

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie  
Spécialité/Option : Biologie moléculaire des procaryotes  
Département: Biologie

### Thème

Contribution à l'étude des partenaires symbiotiques  
des espèces légumineuses du genre

*Mellilotus et Coronilla*

Présenté par :

Aouata Aicha

Azzouzi Imane

Devant la commission composée de :

Mairif S

Torche A

Ayad H

Athamnia M

Benbelkacem S

Drif F

Président

Encadreur

Examineur

Membre

Membre

Membre

Université de Guelma

Juin 2017

## **Remerciements**

Nous voulons avant toute chose remercier « الله » le Tout Puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à adresser l'expression de nos profonds remerciements à notre encadreur **Mme Torche Asma** qui nous a fait l'honneur d'assurer la direction de ce mémoire. Nous la remercions pour son soutien, la pertinence de ses conseils, sa grande disponibilité, sa patience et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail.

Nous tenons à remercier la présidente du jury **Mme Mairif**, ainsi que **Mme Ayad H**, pour l'examen de ce travail, sans oublier les membres de la commission pour nous avoir l'honneur d'évaluer notre travail : **Mr Athamnia A**, **Mme Benbelkacem S** et **Mme Drif F**.

Nos remerciements vont également à **Mr Nadjah R** et **Mme Khalaf M** pour les aides qu'ils nous ont apportées.

Nous aimerons également remercier toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers : **Mme Hassiba**, **Mme Houria**, **Mme wafa**, **Mme Ratiba** et **Mme ghaniya** pour leurs conseils et aides et pour nous avoir facilité l'accès au laboratoire.

Nous sommes redevables à l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation durant ces 5 années.

On réserve enfin nos derniers remerciements aux gens qui nous ont aidées de près ou de loin pour réaliser ce travail.

## Dédicace

*J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail...*

### ***A mon cher père « Salah »***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de ses sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation*

### ***A ma très chère mère « Rahima »***

*Que je ne cesserai jamais de remercier pour son soutien et son encouragement durant mes années d'étude, et aussi pour son sacrifice, sa patience sans limite et l'éducation qu'il m'a donnée*

*Je leur dis merci mille fois, puisse Dieu me les garder*

### ***A mes frères***

*Amine, Khaled, Reda, et ma belle-sœur Nardjess sans oublier ma petite ange allaà*

*Qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

### ***A mon binôme***

*Azzouzi Imane pour les bons moments passés ensemble, merci à toi que Dieu te protège*

### ***A mes amies***

*Zahra, Nabila, Bouchra, Naima, Lamia, Sara, Sara, Awatif et Lwiza*

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs*

### ***A toute ma grande famille***

*Mes tentes, mes oncles, mes cousines et mes cousins surtout Hakima*

*A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que j'aime, je dédie ce travail*

**AICHA**

## Dédicace

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce modeste travail:*

### ***A mon père « Ahmed »***

*Qui peut être fier de trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ;  
Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

### ***A ma mère « Noura »***

*Qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.  
Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me les garder*

### ***A ma grande mère Cherifa***

*Pour son amour et ses prières, Puisse ALLAH me la garder.*

### ***A mes frères Nidal et Abd errahmen et mes sœurs Chaimaa et Roumaissa***

*Qui n'ont cessé de m'encourager et à qui je souhaite réussite et bonheur dans leurs vies.  
Votre fierté de moi me vaut tous les diplômes du monde.*

### ***A mon binôme***

*Aouata Aicha avec qui j'ai passé et partagé de précieux moments et de très belles années.*

### ***A mes chères amies***

*Qui j'ai aimés et estimés du fond du cœur. : Lamia, Nabila, Bouchra, Naima, Ahlem, Rahil,  
Lwiza et Awatif.*

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je vous souhaite une brillante réussite dans la vie professionnelle, familiale  
une bonne santé et une vie inondée de bonheur.*

### ***A ma grande famille.***

***Merci à tous et à toutes.***

**IMANE**

## Liste des abréviations

**BCP:** Pourpre de Bromocrésol

**BET:** Bromure d’Ethidium

**BTB:** Bleu de Bromothymol

**EDTA :** Ethylène Diamine tétra Acétate

**GPA:** Glucose Peptone Agar

**RC:** Rouge Congo

**TBE:** Tris Borate EDTA

**YMA:** Yeast Mannitol Agar

**YMB:** Yeast Mannitol Broth

**nod:** nodulation

**Myc:** mycorhization

**CMA :** Champignon mycorhizien arbusculaire

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : La plante <i>Melilotus</i> .....	06
<b>Figure 02</b> : La plante <i>Coronilla</i> .....	06
<b>Figure 03</b> : Etablissement des symbioses rhizobiennes.....	08
<b>Figure 04</b> : Coupe longitudinale schématique d'une nodosité de type indéterminé (A) et de type déterminé (B).....	12
<b>Figure 05</b> : Les étapes de la formation d'un nodule racinaire chez les légumineuses infectée par Rhizobiums.....	16
<b>Figure 06</b> : Principaux types mycorhiziens représentés sur une coupe transversale de racinemodifié .....	17
<b>Figure 07</b> : Structure caractéristiques des champignons mycorhiziens arbusculaires.....	20
<b>Figure 08</b> : Les étapes de colonisation d'un champignon mycorhizien.....	22
<b>Figure 09</b> : Localisation géographique de zone de prélèvement.....	24
<b>Figure 10</b> : Conservation des nodules des plantes B et D sous CaCl <sub>2</sub> .....	27
<b>Figure 11</b> : Ensemencement par la technique des quatre cadrans.....	28
<b>Figure 12</b> : Schéma récapitulatif des différentes étapes à suivre pour la coloration et l'observation des racines endomycorhizées.....	36
<b>Figure 13</b> : Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire.....	37
<b>Figure 14</b> : Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules.....	38
<b>Figure 15</b> : Le poids initial et constant de <i>Coronilla</i> et <i>Melilotus</i> .....	40
<b>Figure 16</b> : Aspect des colonies sur le milieu YMB.....	41
<b>Figure 17</b> : Aspect des colonies sur le milieu YMA pour les deux plantes.....	42
<b>Figure 18</b> : Croissance sur YMA + RC.....	43
<b>Figure 19</b> : Croissance sur YMA + BTB.....	44

<b>Figure 20</b> : Croissance sur GPA + BCP.....	..44
<b>Figure 21</b> :Examen microscopique par la coloration de Gram .....	45
<b>Figure 22</b> : Résultat de Test du 3-cétolactose.....	45
<b>Figure 23</b> :Utilisation des sucres par toutes les souches testées.....	46
<b>Figure 24</b> :Utilisation des acides aminés par toutes les souches testées.....	47
<b>Figure 25</b> : Test de tolérance au NaCl.....	..50
<b>Figure 26</b> : Effet de pH sur toutes les souches testées.....	..51
<b>Figure 27</b> : Résistance aux antibiotiques.....	53
<b>Figure 28</b> : Profil plasmidique des souches analysées.....	..54
<b>Figure 29</b> : Observation des racines de <i>Coronilla</i> et <i>Mellilotus</i> après coloration de bleu de méthylène .....	..55
<b>Figure 30</b> : Observation des racines de <i>Coronilla</i> et <i>Mellilotus</i> après coloration de l'ancre.....	55
<b>Figure 31</b> : Résultats des paramètres d'infection mycorhizienne de la <i>Coronilla</i> par Mycocalc.....	55
<b>Figure 32</b> : Résultats des paramètres d'infection mycorhizienne de la <i>Mellilotus</i> par Mycocalc.....	56

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Classification des <i>Rhizobiums</i> .....	09
<b>Tableau 02</b> : Les coordonnées géographiques de Guelma.....	24
<b>Tableau 03</b> : Isolats et souches de référence utilisée pour cette étude.....	28
<b>Tableau 04</b> : Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire.....	37
<b>Tableau 05</b> : Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules.....	38
<b>Tableau 06</b> : Résultats obtenus pour les paramètres physico-chimiques du sol.....	40
<b>Tableau 07</b> : Résultat de test activité uréasique.....	48
<b>Tableau 08</b> : Résultat de test tolérance au NaCl.....	49
<b>Tableau 09</b> : Résultat de test de température.....	50
<b>Tableau 10</b> : Résultat de test d'antibiotiques.....	52

## Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude des endosymbioses racinaires bactériennes et mycorhiziennes associés aux deux plantes légumineuses *Mellilotus* et *Coronilla* situées dans la région de Guelma.

L'étude du micro symbiote bactérien est réalisée par une étude morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique en présence des souches de référence de rhizobia. Une extraction des plasmides est réalisée, et les résultats sont révélés par la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose.

L'étude du micro symbiote mycorhizien est réalisée par la détection et l'estimation de la colonisation mycorhizienne chez les deux plantes.

Nous avons également fait une étude pédologique par des analyses physico-chimiques des sols des zones d'étude.

Les résultats obtenus montrent que les isolats bactériens ont la description des rhizobia et possèdent le plasmide symbiotique caractéristique de ces bactéries.

La colonisation mycorhizienne est de type endomycorhize arbusculaire, avec une forte fréquence et teneur arbusculaire élevé.

Les résultats de l'analyse de sol expliquent la répartition des espèces végétales ainsi que le type des partenaires associés.

**Mots-clés** : Symbiose, légumineuses, *Mellilotus*, *Coronilla*, *Rhizobium*, Mycorhize.

## Summary

This work is a contribution to the study of bacterial and mycorrhizal root-dwelling coops associated with leguminous plants *Mellilotus* and *Coronilla* Located in the region of Guelma.

The study of bacterial co-existence was carried out by a morphological study followed by a phenotypic study in the presence of observant strains of Rhizobia. The plasmids were isolated and the results were shown by the electrical migration method on Gel Agarose.

The study of Micorhizian coexistence was revealed and evaluated for the mycorrhizal colonization of both plants.

We also studied the soil by conducting physiochemical analyzes of the soil of the study areas.

The results obtained showed that bacterial isolates had the characteristics of rhizobia and had the characteristic co-plasmid of these bacteria.

Mycorrhizal colonization of the endomycorrhizal type with a frequency and a high content of arbuscular mycorrhizae.

Soil analysis studies the distribution of plant species as well as the type of associated partners.

**Key words :** Symbiosis, Leguminous, *Mellilotus*, *Coronilla*, *Rhizobium*, Mycorrhizae.

## المخلص

هذا العمل هو مساهمة في دراسة المتعايشات الداخلية الجذرية البكتيرية و الميكوريزية المرتبطة بالنباتين البقوليين

*Mellilotus* و *Coronilla* المتواجدة في منطقة قالمة.

دراسة المتعايش الدقيق البكتيري تم عن طريق دراسة مرفولوجية متبوعة بدراسة مظهرية في وجود سلالات شاهدة من الريزوبيا. تم عزل البلاسميدات و اظهار النتائج كان بطريقة الهجرة الكهربائية على جال الاجاروز.

دراسة المتعايش الميكوريزي تم بالكشف و التقدير للاستعمار الميكوريزي لكل من النباتين.

قمنا كذلك بدراسة للتربة باجراء تحاليل فيزيوكيميائية لتربة مناطق الدراسة. النتائج المتحصل عليها بينت ان العزلات البكتيرية لها خصائص الريزوبيا و تملك البلاسميد التعايشي المميز لهذه البكتيريا.

الاستعمار الميكوريزي من نوع ميكوريز داخلي شجيري مع تردد و كمية كبيرة من الميكوريز الشجيري.

دراسة تحليل التربة تفسر توزيع الانواع النباتية و كذلك نوع الشركاء المرتبطة.

الكلمات المفتاحية: التعايش ، *Mellilotus* ، *Coronilla* ، *Rhizobium* ، البكتيري ، الفطري، بقولية

# Sommaire

Introduction .....	1
<b>Chapitre 1 : Etude bibliographique</b>	
1- Les interactions plantes-microorganismes .....	3
1-1- Les interactions de type commensal .....	3
1-2- Les interactions de type parasitaire ou pathogène .....	3
1-3- Les interactions de type symbiose .....	4
2- La symbiose plantes légumineuses-micro-organismes .....	4
3- Les légumineuses .....	4
3-1- Les Caesalpinioideae .....	5
3-2- Les Mimosoideae .....	5
3-3- Les Papilionoideae .....	5
4- La plante légumineuse <i>Mellilotus</i> .....	5
5- La plante légumineuse <i>Coronilla</i> .....	6
6- La symbiose plantes légumineuses – bactéries .....	7
6-1- Le micro-symbiote bactérien .....	8
6-1-1- les caractéristiques morphologique et culturelles des rhizobia .....	8
6-1-2- La classification des rhizobia .....	9
6-1-3- Les caractères symbiotiques .....	11
6-2- La nodulation .....	11
6-2-1- La génétique de la nodulation chez la bactérie .....	12
6-2-2- La génétique de la nodulation chez la plante .....	14
6-2-3- Les étapes du processus de nodulation .....	15
7- La symbiose plantes légumineuses - champignons .....	16
7-1- Le micro-symbiote mycorhizien .....	17
7-1-1- Les ectomycorhizes .....	18
7-1-2- Les ectendomycorhizes .....	18
7-1-3- Les endomycorhizes .....	18
7-2- Les molécules signal dans l'établissement de la symbiose .....	20
7-3- Les différents stades de la mycorhization .....	21
7-3-1- La phase a-symbiotique .....	21
7-3-2- La phase pré-symbiotique .....	21
7-3-3- La phase symbiotique .....	21

8- La symbiose tripartite (Plante, <i>Rhizobium</i> , Mycorhize) .....	22
--	----

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

1-La description de la zone d'étude .....	24
2-L'analyses physico-chimiques du sol .....	24
2-1-La détermination de l'humidité relative.....	25
2-2-Le potentiel d'Hydrogène « pH » .....	25
2-3- Le potentiel d'oxydo-réduction .....	25
2-4- La conductivité électrique « CE ».....	25
2-5- L'oxygène dissout.....	25
2-6- La salinité .....	25
3- L'étude du microsymbiote bactériens des plantes légumineuses <i>Mellilotus</i> et <i>Coronilla</i> .....	26
3-1- La collecte des nodules.....	26
3-2- La conservation des nodules.....	26
3-3- L'isolement des bactéries à partir des nodules.....	27
3-3-1- La stérilisation des nodules .....	27
3-3-2- L'isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés .....	28
3-4- La conservation des souches.....	29
3-5- Les caractères cultureux et morphologique .....	29
3-6- L'examen microscopique par la coloration de Gram .....	29
3-7- L'examen de la mobilité.....	30
3-8- Le test du 3-cétolactose .....	30
3-9- La caractérisation phénotypique des isolats.....	31
3-9-1- Les tests nutritionnels.....	31
3-9-2- L'activité uréasique.....	32
3-9-3- Les tests physiologiques.....	32
3-9-4- La résistances aux Antibiotiques.....	33
3-10- L'extraction de l'ADN plasmidique des isolats .....	33
3-11- L'electrophorèse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose .....	34
4-L'étude du microsymbiote mycorhiziens des plantes légumineuses <i>Mellilotus</i> et <i>Coronilla</i> .....	35
4-1- La collecte des racines .....	35
4-2- La coloration des racines .....	35
4-2-1- La coloration au bleu de Methylène .....	36

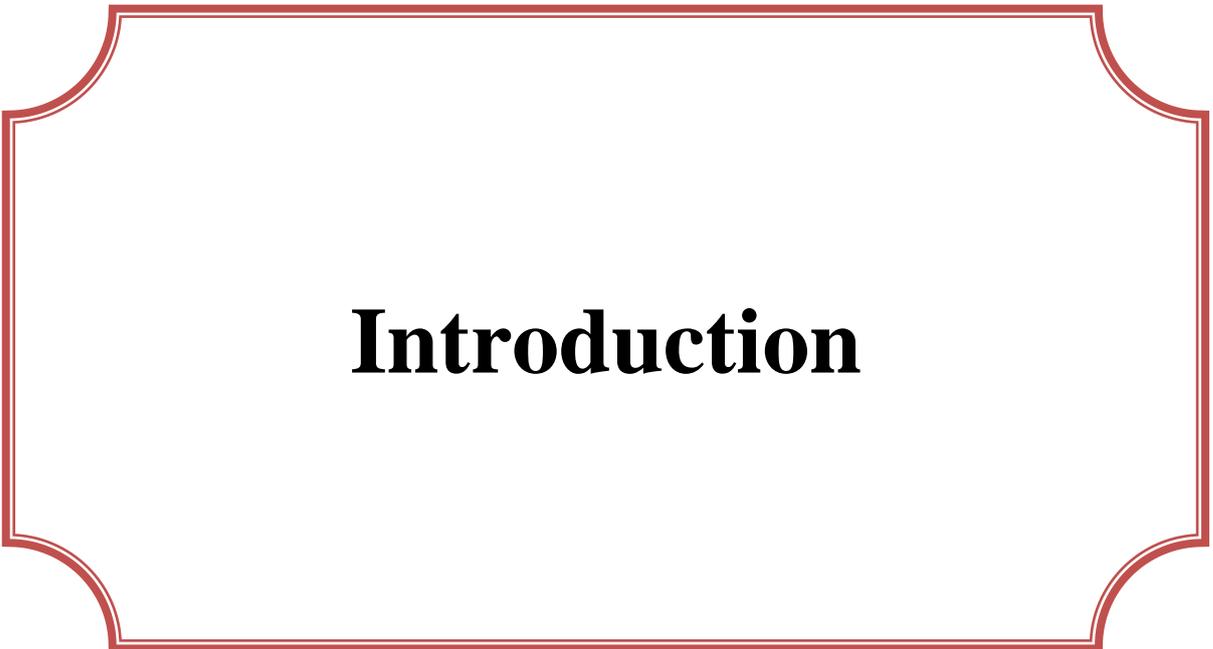
4-2-2- La coloration à l'encre noire .....	36
4-3- L'estimation de la mycorhization.....	37
4-3-1- L'observation de la densité de colonisation par le champignon .....	37
4-3-2- L'observation de la qualité arbusculaire .....	38
4-3-2- Les paramètres de mycorhization.....	39

### **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

1- L'analyses physico-chimiques du sol .....	40
1-1-La détermination de l'humidité relative.....	40
1-2- Les autres paramètres du sol.....	40
2- L'étude du microsymbiote bactériens des plantes légumineuses <i>Mellilotus</i> et <i>Coronilla</i> .....	41
2-1- Les caractères culturaux et morphologique .....	41
2-2- L'examen microscopique par la coloration de Gram .....	44
2-3- L'examen de la mobilité.....	45
2-4- Le test du 3-cétolactose .....	45
2-5- La caractérisation phénotypique des isolats.....	46
2-5-1- Les tests nutritionnels .....	46
2-5-2- L'activité uréasique.....	48
2-5-3- Les tests physiologiques.....	49
2-5-4- La résistance aux Antibiotiques .....	52
2-5-5- L'electrophorèse de l'ADN plasmidique sur gel d'agarose.....	53
3-L'étude du microsymbiote mycorhiziens des plantes légumineuses <i>Mellilotus</i> et <i>Coronilla</i> .....	54
3-1-La détection de mycorhizes et la mise en évidence de l'infection endomycorhizienne .....	54
3-2- L'estimation des paramètres d'infection mycorhizienne .....	55
Conclusion et perspective.....	57

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**



# **Introduction**

### Introduction

Depuis qu'elles ont conquis la surface de la terre il y a environ 475 millions d'années, les plantes ont développé de nombreuses stratégies pour faire face aux carences en eau et en nutriments essentiels de leur environnement. L'une des plus fascinantes est sans doute la mise en place d'associations symbiotiques racinaires avec des micro-organismes du sol, qui engendrent des bénéfices mutuels pour l'hôte et son micro-symbiote. Ces interactions symbiotiques sont diverses et se retrouvent dans tous les écosystèmes, ce qui reflète leur importance pour le développement des plantes (Bendaira, 2016). Ceci est vrai pour la majorité des plantes terrestres dont en particulier les plantes légumineuses qui sont considérées comme l'une des plus importantes parmi les dicotylédones. Elles sont cultivées dans le monde à des fins diverses : alimentaires, fourragères, industrielles, médicinales ou encore écologiques et agricoles.

Parmi les légumineuses qui entrent en association symbiotiques avec les micro-organismes on compte les plantes du genre *Mellilotus* et *Coronilla* qui sont assez répandues dans la région méditerranéenne. Différentes espèces de ces genres sont rencontrées en Afrique et en Europe. L'intérêt de ces genres sur le plan agricole est important notamment la production de nourriture et de fourrage, comme les engrais verts, ou l'assurance du sol pour réduire l'érosion (Harley et Smith, 1983).

Dans le règne végétal légumineux, parmi les symbioses les plus importantes, on distingue les endosymbioses racinaires. Au cours de ces interactions les microorganismes fournissent au végétal hôte des composés nécessaires à leur croissance. En retour, la plante fournit des composés carbonés issus de la photosynthèse. La plus répandue de ces endosymbioses racinaires sont : la symbiose rhizobienne et la symbiose mycorhizienne (Marine, 2015).

Dans la symbiose rhizobienne, les légumineuses peuvent puiser et fixer l'azote gazeux présent dans l'atmosphère grâce à une association symbiotique avec des bactéries appelées rhizobia. Cette symbiose se traduit par la formation au niveau des racines des légumineuses de protubérances appelées nodules ou nodosité dans lesquels ces plantes hébergent les *rhizobia* dans un environnement propice à l'activité fixatrice d'azote. Au sein de ces nodules, la plante fournit les substrats énergétiques/carbonés nécessaires au rhizobia qui en retour fournissent de l'azote sous forme d'ammoniac directement utilisable dans le

flux métabolique de la plante. Cette symbiose permet aux légumineuses d'être relativement indépendantes vis-à-vis de l'azote du sol, ce qui permet d'assurer leurs besoins (Sadowsky et Graham, 2006).

Dans la symbiose mycorhizienne, les éléments de la population des micro-organismes de la rhizosphère, sont incapables de faire la photosynthèse et sont complètement dépendants pour les substances carbonées, de la plante qu'ils colonisent. Ils fournissent en retour de l'azote, du phosphore et d'autres substances minérales qu'ils sont capables de mobiliser grâce à leurs connexions hyphales avec le sol (Béreau, 2003). La mise en place de telles symbioses est un phénomène biologique qui suppose l'existence de voies de signalisation permet tant la reconnaissance entre les deux partenaires (champignon et plante). Au cours de la cette symbiose, la plante autorise à un microorganisme fongique de pénétrer ses racines jusqu'aux cellules corticales (Elmalyani, 2013).

