout de poudre de zinc, qui remplit la même fonction que la nitrate

réductase, aucune modification de couleur n'a été observée, indiquant ainsi l'absence d'ions nitrates dans le milieu et confirmant un résultat positif (**Figure 22**) .

Alors que les souches P4.5 et P4.5 (A) qui ont donné une réaction négative.

Ce résultat correspond à celui observé par **El Hilali, (2006)**.

Selon **Khalfi et Smara, (2017)**, si aucune coloration rouge ne se forme, cela signifie qu'il n'y avait pas de nitrate à réduire. L'absence de nitrite dans le milieu indique que la dénitrification a eu lieu, entraînant la formation d'ammoniac ou d'azote moléculaire.



Figure 21 : Réduction des nitrates par l'isolat P3.3 (**Photo personnelle**).



Figure 22 : Réduction des nitrates après l'ajoute de poudre de zinc par l'isolat P 1.4 (**Photo personnelle**).

4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

L'étude de la croissance des souches de Rhizobium en présence de divers pesticides a révélé que la plupart des souches se développent à des fortes concentrations (**Tableau 05**). Cependant, leur croissance varie en fonction de la souche, du pesticide et de la concentration spécifique.

Tableau 05 : Croissance des souches de Rhizobium en présence de différentes Concentrations en pesticides

souches						
pesticides		P 3-2 (B)	P 3-2 (A)	P 3-3	P 4-5	P 4-5 (A)
Déltamethrine	Temoin	+	+	+	+	+
	1024	-	+	+	+	+
	512	-	+	+	+	+
	256	-	+	+	+	+
	128	-	+	+	+	+
	64	-	+	+	+	+
	32	-	+	+	+	+
	16	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+
0.5	+	+	+	+	+	
Chlorpyriphos-éthyl	Temoin	+	+	+	+	+
	1024	+	+	+	+	+
	512	+	+	+	+	+
	256	+	+	+	+	+
	128	+	+	+	+	+
	64	+	+	+	+	+
	32	+	+	+	+	+
	16	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+
0.5	+	+	+	+	+	
Aceplan 20 SP	Temoin	+	+	+	+	+
	1024	+	+	+	-	-
	512	+	+	+	-	-
	256	+	+	+	-	-
	128	+	+	+	-	-
	64	+	+	+	-	-
	32	+	+	+	-	-
	16	+	+	+	-	-
	8	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	-	-
	1	+	+	+	-	-
0.5	+	+	+	-	-	

En ce qui concerne l'insecticide déltaméthrine, toutes les souches ont présenté une tolérance à de fortes concentrations, à l'exception des souches P3.2 (B) qui tolèrent une faible concentration à partir de 16 mg/l.

D'après **Sethi et al.,(2013)**, la Deltaméthrine a inhibé la croissance de *Rhizobium* (jusqu'à 25 %).

Ces souches devraient être capables de s'adapter aux facteurs présents dans les environnements naturels, notamment la tolérance à l'acidité du sol, les concentrations élevées en alumine et les résidus de pesticides (**Martani et al., 2011**).

Nos résultats ont montré que pour l'insecticide Chlorpyrifos-éthyl, toutes les souches de *Rhizobium* étudiées ont présenté une croissance élevée et nous avons observé que toutes les souches poussent à une concentration de 1024 mg /l . Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus par **Ramdani et Hadroug.,(2017)**. Toutes les souches de *Rhizobium* étudiées ont montré une résistance vis-à-vis de l'insecticide DURSBAN (Chlorpyrifos), ces mêmes auteurs ont constaté que 100 % des souches tolèrent une concentration de 900 mg/l. Cependant, seulement 62,5 % des souches se développent à une concentration de 1000 mg/l.

Shin-Chsiang Lin et al., (1972) ont montré que cet insecticide n'a aucun effet sur les quatre espèces de *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. Trifolii*, *R. japonicum* et *R. meliloti*). Cependant, certains cas d'inhibition ont été observés à des concentrations de 50 ppm et 500 ppm.

Dans l'étude de **Drouin et al., (2010)**, les insecticides utilisés (azinphos-méthyl, carbofurane, chlorpyrifos et endosulfan) n'ont pas entraîné d'inhibition sur un total de 122 souches de *Rhizobium* testées .

Concernant le troisième insecticide Aceplan 20sp, la plupart des souches testées ont présenté une résistance à différentes concentrations, à l'exception de la souche P4.5 et de la souche P4.5 (A) qui sont sensibles.

Les pesticides ont des effets variés (inhibiteurs ou stimulants) sur la nodulation de *Vigna radiata* (L.) wilczek inoculée par *Rhizobium* et de pois chiches inoculés par *Mesorhizobium*. Cet effet inhibiteur des insecticides peut être attribué à l'inhibition des enzymes impliquées dans la croissance et le métabolisme des plantes. Une autre étude rapporte que le mécanisme moléculaire de l'inhibition symbiotique par les pesticides est lié à la perturbation de la signalisation entre les légumineuses hôtes et les récepteurs Nod D de *Rhizobium*, nécessaires à l'initiation de la nodulation et de la symbiose pour la fixation de l'azote (**Munees et Saghir Khan, 2010**).

Les insecticides testés en réagie différemment.

Parmi les trois molécules testées Chlorpyriphos-éthyl, semble être les moins efficace car la totalité des souches présentent une tolérance à au moins 1024 mg/l.

Contrairement à cette molécules Aceplan sp 20 semble présenté une efficacité remarquable puisque une faible concentration (0.5mg/l) de ce produit est arrivé a éliminé deux souches (p4-5 et p4-5(A)).