Les chercheurs ont découvert qu'il existait une relation entre les trois types de partenaires différents : la plante, la bactérie et le champignon. Cette association est une véritable symbiose mutualiste tripartite (El-Hassanin et Lynd, 1985).

Ce présent travail est une contribution à l'étude des partenaires symbiotiques des plantes légumineuses du genre *Mellilotus* et *Coronilla* situées dans la région de Guelma.

L'étude est organisée en 03 chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui vise les principales informations sur l'interaction des plantes légumineuses *Mellilotus* et *Coronilla* avec les micro-organismes (bactéries/ champignons).

Le deuxième chapitre est consacré à la partie matériel et méthodes qui a été réalisée selon les étapes suivantes :

- Description de la zone d'étude par une analyse pédologique
- Collecte des espèces végétales
- Isolement et caractérisation du partenaire racinaire bactérien
- Détection et estimation de la colonisation racinaire par le partenaire mycorhizien

Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus, les interprétations et les discussions.

# **Chapitre 1**

## **Etude bibliographique**

## 1-Interactions plantes-microorganismes

Le sol n'est pas seulement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement il est surtout un milieu vivant qui héberge de très nombreux microorganismes (procaryotes et eucaryotes) qui se nourrissent des composés photo-synthétisés par la plante, remis à leur disposition (Claude, 2009 ; Aurelie, 2010).

Des nombreuses interactions sont observées entre les plantes et les microorganismes, ces interactions peuvent affecter négativement la croissance et la santé des plantes puisqu'elles peuvent provoquer beaucoup de dégâts chez la plante comme la provocation des maladies telles que la nécrose, les tumeurs et les lésions. Mais aussi a des effets positifs puisqu'ils peuvent améliorer la croissance des plantes et aident la plante à résister à des conditions de stress biotique et abiotiques (Aurelie, 2010 ; Djigal, 2003 ; Clementine, 2013).

En effet, il existe trois grands types d'interactions entre les plantes et les microorganismes :

### 1-1- Interaction de type commensal

Est une interaction biologique à bénéfice non réciproque où l'un des partenaires n'a aucune influence sur l'autre. Par exemple : la bactérie *Pseudomonas fluorescens* forme des biofilms sur la racine des plantes sans qu'il n'y ait d'avantages ni pour la plante ni pour la bactérie. Sur les feuilles on trouve *Methylobacterium* et *Sphingomonas* dans ce type d'interaction (Patrick, 2011)

### 1-2- Interaction de type parasitaire ou pathogène

Est une interaction biologique dont un des protagonistes (le parasite) tire profit (en se nourrissant, en s'abritant ou en se reproduisant) d'un autre organisme (hôtes) (Khasirikani, 2009). Par exemple : il y a beaucoup de bactéries pathogènes chez les plantes (*Agrobacteriumsp*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonassp*, *Ralstoniasola-nacearum*), mais ce sont surtout les champignons, les oomycètes et les virus qui provoquent le plus de dégâts chez les plantes (Patrick, 2011).

### 1-3- Interaction de type symbiose

Le terme symbiose fut utilisé pour la première fois par l'allemand Frank en 1877 pour qualifier la coexistence d'organismes différents (Hubert, 1997). En effet, on utilise le terme de symbionte pour caractériser une variété de bactéries/champignons qui établissent une interaction/infection soutenue avec leur hôte au cours de laquelle la colonisation et la multiplication sont contrôlées sans compromettre la vitalité de l'hôte (Philippe, 2009).

L'association symbiotique est souvent construite autour d'un grand partenaire appelé hôte et de plus petits partenaires appelés symbiontes (Philippe, 2009).

## 2- Symbiose plantes légumineuses-micro-organismes

Chez les végétaux supérieurs, l'acquisition des minéraux à partir du sol est d'une importance majeure et la carence en ces éléments constitue une limite à leur développement.

Certains végétaux comme les légumineuses, ont acquis au cours de l'évolution la capacité d'établir des associations symbiotiques avec des micro-organismes du sol dans le but d'améliorer l'acquisition des nutriments dont elle a besoin. Les plus connus sont les associations symbiotiques avec les bactéries de *Rhizobiums* et les champignons *Mycorhiziens*. Ces associations se forment à l'intérieur des cellules de la racine de l'hôte végétal qui appelées endosymbioses racinaires (Mbengue, 2006).

## 3-Les légumineuses

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures qui appartiennent à la famille *Fabaceae*. Elles comprennent 19700 espèces et 674 genres (Sebihi, 2008). Cette famille comprend des plantes herbacées (*Lupin, Tréfle...*), des arbustes (*genet...*) ou des arbres (*Acacia, Minisa, Robiniser...*), elles colonise la plupart des écosystèmes [1]. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales, c'est aussi une source important de fourrage pour les animaux (Patrick et al., 2015). Les botanistes divisent cette famille en trois sous familles :

### 3-1-Les Caesalpinioideae

Cette sous famille rassemble principalement des arbres et des arbustes. Elle pousse dans les régions tropicales et subtropicales, elle comprend environ 150 genres et 220 espèces (Dhanefitouri, 2011 ; Soussou, 2013).

### 3-2- Les Mimosoideae

Elle se compose surtout d'arbres et d'arbustes qui poussent dans le forêt tropical et subtropical. Elle comprend environ 77 genres et 3300 espèces (Dhanefitouri, 2011; Soussou, 2013).

### 3-3-Les Papilionoideae

Constituent la plus grande sous famille des *Fabaceae* avec 28 tribus, 478 genres et environ 13 800 espèces, Les membres de cette sous famille sont principalement des herbacées (Dhanefitouri, 2011 ; Soussou, 2013).

## 4- La plante légumineuse *Mellilotus*

*Mellilotus* vient du grec *melilotus*, nom de la plante, de *meli* qui signifie miel et de *lotos*, substantif s'appliquant à des plante diverses, appartenant à la famille des *Fabacées* (Légumineuses), il est inscrit à la Pharmacopée depuis 1884. Son nom évoque l'attrance qu'il exerce sur les abeilles (Lissac, 1997). Plante mellifère et bisannuelle atteignant 0,30 à 1,50 cm, possède une tige fine et dressée ou ascendante, les feuilles sont petites, trifoliées, et les fleurs, également petites, de type Papilionacées, jaunes, sont réunies en grappes dont les fruits sont des gousses déhiscentes, ovoïdes et légèrement pointues au sommet, contiennent 1 à 2 graines brunes ovoïdes et lisses. (Lissac, 1997 ; Laouar, 2013 ; Fiorini et *al.*, 2002).

Le mélilot plante d'origine Euro-asiatique, le mélilot se rencontre en Europe, dans le Nord et l'Ouest de l'Asie. Il est devenu presque cosmopolite et s'est naturalisé en Amérique (Lissac, 1997). Très commune dans toute l'étendue de notre flore on le trouve sur des sols secs, des lieux incultes et des friches. (Lissac, 1997 ; Fiorini et *al.*, 2002). Le mélilot est utilisé pour soulager les éruptions cutanées, son miel est utilisé pour traiter : Gingivite, sinusite, rhinite, pharyngite, laryngite, amydalite, angine, stomatite aphteuse (Laouar, 2013, Delphine, 2010).



Figure 01 : Melilotus ( Laouar, 2013)

## 5- La plante légumineuse *Coronilla*

Cette plantes fait partie de la famille des fabacées ou légumineuses compte une vingtaine d'espèces. La coronille est un arbrisseau dont la tige anguleuse ne s'élève qu'à un ou deux pieds, elle possède des feuilles glabres paires de folioles ovales, obtuses, avec une impaire. Les fleurs typiques de papilionacées sont regroupées en ombelles ou axillaires en tête de rameaux. Le plus souvent d'un jaune vif et parfumées. Elles apparaissent dès les premiers beaux jours et peuvent refleurir en automne. Les fruits sont des petites gousses allongées et segmentées entre les graines pouvant atteindre 6 à 10 cm.

Originaires du bassin méditerranéen, en Espagne et Portugal, Italie, Sicile, Dalmatie, Grèce, Macédoine, Algérie et Maroc. Afrique septentrionale (Christian, 2017). On les rencontre fréquemment dans les zones de garrigue ou de maquis.



Figure 02 : La plante Coronilla (wikimedia.org)

## 6- Symbiose plantes légumineuses – bactéries

Est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du type *Rhizobium* permettant de réduire l'azote atmosphérique en des formes assimilables par les plantes. A bénéfice réciproque, cette association donne lieu à des interactions multiples entre les deux partenaires. Au cours des ces interactions, un nouvel organe, le nodule, est formé sur les racines ou plus rarement sur les tiges, c'est au sein de cet organe l'azote atmosphérique est fixé par les bactéries (Foussou, 2001).

Bien que la symbiose légumineuse-*Rhizobium* soit une interaction hautement adaptée et régulée, il ne s'agit pas d'une interaction obligatoire ou permanente. En effet, les deux partenaires peuvent vivre indépendamment et de manière autonome, et chaque nouvelle génération de plante doit être infectée par de nouvelles bactéries (Kneip *et al.*, 2007). Lorsque cette symbiose a lieu, elles présentent de nombreux intérêts aussi bien pour les deux partenaires que pour la pratique agricole (Foussou, 2011).

Cette symbiose présente de nombreux avantages pour les légumineuses. En effet, celle-ci leur permet d'avoir une bonne croissance sur des sols carencés en azote (Foussou, 2001). De ce fait, cette symbiose est indubitablement le facteur majeur à l'origine du grand succès de la famille des légumineuses parmi les végétaux (Noel, 2009).

A l'opposé, la plante subvient aux besoins énergétiques de la bactérie au cours de cette symbiose en fournissant des substances carbonées résultant de la photosynthèse. Elle lui offre également un microenvironnement très particulier et nécessaire à la fixation de l'azote. Par ailleurs, outre l'augmentation au niveau du sol de la population des rhizobia spécifiques à la légumineuse hôte après culture, la symbiose fournirait un cadre de reproduction bénéfique qui favoriserait l'évolution des espèces bactériennes (Noel, 2009).

Les bienfaits apportés par les *Rhizobium* sur les plantes et leur environnement laissent entrevoir un apport positif pour l'agronomie car cette symbiose produit assez d'azote assimilable ce qui permet de ne pas leur besoin d'engrais chimique et cela permet de diminuer la pollution [12]. En effet, cet azote nécessaire pour la croissance et le développement de la plante et contribue à l'amélioration du bilan azoté des sols (Farissi *et al.*, 2014).

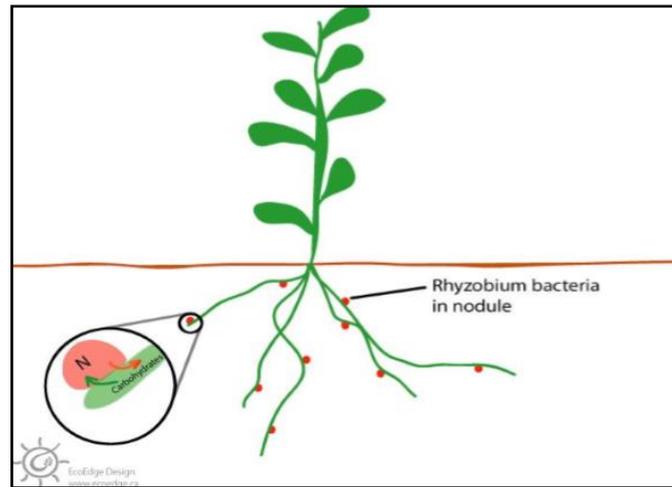


Figure 03 : Etablissement des symbioses rhizobiennes (Sobti, 2013)

## 6-1- Le micro-symbiote bactérien

Les rhizobia furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote. Le nom de *Rhizobium* a été proposé par Frank en 1889 (Ammari, 2011). Le terme *Rhizobium* est attribué aux bactéries telluriques appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*[2]. Il signifie du grec *rhizo* (racine) et *bium* (vivant) donc littéralement organisme vivant dans la racine [3].

### 6-1-1- Caractéristiques morphologique et culturelles des rhizobia

Les rhizobia se présentent sous la forme de bâtonnets à extrémité arrondie, de Gram négatif, non sporulant, aérobies, mobiles grâce à la présence d'un seul flagelle polaire ou deux à six flagelles peritriches, ce sont des organismes de petite taille d'environ 1,2 à 3,4  $\mu\text{m}$  de longueur et de 0,5 à 0,9  $\mu\text{m}$  de largeur, se trouvent isolées, en paire ou bien en amas (Vincent, 1970 ; Jordan, 1984; Somasegaran et Hoben, 1994). Les *Rhizobiums* possèdent un système respiratoire où l'oxygène est l'accepteur d'aérobies, alors que dans les conditions d'anaérobies les espèces de *Rhizobium* peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteur d'électrons. Aussi elles peuvent utiliser des carbohydrates simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Benguedouar, 2000). Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25°C à 30°C et un pH= 7,0 (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994). Le stress salin affecte la croissance et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol. La plupart des souches sont inhibées par des concentrations de 100 mM NaCl (Singleton et *al.*, 1982). Généralement les rhizobia

à croissance rapide sont plus sensibles aux antibiotiques tel que: la tétracycline, pénicilline G et streptomycine (Jordan, 1984).

La croissance des rhizobia implique une source de carbone, d'azote, des facteurs de croissance et des sels minéraux. Le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) est le plus utilisé pour la culture des rhizobia (Vincent, 1970). Elle varie de 3 à 5 jours pour les rhizobia à croissance rapide avec une légère croissance qui peut être détecté au bout de 24 heures. Pour ceux à croissance lente, l'incubation dure de 5 à 10 jours (Allen, 1950).

**6-1-2- Classification des rhizobia**

La combinaison d'étude polyphasique et phylogénétique a permis de modifier considérablement la taxonomie des rhizobia, ces dernières années en raison de l'ajout de plusieurs genres et espèces de ce groupe de bactéries importantes (Noel,2009). Au total, 98 espèces de rhizobia réparties en 14 genres et appartenant aux classe alpha (10 genres) et beta (2 genres) de protéobactéries ont été identifiés depuis 2006 comme *Rhizobiums* (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

La classification des rhizobia est basée sur leur capacité symbiotique et leur spécificité d'hôte, toutes les bactéries fixatrices d'azote en symbiose avec les légumineuses étaient classées en un seul genre *Rhizobium* (Khalef et al.,2006).

**Tableau 01 : Classification des rhizobiums (Torche, 2014)**

Genre	Espèce
<i>Rhizobium</i>	<i>Alamii</i> Berge et al. (2009)
<i>Rhizobium</i>	<i>alkalisoli</i> Lu et al. (2009b)
<i>Rhizobium</i>	<i>cellulosilyticum</i> García-Fraile et al. (2007)
<i>Rhizobium</i>	<i>daejeonense</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>endophyticum</i> López-López et al. (2011)
<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>galegae</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>gallicum</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>giardinii</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>hainanense</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>herbae</i> Ren et al. (2011b)
<i>Rhizobium</i>	<i>huautlense</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>indigoferae</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i> Type species
<i>Rhizobium</i>	<i>loessense</i> formerly <i>Rhizobium huanglingense</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>lusitanum</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>mesosinicum</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>miluonense</i> Lin et al. (2009)
<i>Rhizobium</i>	<i>mongolense</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>multihospitium</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>oryzae</i> Han et al. (2008)

<i>Rhizobium</i>	<i>phaseoli</i>	Peng et al. (2008)
<i>Rhizobium</i>	<i>pisii</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium</i>	<i>tibeticum</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium</i>	<i>sullae</i>	Hou et al. (2009)
<i>Rhizobium</i>	<i>tropicum</i>	formerly <i>Rhizobium hedysari</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>tubonense</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>undicola</i>	Zhang et al. (2011)
<i>Rhizobium</i>	<i>vignae</i>	formerly <i>Allorhizobium undicola</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>yanglingense</i>	Ren et al. (2011)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>albisiae</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>alhagi</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>amorphae</i>	Chen et al. (2010)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>australicum</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>camelthorni</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>caraganae</i>	Chen et al. (2011)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>chacoense</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>ciceri</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>gobiense</i>	formerly <i>Rhizobium ciceri</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>huakuii</i>	Han et al. (2008b)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	formerly <i>Rhizobium huakuii</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>mediterraneum</i>	formerly <i>Rhizobium loti</i> , Type species
<i>Mesorhizobium</i>	<i>metallidurans</i>	formerly <i>Rhizobium mediterraneum</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>opportunatum</i>	Vidal et al. (2009)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>plurifarum</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>robiniae</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>shangrilense</i>	Zhou et al. (2010)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>septentrionale</i>	Lu et al. (2009)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>tarimense</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>temperatum</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>tianshanense</i>	Han et al. (2008b)
<i>Ensifer</i>	<i>abri</i>	formerly <i>Rhizobium tianshanense</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>americanum</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>arboris</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>fredii</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>garamanticus</i>	formerly <i>Rhizobium fredii</i> , former Type of
<i>Ensifer</i>	<i>Sinorhizobium</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>indiaense</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer</i>	<i>kostiensis</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>kummerowiae</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>medicae</i>	
<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>mexicanus</i>	formerly <i>Rhizobium meliloti</i>
<i>Ensifer</i>	<i>morelense</i>	Lloret et al. (2007)
<i>Ensifer</i>	<i>adhaerens</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>numidicus</i>	
<i>Ensifer</i>	<i>saheli</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>sojae</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>terangae</i>	Li et al. (in press)
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>canariense</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>denitrificans</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i>	formerly <i>Blastobacter denitrificans</i> ;
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>iriomotense</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	Islam et al. (2008)
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>jicamae</i>	formerly <i>Rhizobium japonicum</i> , Type species.
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Liaoningense</i>	Ramírez-Bahena et al. (2009)
<i>Burkholderia</i>	<i>pachyrhizi</i>	
<i>Burkholderia</i>	<i>yuanmingense</i>	Ramírez-Bahena et al. (2009)
<i>Burkholderia</i>	<i>caribensis</i>	
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	

Burkholderia	<i>mimosarum</i>	
Burkholderia	<i>nodosa</i>	
Burkholderia	<i>phydatum</i>	Chen et al (2007)
Phyllobacterium	<i>sabiae</i>	
Phyllobacterium	<i>tubercum</i>	
Phyllobacterium	<i>trifolii</i>	Chen et al (2008)
Microvirga	<i>ifriqiense</i>	
Microvirga	<i>leguminum</i>	
Microvirga	<i>lupine</i>	Mantelin et al. (2006)
Azorhizobium	<i>lotononidis</i>	Mantelin et al. (2006)
Azorhizobium	<i>zambiense</i>	New: Ardley et al. (in press)
Ochrobactrum	<i>caulinodans</i>	New: Ardley et al. (in press)
Ochrobactrum	<i>doebereineriae</i>	New: Ardley et al. (in press)
Methylobacterium	<i>cytisi</i>	Type species
Cupriavidus	<i>lupine</i>	formerly <i>Azorhizobiumjohannae</i>
Devosia	<i>nodulans</i>	Zurdo-Piñeiro et al. 2007
Shinella	<i>taiwanensis</i>	
	<i>neptuniae</i>	
	<i>kummerowiae</i>	Lin et al. (2008)

### 6-1-3- Caractères symbiotiques

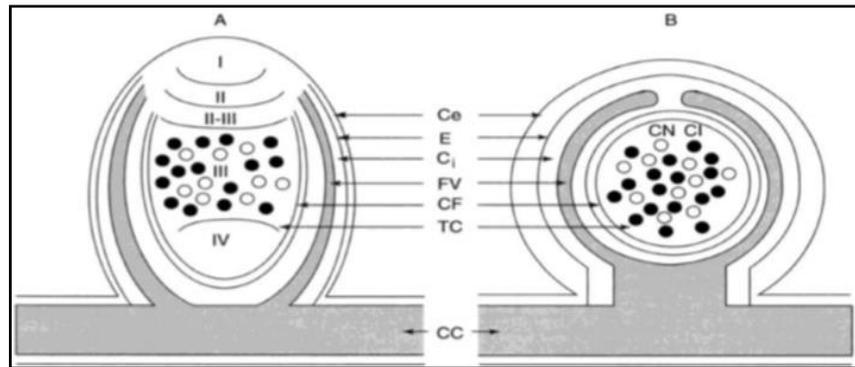
- **L'infectivité:** Exprime le pouvoir de la bactérie à noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées.
- **L'effectivité ou efficacités :** c'est l'aptitude d'un micro-organisme à fixer l'azote dans le nodule.
- **La compétitivité :** représente la résistance de la souche bactérienne considérée aux microorganismes antagonistes et la concurrence avec les souches indigènes pour la nodulation (Ayisi et al.,1992 ; Giraud, 2007).

### 6-2- La nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique se manifeste par l'apparition de nodules qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Dhanefitouri, 2011; Lohar et al., 2009)

Les nodules sont définis par des petites boursouffures se formant sur les racines de nombreuses espèces de plantes, notamment les *Fabacées* sous l'action de deux partenaires dans la rhizosphère d'une manière coordonnée et contrôlée [4]. Ces nodules peuvent prendre deux formes: cylindrique (type indéterminé) ou sphérique (type déterminé).

Le mode de fonctionnement du méristème explique la différence morphologique. Une activité méristématique continue aboutit à la formation de nodosités de type indéterminé. Ce type est formé dans les symbioses entre les *Rhizobia* à croissance rapide et les légumineuses des régions tempérées. Alors qu'une activité méristématique limitée aboutit à la formation des nodules de type déterminé. Ce type observé chez les espèces tropicales (Gough, 2009).



**Figure 04:** Coupe longitudinale schématique d'une nodosité de type indéterminé (A) et de type déterminé (B) (Dhanefitouri, 2011)

I = zone méristématique, II = zone d'infection, II-III = interzone, III = zone fixatrice d'azote. IV = zone de sénescence. Ce = cortex externe, E = endoderme, Ci = cortex interne, FV = faisceau vasculaire, CF = cortex faisceau TC = Tissu conducteur, CC = Cortex conducteur

### 6-2-1- Génétique de la nodulation chez la bactérie

La génétique de *Rhizobium* n'est pas facile, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre. Les souches de *Rhizobium* nodulant les légumineuses sont considérées particulièrement sensibles en raison de leurs caractéristiques génétiques (Pelmont, 1995).

Le génome du *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un mégaplasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieure à 1 Mb, selon les espèces (Ammari, 2011).

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasmide (*Psym*) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti* (Pelmont, 1995). La spécificité de l'hôte est codée par les gènes du plasmide *sym*, un échange dans ce plasmide signifie un échange dans la spécificité de l'hôte (Ammari, 2011).

Un certain nombre de gènes bactériens indiqués est exigé pour la nodulation et sont localisés sur le grand plasmide *Sym*. Ces gènes contribuent à la nodulation et à la fixation biologique de l'azote (Hopkins, 2003 ; Torche, 2006).