Quant à la Deltamethrine qui reste relativement efficace sur 4 souches (p3-2 ; p3-3 ; p4-5 ; p4-5(A)), elle présente une activité modéré contre la souche p3-2(B) enregistrant une tolérance à la concentration de 16mg/l.

Par ailleurs nous avons observé un effet souche puisque les souches testées en réagis différemment vis à vis des trois molécules ainsi p3-3 et p3-2(A) ont présenté une tolérance à 1024mg/l.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au terme de ce travail, 18 isolats des bactéries assignés au genre *Rhizobium* ont été collectées ces souches proviennent des nodules de la légumineuse *Vicia faba* situées dans la wilaya de Tlemcen.

La détermination des caractéristiques phénotypiques a été réalisée en utilisant des techniques d'isolement et de caractérisation conformes à celles spécifiques aux *Rhizobium*, comme décrit dans le manuel de Somasegaran et Hoben (1994). L'étude de la résistance de ces souches aux insecticides a été faite en déterminant les concentrations minimales inhibitrices sur milieu solide.

Les aspects morphologiques et culturels des isolats sur les différents milieux de culture indiquent que certains de nos isolats appartiennent à des souches à croissance rapide, se développant en 48 heures, tandis que d'autres présentent une croissance plus lente, nécessitant plus de 7 jours.

Les résultats des tests biochimiques ont montré que la plupart des souches possèdent une nitrate réductase une oxydase une catalase.

Cette recherche nous a permis de révéler des fluctuations dans les taux de tolérance aux insecticides. En effet aucune molécule n'a été épargnée de cette insensibilité.

Cette étude a révélé que certaines souches de *Rhizobium* présentent une résistance aux différents pesticides. D'autres souches sont sensibles aux pesticides. Nous pouvons donc suggérer que des concentrations élevées de pesticides pourraient avoir un impact significatif sur la croissance des souches et des plantes, en bloquant la communication biochimique entre les légumineuses et les *Rhizobiums*. Par conséquent, il est nécessaire d'appliquer des recommandations pour une utilisation optimale des pesticides afin de minimiser les dommages aux produits agricoles.

En Algérie ces données peuvent être judicieusement utilisées pour faire un criblage des souches les plus performantes en matière de résistance aux insecticides en vue de les introduire de manière efficaces dans le domaine agricole.

En perspectives de notre recherche, il serait souhaitable :

- Une étude plus approfondie de la tolérance des souches aux divers stress environnementaux et de leur potentiel de fixation de l'azote.

- Étudier la relation entre les Rhizobiums et les légumineuses en présence de pesticides pour évaluer leur niveau de résistance et l'impact de ces pesticides sur la symbiose.
- Réaliser une étude sur les mécanismes de résistance des souches de Rhizobium aux pesticides.

Référence
Bibliographie

A

- Agoussar, A. (2017). Effet des pesticides sur la diversité bactérienne des champs agricoles et la capacité des bactéries à les dégrader. Thèse pour l'obtention du grade de maîtrise : Microbiologie. Département de Microbiologie Immunologie et Infectiologie. Faculté de médecine : Université de Montréal ,92p.
- Ayad-Mokhtari, N. (2012). Identification et dosage des pesticides dans l'agriculture et les problèmes d'environnement liés. Mémoire Magister : chimie organique (environnement). Laboratoire de synthèse organique appliquée (LSOA) : Université d'Oran, 54p.
- Arkoub, F. (2012). Impacts des pesticides sur la santé des agriculteurs dans la wilaya de Bejaia. Mémoire master : Environnement et santé Publique. Département des Références bibliographiques 59 sciences biologiques de l'environnement : Université Abderrahmane Mira - Bejaia ,45p.
- Anderson, A., Baldock, J. A., Rogers, S. L., Bellotti, W., & Gill, G. (2004). Influence of chlorsulfuron on rhizobial growth, nodule formation, and nitrogen fixation with chickpea. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55(10), 1059. <https://doi.org/10.1071/ar03057>.
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.

B

- Belhadi, D., De Lajudie, P., Ramdani, N., Roux, C. L., 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. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.10.004>.
- Bladergroen M R, Spaink H S (1998) *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 353–359.
- Bogusz D, Franche C (1985) *La Fixation Biologique de L'azote*. L'Orstom et Les Recherches Fondamentales Microbiologie. Dakar L'OSTRON, N°23059.
- Benabdoun M., H. gherbi A.djekoun1, D. bogusz, C. franche, N. ykhlef .2012 .Fixation biologique de l'azote : la symbiose actinorhizienne casuarina-frankia 16 pp.15-19.
- Baudoin J.P. 2001. Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *BASE*. 5(4) : 221-230.

- Baba Arbi S. 2016. Étude phénotypique et génotypique des rhizobia symbiotiques des légumineuses spontanées *Medicago littoralis* Rhode et *Melilotus indicus* (L.) All. présentes dans les palmeraies de la région de Touggourt (Wilaya de Ouargla). Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat microbiologie appliquée, université badji Mokhtar – Annaba, page 19.
- Bala A, Murphy P J, Giller K. E. (2004) Classification of Tropical Tree Rhizobia Based on phenotypic characters forms Nested Clusters of phylogenetic Groups. *West African J Appl Ecol*, 6: 9-19.
- Batsch, D. (2011). L'impact des pesticides sur la santé humaine. Thèse pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur : Pharmacie .Faculté de pharmacie. Université Henri Poincaré-UHP, 185p.
- BOULAND J., KOOMEN I., VAN LIDTH DE JEUDE J. 2004. Les pesticides compositions, utilisation et risque. Série Agrodok No .29, Ed Fondation Agromisa, wageningen.
- Berrah, A. (2011). Etude sur les pesticides. Mémoire master [en ligne]: toxicologie appliquée. Université de Tébessa Algérie.
- Bonnefoy N (2012).Les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement.42 :348 p.
- Boutmedjet, A., Boukaya, N., Houyou, Z., et al. (2015). Étude des effets de l'application de boues d'épuration urbaines sur un sol érodé cultivé dans la région de Laghouat. *Revue des Régions Arides*, 36, 235
- Boland, J., Florijn, A. (2004). Les pesticides : composition, utilisation et risques : les pesticides. Wageningen : Agromisa CTA. 216p.
- Bouziani, M. (2007). L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. *Le Guide de la Médecine et de la Santé. Epidémiologiste*, Faculté De Médecine d'Oran.
- Bras, A., Roy, A., Heckel, D. G., Anderson, P., & Green, K. K. (2022). Pesticide resistance in arthropods: Ecology matters too. *Ecology Letters*, 25(8), 1746-1759. <https://doi.org/10.1111/ele.14030>
- Biochemistry & Molecular Biology (2013).
- Belay, Z., & Assefa, F. (2010). Symbiotic and phenotypic diversity of *Rhizobium leguminosarum* by. *viciae* from Northern Gondar, Ethiopia. Faculty of Life Science, Microbial,

Cellular and Molecular Program Unit, Addis Ababa University, Ethiopia. Accepted 19 November, 2010

- Benidire, L., Lahrouni, M., Daoui, K., Fatemi, Z. E. A., Carmona, R. G., Göttfert, M., & Oufdou, K. (2018). Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.003>
- Benselama A., Tellah S., Ourem F., Ounane S. M. 2018. Characterization of rhizobia from root nodule and rhizosphere of *Vicia faba* in Algeria 41(4): 624-628.

C

- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science*, 330(6001), 192–196. <https://doi.org/10.1126/science.1186120>
- Chafi M H, Bensoltane A (2009) *Vicia faba* (L) A Source of Organic and Biological Manure for the Algerian Arid Regions. *World Journal of Agricultural Sciences* 5 (6): 698-706.
- Cooper J. E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1355–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x>.
- Cheng, Q. (2008). Perspectives in Biological Nitrogen Fixation Research. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), 786-798. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00700.x>
- Chao WL. Antagonistic.1990 activity of *Rhizobium* spp. against beneficial and plant pathogenic fungi. *Lett Appl Microbiol*; 10: 213-215.
- Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M., & Coquet, Y. (2005). *Les Pesticides dans le Sol, Conséquences Agronomiques et Environnementales*. Référence Scientifique. Editions France Agricole, 641 p.
- Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., & Svendsen, A. B. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta medica*, 53(05), 395-398.

D

- Drouin, P., Sellami, M., Prévost, D., Fortin, J., & Antoun, H. (2010). Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae. *Journal of*

environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes, 45(8), 757–765. <https://doi.org/10.1080/03601234.2010.515168>.

- Doyle JJ, Luckow MA. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 14: 334–342
- Duhoux E. & Nicole M. (2004). *Biologie Végétale : association et interaction chez les plantes*, Edition : Dunod-Paris-166p. 53.
- Daoui, K. ⵜⴰⵎⴰⵔⴰⵏⵜ. ‘eḏhedḏhe de stḏatġgies ḏawġliodatioŸ de ḏeffiḏieŸḏe ḏutilisatioŸ du phosphoḏe ḏhez la fġle ;Viḏia fad’a L.J daŸs les ḏoŸditioŸs ḏagḏiḏultuḏe pluliale au Maḏoḏ / ‘eseadḏh of stḏategies for improving phosphorus use efficiency in *Vicia faba* L. conducted in pluvial conditions in Morocco". Thèse 228.
- Dahbia CH .2016 .Étude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris* L.) fixatrices d’azote .Thèse Présentée en vue de l’obtention du Diplôme de Doctorat , microbiologie appliquée ,université badji mokhtar –Annaba, page 14.
- Djouadi S. 2018 .Prévalence de la symbiose des rhizobia associés aux légumineuses d’Algérie. Thèse présenté pour l’obtention du garde de docteur en sciences biologique, éco biologie et amélioration végétal, université de la science et de la technologie houari Boumediene, P 18.
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621-631. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>.

E

- Ertl, G. (2012). The Arduous Way to the Haber - Bosch process. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 638(3-4), 487-489. <https://doi.org/10.1002/zaac.201190458>
- Errami M (2012). Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites (les diazines) dans l’atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomate et sa dégradation électrochimique. Thèse de doctorat en science d’ingénieur et qualité de l’environnement, université Ibn Zohr et université de Reims Champagne-Ardenne, Agadir, 212 p.
- El-Hilali, I. (2006). La symbiose *Rhizobium-LUPIN* : biodiversité des micros symbiotes et mise en évidence d’une multi-infection nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université du Rabat. 206p.

F

- Foret Romaric (2004) *Dico de Bio*, édition de Doeck: 229, 230, 306, 350.