### **6-2-1-1- Gènes nod**

Gènes nécessaires à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités. Les gènes *nod* ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactérien géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy et Nougier, 2005). Ces gènes peuvent être fonctionnellement divisés en 3 classes :

#### ➤ **Les gènes nod communs**

Comportant *nod A, B, C, J et I*, sont des gènes de nodulation communs à tous les rhizobia codent pour des enzymes catalysant la synthèse du facteur de nodulation (facteur *nod*), et pour les étapes conservées évolutives essentielles pour le processus de nodulation, ils sont situés sur un opéron duquel *nod ABC* sont essentiels pour la nodulation, En effet, ces gènes sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants en forme de crosse (curling) et inciter les cellules végétales à se diviser. (Hopkins, 2003 ; Foussou, 2001 ; Pelmont, 1995 )

#### ➤ **Le gène nod D**

C'est un gène régulateur négocie les premières étapes de la nodulation chez la bactérie, il est par conséquent le premier gène *nod* transcrit lors du processus de nodulation. Sa transcription se fait de manière constitutive, son produit est la protéine NodD influencés par les flavonoïdes (Geurts, 2002).

#### ➤ **Les gènes hsn (host specific nodulation)**

Sont des gènes spécifiques de la plante à infecter. Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobia. Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Torche, 2006 ; Pelmont, 1995).

### **6-2-1-2- Gènes *nif***

Les gènes *nif* existent chez plusieurs bactéries dont les rhizobia. Chez ces derniers, ces gènes codent pour la synthèse d'un complexe enzymatique catalysant la réduction de l'azote et connu sous le nom de nitrogénase ou dinitrogénase. Ils interviennent seulement après la formation du nodule (Grama, 2008 ; Hopkins, 2003).

### **6-2-1-3- Gènes *fix***

Les gènes *fix* sont des gènes additionnels, propres aux fixateurs symbiotiques et impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules lors de la fixation symbiotique azotée (Brewin et al., 1992).

Il existe d'autres gènes sont également nécessaires en particulier des gènes impliqués dans la synthèse des composants de la paroi bactérienne comme des exopolysaccharide (gènes *exo*, *exs*, *pss*) , lipopolysaccharides (gène *Ips*) (Brewin et al., 1992)

### **6-2-2- Génétique de la nodulation chez la plante**

Tout comme la bactérie, la plante émet des molécules essentielles à la réalisation de chaque étape du processus de nodulation et de fixation. Ainsi, au début du processus de nodulation, divers composés déterminant une chimiotaxie positive entre les deux symbiotes sont émis par la racine de la légumineuse, parmi lesquels des flavonoïdes (Fossou, 2001). Dans l'interaction rhizobium-légumineuse, les flavonoïdes constituent les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez la bactérie l'expression du gène de régulation de la nodulation *nod D* et induisent le mécanisme du chimiotactisme des rhizobia. La production de ces molécules est limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir de laquelle la plupart des nodules se développent plus tard (Broughton et al., 2000) .

Les légumineuses participent aussi à la synthèse d'un certain nombre de protéines essentielles au développement de nodules fonctionnels. La plus spectaculaire est une protéine (la globine) qui, associée à l'hème produit par les bactéroïdes, constitue la léghémoglobine, protéine fixatrice d'oxygène, et ce dispositif est indispensable à la fixation de l'azote (Pelmont, 1995).

### **6-2-3- Les étapes du processus de nodulation**

Le développement de la relation symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses est un processus fortement interactif qui inclue la communication moléculaire entre les organismes. (Torche, 2006)

#### **6-2-3-1- La pré-infection**

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En condition de carence en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), la bactérie et la plante mettent en place un système de « dialogue » basé sur un échange de molécules chimiques (Perry et al., 2004). Les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca et al., 2004). Ce signal, une fois perçu par le *Rhizobium*, induit l'expression de gènes nod codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipo chitino oligosaccharides ou LCO) (Dénarié, 2000).

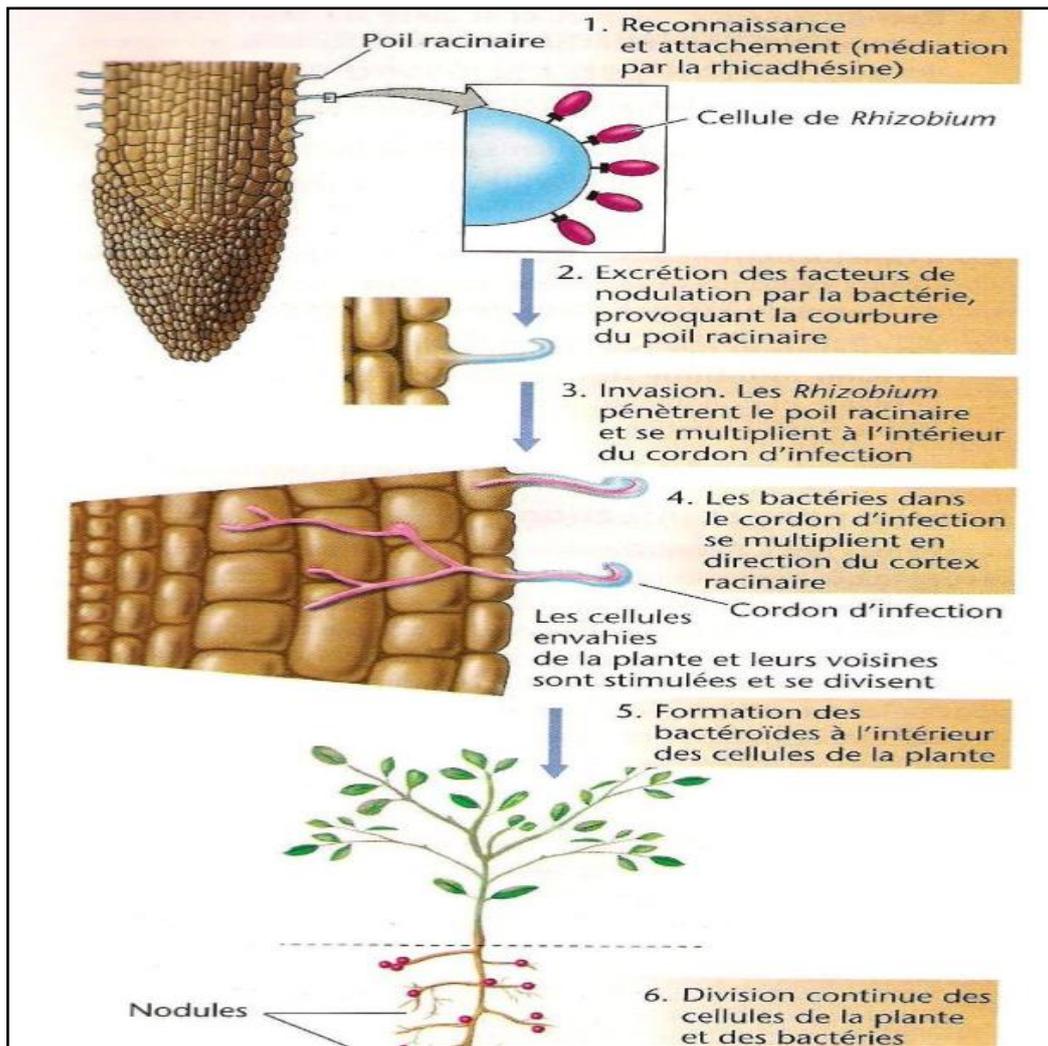
#### **6-2-3-2- Phase d'infection**

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire (Hopkins, 2003). Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisée à la surface des cellules de rhizobia, la rhicadhésine est une protéine qui lie le calcium. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (Perry et al., 2004). La bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemme (Hopkins, 2003).

#### **6-2-3-3- Développement du nodule et libération des bactéries**

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkins, 2003). La division bactérienne rapide entraîne la formation d'un nodule qui consiste en un relâchement des *Rhizobiums* à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (Perry et al., 2004)

Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).



**Figure 05** : Les étapes de la formation d'un nodule racinaire chez les légumineuses infectée par *Rhizobium* (Perry, 2004)

## 7- Symbiose plantes légumineuses - champignons

La symbiose mycorhizienne est un phénomène général chez la plupart des végétaux terrestres se trouvent de près de 90% des plantes. Elle est obligatoire pour les deux partenaires car sans elle, la plante et le champignon sont incapables d'extraire efficacement l'eau, les carbohydrates et les éléments minéraux. Pour cela, le champignon entre en interaction très étroite avec le végétal, en se développant simultanément à l'intérieur des racines de la plante hôte et dans le sol (Duhoux, 2004 ; Rajaonarimamy, 2010 ; Soualmia, 2010).

Les mycorhizes permettent aux plantes d'absorber plus de nutriments (particulièrement du phosphore) et d'eau contenus dans le sol grâce au réseau d'hyphes du champignon qui colonisent le sol. Ils augmentent aussi la tolérance aux différents stress

environnementaux. De plus, ces organismes jouent un rôle majeur dans le processus d'agrégation des particules du sol et stimulent l'activité microbienne améliorant par conséquent la circulation des gaz et de la rétention de l'eau (Bendaira, 2016 ; Laurence, 2014 ; Hopkins, 2003).

Selon l'espèce, les pratiques et les conditions de culture, la mycorhization procure des avantages aux végétaux et à l'environnement, ainsi, les plantes mycorhizées ont tendance à être moins affectées par les périodes de sécheresse. Les bienfaits apportés par les mycorhizes sur les plantes et leur environnement laissent entrevoir un apport positif pour l'agriculture (Laurence, 2014).

### 7-1- Le micro-symbiote mycorhizien

Le mot «mycorhize» est d'origine du grecque (mukès = champignons, rhiza = racines), ce sont des micro-organismes du groupe des champignons vivant en symbiose avec les racines des plantes supérieures comme les légumineuses. Pendant le stade de vie symbiotique, vivent à l'intérieur des racines en formant des structures bien différenciées et présentant des prolongements mycéliens extraordinaires qui se propagent dans le sol (Diem et *al.*, 1998 ; ).

Les mycorhizes prennent différentes formes, appelées ectomycorhizes, endomycorhizes ou ectendomycorhizes, selon les caractères anatomiques de l'association qui dépendent en fait directement des partenaires impliqués (Figure 08) (Peyronel et *al.*, 1969).

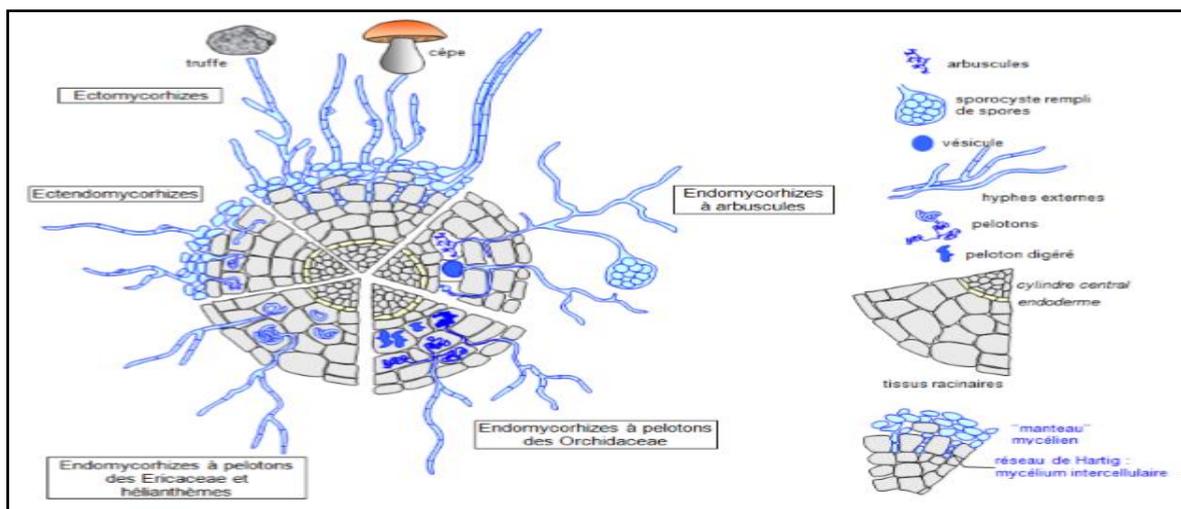


Figure 06 : Principaux types mycorhiziens représentés sur une coupe transversale de racine

modifié par F. Le Tacon,

### **7-1-1- Les ectomycorhizes**

Du grec ectos : extérieur, peuvent être visibles à l'œil nu ou à la loupe. Ils concernent qu'environ 5% des espèces et plus particulièrement les plantes ligneuses formant du bois, comme les arbres et arbustes (Valentin, 2015). Les ectomycorhizes revêtent les racines latérales à structure primaire d'un manteau fongique, le mycélium ne se développe pas dans les cellules de l'hôte, mais plutôt vers l'extérieur des cellules. Les hyphes en s'accolant les uns aux autres forment un manchon autour des radicelles et pénètrent aussi dans la racine, mais en se confinant aux espaces intercellulaires, formant dans le cortex un système complexe portant le nom de Hartig, nom de chercheur qui l'a observé et décrit le premier. A partir de cet ancrage, le mycélium peut alors se développer et envahir le sol adjacent (Fortin et al, 2008).

### **7-1-2- Les ectendomycorhizes**

Il arrive que les ectomycorhizes et les endomycorhizes soient présents en même temps sur une racine, on parle alors d'ectendomycorhizes (Hamza, 2014). Le champignon forme un manteau et un réseau de Hartig intercellulaire rappelant les structures développées par les champignons ectomycorhiziens, mais en plus les hyphes fongiques pénètrent à l'intérieur des cellules, qui ce sont les structures développées par les champignons endomycorhizes (Calonne, 2012).

### **7-1-3- Les endomycorhizes**

Du grec endon : à l'intérieur. Les champignons endomycorhiziens ne sont pas spécifiques et sont normalement associés aux plantes comme les plantes forestières agricoles et horticoles (Hamza, 2014). Les endomycorhizes sont caractérisés entre autre, par l'absence de manteau fongique autour de la racine et la présence d'hyphes intraracinaires, de vésicules et/ou d'arbuscules endocellulaires qui ne sont pas visibles qu'après coloration. Les endomycorhizes sont très peu spécifiques et ne modifient pas la structure de la racine (Soualmia, 2010). Il existe trois types d'endomycorhizes, Les endomycorhizes arbutoides des Ericacées, les endomycorhizes orchidoides des Orchidées et les endomycorhizes à arbuscules (Hamza, 2010).

Les champignons mycorhiziens à arbuscules constituent le type de symbiose le plus répandu et le plus ancien. Ils peuvent former des associations mutualistes avec les racines fines d'environ 80 % de toutes les plantes terrestres (Smith et Read, 1997 ; Valentin, 2015).

Le terme arbuscule réfère à une structure microscopique unique que développent ces champignons dans les cellules corticales des racines. Chez ce type de mycorhize, le champignon ne cherche pas à envelopper les cellules de l'hôte, comme chez les ectomycorhizes, mais y pénètre de façon subtile sans trop en perturber les structures. A partir de ce point d'ancrage dans la racine, le champignon mycorhizien à arbuscule développe dans le sol une phase dite extra radiculaire, qui s'étend en un réseau mycélien et envahit le sol adjacent, dans toutes les directions. Ce mycélium de très fine dimension offre une surface considérable de contact avec le sol (Fortin et al, 2008). Les mycorhizes à arbuscule ont les structures suivantes :

➤ **Arbuscule**

L'arbuscule est l'unité au niveau de laquelle se produisent les échanges entre la plante hôte et le champignon. C'est une ramification latérale des hyphes fongiques dans les cellules du cortex racinaire où le champignon pénètre et croit à l'intérieur. La membrane de la cellule hôte s'invagine et enveloppe le champignon, ce nouveau compartiment fournit un contact direct entre le champignon et la plante (Hamza, 2014)

➤ **Spore**

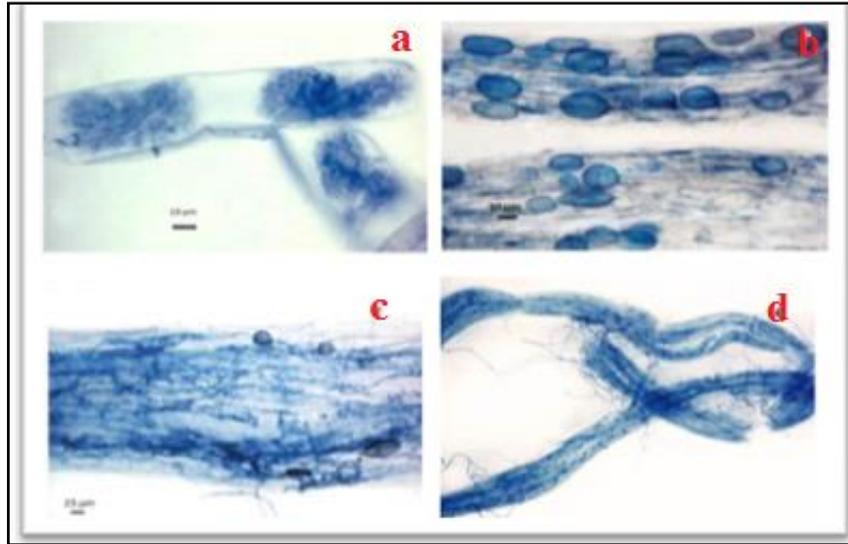
La spore sert d'organe de stockage et de propagation des CMA. Elle germe et donne naissance à des filaments mycéliens (Diane, 2016).

➤ **Vésicule**

La vésicule est une structure de stockage à paroi fine, à contenu lipidique et apparait généralement dans les espaces intercellulaires (Limam, 2016).

➤ **Hyphes**

Filaments cellulaires constituant le mycélium des champignons supérieurs et il peut coloniser une plante autre que la plante dont ils sont issus (Diane,2016 ; Limam,2016) .



**Figure 07 :** Structure caractéristiques des champignons mycorhiziens arbusculaires  
(a) Arbuscules intercellulaires (b) vésicules intraradiculaires (c) Hyphes intraradiculaires (d) hyphes extraradiculaires (Hamza, 2014).

## 7-2-Les molécules signal dans l'établissement de la symbiose

Un dialogue moléculaire entre les champignons mycorhiziens et leurs plantes hôtes est nécessaire pour permettre la reconnaissance mutuelle entre les deux partenaires. Ce dialogue est réalisé par la participation de la plante hôte par la sécrétion des strigolactones dans ses exsudats racinaires et le champignon mycorhizien par la production des molécules diffusibles perçues par la plante dites facteurs Myc (Guinberteau *et al.* 1997).

Les strigolactones sont des molécules organiques qui sont présentes dans les exsudats racinaires et sont responsables de la réponse du champignon. Ces molécules naturelles agissent sur le champignon à très faible concentration, et il a été montré qu'elles induisent une prolifération cellulaire chez le champignon mycorhizien indiquant une modification claire de l'état physiologique du champignon mycorhizien (Bendaira, 2016).

Les facteurs Myc appartiennent à la même famille chimique que les facteurs Nod, ce sont des lipochitoooligosaccharides. Ils distinguent comme des signaux symbiotiques qui permettent une stimulation de la formation des mycorhizes, aussi bien chez les légumineuses. Ces facteurs sont également des régulateurs de croissance qui peuvent induire un accroissement important du système racinaire (Pascale, 2014).

Les premiers signaux d'appel, sont des exsudats comprenant des composés volatiles organiques et plus particulièrement des composés de type flavonoïdes, et des attractants chimiques qui permettent la germination des hyphes des champignons mycorhiziens (Elmalyani *et al.*, 2013). Les flavonoïdes sont présents à de fortes concentrations dans les racines et les exsudats de plantes poussant sous de faibles concentrations en phosphate et,

pour des concentrations micromolaires, ont la capacité de faire croître le Champignon mycorhizienne *in vitro*. De plus, les flavonoïdes peuvent stimuler la mycorhization, et il a été observé des modifications dans la composition des flavonoïdes dans les racines mycorhizées (Walker, 2010).

### **7-3- Les différents stades de la mycorhization**

#### **7-3-1- La phase a-symbiotique**

Durant laquelle la spore, même en l'absence d'une plante hôte, germe spontanément en formant de courts hyphes exploratoires et produit un ou plusieurs tubes germinatifs. La croissance du champignon mycorhizein arbusculaire très limitée, en absence de plante hôte ne dure que quelques jours et ne consomme que très peu des réserves carbonées de la spore. Selon les espèces, le cytoplasme des hyphes germinatifs peut se rétracter dans la spore ou servir à former de nouvelles spores. Dans tous les cas, le CMA maintient son potentiel de germination. Si une racine hôte est présente, les phases pré-symbiotique puis symbiotique se mettent en place ( Marine, 2015 ; Balzergue, 2013) .

#### **7-3-2- La phase pré-symbiotique**

Commence lorsque le partenaire fongique a perçu la présence de son hôte et active son métabolisme et sa croissance. C'est une phase où sont échangés, avant tout contact physique, des signaux d'origines végétale et fongique (Delaux, 2011). La perception des exsudats des plantes hôtes, parmi lesquels les strigolactones qui permet l'induction de la ramification des hyphes ainsi augmentant la probabilité d'un contact direct entre les deux symbiotes. Parallèlement, le Champignons mycorhizien arbusculaire sécrète des signaux symbiotiques diffusibles, appelés facteurs Myc qui stimulent la croissance des racines et leur ramification. Un dialogue s'installe entre les partenaires ce qui modifie leur métabolisme et leur expression génique. Cela peut conduire à la mise en place d'une réponse morphologique adaptée pour favoriser l'interaction, telle que la ramification des hyphes, et la formation de racines latérales (Marine, 2015).

#### **7-3-3- La phase symbiotique**

Après le contact avec le partenaire végétal et afin de pénétrer dans la racine, le champignon forme un hyphopode à la surface de celle-ci, Ce dernier représente le point d'accroche du champignon à la racine et son futur point de pénétration. La formation de hyphopode peut être négativement contrôlée par la plante en présence de forte teneur en phosphate. Si au contraire les conditions sont favorables, la plante répond positivement en développant dans la cellule de l'épiderme racinaire un appareil de pré-pénétration (PPA)

(Delaux, 2011). Ce PPA permet la formation d'un pont apoplasmique endocellulaire à travers lequel le champignon va se développer pour traverser les différentes couches cellulaires jusqu'aux cellules corticales (Delaux, 2011). Le champignon pénètre dans les cellules corticales sans en traverser la membrane plasmique et forme des structures hyper-ramifiées appelées arbuscules. Les arbuscules sont entourés d'une membrane plasmique peri-arbusculaire séparant le champignon du cytoplasme végétal. C'est au niveau des arbuscules qu'ont lieu les échanges carbone phosphate azote entre le champignon et la plante grâce à des transporteurs spécifiques (Balzergue, 2013).