- Franche C, Lindström K. and Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321: 35–59.
- Fatnassi, I. C., Chiboub, M., Saadani, O., Jebara, M., & Jebara, S. H. (2015). Impact of dual inoculation with Rhizobium and PGPR on growth and antioxidant status of *Vicia faba* L. under copper stress. *Comptes rendus biologies*, 338(4), 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2015.02.001>.
- Franche C, Lindström K. and Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321: 35–59.
- Fossou, Kouakou Romain. 2011. Diversité génétique des rhizobia associés à un champ de pois d'angle (*Cajanus cajan* L.). Diplôme d'Agronomie Approfondie (DAA) en Agronomie et Productions Végétales. Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA) de l'institut national polytechnique Félix Houphouët-Boigny de Yamoussoukro. Centre de la cote d'Ivoire.
- Faghire, M. (2012). Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de Rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin (thèse doctorat). Université Cadi Ayyad.
- FAO stat. Pesticides Utilisation. Organisations des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture (Food and Agriculture Organisation). 1998-2017.
- Fao stat, (2014). Algérie. URL: <http://faostat.fao.org>.
- FAO stat. Pesticides Utilisation. Organisations des Nations Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture (Food and Agriculture Organisation). 1998-2017.

G

- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>.
- Galloway JN, Aber JD, Erisman JW, Seitzinger SP, Howarth RW, Cowling EB, Cosby BJ. 2003. The nitrogen cascade. *BioScience* 53: 341–356.
- Gutiérrez, R. A. (2012). Systems Biology for Enhanced Plant Nitrogen Nutrition. *Science*, 336(6089), 1673–1675. <https://doi.org/10.1126/science.1217620>
- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., & Cosby B.J. (2003). The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 53(4), 341-356. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)

- Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Kumar R, VarshneyCL, Gowda L, Krishnamurthy L. 2015.Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities Biotech.; 5: 355-377.
- Graham, P.H. et Vance, C.P. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. Plant Physiology 131 (3) : 872- 877.
- Gatignol C. et Etienne J.C. (2010). Pesticides et santé. Rapport de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, 262 p.
- Google Maps

H

- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., & Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? Trends in plant science, 14(3), 125-132.
- Hawkins, J. P., & Oresnik, I. J. (2022). The Rhizobium-Legume Symbiosis: Co-opting Successful Stress Management. *Frontiers in plant science*, 12, 796045. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.796045>.
- Hirsch A M (2001) Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) legume nodulation. Biotic interaction 19: 320-326.
- Hopkins W.G., 2003.-Physiologie végétale. université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. .
- He, J., Li, J., Gao, Y., He, X., & Hao, G. (2023). Nano-based smart formulations: A potential solution to the hazardous effects of pesticide on the environment. *Journal of Hazardous Materials*, 456, 131599. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131599>.
- Hussein, M. H. A., Zaghloul, R. A., Abou Aly, H. A., Abdel-Rahman, H. M., & Abotaleb, H. H. (2016). Isolation and identification of rhizobial strains from faba bean nodules. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 54(3), 591-600. <https://doi.org/10.21608/assjm.2016.112615>
- Howieson, J.G., Dilworth, M.J., 2016. Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.

I

- INRA., 2019 : Sciences & Impact, R4P (Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides), ANSES (Agence National de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail), Fongicides Agricoles : Modes d'Action, Mécanismes de Résistance

et Exemples par Filière, Colloque Résistance aux Pesticides à Montréal, Site web : <https://irda.blob.core.windows.net>.

- Islam, M. A., Arshad, A., Rahman, M., Juraimi, A. S., Uddin, M. K., Brown, C. L., & Arshad, A. (2022). Chronic effects of organic pesticides on the aquatic environment and human health : A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 18, 100740. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100740>.
- Idrissi, M. M. E., Lamin, H., Bouhnik, O., Lamrabet, M., Alami, S., Jabrone, Y., Bennis, M., Bedmar, E. J., & Abdelmoumen, H. (2020). Characterization of *Pisum sativum* and *Vicia faba* microsymbionts in Morocco and definition of symbiovar *viciae* in *Rhizobium acidisoli*. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(3), 126084. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126084>.
- **Inserm (2013)**. (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale) Expertise collective. Pesticides, effets sur la santé, 2013. Disponible sur <http://editions.inserm.fr/zh5/109743>

J

- Journet, E.P. (2004). Symbioses racinaires. Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais. [Www.crdp-toulouse.fr](http://www.crdp-toulouse.fr).
- John M, Schmidt J, Wienekel U, Kondorosil E, Kondorosil A, Schell J (1985) Expression of the nodulation gene *nodC* of *Rhizobium meliloti* in *Escherichia coli*: role of the *nod C* gene product in nodulation. *EMBO Journal* 10: 2425-2430.
- Jean-Marc .2017.Légumineuse/Bactérie rhizobium= symbiose.
- 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.
- *Jornal Plante and Soil* (1972), vol. 37. P.489-496

K

- Kaye JP, Hart SC. 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution* 12 : 139–143.
- Kenzari, M. (2021). Interaction Entre Les Rhizobia Nodulant L'arachide (*Arachis Hypogaea* L.) Et Quelques Champignons Phytopathogènes (Thèse De Doctorat). Université Kasdi Merbah-Ouargla.

- Kim, K., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.
- Küçük, Ç., & Kıvanç, M. (2018). Biochemical characterization and protein profile by SDS-PAGE of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) associated Rhizobia.
- Khalfi, Ch., & Smara, R. (2017). Caractérisation phénotypique des microsymbionts isolés à partir des nodules racinaires de la légumineuse *Lupinus angustifolius*. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine.