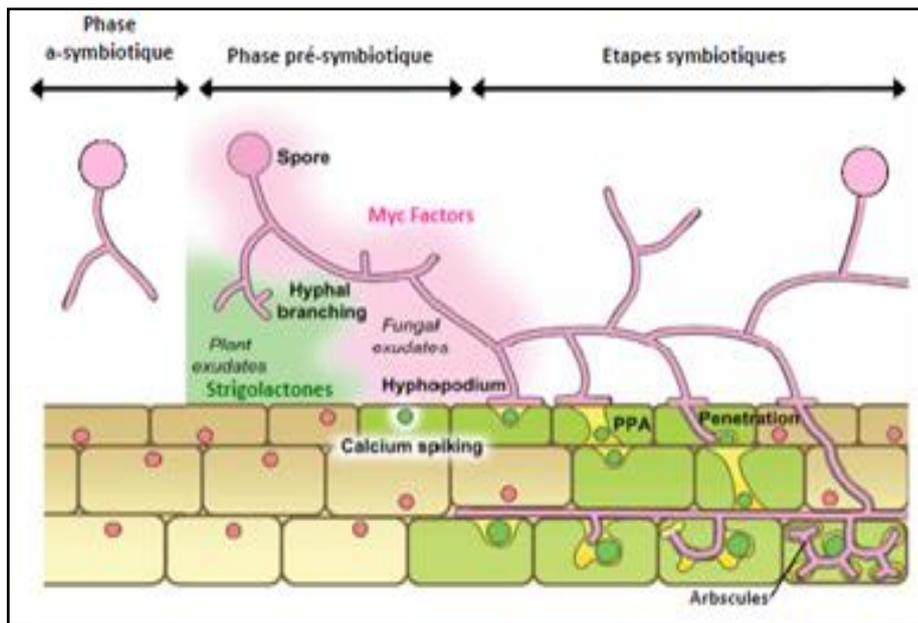


Figure 08 : Les étapes de colonisation d'un champignon mycorhizien. (Balzergue, 2012).

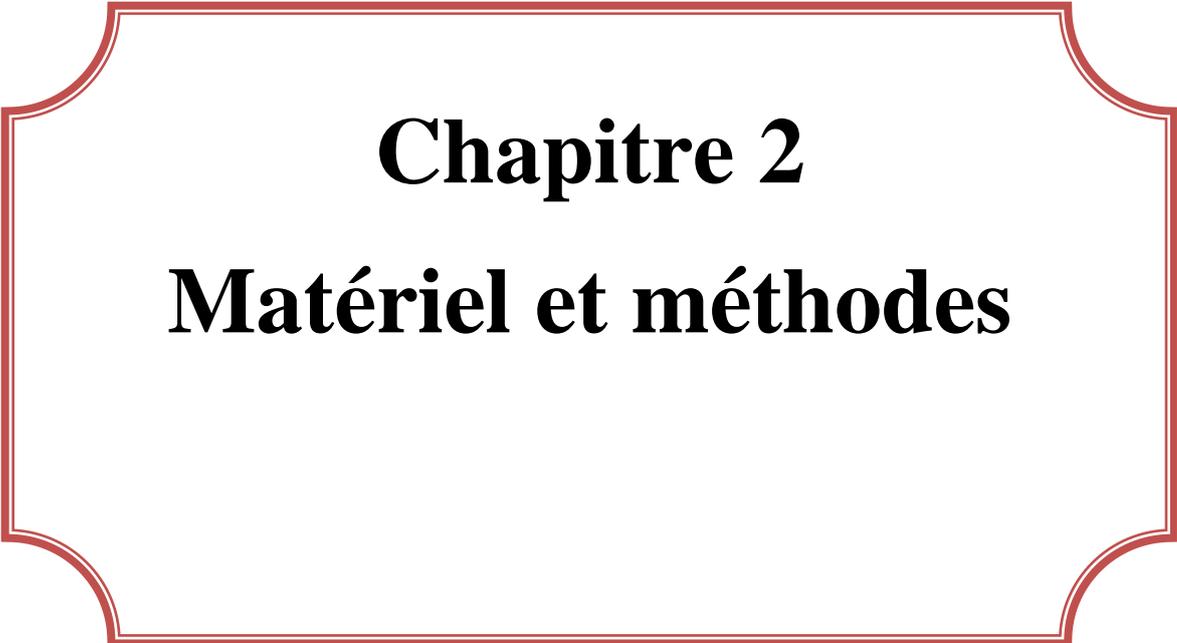
## 8- La symbiose tripartite (Plante, *Rhizobium*, Mycorhize)

Depuis des millions d'années, les deux types de symbiose mycorhizienne et bactérienne jouent un rôle considérable dans le fonctionnement des écosystèmes naturels et dans la nutrition phosphatée et azotée des plantes. De plus, ceux-ci ont été étudiés depuis plusieurs années, mais ces dernières années, des chercheurs ont découvert qu'il existait une relation entre trois types de partenaires différents : la plante, la bactérie et le champignon (Cluett et Boucher, 1983 ; Xie et al., 1995) .

En 1993, Ianson et Linderman ont découvert que les Fabacées établissaient des associations intimes avec les *Rhizobium*s et les Mycorhizes. Cette association est une véritable symbiose mutualiste tripartite (El-Hassanin et Lynd, 1985).

Les chercheurs ont découvert que la symbiose mycorhizienne assure l'apport de phosphore nécessaire au fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote et l'augmentation de l'absorption du phosphore par le champignon mycorhizien améliore également le fonctionnement de la nitrogénase, enzyme active dans la nodulation, permettant ainsi une fixation d'azote plus importante. La carence de phosphore dans les sols constitue le principal facteur limitant l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote (Badji *et al.*, 1988 ; Smith et Read, 1997). Vidal-Dominguez *et al.*, 1994 ont mis en évidence la présence d'hyphes et de spores de champignons endomycorhiziens dans des nodules de légumineuses. En contre partie, l'amélioration de la fixation d'azote permettrait un meilleur développement du champignon via une meilleure croissance racinaire (Smith et Read, 1997).

En général, cette association est très bénéfique pour les plantes : croissance meilleure pour celles-ci, augmentation des rendements, meilleur contrôle des maladies, facilite la nutrition azotée et phosphatée et une plus grande résistance à la sécheresse.

A decorative border in a dark red color, consisting of two parallel lines. The corners of the border are rounded and feature a slight inward curve, creating a frame for the text.

# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**



## **2-1-Détermination de l'humidité relative**

L'humidité d'un sol est la quantité d'eau contenue dans un sol. La méthode de mesure de l'humidité relative consiste à sécher l'échantillon de sol à l'étuve à 105°C jusqu'à atteindre un poids constant. La différence du poids avant séchage et après séchage correspond à la quantité d'eau (Limam, 2015). L'humidité relative du sol est ainsi calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Humidité du sol} = (\text{masse humide} - \text{masse sèche}) / \text{masse sèche} \times 100.$$

Pour les autres analyses, nous avons préparé des solutions d'extrait de sol 1/5 (poids/volume). Les mesures sont faites à l'aide d'un multiparamètre HI9829.

## **2-2-Potentiel d'Hydrogène « pH »**

Indice permettant de mesurer l'activité de l'ion hydrogène dans une solution. C'est un indicateur de l'acidité (pH inférieur à 7) ou de l'alcalinité (pH supérieur à 7) d'une solution [6].

## **2-3- Le potentiel d'oxydo-réduction**

Est une grandeur thermodynamique qui mesure le pouvoir oxydant ou réducteur d'un système redox. Plus un système est oxydant, c'est-à-dire plus il est apte à se réduire en captant des électrons, et plus son potentiel d'oxydoréduction est élevé, plus il est réducteur et a tendance à céder des électrons, et plus son potentiel redox est bas. Il se mesure en millivolts (mV) [7].

## **2-4- Conductivité électrique « CE »**

La conductivité est la mesure de la capacité d'une eau à conduire un courant électrique. La conductivité varie en fonction de la température. Elle est en fonction de la concentration de sels dissous dans la solution du sol [8].

## **2-5- L'oxygène dissout**

L'oxygène dissout est en fait la quantité d'oxygène présent en solution dans l'eau à une température donnée. On peut mesurer l'oxygène dissout en pourcentage et en mg/l [9].

## **2-6- La salinité**

Découle de la présence des solutés minéraux majeurs dissouts dans les sols. C'est la mesure de la totalité des sels dissouts [10].

## **3- Etude du microsymbiote bactériens des plantes légumineuses *Mellilotus* et *Coronilla***

### **3-1- Collecte des nodules**

La collecte des nodules est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) .:

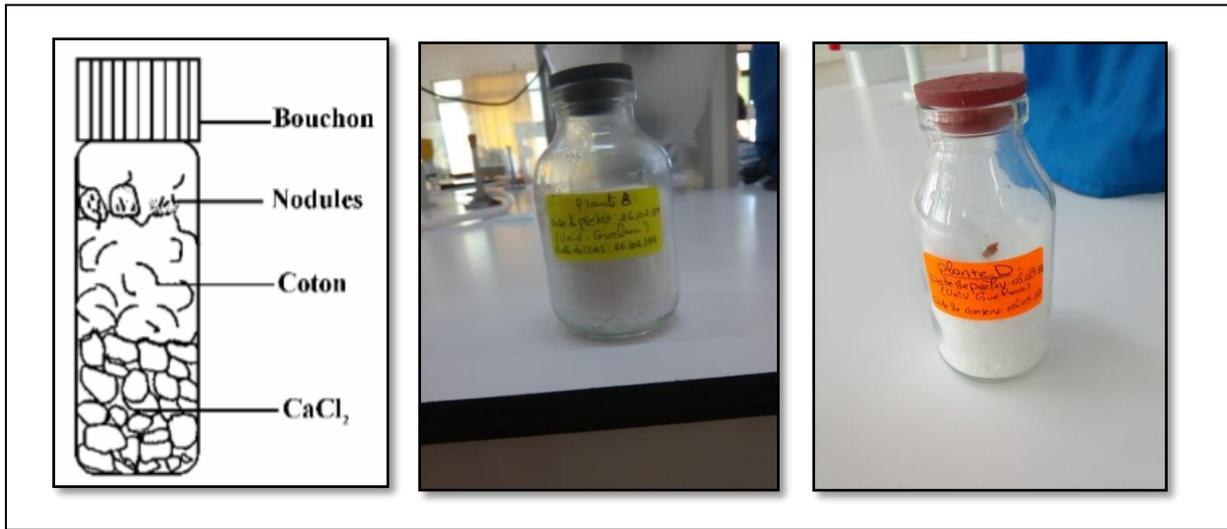
- Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire.
- Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les racines secondaires où beaucoup de nodules sont souvent trouvés.
- Placer délicatement toute la plante dans un sachet en plastique.
- Au laboratoire, enlever la partie supérieure de la plante et laver délicatement les racines sous l'eau courante.
- Pour des raisons de stockage et d'isolement, les racines doivent être coupées 1 à 2 mm du site d'attache de nodules ce qui maintient les nodules intacts et améliore les chances d'obtenir des cultures viables et propres de bactéries.
- A la fin, sécher les nodules avec du papier filtre avant le stockage.

### **3-2- Conservation des nodules**

Pour usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C pour une durée qui ne dépasse pas les 48 heures après leur séparation des racines de la plante. Alors que pour une longue durée de conservation la dessiccation des nodules est recommandée. Elle est réalisée dans des flacons en verre contenant un déshydratant tel que CaCl<sub>2</sub> (Figure 10). Le flacon en verre est rempli au quart de son volume par du CaCl<sub>2</sub> et

par une couche de coton sur laquelle sont déposés les nodules et fermé avec un bouchon. Ainsi les nodules peuvent être conservés de 6 à 12 mois. Chaque flacon est identifié et portera :

- nom de la plante hôte,
- date de conservation,
- date et lieu de prélèvement.



**Figure 10** : Conservation des nodules des plantes B et D sous CaCl<sub>2</sub> (Vincent, 1970)

### **3-3- Isolement des bactéries à partir des nodules**

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

Les nodules fraîchement lavés sont détachés de la racine à l'aide d'une pince et utilisés directement. Alors que ceux qui sont conservés par dessiccation sont réhydratés durant une nuit au réfrigérateur à 4C° dans de l'eau distillée, puis laissés pendant une heure à température ambiante.

#### **3-3-1- Stérilisation des nodules**

La stérilisation des nodules s'effectue selon les étapes suivantes :

Les nodules sont immergés dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes. Puis transférés rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0.1% (1g Hg Cl<sub>2</sub> + 5 ml HCl + 11 d'eau distillée) pendant 3 minutes. Enfin rincés abondamment à l'eau distillée stérile (10 fois), et laissés pendant 1 heure dans l'eau distillée après le dernier rinçage.

### 3-3-2- Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

L'isolement a été réalisé selon la méthode de Vincent (1970) dans des conditions d'asepsie totale.

Les nodules stériles sont déposés séparément dans une boîte de pétri stérile, chacun est immergé par 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile. A l'aide d'une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen, les nodules sont écrasés jusqu'à obtention du jus nodulaire. Une suspension de chaque nodule écrasé est étalée selon la méthode des quatre quadrants (figure 11) sur les milieux de culture YMA+ rouge Congo, GPA+ Bromocrésol pourpre de manière à isoler des simples colonies (Annexe 01). Les boites sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

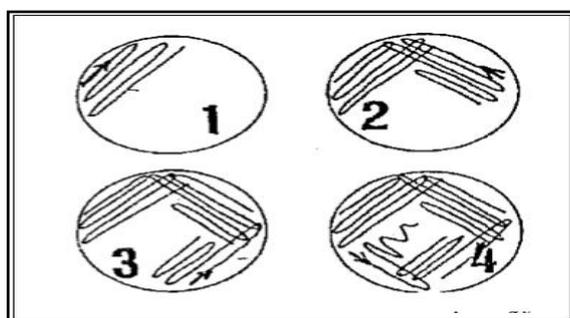


Figure 11: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

Après avoir purifié les isolats nous avons choisie des souches pour l'étude d'identification et de la caractérisation. Cette dernière est faite en présence des souches de référence de rhizobia.

Tableau 03 : isolats et souches de référence utilisée pour cette étude

Souches	Nom	Plante- hôte	Origine géographique	Source
B1	Isolat	<i>Mellilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
B2	Isolat	<i>Mellilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
B3	Isolat	<i>Mellilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
B4	Isolat	<i>Mellilotus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
D1	Isolat	<i>Coronilla</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
D2	Isolat	<i>Coronilla</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
D3	Isolat	<i>Coronilla</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
SAM	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine, Algérie	S.dakkiche, Constantine
F	<i>R. sullae</i> RHF	<i>H. coronarium</i>	Pise, Italie	S. Casella- Pise
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp. nov. RHA6	<i>H. coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar-Constantine

### **3-4- Conservation des souches**

La conservation des souches a été réalisée sur le milieu YMA additionnée de 3 g/l de CaCO<sub>3</sub> comme agent neutralisant de l'acidité. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières et simples sont effectuées sur la surface d'une gélose inclinée. Après incubation à 30°C pendant 3 à 4 jours, les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

### **3-5- Caractères cultureux et morphologique**

L'étude morphologique est faite sur des milieux de culture solides et liquides (Annexe 02) :

Milieux liquides: YMB (yeast mannitol broth)

Milieux solides: YMA (yeast mannitol agar)

YMA+RC (yeast mannitol agar + rouge Congo)

YMA+BTB (yeast mannitol agar + bleu de bromothymol)

GPA+BCP (Glucose peptone agar + Bromocrésol pourpre).

Toutes les souches sontensemencées dans des tubes à essai contenant (9ml) du milieu YMB puis incubées 24 à 48h à 30°C. Et sur les milieux solides l'ensemencement se fait à partir d'une culture sur YMB selon la méthode des trois cadrans, puis incubation dans une étuve à 30°C pendant 24 heures.

### **3-6- Examen microscopique par la coloration de Gram**

La coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer en deux grands groupes : bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif. Cette coloration se fait à partir d'une culture fraîche en milieu YMB de chaque souche, la préparation d'un frottis est étalée en une couche mince sur une lame séchée et fixée par la chaleur du bec bunsen.

La coloration est faite selon les étapes suivantes :

- Recouvrir la lame par un colorant basique le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- Ajouter le lugol et laisser agir pendant 30 secondes.
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone.
- Laver avec l'eau distillée.
- Recolorer avec de la fuschine et laisser agir durant 1 minute.
- Laver avec l'eau distillée.
- Egoutter la lame sur du papier absorbant
- Observer à immersion.

### **3-7- Examen de la mobilité**

Cet examen est réalisé sur le milieu Mannitol-mobilité en ensemençant par pique centrale. Incuber pendant 24 à 48 heures à 30 °C.

### **3-8-Test du 3-cétolactose**

Ce test permet de distinguer le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium* .Il se base sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides (Torche, 2006).

Les souches sont cultivées à 28°C pendant 3 jours sur le milieu suivant :

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Carbonate de calcium	20g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Une anse de ce milieu est ensemencée sur milieu solide contenant :

Lactose	10g
Extrait de levure	1g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Les boîtes sont incubées 2 jours à 28°C.

Pour révéler les résultats il est nécessaire d'inonder les boîtes avec le réactif de Benedict à température ambiante.

**Réactif de Benedict :**

Citrate de sodium	173g
Carbonate de sodium anhydre	100g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	17.3g
Eau distillée	1000ml

La présence du 3-cétolactose se manifeste par la formation d'un halo jaune de Cu<sub>2</sub>O autour des colonies après environ 1 heure. Le diamètre du halo est 2-3cm, jaune comparativement avec le fond bleu du réactif de Benedict.

Seules les souches de *Agrobacterium* spp produisent l'enzyme 3-cétoglucosidase.

### **3-9- Caractérisation phénotypique des isolats**

#### **3-9-1-Tests nutritionnels**

Les tests nutritionnels regroupent l'aptitude des bactéries à assimiler une gamme des hydrates de carbone et différentes sources d'acides aminés.

### **3-9-1-1- Source de carbone**

Ce test est réalisé sur le milieu YMB où le Mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants :

Glucose, Xylose, Sorbitol, Fructose, Galactose, Lactose, Saccharose

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.

- Mesurer la DO à 600nm.

### **3-9-1-2- Source d'azote**

Pour ce test les souches sont cultivées sur le milieu Défini 8 (Vincent, 1970) (Annexe 01) où le glutamate de sodium est remplacé par l'un des acides aminés suivants :

Alanine, Valine, Leucine, Tyrosine, Proline, Lysine

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.

- Mesurer la DO à 600nm.

### **3-9-2-Activité uréasique**

Pour mettre en évidence l'uréase, les souches sont ensemencées sur le milieu urée indole, puis incubées à 30°C pendant 24 heures.

### **3-9-3-Tests physiologiques**

#### **3-9-3-1- Tolérance au NaCl**

Les souches sont ensemencées sur le milieu YMA avec différentes concentrations de NaCl: 1%, 3%, 5% et incubés à 28°C pendant 24 heures.

#### **3-9-3-2- Température de croissance**

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont cultivées sur YMA et incubées aux températures suivantes : 4°C, 22°C, 30°C, 37°C et 44°C. Les lectures sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

### **3-9-3-3- Effet de pH**

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide YMB aux différents pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9.

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

### **3-9-4- Résistances aux Antibiotiques**

Avec un écouvillon on prélève une suspension bactérienne réalisée sur le milieu YMB puis on ensemence ce prélèvement sur une boîte contenant de la gélose Muler-Hinton. Cet ensemencement se fait en tournant la boîte 3 fois de 60°. Après on dépose des disques antibiotiques à la surface de la gélose puis incuber à 28°C pendant 24-48 heures

Les antibiotiques utilisés : Amoxiciline, Penicilling G, Gentamicine et Cliprofioxacine

### **3-10- Extraction de l'ADN plasmidique des isolats**

Le protocole utilisé est celui décrit par Charaoui -Boukerzaza (2011) :

- Préparer de suspensions bactériennes : ensemencer 2ml dans le milieu YMB, incubé 24 h à 30°C.
- Centrifuger 1,5 ml de culture pendant 2 min à 9000 rpm à température ambiante.
- Jeter le surnageant, mettre le culot sur la glace.
- Resuspendre le culot dans 100 µl de **solution I** froide et vortexer (5mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris, pH8.0).
- Ajouter 200 µl de la **solution II** fraîchement préparée (0,2 N NaOH, 1% SDS).
- Mélanger délicatement en inversant doucement les tubes 2 à 3 fois.
- Laisser les tubes 3 min avant d'ajouter 150 µl de la **solution III** froide (3 M acetate de sodium. pH 4.8).
- Mélanger délicatement en inversant doucement les tubes 2 à 3 fois (un caillot blanc d'ADN/ protéine/ SDS doit être formé).
- Incuber les tubes sur la glace 20 min.
- Centrifuger 10 min à 9000 rpm à température ambiante.
- Transférer délicatement le surnageant (~400 µl) dans un tube propre.

- Ajouter 1 ml d’Ethanol 95%, vortexer.
- Centrifuger 10 min à 9000 rpm à température ambiante.
- Eliminer le surnageant rapidement en retournant le tube (Un culot est généralement visible à cette étape).
- Laver le culot avec 500 µl d’Ethanol 80%.
- Centrifuger 10 min à 9000 rpm à température ambiante.
- Eliminer le surnageant rapidement en retournant le tube.
- Sécher le culot à l’air libre pendant 5 à 10 min.
- Ajouter 100 µl de TE (l’eau physiologique).
- Conserver au frigo jusqu’au moment d’utilisation

### **3-11- Electrophorèse d’ADN plasmidique sur gel d’agarose**

Nous avons utilisé des mini-cuves d’électrophorèse :

- Mettre 1 g d’agarose, dans un Erlen Meyer de 250 ml, ajouter 100 ml de tampon TBE 1X.
- Faire fondre le mélange sur une plaque chauffante en arrêtant de temps en temps pour agiter. Le mélange doit être parfaitement transparent, sans particules d’agarose.
- Refroidir, ajouter 10 µl de la solution de bromure d’éthidium (BET) 10 mg/ ml.
- Homogénéiser.
- Couler le gel sans faire de bulles.
- Placer le peigne (veiller à ce que la base des dents soit à 1 mm du fond du plateau), laisser polymériser.
- Enlever le peigne.
- Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.
- Placer le plateau avec le gel dans la cuve d’électrophorèse, ensuite remplir la cuve de tampon TBE 1X de façon à ce que le gel soit immergé sous environ 1 mm de tampon.
- Dans un tube Eppendorff, mélanger 20 µl de la solution d’ADN et 4 µl du bleu de bromophenol .
- Remplir les puits Avec 12 µl d’échantillon ( ADN plasmidique+bleu de bromophénol) en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la micropipette.

- Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension.
- Laisser migrer, 1h à 90 V (la durée de migration est éminemment variable selon que l'on désire séparer de grands ou petits fragments).
- Récupérer le gel délicatement, le mettre sur la table UV, prendre une photo au polaroid.

## **4-Etude du microsymbiote mycorhiziens des plantes légumineuses *Mellilotus* et *Coronilla***

### **4-1-La collecte des racines**

Les prélèvements sont réalisés sur une profondeur de 10 à 20 cm à proximité de la plante étudiée.

Les blocs de terre prélevés sont placés dans des sachets en plastique fermés très serrés. Si les échantillons ne sont pas observés dans les 24 heures, ils doivent être conservés au réfrigérateur à 4°C.

### **4-2-Coloration des racines**

Les endomycorhizes ne sont observables qu'au microscope, mais il faut au préalable leur faire subir une série de traitements décrite par Philips et Hayman (1970) pour qu'elles soient visibles

- Mettre le bloc de la terre dans de l'eau afin de séparer les racines de la terre.
- Dans une grande boîte de Pétri sélectionner les racines fines et les découper.
- Préparer une solution de KOH 10%.
- Mettre la solution de KOH dans un récipient et mélanger ensuite les racines dans cette solution.
- Chauffer le tout dans un bain Marie à 85°C (pas une forte chaleur) jusqu'à qu'il aura un changement de couleur de la solution KOH qui devient marron (30 min).
- Répéter l'opération 2 à 3 fois jusqu'à l'obtention des racines blanches contenant à l'intérieur des champignons.
- Laver les racines avec de l'eau distillée ou bien l'eau acidifiée (1% acide acétique).

**4-2-1- Coloration au bleu de Methylène**

- Dans des flacons mettre les racines avec 2 ml de bleu de méthylène et porter au bain Marie (95C°) pendant 15 minutes.
- Laver à l'éthanol 70% puis à l'eau acidifiée (1% acide acétique).
- Monter les échantillons entre lame et lamelle dans une goutte d'eau Lactoglycérol et (Lactoglycérol = 1 volume d'acide lactique 100% 1 volume glycérol + volume d'eau distillé)
- Observer aux grossissements  $\times 10$ ,  $\times 40$ .

**4-2-2- Coloration à l'encre noire**

- Dans un pilulier, recouvrir les racines avec de la solution d'encre noire d à 8% dans d'acide acétique.
- Le placer 15 minutes à l'étuve à 90°C.
- Bien rincer à l'eau déminéralisée additionnée de quelques gouttes de vinaigre blanc. Prévoir au moins 5 rinçages, les 2 premiers rapides pendant 1 ou 2 minutes et les 3 derniers environ 5 minutes pour éliminer l'excès de coloration.
- Monter les échantillons entre lame et lamelle dans une goutte d'eau ou de Lactoglycérol et observer au microscope optique aux grossissements  $\times 10$ ,  $\times 40$ .

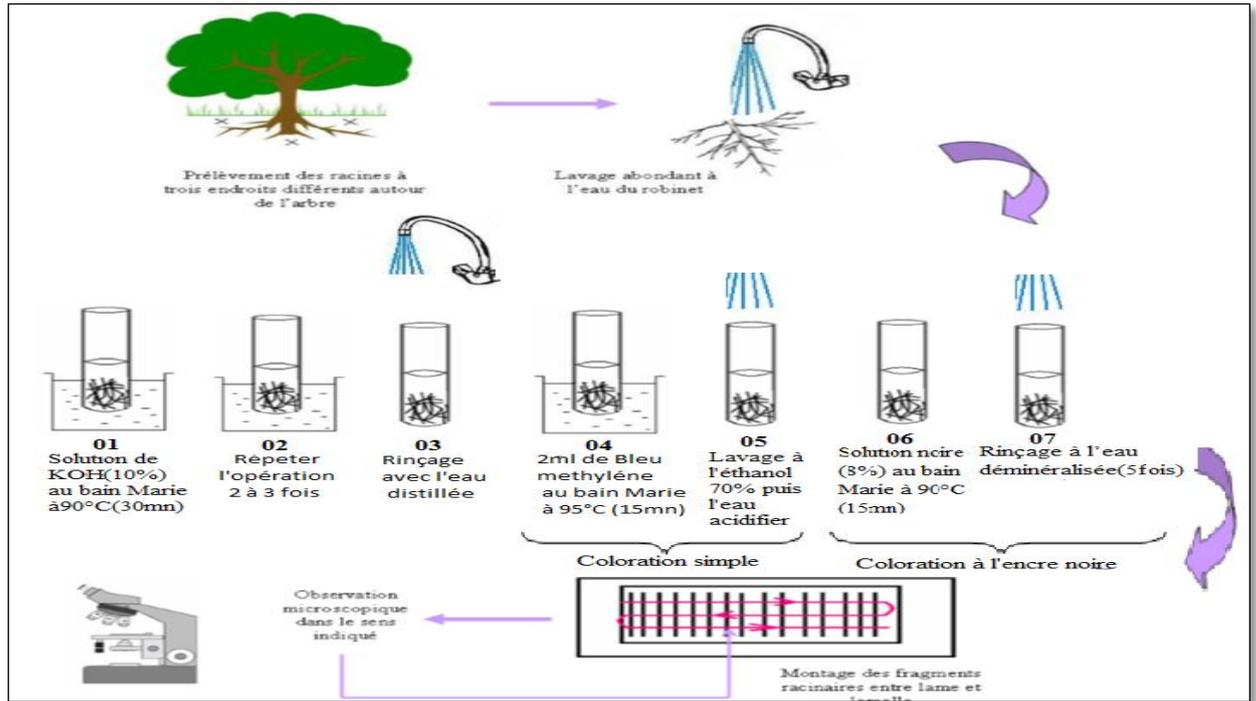


Figure 12 : Schéma récapitulatif des différentes étapes à suivre pour la coloration et l'observation des racines endomycorhizées (Soualmia, 2010 modifié)

### 4-3- Estimation de la mycorhization

Afin d'estimer la colonisation par les mycorhizes arbusculaires nous avons utilisé la méthode de Trouvelot et *al.* (1986).

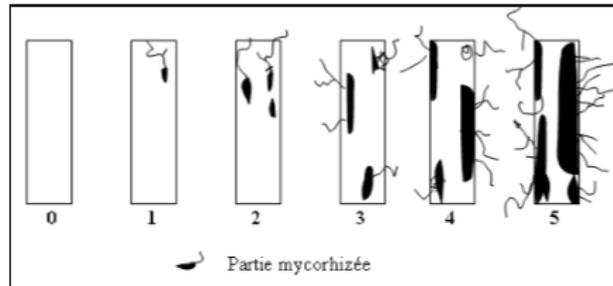
Après avoir coloré les racines, nous les avons découpées en fragments de 1 cm environ, puis nous les avons montées parallèlement les uns aux autres entre lame et lamelle dans du glycérol. Nous avons pris trente fragments racinaires pour chaque plante que nous avons ensuite distribué sur cinq lames (6 fragments par lame). Les lames sont ensuite observées au microscope (grossissement 10, 20, 40) chaque racine étant soigneusement vérifiée sur toute sa longueur. L'estimation de la colonisation endomycorhizienne est exprimée dans un tableau d'évaluation (annexe 06).

#### 4-3-1- Observation de la densité de colonisation par le champignon

Après l'observation au microscope, attribuer à chaque fragment une note de classe comprise entre 0 et 5 selon l'estimation de la proportion de racine colonisée par les mycorhizes arbusculaires (Figure 13).

**Tableau 04** : Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire

Classes	Pourcentage des classes
0	Absence d'infection
1	Moins de 1% de la surface est colonisée
2	Moins de 10% de la surface est colonisé
3	Entre 10 et 50% de la surface est colonisée
4	Entre 50 et 90% de la surface est colonisée
5	Plus de 90% de la surface est colonisée



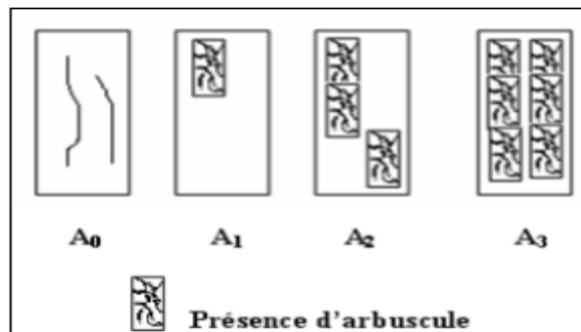
**Figure 13** : Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire (Soualmia, 2010)

#### 4-3-2-Observation de la qualité arbusculaire

La présence des arbuscules est notée simultanément en indiquant leur classe de fréquence de A0 à A3 (Figure 14).

**Tableau 05** : Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules

Classes	Pourcentage des classes
A0	Absence d'arbuscule
A1	Peu d'arbuscules 10%
A2	Arbuscules fréquents 50%
A3	Arbuscules abondants 100%



**Figure 14** : Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules ( Soualmia, 2010)

#### **4-3-2- Paramètres de mycorhization**

Trois paramètres liés à la mycorhization peuvent être mesurés : La fréquence de mycorhization (F), l'intensité de mycorhization (M) et la teneur en arbuscule (A).

Nous avons toute fois, fait appel à un programme informatique appelé « mycocalc » [11] pour calculer les paramètres suivant :

##### **(F) fréquence de mycorhization :**

$$F\% = (n/N) \times 100$$

**n** : nombre de fragments observés

**N** : nombre de fragments mycorhizés

##### **(M) intensité de mycorhization :**

$$\text{Globale : } M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1)/N$$

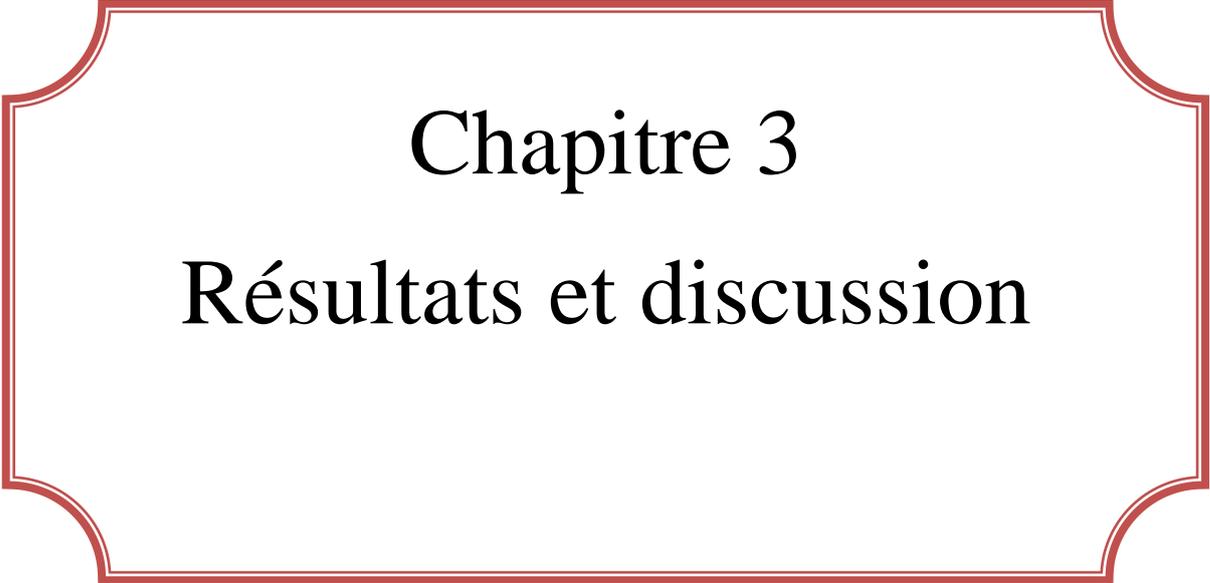
$$\text{Fragments mycorhizés : } m\% = M \times N/n = M \times 100/F$$

$n_1, n_2, n_3, n_4, n_5$  sont les nombres de fragments notés de 1 à 5 respectivement.

##### **(A) intensité arbusculaire :**

$$\text{Partie mycorhizée } A\% = (100m_{A3} + 50 m_{A2} + 10 m_{A1})/100$$

$m_{A3}, m_{A2}$  et  $m_{A1}$  représentent le % de mycorhization de qualité arbusculaire donnée respectivement pour chaque classe A1, A2 et A3 selon :  $m_A = ((95n_{5A} + 70 n_{4A} + 30 n_{3A} + 5n_{2A} + n_{1A1})/N) \times 100/m$ .



# Chapitre 3

## Résultats et discussion

## 1- Analyses physico-chimiques du sol

### 1-1-Détermination de l'humidité relative

L'expérience a déroulé 20 fois, la durée de chaque étape est de 15 minutes (Annexe 01) . La différence du poids avant séchage (*Coronilla* = 141,12g et *Mellilotus* = 135,21g) et après séchage (*Coronilla* = 136,74g et *Mellilotus* = 132,23g) correspond à la quantité d'eau.

Toutefois, il faut signaler que le taux d'humidité est relativement plus élevé dans le sol de *Coronilla* par rapport au sol de *Mellilotus*.



Figure 15: Le poids initial et constant de *Coronilla* et *Mellilotus*

En utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ Humidité du sol} = (\text{masse humide} - \text{masse sèche}) / \text{masse sèche} \times 100$$

On a trouvé que l'humidité relative du sol de la plante *Mellilotus* est de 2,26 % et 4,38% et pour la plante *Coronilla*.

### 1 2- Les autres paramètres du sol

Les résultats obtenus quant aux paramètres physicochimiques des échantillons des deux sols des plantes étudiées sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 06 : Résultats obtenus pour les paramètres physico-chimiques du sol

Paramètre \ Plante	<i>Mellilotus</i>	<i>Coronilla</i>
pH	8,15	8,16
Potentiel oxydo-réduction (ORP)	125,0 ORP	126,7 ORP
Oxygène dissout par mg/l	0,61 ppmDO	0,63 ppmDO
Conductivité $\mu\text{S}/\text{cm}$	402 $\mu\text{S}/\text{cm}$	428 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Salinité PSU	0,21 PSU	0,23 PSU

D'après le tableau on peut dire que le sol de la région d'étude ayant des propriétés physico-chimiques avec des valeurs proches, et un pH alcalin, et relativement riche en matière organique.

En ce qui concerne le pH nous avons enregistré des valeurs proches (8,15/8,16) pour les deux sites. Donc, les sols sont généralement alcalins.

Selon Bordeleau et Prévost, 1994 la majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficace dans le sol, et le pH du sol a une grande influence sur la survie et la multiplication des rhizobies (Benselma, 2015).

## **2- Etude du microsymbiote bactériens des plantes légumineuses *Mellilotus* et *Coronilla***

### **2-1- Caractères culturels et morphologique**

Le milieu YMB utilisé comme support de repiquage d'un milieu à un autre, c'est un bouillon qui permet d'enrichir les souches sélectionnées et suspectées d'être *Rhizobium*.

Une foisensemencé et après 24h d'incubation à 30°C, il se caractérise par l'apparition d'un trouble ce qui a été observée au niveau de tous nos isolats y compris les souches de références (figure 16).

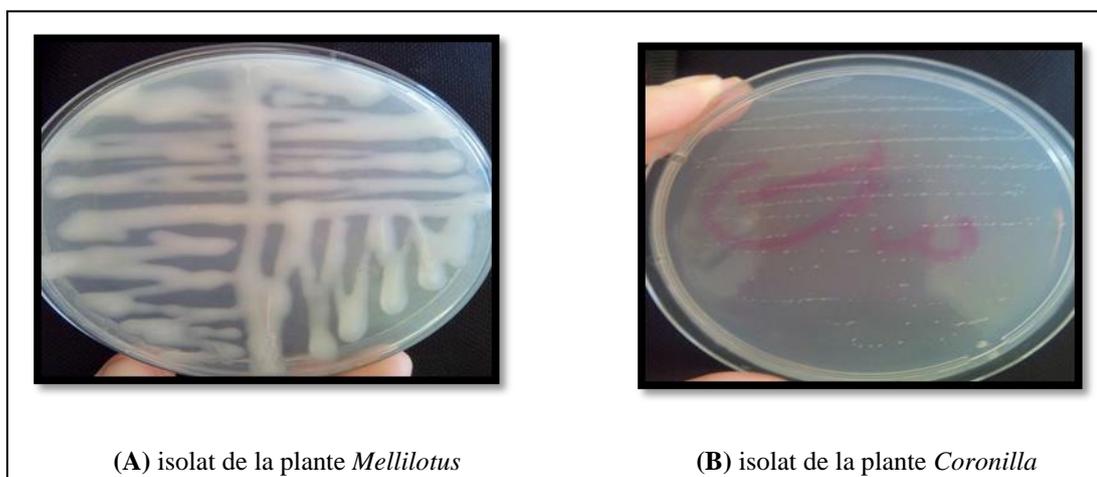


**Figure 16 :** Aspect des colonies sur le milieu YMB

La plupart des isolats des *Mellilotus* et *Coronilla* ont bien poussés sur le milieu YMA au bout de 24h à 48h.

Les souches isolées et les souches de référence apparaissent avec une surface lisse et brillante, texture translucide ou opaque, de couleur blanchâtre ou crème. Il y a cependant une différence entre les souches des deux plantes : les souches de la plante *Mellilotus* sont plus visqueuses par rapport aux les souches isolées de la *Coronilla*. (Figure 17).

Cette description est valable pour la grande majorité des colonies, et ceci correspond à la description des rhizobia (Jordan, 1984).



**Figure 17** : Aspect des colonies sur le milieu YMA pour les deux plantes

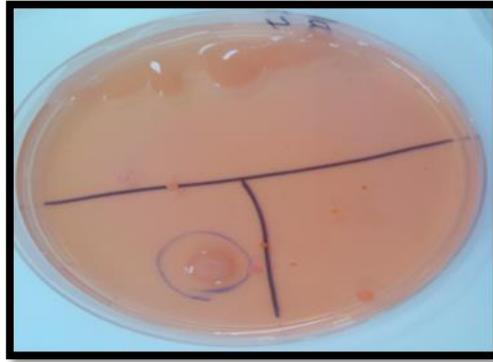
Au bout de 72 heures d'incubation à 30°C, les colonies sont bien poussées sur le milieu YMA-RC, la majorité des isolats ainsi les souches de référence absorbent faiblement le rouge Congo avec couleur orangé et rose (Figure 18).

En général, Les souches isolées à partir des nodules absorbent très peu le colorant, ceci est observé chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

Malgré que le rouge Congo soit souvent rajouté aux milieux de culture pour isoler les rhizobia ou pour tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être un agent sélectif pour distinguer les rhizobia des autres bactéries (Torche, 2006).

Kneen et La Rue (1983), ont déclaré que les souches de *R.meliloti* et *R.trifoli* sur YMA- rouge Congo apparaissent blanches, roses, oranges ou rouge. Ceci est valable pour

les souches Gammaproteobacteria (Benhizia, 2006) qui présentent une différence dans leur absorption du rouge Congo (Torche, 2006).



**Figure 18 :** Croissance sur YMA + RC

Sur le milieu YMA au bleu de bromothymol, après 24 heures d'incubation à 28°C, on n'observe aucune croissance des isolats et aucun virage de couleur par contre les souches de référence ont une croissance et un virage de couleur du milieu.

Alors qu'après 48 heures d'incubation 28°C, On observe l'apparition des colonies avec un virage de la couleur du milieu du vert vers le jaune verdâtre, indiquant une production d'acide, ce qui prouvent que les isolats ont une croissance rapide (Figure 19) (Annexe 03) .

Les colonies suspectées et retenues sont ensemencées sur milieu YMA au bleu de bromothymol, milieu permettant de distinguer les bactéries à croissance rapide (genre *Rhizobium*) et bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes qui changent la coloration verte du milieu YMA+BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984).

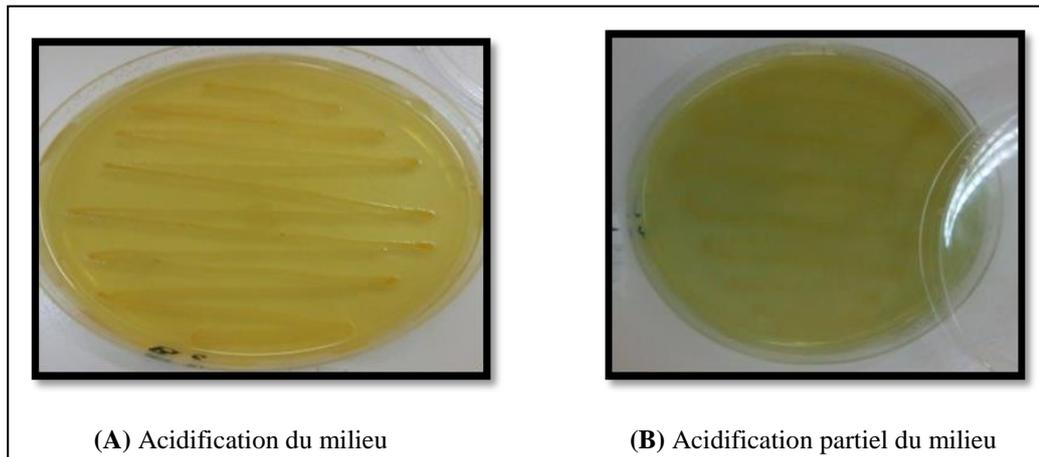


Figure 19: Croissance sur YMA + BTB

Le développement des isolats et les souches de références sur le milieu GPA au bromocrésol pourpre se fait avec acidification partiel du milieu ce qui se traduit par modification du pH avec un virage de couleur du milieu violet vers le jaune (Figure 20) et aussi avec alcalisation du milieu. En effet, ce milieu est utilisé pour le contrôle de la pureté des isolats (Somasegaran and Hoben, 1994).

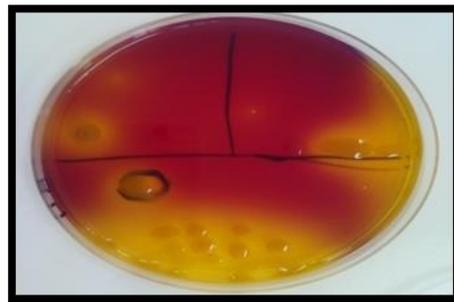


Figure 20 : Croissance sur GPA + BCP

## 2-2- Examen microscopique par la coloration de Gram

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, une coloration de Gram est réalisée. Cette coloration permet de visualiser les bactéries au microscope optique. L'observation microscopique de nos isolats a permis d'observer des bâtonnets de taille différente et des coccobacilles roses à Gram négatif, compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (Figure 21).

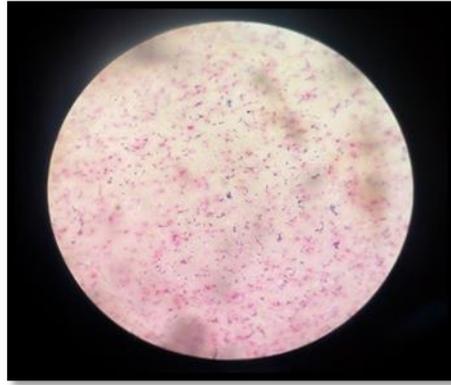


Figure 21 : Examen microscopique par la coloration de Gram (objectif x100)

### 2-3- Examen de la mobilité

Après 24 heures d'incubation sur le milieu mannitol-mobilité, il y a une mobilité des souches B2, B3 et D2 et il n'y a aucune fermentation par contre les souches de référence sont mobiles et fermentaires. Après 48 heures d'incubation, on observe l'envahissement de la gélose ce qui confirme que les souches sont mobiles avec une acidification de milieu à l'exception des souches B4, D1 qui n'ont pas acidifié le milieu (Annexe 04).

### 2-4- Test du 3-cétolactose

Après l'addition du réactif de Benedict, aucun halo n'est formé autour des colonies et ces dernières restent toujours blanchâtres, ce qui signifie que toutes les souches ne produisent pas la 3-cetoglucosidase et donc n'oxydent pas le C3 du glycosyl des saccharides.

Le même résultat est démontré par de Lajudie (2000) pour le genre *Allorhizobium* et le genre *Phylobacterium*.

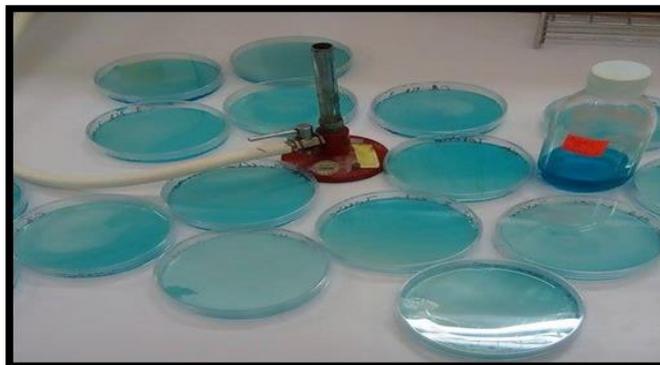


Figure 22 : Résultat de Test du 3-cétolactose

## 2-5- Caractérisation phénotypique des isolats

### 2-5-1- Tests nutritionnels

#### 2-5-1-1- Source de carbone

Les résultats obtenus montrent que les souches peuvent utiliser une grande variété de carbohydrates comme source de carbone mais avec une différence l'un par rapport à l'autre. Les mesures de la densité optique montrent que le mannitol, le glucose et le saccharose donnent un bon développement pour la plupart des souches, alors que les sucres les moins utilisés sont le fructose et surtout le xylose qui ne favorisent pas le développement de la plupart des souches. D'autre part on remarque que les souches de référence utilisent préférentiellement le sorbitol, galactose et le mannitol (Figure 23).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chabbi(2010) qui ont indiqué la capacité des isolats et des souches de référence à utiliser plusieurs substances carbonés comme source de carbone et n'exigent pas uniquement le mannitol.

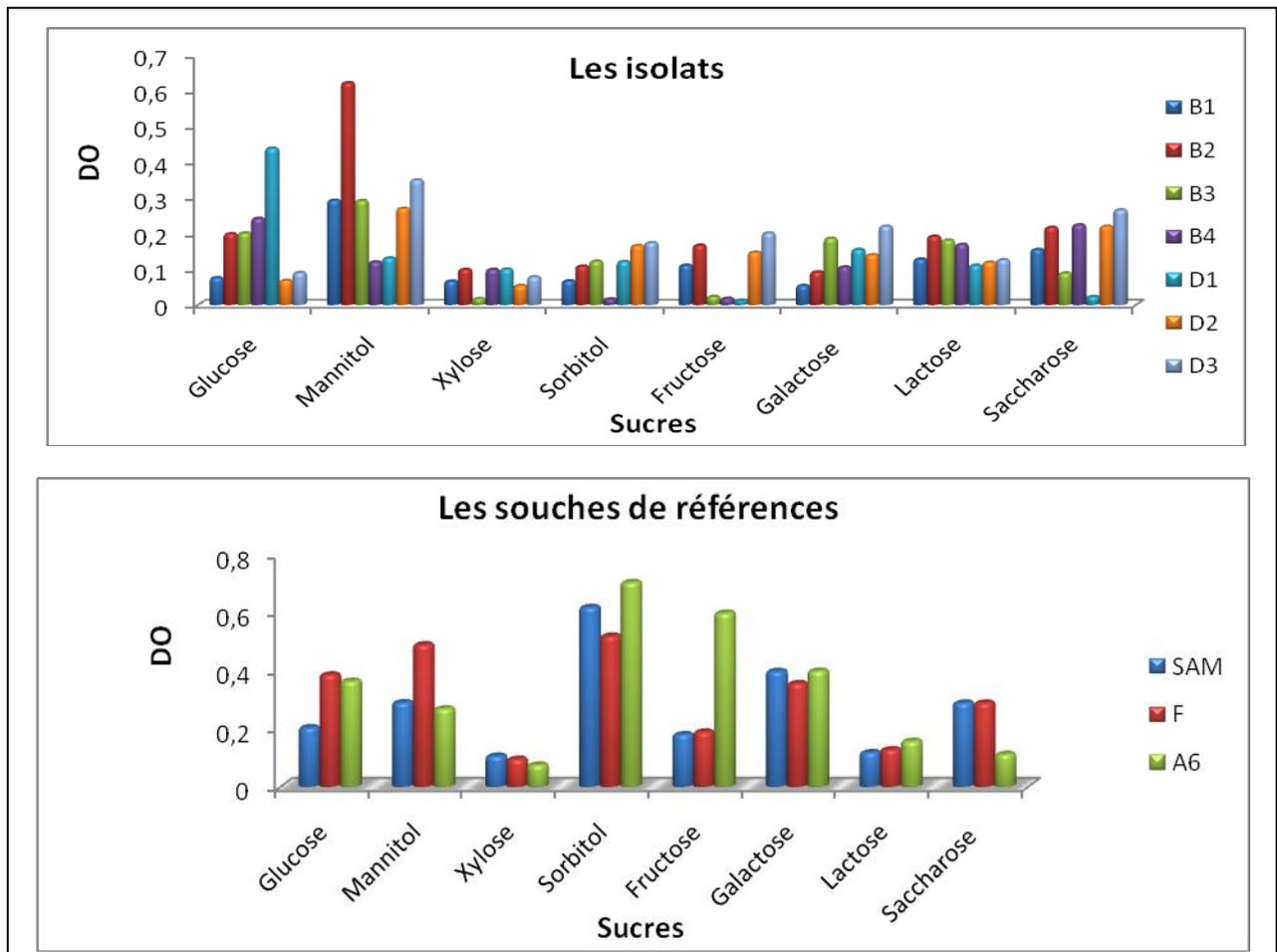


Figure 23: Utilisation des sucres par toutes les souches testées

2-5-1-2- Source d'azote

Les résultats obtenus montrent que les souches testées sur le milieu défini 8 utilisent tous les acide aminées testés comme source d'azote mais avec une différence l'un par rapport à l'autre. Les mesures de la DO montrent que l'alanine, la lysine et la leucine donnent une bonne croissance pour la plupart des souches, alors que les acides aminés les moins utilisés par les souches sont la proline et la tyrosine. D'autre part on remarque que les souches de référence utilisent préférentiellement l'alanine, la valine et la lysine (Figure 24).

Donc on peut dire que nos isolats peuvent utiliser divers acides aminés comme source d'azote. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Jordan (1984) et Somasegarn et Hoben (1994) qui ont constaté beaucoup d'acides aminés peuvent servir comme source d'azote pour les rhizobia.

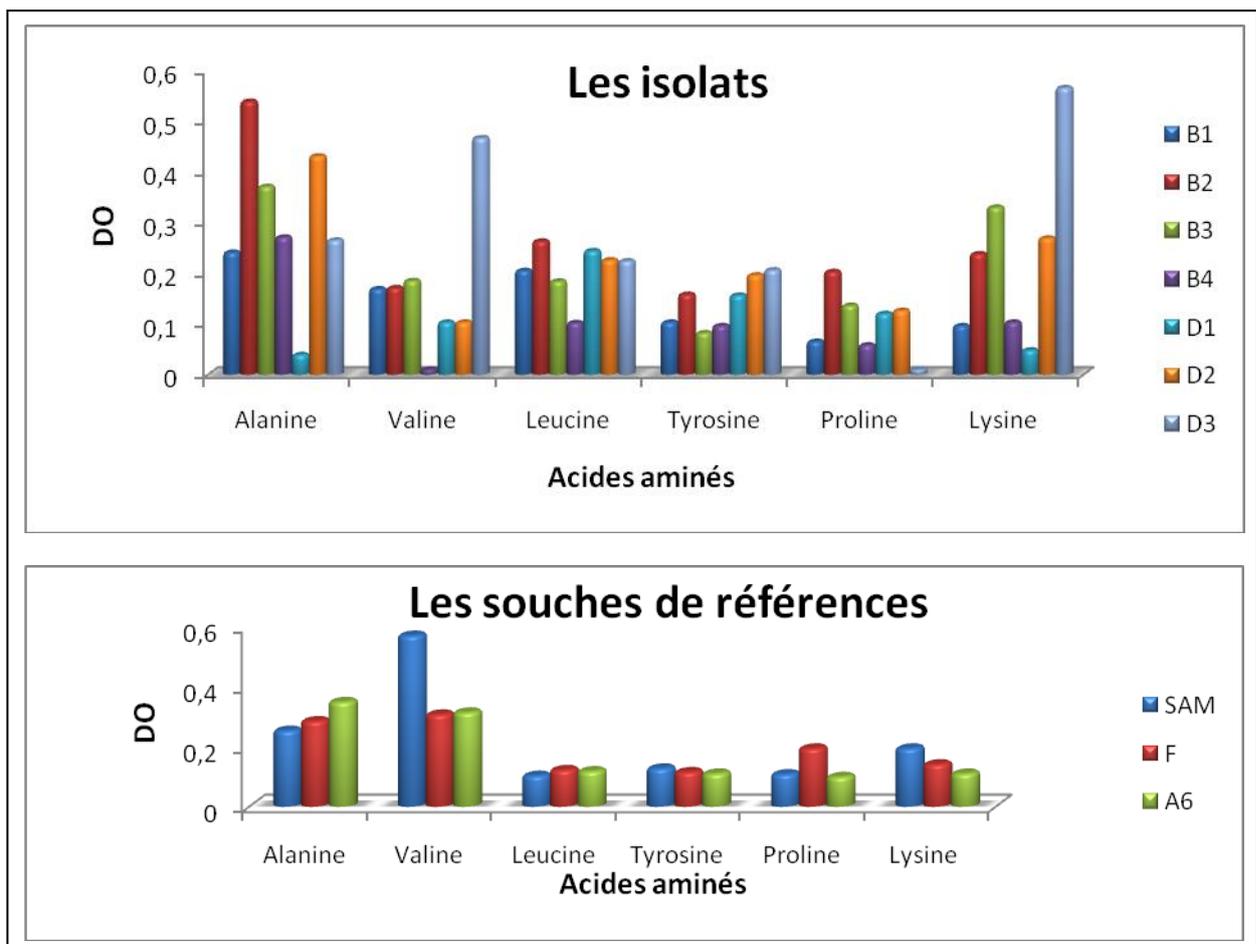


Figure 24: Utilisation des acides aminés par toutes les souches testées

### 2-5-2- Activité uréasique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries d'hydrolyser l'urée grâce à l'uréase, est initialement décrit par Javis et *al.*,(1970). En utilisant le rouge de phénol comme indicateur du pH.

Après 24 heures d'incubation, à l'exception la souche B2, toutes les souches testées n'effectuent aucun virage de couleur c'est-à-dire n'ont donné aucune alcalinisation du milieu, ce qui indique l'absence de l'activité uréasique.

Par contre après 48 heures, contrairement à la souche B4 et la souche de référence A6, toutes les souches testées ont une activité uréasique et alcalinisent le milieu de culture en observant un virage de la couleur du rouge vers le rose ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998).

L'uréalyse est une propriété très répandue dans le monde bactérien et se traduit par la libération de l'ammonium qui a une importance très répandue dans le monde agricole (Mobley, 1992).

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière. En fait, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des rhizobia sur la surface des racines ainsi que sur leur capacité infective et effective (Davidson et Robson, 1986).

**Tableau 07 : Résultat de test activité uréasique**

Souches	24 heures	48 heures
<b>B1</b>	-	+++
<b>B2</b>	++	+++
<b>B3</b>	-	+++
<b>B4</b>	-	-
<b>D1</b>	-	++
<b>D2</b>	-	++
<b>D3</b>	-	++
<b>SAM</b>	-	+++
<b>F</b>	-	++
<b>A6</b>	-	-

+++ : Forte virage de couleur, ++ : Bonne virage de couleur, - : aucun virage de couleur

### 2-5-3- Tests physiologiques

#### 2-5-3-1- Tolérance au NaCl

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches tolèrent une concentration de 1%, 3% et 5% à l'exception de la souche B3 qui ne tolère pas la concentration de 3% et 5%, et la souche D1 qui ne tolère aucune concentration.

La symbiose légumineuses- *Rhizobium* et la formation des nodules sur les racines des plantes légumineuses sont plus sensibles au sel et au stress osmotique que leur rhizobia (Zahran, 1999). La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah et al., 2001). Ainsi, la salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la fixation symbiotique de l'azote est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (Rao et al., 2002). Selon Kassem et al., (1985), il a été constaté que la sensibilité de la nodulation à la salinité est très variable, elle peut être inhibée par des petites quantités de NaCl, cette inhibition peut être due à la sensibilité de *Rhizobium* au sel, à la sensibilité de la plante-hôte et à celle de l'interaction *Rhizobium*-plante hôte.

**Tableau 08 : résultat de test tolérance au NaCl**

Souches	1%	3%	5%
<b>B1</b>	+	+	+
<b>B2</b>	++	+	+
<b>B3</b>	+	-	-
<b>B4</b>	++	+	+
<b>D1</b>	-	-	-
<b>D2</b>	+	+	+
<b>D3</b>	++	+	+
<b>SAM</b>	+++	++	+
<b>F</b>	+++	++	+
<b>A6</b>	++	+	+

+++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Faible croissance, - : Absence de croissance.

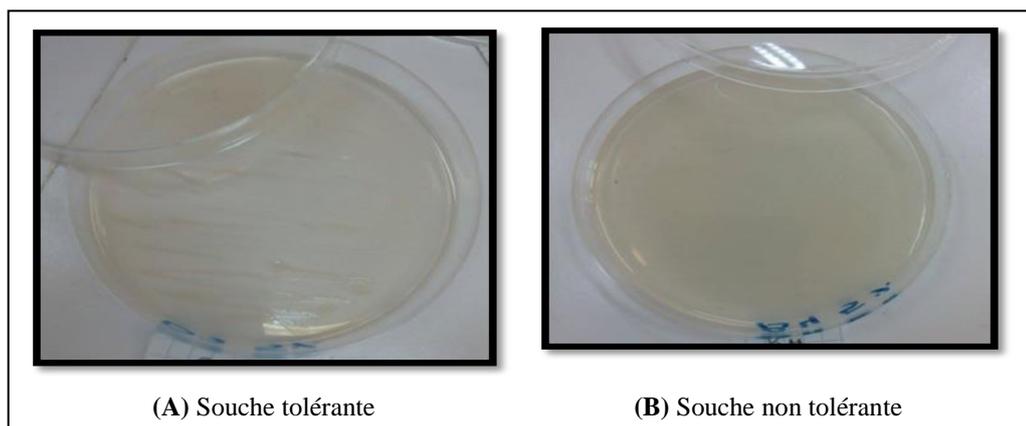


Figure 25 : Test de tolérance au NaCl

### 2-5-3-2- Température de croissance

La plupart des isolats ainsi que les souches de référence sont capable de croître à une température allant de 4°C jusqu'à 44°C, mais pour la température 4°C les colonies apparaissent ente 3 et 10 jours à l'exception de la souche B3 qui ne peut pas pousser à cette température. Pour les températures 22°C, 30°C, 37°C et 44°C les souches montrent une bonne croissance après 48h. Ce qui indique que nos isolats sont thermo tolérants. Les mêmes résultats ont été observés chez les souches de référence.

Les souches rhizobiales isolées par Wei et *al.*,(2003) peuvent également croître à 4°C et celles isolées par Diouf et *al.*(2000) résistent des températures très élevée de 40°C à 44°C.

Razanen et *al.*(2002) déterminent que les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermo-résistance est probablement reliée à la capacité des bactéries de survivre dans des périodes chaudes.

Tableau 09 : résultat de test de température

T°C Souches	04°C	22°C		30°C		37°C		44°C	
	Pendant 10 j	24 H	48 H						
B1	+ (7j)	-	+	++	++	+	+	++	+++
B2	+ (10j)	+	++	++	+++	+	++	+	+++
B3	-	+	++	++	+++	+	++	++	++
B4	+ (3j)	+	++	+	++	+	++	++	+++
D1	+ (6j)	+	+	++	+++	+	++	+	++
D2	+ (6j)	+	++	++	+++	+	++	+	+
D3	+ (7j)	+	++	+++	+++	+	++	++	+++
SAM	+(7j)	++	++	++	+++	+	+++	++	++
F	+ (7j)	+	++	++	+++	-	+	++	++
A6	-	+	++	++	+++	+	++	++	++

+++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Faible croissance, - : Absence de croissance.

2-5-3-3- Effet de pH

Les souches ont poussé dans l'intervalle de pH 4 à pH 9, les mesures de la densité optique montrent que nos souches tolèrent l'alcalinité et l'acidité.

Un optimum de croissance de toutes les souches testées est remarqué à pH 7, et il y a une croissance à pH 6 et pH légèrement basique pH 8, 9. D'autre part on remarque que les souches de références sont tolérantes à l'acidité avec une croissance élevée à pH 6 (Figure 26)

Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par (Maatallah et al ;2002) qui ont détecté la croissance de leur isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4 et pH supérieur à 7,5. Ainsi (Raza et al ,2001) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH 4 à pH10 (Torche, 2006).

Les travaux de Torche (2006) ont montré que la majorité des souches sont capables de pousser entre pH 4 et 10, avec un optimum de croissance se situant entre pH 6,5 et 7,5.

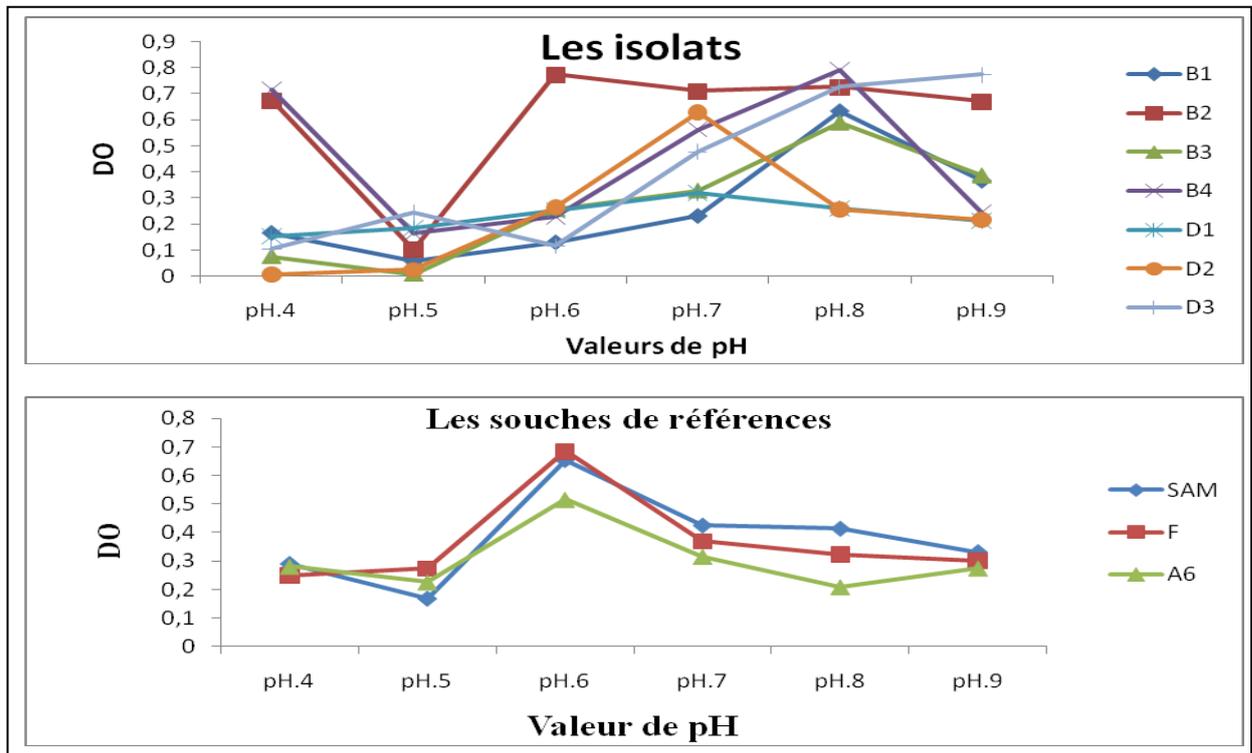


Figure 26 : Effet de pH sur toutes les souches testent

#### **2-5-4- Résistance aux Antibiotiques**

Les résultats obtenus révèlent une variabilité de la résistance et la sensibilité des souches vis-à-vis aux antibiotiques testés: Amoxicilline, Pénicilline G, Gentamicine et Ciprofloxacine.

Nous n’observons aucune zone d’inhibition autour des disques d’amoxicilline et de pénicilline G, c'est-à-dire que les souches sont résistantes à ces antibiotiques.