L

- Li, C., Li, X., Yang, Y., Shi, Y., & Li, H. (2022). Degradation reduces the diversity of nitrogen-fixing bacteria in the alpine wetland on the Qinghai-Tibet Plateau. *Frontiers in plant science*, 13, 939762. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.939762> .
 - Ladha, J. K., Peoples, M. B., Reddy, P. M., Biswas, J. C., Bennett, A., Jat, M. L., & Krupnik, T. J. (2022). Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field crops research*, 283, and 108541. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108541>
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
- Lindström, K., Murwira, M., Willems, A., and Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbehost mutualism: the case of rhizobia. *Res. Microbiol.* 161, 453–463.
 - Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1314-1335.
 - Les légumineuses : Définition. Dictionnaire d'Agroécologie, <https://dicoagroecologie.fr/encyclopedie/les-legumineuses/>.
 - Lewis G, Schrire B, MacKinder B, Lock M. 2005. Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
 - Louachi M. 2015. Enquête sur les conditions d'utilisation des pesticides en agriculture dans la région centre de l'algérois et la perception des agriculteurs des risques associés à leur utilisation. Diplôme de magistère, école national supérieur d'agronomie, Algérie, pp04.
 - (2004) le cassis dans pesticides, risque et sécurité alimentaire édition Aprifel, Paris, 12p.
 - Lalancette, A. (2012). Méthodes de lutte à la contamination des eaux de surface en Montérégie par les pesticides agricoles. Thèse pour l'obtention d'une maîtrise en

environnement. Centre universitaire de formation en environnement : Université de Sherbrooke ,122p

- Legume-Rhizobium Symbiosis: a Paradigmatic and Mechanistic Outlook.
- Lakhal A. 2011. Effet de certains indicateurs de gènes Nod (composé phénoliques) sur la croissance de rhizobium en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique .en vues de l'obtention du diplôme de doctorat –es- sciences en biologie moléculaire et cellulaire, université ABoubaker belkaid .Telmcen, page 43.

M

- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current Progress in Nitrogen Fixing Plants and Microbiome Research. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 97. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Murray, J. D., Liu, C. W., Chen, Y., & Miller, A. J. (2017). Nitrogen sensing in legumes. *Journal of experimental botany*, 68(8), 1919–1926. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw405>
- Mezani, S., Khelfane-Goucem, K., and Medjdoub-Bensaad, F. (2016). Evaluation of invertebrate diversity on a broad bean crop (*Vicia faba* L. var. major) in Tizi-Ouzou area (Algeria). *Zool. Ecol.* 26, 129–133.
- Masson-Boivin C, Bontemps C, Golfier G, Gris-Liebe C, Talini L (2006) Détection et typage du gène nodC à l'aide de bio puces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG*, 6: 97-110.
- Machefert SE, Dise NB, Goulding KWT, Whitehead PG. 2002. Nitrous oxide emission from a range of land uses across Europe. *Hydrology and Earth System Sciences*. 6: 325-337.
- Mishra RPN, Singh RK, Jaiswal HK, Kumar V, Maurya S. 2006. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr Microbiol.* 2006; 52: 383-389.
- Musarrat, J., Haseeb, A. (2000). Agrichemicals as antagonist of lectin-mediated Rhizobium-legume symbiosis: Paradigms and prospects, *Curr. Sci.* 78, 793-797.
- Martins, D. C. D. S., Resende, I. T., & da Silva, B. J. R. (2022). Degradation features of pesticides: a review on (metallo) porphyrin-mediated catalytic processes. *Environmental science and pollution research international*, 29(28), 42384–42403. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19737-3>.

- Magdelaine Christophe. Les pesticides ou produits phytosanitaires[en ligne]. (page consultée le 04/08/2020) <https://www.notreplanete.info/services/membres/membre.php?> .
- Maldani, M., Aliyat, F. Z., Messaoud, B. B., Simone, C., Marina, M., Filippo, G., & Laila, N. (2021, October 1). *Effects of Pesticides Use (Glyphosate & Paraquat) on Biological Nitrogen Fixation*.
<https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA678355007&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=00496979&p=AONE&sw=w>.
- Matthews, G. (2018). A history of pesticides [Review of the book a history of pesticides, by G. Matthews]. CABI
https://www.researchgate.net/publication/339054358_BOOK_REVIEW_Matthews_2018_A_history_of_pesticides_CABI
- Munees, A, Saghir Khan M. Pesticides as Antagonists of Rhizobia and the Legume-Rhizobium Symbiosis: a Paradigmatic and Mechanistic Outlook. *Biochemistry & Molecular Biology* (2013). Vol. 1(4), p.63-75.
- Martani, E., Margino, S., Indradewa, D., & Supriyo, A. (2011). Isolation and selection of Rhizobium tolerant to pesticides and aluminum from acid soils in Indonesia. *Agriculture Microbiology, Faculty of Agriculture, Gadjah Mada University*. Received 12 October 2010 / accepted 15 January 2011.
- Munees, A., & Saghir Khan, M. S. (2010). Comparative toxicity of selected insecticides to pea plants and growth promotion in response to insecticide-tolerant and plant growth promoting Rhizobium leguminosarum. *Crop Protection*, 29(4), 325-329.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.01.005>.
- Marchal N., Bourdon J.L. et Richard CL. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- Mecheri, F. (2014). Préparation et caractérisation des nano-cristallites de TiO2 Effets des conditions préparatoires (Mémoire de master). Université de Ouargla.

N

- Noel., 2009. Diversité génétique des Rhizobia associés à un champ de pois d'angle (caganuscajan I) à Yamoussoukrou (centre de la cote d'Ivoire).
- Ndoye I.1990. Contribution à l'étude de la symbiose entre Azorhizobium, Rhizobium et Sesbania rostrata. Thèse de doctorat. Université des sciences et techniques de Lille ; 170p.

- Ngoma L, Babalola OO, Ahmad F. 2012. Eco physiology of plant growth promoting bacteria. *Scie Res Ess.* 2012; 7(47): 4003-4013.
- Peters, N.K. ET Verma, D.P.S. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in Plant Microbe Interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3 (1): 48.
- Noel K.D., 2009: Bacteria Rhizobia. Encyclopedia of microbiology, SCHAECHTER M. San Diego. Marquette University, Milwaukee, WI, USA, 3, 877-893.
- Nair, I., & Bendaira, S. (2015). Mise en évidence des Rhizobia chez la légumineuse *Pisum sativum* L. poussant dans différents écosystèmes algériens. Mémoire de Master .Université des Frères Mentouri Constantine.

O

- Ongena M, Daayf F, Jacques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Cornélis P, Koedam N, Bélanger RR. 1999. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads; predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol.* ; 48: 66-76.
- Ouslim S. 2015 .BNL associées aux légumineuses alimentaires (*Vicia faba* L) dans l'ouest Algérien « caractérisation et importance » .Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat (LMD), Université d'Oran, p31.
- Ouslim S., Merabet CH., Boukhatem Z., Bouchentouf L., Bekki A. 2019. Phenotypic and Symbiotic Diversity, Of Nodulating Rhizobia Associated With Bean (*Vicia Faba*) In West Algeria 3(9): 2347-4289.

P

- Purwaningsih, S., Agustiyani, D., & Antonius, S. (2021). Diversity, activity, and effectiveness of *Rhizobium* bacteria as plant growth promoting rhizobactéries (PGPR) isolated from Dieng, central Java. *Iranian journal of microbiology*, 13(1), 130–136. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5504> .
- Pankievicz, V. C. S., Irving, T. B., Maia, L. G. S., & Ané, J. M. (2019). Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing bacteria and non-leguminous crops. *BMC biology*, 17(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0710-0> .
- Pashaei, R., Zahedipour-Sheshglani, P., Dzingelevičienė, R., Abbasi, S., & Rees, R. M. (2022). Effects of pharmaceuticals on the nitrogen cycle in water and soil: a

review. *Environmental monitoring and assessment*, 194(2), 105.
<https://doi.org/10.1007/s10661-022-09754-7>

- Perrin JF.2019. Assimilation du diazote.
http://www.perrin33.com/microbiologie/azote/entree-n_3.php.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 180–201.
- Postgate, J. R. (1982). Biology Nitrogen Fixation: Fundamentals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, Vol. 296, No. 1082, the Nitrogen Cycle (Jan. 27, 1982), pp. 375-385.
- Pathak, V. M., Verma, V., Rawat, B., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumarchandra, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022). Status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>.
- Peron J-Y., 2006 Références. Production légumières.2èmeed. 613 p.

R

- Requena, N., Jimenez, I., Toro, M., & Barea, J. M. (1997). Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. *The New phytologist*, 136(4), 667–677. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00786.x>.
- Roche P, Maillat F, Plazanet C, Debelle F, Ferro M, Truchet G, Promé J K, Dénarié J (1996) The common nod ABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc Natl Acad Sci* 93: 15305–15310
- Rabah CH .2009.Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l’Est Algérie. Mémoire en vue de l’obtention du diplôme de Magister (École Doctorale), Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie, p 6
- Rajaonarimany, Elinarindra., 2010.Influence de la diversité mycorhizienne sur la symbiose *Dalbergia trichocarpa*–*Rhizobia* et sur structure de la microflore tellurique. Mémoire de diplôme d’étude approfondie en sciences de la vie Université d’Antananarivo. p99.

- Ramdani, T., & Hadroug, H. (2017). Influence des pesticides sur la croissance des Rhizobium. Mémoire de Master. Université A. MIRA Bejaia.
- Rüberg S, Tian ZX, Krol E, Linke B, Meyer F, Wang Y, Pühler A, Weidner S, Becker A. 2003 Construction and validation of a Sinorhizobium meliloti whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotechnol*; 106: 25- 56.
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., Srivastav, A. L., & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal Of Cleaner Production*, 283, 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>.

S

- 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 (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1011. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>.
- Shumilina, J., Soboleva, A., Abakumov, E., Shtark, O. Y., Zhukov, V. A., & Frolov, A. (2023). Signaling in Legume-Rhizobia Symbiosis. *International journal of molecular sciences*, 24(24), 17397. <https://doi.org/10.3390/ijms242417397>.
- 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 (Basel, Switzerland)*, 9(8), 1011. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>.
- Suty, L. (2015). Les végétaux : des symbioses pour mieux vivre. France : QUAE. p : 20, 22.
- Schultze M, Quiclet-Siret B, Kondorosi E, Vireliziert H, Glushka J N, Endre G, Géro S D, Kondorosi A (1992) Rhizobium meliloti produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 192-196.
- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint J P, Vierheilig H (2007) Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic PlantFungus Interactions, Review. *Molecules* 12: 1290-1306.
- Spaink HP. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 54: 257–288.