Autour des disques de Gentamicine et Ciprofloxacine, on observe un recul de colonies pour toutes les souches testées sur des diamètres différents, plus la zone d’inhibition est grande plus l’efficacité de l’antibiotique est importante. La résistance intrinsèque aux antibiotiques révèle que toutes les souches sont sensibles aux Gentamicine et Ciprofloxacine.

Hagedorn (1979) trouve que 50 isolats de *Rhizobium trifolii* ont résisté à de fortes concentrations de 11 antibiotiques (sur 15 testés, mais relativement sensibles au chloramphénicol, la streptomycine, la tétracycline, et la Vancomycine. Les rhizobia à croissance rapide et ceux à croissance lente, sont extrêmement résistants à l'acide naludixique et la pénicilline.

**Tableau 10:** Résultat de test d’antibiotiques

ATB souches	Amoxicilline	Pénicilline G	Gentamicine	Ciprofloxacine
<b>B1</b>	R	R	S	S
<b>B2</b>	R	R	S	S
<b>B3</b>	R	R	S	S
<b>B4</b>	R	R	S	S
<b>D1</b>	R	R	S	S
<b>D2</b>	R	R	S	S
<b>D3</b>	R	R	S	S
<b>SAM</b>	R	R	S	S
<b>F</b>	R	R	S	S
<b>A6</b>	R	R	S	S

R : Résistance, S : Sensible

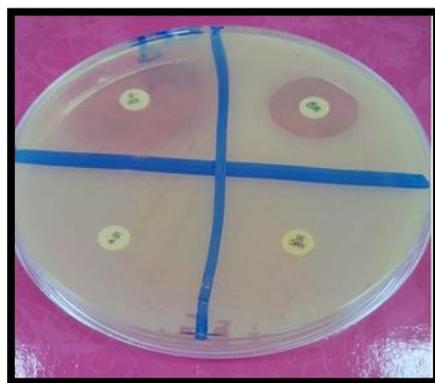


Figure 27: Résistance aux antibiotiques

#### 2-5-5- Electrophorèse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose

Après la récupération de gel et sa mise sur la table UV on remarque l'existence des bandes pour les différents échantillons. Ce qui signifie la présence des plasmides chez tous les isolats et les souches de référence. Ces échantillons d'ADN migrent vers le même niveau, donc ces plasmides possèdent une taille similaire. On peut dire donc que les isolats possèdent le même plasmide existant chez les souches de référence.

Ces plasmides ont migré légèrement, ce qui indique que ce sont des plasmides de grande taille (mégaplasmides) on peut suggérer donc que nos isolats possèdent le mégaplasmide symbiotique caractéristique des rhizobia (Figure 28).

La première hypothèse de l'existence d'un élément génétique extrachromosomique chez *Rhizobium* fut émise par Higashi en 1967, qui, par transfert de la spécificité d'hôte de *R. trifolii* à *R. phaseoli* avec élimination du donneur *R. trifolii* par un bactériophage spécifique, a obtenu des *R. phaseoli* capables de noduler le trèfle. Il en a donc conclu que la spécificité d'hôte était portée par un facteur épisomique.

Des méthodes de Eckhardt 1978 ont révélé la présence de mégaplasmides chez *R. melliloti* (Rosenberg et al., 1982).

L'investigation de la présence de grands plasmides chez les diverses espèces de *Rhizobium* a permis de décrire plus de 60 souches à croissance rapide possédant de grands plasmides (Denarie et al., 1979). Chez la plupart des souches étudiées, un ou plusieurs plasmides ont été détectés.

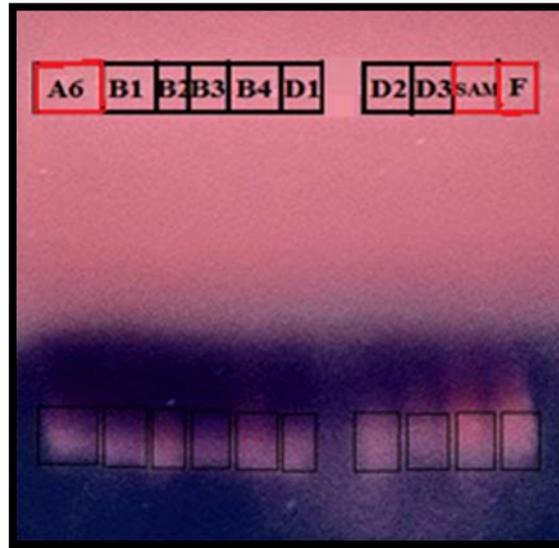


Figure 28 : Profil plasmidique des souches analysées

### 3-Etude du microsymbiote mycorhiziens des plantes légumineuses *Mellilotus* et *Coronilla*

#### 3-1-Détection de mycorhizes et la mise en évidence de l'infection endomycorhizienne

Les examens microscopiques effectués sur les racines de *Mellilotus* et *Coronilla* par la technique de Trouvelot et *al.*, 1986 ont montré la présence d'une colonisation mycorhizienne chez les deux plantes. Ces mycorhizes sont de type endomycorhize arbusculaire, puisque on observe la présence des arbuscules et une forte propagation des hyphes dans la racine qui sont les structures principales propres de ce type (Figure 29 ; 30).

Leur observation n'a pas été chose facile : au grossissement  $\times 100$ , ces derniers apparaissent sous forme de tâches foncées et il fallait souvent aller au grossissement supérieur pour avoir plus de détails. Malheureusement, on manque des microscopes de grossissement plus important.

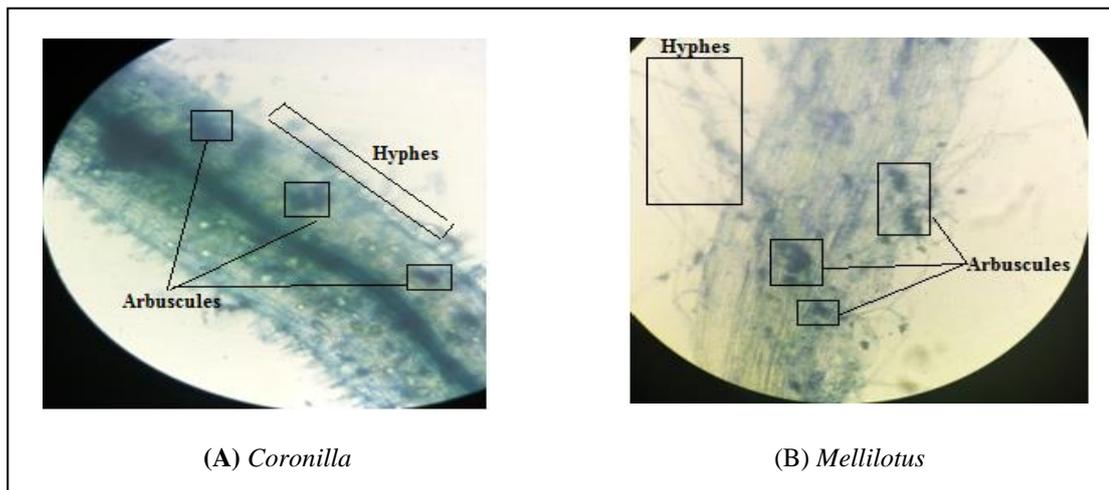


Figure 29: Observation des racines de Coronilla et mellilotus après coloration de bleu de méthylène (grossissement×20)

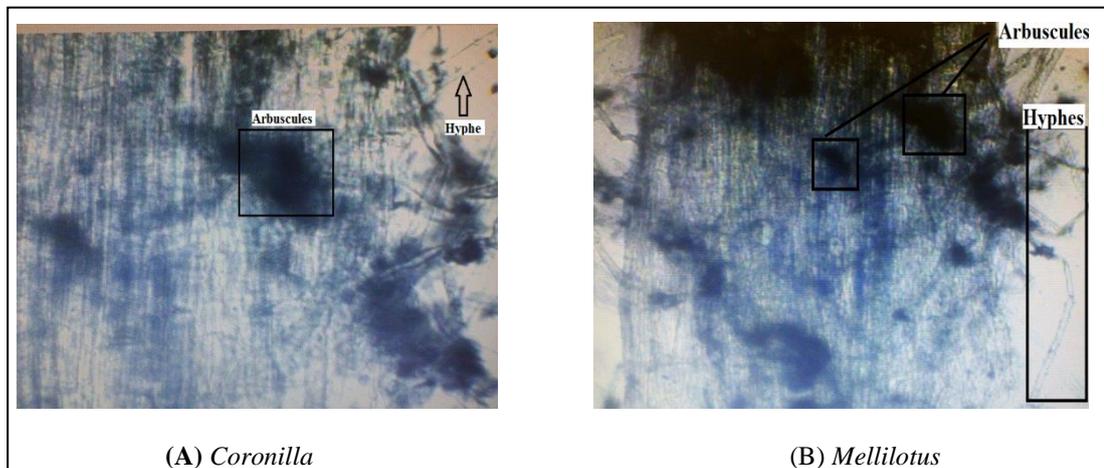


Figure 30: Observation des racines de Coronilla et mellilotus après coloration de l'ancre (grossissement×40)

### 3-2- Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne

La fréquence, l'intensité de mycorhization et la teneur arbusculaire ont été calculées par le programme informatique MycoCalc [11] , les résultats obtenus figurent sur le tableau ci-dessous :

	A3	A2	A1	A0
0	0	0	0	1
1	0	0	1	0
2	0	0	8	0
3	0	12	0	0
4	8	0	0	0
5	0	0	0	0

Fragments observed = 30	
F%	= 96,67
M%	= 32,03
m%	= 33,14
A%	= 77,43
a%	= 24,80

Figure 31 : Résultats des paramètres d'infection mycorhizienne de la *Coronilla* par MycoCalc

	A3	A2	A1	A0
0	0	0	0	2
1	0	0	6	0
2	0	0	7	0
3	0	8	0	0
4	7	0	0	0
5	0	0	0	0

Fragments observed = 30
F% = 93,33
M% = 25,70
m% = 27,54
A% = 79,65
a% = 20,47

Figure 32 : Résultats des paramètres d'infection mycorhizienne de la *Mellilotus* par MycoCalc

➤ **Fréquence de mycorhization**

Les deux plantes sont mycorhizé avec une fréquence élevée de colonisation (F %) où elle est estimée à 96,67% pour la plante de *Coronilla* et 93,33% pour la plante de *Mellilotus*.

D'après les pourcentages élevés de la fréquence de mycorhization, on peut déduire que les champignons mycorhiziens qui colonisent les plantes testés ont une grande résistance aux stress environnementaux défavorables pour leur germination, ce qui se traduit par leurs forts taux de colonisation du système racinaire (Limam, 2015).

➤ **Intensité de mycorhization**

La variation de l'intensité de la colonisation du cortex racinaire (M%) et la variation de l'infection dans la partie endomycorhizée de la racine (m%) sont plus faibles chez les deux plantes. De plus on constate que les deux valeurs sont proches. Dans la *Coronilla* M%=31,03 et m%=33,14 et dans la *Mellilotus* M%=25,70 et m%=27,54.

(Dickson et al., 1999) déclare que l'intensité de mycorhization est réduite quand le niveau de phosphore augmente dans le sol et devient ainsi directement disponible pour la plante. A l'opposé, la forte intensité de mycorhization de *Daucus carotta* peut être justifiée par la pauvreté de la rihzosphère en phosphore (Limam, 2015).

➤ **Teneur arbusculaire**

La teneur arbusculaire de la racine pour *Coronilla* (A%) est de taux élevé où elle est estimée à 77,43% et chez le *Mellilotus* 79,65%. En même temps les résultats relatifs à la variation de la teneur arbusculaire dans la partie endomycorhizée de la racine (a%) pour *Coronila* est estimée à 24,80% et pour le *Mellilotus* à 20,47%.



## **Conclusion et perspective**

## **Conclusion et perspective**

Notre travail est basé sur deux objectifs principaux, le premier ayant pour but de caractériser et d'identifier des souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaires des plantes légumineuses de genre *Mellilotus* et *Coronilla* située dans la région de Guelma. Le deuxième objectif est une étude de la colonisation mycorhizienne présente dans les systèmes racinaires des deux plantes choisies.

L'étude du micro symbiote bactérien est réalisée par une caractérisation phénotypique en présence des souches de références de rhizobia. En plus de l'étude culturale, morphologique et microscopique, l'étude de la caractérisation et d'identification comporte une série de tests : tests nutritionnels, tests biochimiques, tests physiologiques ainsi que la détermination de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que nos isolats présentent des résultats comparables à ceux des souches de référence et ont donc la description des rhizobia

Nous avons également fait une extraction des plasmides, et la révélation sur gel d'agarose. La technique d'électrophorèse montre que les souches possèdent un seul plasmide (mégaplasmides) de même taille pour les isolats et les souches de référence. On peut suggérer donc que nos isolats possèdent le plasmide symbiotique caractéristique des rhizobia.

L'étude du micro symbiote mycorhizien est réalisée par la détection et l'estimation de la colonisation mycorhizienne chez les deux plantes. Les résultats obtenus montrent la présence d'une colonisation de type endomycorhize arbusculaire, puisque on observe la présence des arbuscules et une forte propagation des hyphes dans la racine qui sont les structures principales propres à ce type.

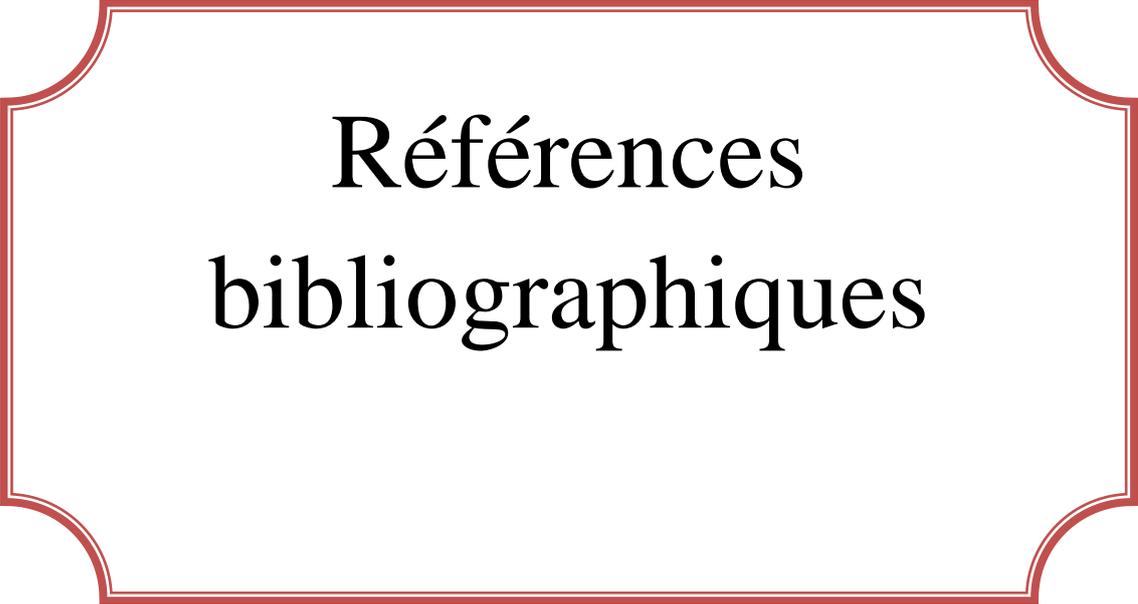
Les deux plantes présentent une importante fréquence de mycorhization supérieure de 90%, avec une intensité de mycorhization acceptable évalué à 25,70% pour *Mellilotus* et 31,03% pour *Coronilla*. La teneur arbusculaire élevée où elle est estimée à 77,43% pour *Coronilla* et 79,65% à *Mellilotus*.

En effet, la symbiose tripartite des plantes légumineuses avec les rhizobia et le champignon mycorhizien présente un intérêt économique et agronomique considérable. Leur association agit comme engrais fertilisant et limite l'utilisation des engrais qui sont coûteux et polluants et joue un rôle majeur dans l'augmentation de la productivité des cultures.

Cependant, cette étude est loin d'être finie. Dans l'avenir, nous envisagerons d'entreprendre des travaux de recherches visant à l'application et à la vulgarisation des techniques mises au point.

Cette étude peut être suivie par les recherches suivantes:

- La caractérisation phénotypique des isolats selon d'autres facteurs abiotiques et biotiques.
- La caractérisation moléculaire des isolats.
- L'étude de la compétitivité des souches introduites vis-à-vis d'autres microorganismes du sol.
- Réalisation d'un inventaire des plantes mycorhizées et l'identification les champignons mycorhiziens afin de les impliquer dans divers domaines à savoir l'agriculture.
- Une étude plus approfondie concernant les spores endomycorhiziennes car les moyens dont nous disposions nous ont juste permis de déterminer les arbuscules.
- Application de la biotechnologie des mycorhizes en agriculture pour l'amélioration du rendement et l'utilisation plus rationnelle des fertilisants de synthèses et le développement d'une agriculture durable.



Références  
bibliographiques

**A**

**Allen, O.N., Allen, E.K.** 1950. Biochemical and symbiotic properties of Rhizobia Bacterial. Rev.14: 273-330.

**Ammari, Warda.** 2011. Etude des interactions entre des souches rhizobienne par production des substances inhibitrices « Bactériocines ». Diplôme de Magister. Université es-sania, Oran.

**Aurelie, Faugier.** 2010. Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires « the rare biosphere ». Sciences du Vivant.Ecole Centrale de Lyon. France.

**Ayisi, K. K. D. H., Putnam, C. P., Vance., and, GRAHM, P.H.** 1992. bradyrhizobium inoculation and nitrogen fertilizer effects on seed yield and protein of white lupin. Agronomy .84, 857-861.

**B**

**Badji, S., Ducouso, M., Gueye, M. & Colonna, J.P.** 1988. Fixation biologique de l'azote et possibilité de nodulation croisée chez les deux espèces d'Acacias producteurs de 38 gommes dure : Acacia Sénégal L. Willd et Acacia laeta R. Br. ex Benth. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 663- 668 p.

**Balzergue, Coline,** 2012. Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate. Université de Toulouse. PP. 345.

**Bendaira, Zineb.** La voie de signalisation « Myc » : création d'une base de données du gène dmi3. Université des Frères Mentouri. Constantine. Algérie. PP. 62.

**Benguedouar, A.** 2000. Etude de la symbiose: Rhizobium- Hedysarum coronarium. Essai de la caractérisation de l'espèce Rhizobium hedysary. Th doct. Université de Constantine, Algérie.

**Benhizia, Y.** 2006. Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre Hedysarum: H.carnosum Desf., Hspinossissimum subsp. Capitatum Desf. Et H.pallidum Desf. Th doct. Université Mentouri Constantine. Algérie.

**Benselma, Amel.** 2015. Réhabilitation de la culture du *Lablabpurpureux*L. Ex Sweet et études de son partenaire symbiotique. Th.doct. Université ES-SENIA. Oran. Algérie. PP. 133.

**Béreau, M., Louisanna, É., Grandcourt, A., and Garbaye, J.** 2003. Symbiose mycorhizienne et nutrition minérale. PP . 74.

**Berrada, H., Fikri-Benbrahim, K.** 2014. Taxonomy of rhizobia: Current perspectives. British Microbiology Journal.4 (6): PP. 616-639.

**Brewin, N.J; Downie, J.A; Young, J. P. W.** 1992.Nodule formation legumes.Encyclopedia of microbiology, M.R Josha Lederberg. Rockefeller. University of New York. PP : 239-248.

**Broughton, W. J., Jabbouri S. &, Perret, X.** 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.*182, 5641-5652.

**C**

**Calonne, Marlyne.** 2012. Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore chez le champignon mycorhizien à arbuscule *Rhizo phagusirregularis*. Université du Littoral Cote d'Opale.

**Chabbi, R.** 2010 ; Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Th magister. Université Mentouri Constantine. Algérie.

**Charaoui-Boukerzaza Sana.**2011. Caractérisation génétique et biochimique de glycosidases de la bactérie pathogène des plantes *Dickeyadadantii*. Th doct. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon .pp159 .

**Christian, Meyer.** 2017. article *coronilles*. Éditeur scientifique. *Dictionnaire des sciences animales*, Cirad, Montpellier, France.

**Claude, Alabouvette.** 2009. Colloque : "Jardins, environnement et santé" Université de Bourgogne. INRA, UMR 1229.

**Clementine, Lepinay.** 2013. Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, France.

**Cluett, H.C., Boucher, D.H.** 1983. Indirect mutualism in the legume - Rhizobium-mycorrhizal fungus interaction. *Oecologia* 59,pp 405–408.

**D**

**Davidson, I. A., Robson, M. J.** 1986. Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N<sub>2</sub> fixation, nodulation and growth of white clover. *Ann. Bot.* 57. PP. 331 - 338.

**De lajudie, P., Diouf, A., Neyra, M., Kersters, K., Gillis, M., Martinez-Romero, E., Gueye, M.** 2000.Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: PP 159–170.

**Delaux, P.M.** 2011. Rôles des strigolactones et évolution des compétences mycorhiziennes dans la lignée verte. PP. 29.

**Delphine, Irlande.** 2010. Le miel et ses propriétés thérapeutiques, Utilisation dans les plaies cutanées.

**Denarie, J., et Truchet, G.** 1979. La symbiose Rhizobium-légumineuses : rôles respectifs des partenaires. *Physiol. veg.* 17 (4): 647-667.

**Denarie, J.** 2000. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.

**Dhane Fitouri, Sana.**2011. Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hédysarum Coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Th. doct. Institut national agronomique de Tunisie.

**Diane, Rivaton.** 2016, Etude des champignons mycorhiziens arbusculaires des sols en systèmes de grandes cultures biologiques sans élevage : application à la nutrition phosphatée. Sciences du Vivant [q-bio].

**Diem G.H., Dommergues Y., Duhoux E.,** 1998. Les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques et rôle dans les écosystèmes méditerranéens et tropicaux. 500p

**Diouf, A., De lajudie, P., Neyra, M., Kersters, K., Gillis, M., Martinez-Romero, E., Gueye, M.**2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia).International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50: PP. 159–170.

**Djigal, Djibri.** 2003. Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Diplôme de docteur de 3<sup>ème</sup> cycle. Université cheikhanta diop, dakar. PP.68.

**Duhoux E., Nicole M.,** 2004. Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. Edition Dunod. Paris. France. pp 1, 20, 70.

**Dupuy, Y., Nougier, P.** 2005. Les microorganismes, du gène à la biosphère. Edition Ellipses. Paris.

## **E**

**Eckhardt, T.** 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria.Plasmid 1: 584-588.

**El-Hassanin, A.S., Lynd, J.Q.** 1985.Soil fertility effects with tripartite symbiosis for growth, nodulation and nitrogenase activity of *Vicia faba* L. Journal of Plant Nutrition 8, pp 491–504.