- Schwartz C., Decroux J., & Muller J.C. 2005. Guide de la fertilisation raisonnée : Grandes cultures et prairies. Edition France Agricole.298p.
- Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag. Berlin.
- Spaink HP. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annual Review of Microbiology. 54: 257–288.
- Sadowsky M J, Keyser H, Ben Bohlool B (1983) Biochemical Characterization of fast- and Slow Growing Rhizobia That Nodulate Soybeans. Int J Syst Bacteriol: 716-722.
- Schiffers B (2012).L'emploi des pesticides dans les cultures : entre tracteurs et détracteurs. Probio .2:80-93.
- Socorro J (2015). Etude de la réactivité hétérogène de pesticides adsorbés sur des particules modèles atmosphériques : cinétiques et produits de dégradation. Thèse de doctorat en Chimie de l'Environnement, Université Aix-Marseille, France, 245p.
- Sethi, S., Mathur, N., & Bhatnagar, P. (2013). Growth response of microbial population exposed to synthetic pyrethroids. *International Journal of Environmental Sciences, 4*(1), 42. <https://doi.org/10.6088/ijes.2013040100005>
- SHIN-CHSIANG LIN, B. R. FUNKE and J. T. SCHULZ. Effects of some Organophosphate and carbamate insecticides on Nitrification and legume growth.
- Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. *Handbook for Rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology*. Springer-Verlag, New York, USA.
- Somasegaran P, Hoben H G (1985) Methods in Legume Rhizobium Technology. United States Agency for International Development (USAID).
- *Stade communal Bordj Arima*. (s. d.). Mapcarta. <https://mapcarta.com/fr/W89548222>
Longitude latitude in Remchi, Tlemcen, Algeria GPS coordinates. (s. d.). https://www.longitude-latitude-maps.com/city/2_560,Remchi,Tlemcen,Algeria

T

- TESTUT F. GRILLET J P., 2007 : Insecticides Organophosphorés, Carbamates, Pyréthrinoides de Synthèse et Divers, Article Scientifique sur Researchgate.

U

- UIPP, (2009). Rapport d'activité <http://www.Uipp.org/var/uipp/storage/original/aplication/c501ecdf65f1-fa5c7669dbf212580.pdf>.

- Umetsu, N., & Shirai, Y. (2020). Development of novel pesticides in the 21st century. *Nippon Nōyaku Gakkaishi*, 45(2), 54–74. <https://doi.org/10.1584/jpestics.d20-201>.

V

- Vance, C. P. (2001). Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. *Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources*. *Plant Physiology*, 127(2), 390-397. <https://doi.org/10.1104/pp.010331>.
- Vitousek PM, Howarth RW. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13: 87–115.
- Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena MH, Rivas R, Martínez-Molina E. Current. 2017. Status of the Taxonomy of Bacteria Able to Establish Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis. *Microbes for Legume Improvement*. 2017 ; 1-43.
- Vidal, D., Martínez, J., Bergareche, C., Miranda, A. M., & Simon, E. (1992). Effect of methabenzthiazuron on growth and nitrogenase activity in *Vicia faba*. *Plant and Soil*, 144(2), 235-245. <https://doi.org/10.1007/bf00012880>.
- Vaudano Maxime. « A quoi servent les pesticides, qui se retrouvent dans notre alimentation ? » [En ligne]. (consulté le 4 août 2020) https://www.lemonde.fr/lesdecodeurs/article/2018/02/27/au-fait-a-quoi-servent-lespesticides_5263042_43557.

W

- Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334-342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>
- White, P. J., & Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105(7), 1073–1080. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Wakford, Tom. 2004. *Aux origines de la vie : Quand l'homme et le microbe s'approprient*. Editions de Boeck Université. Bruxelles. ISSN : 1378-4080.
- Werner, G.D.A, Cornwell, W.K., Sprent, J.I., Kattje, J., & Kiers, E.T. (2014). A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N₂-fixation in angiosperms. *Nature communications* 5, Article number : 4087.

Y

- Yaw Boakeye E., Dotse Lawson I.Y., Akyea Danso S.K., Kwame OffeiS. (2016). Characterization and diversity of rhizobia Nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbioses*. 69.89 p.

Z

- Zamoum, R., Ben Ali, A., & Bellabaci, M. R. (2023). Modalités d'utilisation des pesticides en agriculture et impact sanitaire : Enquête cas-témoin au niveau d'El Oued. *Journal Algérien des Régions Arides*, 16(1), 46-58.
- Zakhia F., & de Lajudie P. 2001. Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*, 21(6-7):569-576 <https://doi.org/10.1051/agro:2001146>.
- Zakhia F, De Lajudie P. Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*. 2001; 21: 569-576.
- Zahran, H. H. (1999). Rhizobium -Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968-989. <https://doi.org/10.1128/mnbr.63.4.968-989.1999>.

Annexe

Annexe 01

Milieux de culture utilisés**Composition de milieu YMA (Yeast Manitol Agar) en g/l (Somasegaran et Hoben ,1985)**

YMB	1000 ml
Agar	18
PH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMB (Yeast Manitol Broth) en g/l (Somasegaran et Hoben ,1985)

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
Na Cl	0.10
MgSO ₄ 7(H ₂ O)	0.20
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1.00 L
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA+ RC (Rouge Congo) en g/l (Somasegaran et Hoben ,1985)

YMB	1.00 L
Solution stock de RC	10.00 ml
Agar	18.00
PH	6.80

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

- Après l'ajustement de pH on ajoute 10 ml de Rouge Congo (0.25 g Rouge Congo dans 100 ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu YMA+ BTB (Bleu de Bromothymol) en g/l (Somasegaran et Hoben ,1985)

YMB	1.00 L
Solution stock de bleu de BTB	5.00 ml
Agar	18
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes.

- Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de Bromothymol (0.50 g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu Glucose Peptone Agar (GPA) (Somasegaran et Hoben ,1985)

Glucose	5g
Peptone	10g
Agar	15g
Eau distillée	1L
Solution de BCP	100ml

Solution de pourpre de Bromocrésol (Bromocrésol Purple BCP)

Pourpre de Bromocrésol	0.5
Ethanol	100ml

- Additionner 5 ml de la solution de pourpre de Bromocrésol (BCP) à 1 Litre du milieu GPA après autoclavage.

Annexe 02

Coloration de Gram

Le protocole expérimental comprend les étapes suivantes :

1. Placer une goutte d'eau distillée stérile au centre d'une lame propre.
2. Prélever une petite quantité d'une colonie à l'aide d'une anse de platine.
3. Mélanger la colonie avec la goutte d'eau, puis sécher en passant rapidement sur la flamme d'un bec Bunsen.

Voici le protocole expérimental détaillé :

4. Appliquer le Violet de Gentiane sur la lame et laisser agir pendant 1 minute.
5. Verser Lugol sur la lame et laisser agir pendant 30 secondes.
6. Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte le mélange "Alcool-Acétone".
7. Rincer abondamment à l'eau distillée.
8. Appliquer la fuchsine sur la lame et laisser agir pendant 1 minute.
9. Rincer à nouveau à l'eau distillée.
10. Sécher la lame avec un papier absorbant.
11. Observer au microscope (grossissement x100) en ajoutant de l'huile à immersion.

L'état frais

- 1) Utiliser une pipette Pasteur stérile pour prélever un échantillon de la culture du bouillon.
- 2) Déposer une goutte de la culture au centre d'une lame et recouvrir avec une lamelle.
- 3) Examiner au microscope en utilisant l'objectif X40.

Résumé

Vicia faba est une légumineuse qui forme une interaction symbiotique avec les bactéries Rhizobium. Cette interaction provoque l'organogenèse d'un nouvel organe racinaire appelé nodosité, où un microenvironnement favorable permet aux Rhizobiums de se différencier en bactérie capables de fixer le diazote atmosphérique. Ces bactéries convertissent le N₂ atmosphérique en ammonium, qui est ensuite assimilé par la plante hôte.

L'étude phénotypique des souches, portant sur les caractères morphologiques et culturaux, la tolérance aux insecticides a révélé une grande diversité physiologique chez les isolats de *Vicia faba* testés. La résistance aux insecticides a été évaluée sur un milieu solide avec différentes concentrations de pesticides.

Les résultats obtenus montrent à la fois la résistance et la sensibilité des souches vis-à-vis des insecticides.

Parmi les trois molécules testées Chlorpyrifos-éthyl, semble être les moins efficace car l'ensemble des souches présentent une tolérance à au moins 1024 mg/l.

Aceplan sp 20 semble présenter une activité remarquable car même une faible concentration (0.5mg/l) de ce produit est arrivé à éliminé deux souches (p4-5 et p4-5(A)).

Ces données doivent être utilisées afin de faire un screening de nouvelles souches permettant la sélection des plus performantes en matière de tolérance aux insecticides.

Mots clés : Rhizobium, Tolérance, insecticides, *Vicia faba*.

Abstract

Vicia faba is a legume that forms a symbiotic interaction with bacteria Rhizobium. This interaction causes organogenesis of a new root organ called nodosity, where a favorable microenvironment allows the rhizobia to differentiate into bacteria capable of fixing the atmospheric nitrous. These bacteria convert atmospheric N₂ into ammonium, which is then assimilated by the host plant.

The phenotypic study of the strains, concerning morphological and cultural characteristics, tolerance to insecticides revealed a great physiological diversity in the isolates of *Vicia faba* tested. Insecticide resistance was assessed on a solid medium with different pesticide concentrations.

The results obtained show both resistance and sensitivity of the strains to insecticides. Among the three molecules tested Chlorpyrifos-ethyl, seems to be the least effective because all strains have a tolerance of at least 1024 mg/ l.

Aceplan sp 20 seems to have a remarkable activity because even a low concentration (0.5mg/l) of this product arrived to eliminate two strains (p4-5 and p4-5(A)).

These data must be used in order to screen new strains allowing the selection of the most effective in terms of insecticide tolerance.

Keywords: Rhizobium, Tolerance, insecticides, *Vicia faba*.

ملخص

Vicia faba عبارة عن بقوليات تشكل تفاعلاً تكافلياً مع بكتيريا Rhizobium. يؤدي هذا التفاعل إلى تكوين عضوي لعضو جذر جديد يسمى العقيدات، حيث تسمح البيئة الدقيقة المواتية للريزوبيا بالتمايز إلى بكتيريا قادرة على تثبيت النيتروجين في الغلاف الجوي. تقوم هذه البكتيريا بتحويل النيتروجين الموجود في الغلاف الجوي إلى أمونيوم، والذي يتم بعد ذلك استيعابه بواسطة النبات المضيف.

Vicia faba كشفت الدراسة النمطية للسلاسل، المتعلقة بالخصائص المورفولوجية والثقافية، والتسامح مع المبيدات الحشرية عن تنوع فسيولوجي كبير في عزلات التي تم اختبارها. تم تقييم مقاومة المبيدات الحشرية على وسط صلب بتركيزات مختلفة من مبيدات الآفات *faba*.

يبدو أنها Chlorpyrifos-ethyl تظهر النتائج التي تم الحصول عليها مقاومة وحساسية السلاسل للمبيدات الحشرية. من بين الجزئيات الثلاثة التي تم اختبارها الأقل فعالية لأن جميع السلاسل لديها تحمل لا يقل عن 1024 ملجم/لتر

(A) p4-5 و p4-5 له نشاط ملحوظ لأنه حتى التركيز المنخفض (0.5 ملغ/لتر) من هذا المنتج وصل للتخلص من سلالتين من Aceplan sp 20 يبدو أن

يجب استخدام هذه البيانات من أجل فحص سلالات جديدة تسمح باختيار الأكثر فعالية من حيث تحمل المبيدات الحشرية

الكلمات المفتاحية: Rhizobium، التسامح، المبيدات الحشرية، *Vicia faba*.