**Elmalyani, A., and,Elidrissi, T.** 2013. Le rôle des mycorhizes dans la nutrition phosphatée et azotée de certaines légumineuses : cas du pois chiche. PP. 10.

## **E**

**Farissi , Mohamed., Faissal, Aziz., Abdelaziz,Bouizgaren., and Cherki, Ghoulam.** 2014. La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité: Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. pp. 96-104 .ISSN : 2351-80.

**Fiorini, Christel., Lacoste, C., Fourasté, I., Stanislas, E.** 2002. Guide d'Herborisation. Institut Klorane.

**Fortin, J. A., Plenchette, C., Piche, Y.**2008. Les mycorhizes. La nouvelle révolution verte. Édition Multi Monde Quae, Québec, 131 p.

**Fossou, Kouakou Romain.** 2001. Diversité génétique des rhizobia associés à un champ de pois d'angole (*CajanuscajanL.*). Diplôme d'Agronomie Approfondie (DAA) en Agronomie Production Végétales. Ecole Supérieure d'agronomie de l'institut national polytechnique Félix Houphouët Biogny de *Yamoussoukro*. Centre de la Côte d'Ivoire.

## G

**Geurts, R., & Bisseling, T.** 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signaling. *Plant Cell*,14, 239-249.

**Giraud, E.** 2007. Symbiose rhizobium/légumineuse: un nouveau sésame. Vol. 23, N° 6-74 p.

**Gough, C.**2009. *Medicago truncatula*, un modèle pour l'étude des endosymbioses racinaires. *Biofutur*. 298: 30-32.

**Gram, Borhane.** 2008. Utilisation des techniques d'électrophorèses pour l'identification et l'étude de la diversité des Rhizobia de quelques légumineuses. Thèse de Magistère. Université Mentouri, Constantine, Algérie.

**Guinberteau, J., and Courtecuisse, R.** 1997. Diversité des champignons (surtout mycorrhiziens) dans les écosystèmes forestiers actuels. PP. 28.

**Guiraud J.P., 1998.** – Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.

## H

**Hagedorn,C.** 1979.Relationship of Antibiotic Resistance to Effectivenessin *Rhizobium trifolii* Populations. *SoilSci Soc Am J* 43:921-925.

**Hamza, Nabila.** 2014. Application des mycorhizes arbusculaires en culture maraichère cas de pastèque (*Citrulluslanatus*). Université Farhat Abbas 1, Sétif. Algérie. PP. 83.

**Harley ,J.L. , and Smith , S.E.** 1983 . Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Londres . PP. 483.

**Higashi, S.** 1967. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *J. Gen. Appl. Microbio.*13: 391-403.

**Hopkins. W.G.** 2003. Physiologie végétale. Edition de boeck. Université de Lille. France.

**Hubert, Charles.** 1997. Aspects moléculaires de la bactérie symbiotique principale du charançon des Céréales *Sitophilus oryzae* (Coléoptère, Curculionidae) et études de ses interactions avec l'hôte. Sciences du Vivant [q-bio]. INSA de Lyon. France.

**I**

**Jordan, DC.** 1984. Rhizobiaceae. In: N. R. Krieg and J. G. Holt editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. 234-245.

**K**

**Kassem, M., Capellend, I., Gounot, A.M.** 1985. Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Sinorhizobium meliloti*, *Mircen J.PP* 63-75.

**Khallef, Lina Rayene.** 2016. Isolement et caractérisation des bactéries nodulantes la lentille (*Lens culinaris*) cultivée dans la région d'Ain Smara à Constantine. Th master. Université des Frères Mentouri, Constantine. Algérie. PP. 68.

**Khasirikani, Mbakwiravyo.** 2009. Notes d'écologie générale [En ligne].Th doc.

**Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C. & Maier, U.G.** 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes - new models for symbiosis. *BMC EvolBiol*, 7, 55. Université de conservation de la nature et de développement, 96, Disponible sur : [http://www.memoireonline.com/08/10/3782/m\\_Notes-decologie-generale23.html](http://www.memoireonline.com/08/10/3782/m_Notes-decologie-generale23.html).

**L**

**Laouar, Amina.** 2013. Importance des plantes médicinales dans les agrosystèmes cultivés dans la région de Ouargla (Synthèse bibliographique). Mémoire e Master. Université Kasdi Merbah, Ouargla. Algérie. 96p.

**Laurence, Jochems-Tanguay.** 2014. Les inoculants mycorrhiziens pour une agriculture Québécoise plus productive et moins dépendante aux engrais minéraux phosphatés. M. Env. Université de Sherbrooke. PP.26-30.

**Limam, M. A. Fouad.** 2015. Isolement et pré-identification des mycorhizes à arbuscules provenant de quelques palmeraies de Ouargla. Université Kasdi Marbah, Ouargla. Algérie.

**Lissac, Laetitia.** 1997. Le mélilot officinal, *melilotus officinalis* (L). Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Limoges, 213p.

**Lohar D., Stiller J., Kam J., Stacey G., And Gresshoff P.M.,** 2009. Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 104: 277 - 285

**M**

**Maatallah, J., Berraho, E., Sanjuan, J., Lluch, C.** 2002. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22: PP. 321–329.

**Marine, Forges.** 2015. Régulation des échanges de nutriments au sein de la mycorhize à arbuscules. Thèse de doctorat .Université de Bourgogne. PP :72.

**Mbengue, Malik.** 2010. perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires du LysM- RLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Medicago truncatula*. Th : doc : Biosciences Végétales. université Toulouse III - Paul Sabatier. PP :209.

**Mobley, L.T.H.** 1992. Edition Urease Microbial.J Lederberg. *Encyclopedia of microbiology* .4: PP. 327-346.

**N**

**Noel.** 2009. Diversité génétique des Rhizobia associés à un champ de pois d'angole (caganuscajan I) à Yamoussoukrou. Centre de la Cote d'Ivoire.

**P**

**Patriarca, E J., Tate r., Ferraioli, S., Iaccarino, M.** 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int: Rev Cytol*, PP. 62- 201.

**Patrick, Etievant.** 2011. La bactérie et son hôte. 8<sup>ème</sup> éd. département Alimentation humaine. Dijon. France.

**Patrick, H.M., Neville, M.A., Jean, C.**2015. Les légumineuses a importance sylvopastorale des quelques hautes altitudes du Sud-Kivi. *Innovative Space of Scientific Research Journals* [en ligne]. 18 No, 362-368.Consulté le [22.04.2017] .ISSN :2351-8014. Disponible à l'adresse :<http://www.ijisr.issr-journals.org/>.

**Pascale, Mollier.**2014. Communication externe : les liens plantes-champignons, INRA Press, Grand Est - Nancy, Occitanie-Toulouse.

**Pelmont, J.** 1995. Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires. Vol 2. P: 541 - 572.

**Perry J.J., Staley J.T., Lory S.** 2004. *Microbiologie*. Edition Dunod, Paris. PP. 633-635.

**Peyronel, B., Fassi, B., Fontana, A., Trappe, Jm.** 1969.Terminology of Mycorrhizae. *Mycologia*, 61 : 410 - 411.

**Philippe, Sansonett.** 2009. *Histoires de symbioses*, Paris, France.

**Phillips, J. M., Hayman, D.S.** 1970, Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:158–160.

### **R**

**Rajaonarimamy, Elinarindra.** 2010. Influence de la diversité mycorrhizienne sur la symbiose *Dalbergia trichocarpa* - Rhizobia et sur la structure de la microflore tellurique. Université d'Atananarivo. PP. 99.

**Rao, D. L. N., Giller, K. F., Yea, A. R., Flower, T. J.** 2002: The affects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chichpea (*Vicerarietimum*). Annals of Botany. 89: PP. 563-570.

**Rasanen, L. A.** 2002. Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes Acacia and Prosopis. Th doct. Université d'Helsinki. Finland.

**Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., Dusha, L., David, M., and, Boucher, C.** 1982. Megaplasmids in the plant-associated bacteria Rhizob hmexixoti and Pseudomonas nolanaceatrum. BactehioL.150 (1): 402-406.

### **S**

**Saadallah, K., Drevon, J.J., EtAbdelly, C.** 2001. Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie 21: PP. 627-634. INRA, EDP Sciences.

**Sadowsky M.J., et Graham P.H.,** 2006. Root and stem nodule bacteria of legumes. In: Dworkin M et Falkou S. (Eds): the prokaryotes: ecology and biochemistry. Springer. pp 817 - 841.

**Sebihi, F.** 2008. Les bactéries Nodulantes des légumineuses (B.N.L): caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister. Université Mentouri. Constantine, Algérie.

**Singleton, P. W., El Saify, S. A., Bohlool, B. B.** 1982. Effect of salinity on Rhizobium growth and survival. Appl. Environ. Microbiol. 44, 884-890.

**Smith, S.E., Read, D.J.** 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press; Harcourt Brace and Company Publishers, pp: 605.

**Sobti, Sarah.** 2013. Isolement des bactéries telluriques résistantes aux effets de salinité. thèse master. Université kasdi merbah, ouargla. Algérie.

**Somasegaran, P., Hoben, H.J.** 1994. Handbook for Rhizobia. Springer verlage. New York. Inc, p.450.

**Soualmia, Asma.** 2010. Biodiversité et isolement des symbiotes mycorrhiziens et symbiotes fixateurs d'azote d'*Alnus glutinosa* (L. Gaertn) et d'*Acacia melanoxylon* (R.) de la station du la

lac Tonga (Nord-Est Algérien). Thèse de magister. Université Badji Mokhtar, Annaba. Algérie. PP. 125.

**Soussou, Souhir.** 2013. Adaptation de la symbiose *Fabacées- rhizobium* aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d' *Hedysarum coronarium*. Th. doct. Université de sousse, Tunisie.

### T

**Torche, A.** 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de magistère. Université Mentouri Constantine. Algérie.

**Torche, A.** 2014. Caractérisation des souches bactériennes isolées à partir des nodules de quelques légumineuses endémiques de l'Algérie et détermination du polymorphisme génétique. Th. doct. Université de constantine 1. Algérie.

**Trouvelot, A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V.**1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: physiology and genetics aspects of mycorrhizae. Gianinazzi Pearson V et Gianinazzi S (Eds), 1st ESM, INRA Press, Paris, 217-221 p.

### V

**Valentin, Vidal – Ribeil.** 2015. Impact de la mycorhization de variété population de blé en culture pure et en association avec une légumineuse. thèse de doc. Université Anger.

**Vincent, J. M.** 1970. The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.

### W

**Walker, M. Vincent.** 2010. Impact de l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zeamays L.* Université de Lyon. France. PP. 207.

**Wei, G.H., Zhang, Z.X., Chen, C. W. M., Et Ju, W.T.**2008. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astroagalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. *Microbiol. Researh.* 163:651-662.

### X

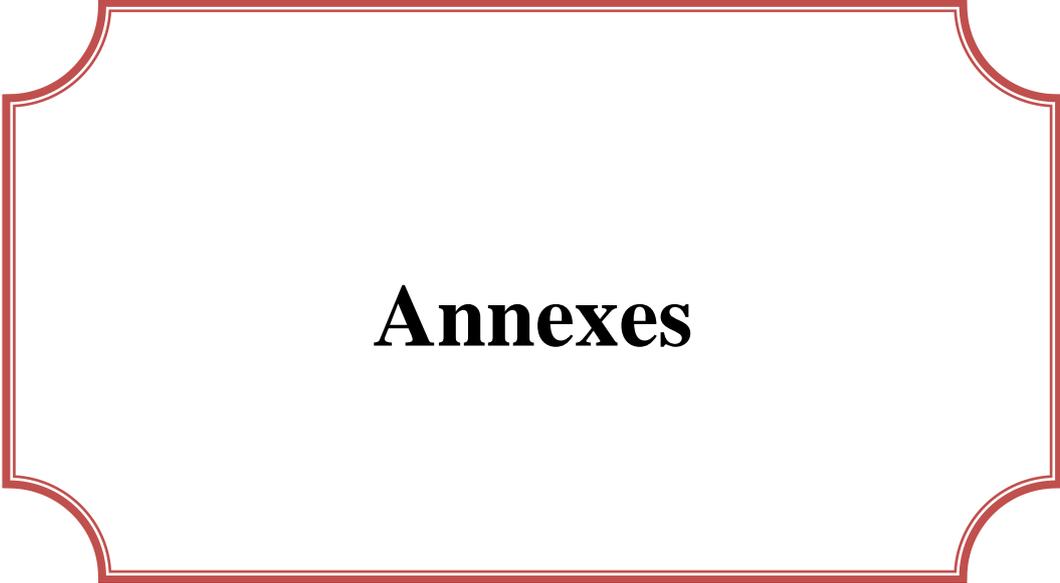
**Xie, Z.-P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W.J., R., Boller, T,** 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and non nodulating soybeans. *Plant Physiology* 108, pp 1519–1525.

### Z

**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) : PP. 968-989.

## Web graphie :

- [1] <https://parisse17.wordpress.com/le-saviez-vous/les-legumineuses-des-plantes-qui-vous-veulent-du-bien>. Consulté le 06/03/2017.
- [2] <http://dictionnaire.education.fr/rhizobium>. Consulté le 15/03/2017.
- [3] [http://www.memoireonline.com/05/12/5818/m\\_Effet-de-linoculation-avec-bradyrhizobium-japonicum-et-de-lapport-de-phosphore-sur-la-product8.html](http://www.memoireonline.com/05/12/5818/m_Effet-de-linoculation-avec-bradyrhizobium-japonicum-et-de-lapport-de-phosphore-sur-la-product8.html). Consulté le 22/03/2017.
- [4] <http://dictionnaire.education.fr/nodosite>. Consulté le 12/04/2017.
- [5] <http://www.el-annabi.com/algerie/wilaya/guelma.htm>. Consulté le 26/04/2017.
- [6] <http://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/chimie-ph-222/>. Consulté le 02/05/2017.
- [7] <http://www.universalis.fr/encyclopedie/oxydoreductions-biologie/2-le-potentiel-d-oxydoreduction/>. Consulté le 02/05/2017.
- [8] <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA115Cond11.pdf>. Consulté le 04/05/2017.
- [9] <http://www.villemontlaurier.qc.ca/DATA/DOCUMENT/Fiche%20-%20oxygène%20dissous.pdf>. Consulté le 04/05/2017.
- [10] <http://www.memoireonline.com/11/13/7973/Etude-de-la-salinite-des-sols-par-la-methode-de-detection-electromagnetique-dans-le-perimetre.html>. Consulté le 08/05/2017.
- [11] <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/MYCOCALC.EXE>. Consulté le 10/05/2017.



**Annexes**

---

**Annexe 01:****Milieux de culture et solutions utilisés****Composition de milieu YMB (Yeast mannitol broth) en g/l. (Vincent, 1970)**

Mannitol	10.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
Mg SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20
Na Cl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

**Composition de milieu YMA (Yeast mannitol agar) en g/l. (Vincent, 1970)**

YMB	1000 ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

**Composition de milieu YMA+ rouge Congo en g/l**

YMB	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10 ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

---

### **Composition de milieu YMA+ bleu de bromothymol en g/l**

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymo	15 ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

### **Composition de milieu GPA (Glucose peptone agar) + pourpre de bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970)**

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100 ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement de milieu.

---

**Composition de milieu Défini 8 en g /l. (Vincent, 1970)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub>	0.21
CaCl <sub>2</sub>	0.21
Glutamate-Na	1
Mannitol	1
Solution stock vitamines	1ml
Oligoéléments	1ml
pH	6.9

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

**Solution stock vitamines: (mg/l)**

Acide nicotinique	100
Thiamine	100
Panthotenate-Ca	100
Dissoudre dans un tampon Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05M

pH 7.

La stérilisation de la solution stock vitamines par filtration (0.22µm).

**Solution oligoéléments : (mg/l)**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	35
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	8
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	40
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	16

La stérilisation de la solution oligoéléments est effectuée par autoclavage.

---

## Annexe 02 :

## Les résultats de la mesure de la densité optique des différents tests

## 1- Source de carbone :

Sucre souche	Glucose	Mannitol	Xylose	Sorbitol	Fructose	Galactose	Lactose	Saccharose
<b>B1</b>	0,076	0,293	0,066	0,067	0,111	0,054	0,128	0,155
<b>B2</b>	0,199	0,623	0,099	0,108	0,167	0,092	0,192	0,217
<b>B3</b>	0,201	0,292	0,017	0,122	0,023	0,186	0,181	0,089
<b>B4</b>	0,242	0,120	0,099	0,016	0,018	0,106	0,169	0,224
<b>D1</b>	0,439	0,131	0,1	0,121	0,012	0,155	0,111	0,023
<b>D2</b>	0,068	0,270	0,054	0,166	0,147	0,140	0,119	0,220
<b>D3</b>	0,090	0,350	0,078	0,174	0,201	0,220	0,126	0,266
<b>SAM</b>	0,204	0,290	0,106	0,619	0,180	0,398	0,118	0,289
<b>F</b>	0,386	0,490	0,095	0,520	0,189	0,356	0,128	0,289
<b>A6</b>	0,364	0,269	0,075	0,705	0,599	0,399	0,157	0,112

## 2- Source d'azote :

Acides aminés Souches	Alanine	Valine	Leucine	Tyrosine	Proline	Lysine
<b>B1</b>	0,241	0,169	0,205	0,103	0,065	0,096
<b>B2</b>	0,539	0,171	0,263	0,158	0,203	0,238
<b>B3</b>	0,371	0,185	0,184	0,082	0,136	0,330
<b>B4</b>	0,271	0,010	0,102	0,096	0,058	0,103
<b>D1</b>	0,039	0,103	0,244	0,156	0,120	0,048
<b>D2</b>	0,431	0,103	0,226	0,196	0,126	0,269
<b>D3</b>	0,265	0,467	0,224	0,206	0,010	0,566
<b>SAM</b>	0,253	0,570	0,103	0,127	0,108	0,194
<b>F</b>	0,285	0,307	0,122	0,115	0,194	0,141
<b>A6</b>	0,349	0,314	0,118	0,110	0,099	0,110

## 3- Effet du pH :

pH Souches	pH.04	pH.05	pH.06	pH.07	pH.08	pH.09
<b>B1</b>	0,166	0,057	0,130	0,231	0,633	0,366
<b>B2</b>	0,674	0,103	0,774	0,710	0,725	0,670
<b>B3</b>	0,076	0,008	0,256	0,327	0,588	0,385
<b>B4</b>	0,713	0,164	0,227	0,562	0,790	0,244
<b>D1</b>	0,152	0,183	0,252	0,319	0,260	0,211
<b>D2</b>	0,007	0,026	0,265	0,628	0,257	0,216
<b>D3</b>	0,104	0,244	0,115	0,478	0,727	0,774
<b>SAM</b>	0,290	0,168	0,653	0,424	0,413	0,331
<b>F</b>	0,249	0,273	0,685	0,369	0,323	0,302
<b>A6</b>	0,280	0,225	0,516	0,315	0,208	0,274

## Annexe 03 :

1- Résultats de la colonisation endomycorhizienne de plante *Mellilotus*

<b>Racines</b>	<b>Mycorhization</b>	<b>Arbuscules</b>
<b>R1</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R2</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R3</b>	Classe 1	Classe A1
<b>R4</b>	Classe 1	Classe A1
<b>R5</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R6</b>	Classe 1	Classe A1
<b>R7</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R8</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R9</b>	Classe 1	Classe A1
<b>R10</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R11</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R12</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R13</b>	Classe 0	Classe A0
<b>R14</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R15</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R16</b>	Classe 1	Classe A1
<b>R17</b>	Classe 0	Classe A0
<b>R18</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R19</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R20</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R21</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R22</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R23</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R24</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R25</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R26</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R27</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R28</b>	Classe 1	Classe A1
<b>R29</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R30</b>	Classe 3	Classe A2

---

**2- Résultats de la colonisation endomycorhizienne de plante *Coronilla***

<b>Racines</b>	<b>Mycorhization</b>	<b>Arbuscules</b>
<b>R1</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R2</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R3</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R4</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R5</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R6</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R7</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R8</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R9</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R10</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R11</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R12</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R13</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R14</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R15</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R16</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R17</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R18</b>	Classe 1	Classe A1
<b>R19</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R20</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R21</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R22</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R23</b>	Classe 0	Classe A0
<b>R24</b>	Classe 4	Classe A3
<b>R25</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R26</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R27</b>	Classe 2	Classe A1
<b>R28</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R29</b>	Classe 3	Classe A2
<b>R30</b>	Classe 4	Classe A3

---

## Annexe 04 :

## Résultats de l'humidité du sol des deux plantes

Poids du sol (g) N° de fois	Coronilla	Mellilotus
1	141,12	135,21
2	140,73	134,89
3	140,39	134,66
4	139,92	134,33
5	139,62	134,11
6	139,39	133,94
7	139,15	133,77
8	138,85	133,61
9	138,47	133,38
10	138,16	133,20
11	137,70	132,92
12	137,38	132,69
13	137,25	132,61
14	137,17	132,55
15	137,01	132,46
16	136,98	132,43
17	136,82	132,30
18	136,78	132,28
19	136,74	132,23
20	136,74	132,23

## Annexe 05

## Résultats sur YMA + BTB

	24H		48 H	
	Croissance	Virage de couleur	Croissance	Virage de couleur
<b>B1</b>	-	-	++	+
<b>B2</b>	-	-	++	++
<b>B3</b>	-	-	+	++
<b>B4</b>	-	-	++	++
<b>D1</b>	-	-	++	++
<b>D2</b>	-	-	++	+
<b>D3</b>	-	-	-	+
<b>SAM</b>	++	++	+++	++
<b>F</b>	+++	++	+++	++
<b>A6</b>	++	+	++	++

+++ : Très bonne croissance, ++ : Bonne croissance, + : Faible croissance, - : Absence de croissance

## Annexe 06

## Résultats du teste mannitol mobilité

	24H		48 H	
	Mobilité	Fermentation	Mobilité	Fermentation
<b>B1</b>	-	-	+	+
<b>B2</b>	+	-	++	++
<b>B3</b>	+	-	++	++
<b>B4</b>	-	-	+	-
<b>D1</b>	-	-	+	-
<b>D2</b>	+	-	++	+
<b>D3</b>	-	-	+	+
<b>SAM</b>	++	+++	++	+++
<b>F</b>	+	++	++	+++
<b>A6</b>	++	+	++	++

+++ : Très bonne croissance/virage, ++ : Bonne croissance/virage, + : Faible croissance/virage, - : Absence de croissance/virage