

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 *Scorpiurus* et *Hedysarum***

---

Présenté par :

Fadlia Awatif

Khemissi Lwiza

Devant la commission composée de :

Athamnia M  
Torche A  
Benbelkacem S  
Ayad H  
Drif F  
Mairif S

Président  
Encadreur  
Examineur  
Membre  
Membre  
Membre

Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma

Juin 2017

# Remerciements

Nous nos remercies tout d'abord le bon Dieu qui nos 'a donné le courage et la patience pour terminer ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance et notre gratitude à madame **Asma TORCHE**, pour avoir joué le rôle d'un encadreur, qui nous a guidés et encouragés pendant ces mois à la réalisation de notre mémoire, elle nous a aidés méthodologiquement et scientifiquement et en partageant nos idées.

Nous remercions tous les membres de la commission, d'accepter de juger notre travail.

Nous tiens également à remercier M<sup>me</sup>. **KHALLEF** et Ms. **NEDJAH** qui nous aident pendant la réalisation de ce travail.

Nos sincères remerciements vont également à toute l'équipe du service du laboratoire du département science de la nature et de la vie pour leurs précieuses aides et collaborations et surtout M<sup>me</sup>. **Hassiba** et M<sup>me</sup>. **Wafa**.

Un grand merci à nos parents, pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, à la fois moral et économique, qui nos 'a permis de réaliser les études que nous voulais et par conséquent ce mémoire.

Enfin nous voulons remercier aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à nos recherches et à l'élaboration de ce mémoire.

# *Dédicace*

- ✍ *Je dédie ce modeste travail :*
- ✍ *A Mes chères frères WALID et KOSSAY et Ma belle sœurs DJIHAD, et toute la famille sans exception.*
- ✍ *A mon binôme AWATEF pour leurs soutiens et son patience Pendant la période de réalisation de mémoire.*
- ✍ *A Mes collègues IMEN, AICHA, NAWEL, AMEL, FATMA.*
- ✍ *A tous ceux qui m'ont aidé durant ma vie universitaire.*
- ✍ *A tous la promotion BMP.*

∞ *LUIZA* ∞



# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A Ma mère Khammissa, mes sœurs et mon frère*

*Et à toute ma famille*

*A lwiza pour leurs soutiens et son patience Pendant la  
période de réalisation de mémoire.*

*Aussi à Aicha et Imane*

*A mes amies Aicha, Besma, Khadidja, Khawla, Najwa,  
Salima, Wissame et Zahra.*

*A tous ceux qui m'ont aidé durant ma vie universitaire.*

*Ainsi qu'à tous mes amis et camarades de promotion.*

*Awatef*



## Résumé

Ce travail a été réalisé pour objectifs d'apporter une contribution à l'étude des symbioses bactériennes et mycorhiziennes chez les deux plantes légumineuses *Scorpiurus* et *Hedysarum* dans la région de Guelma.

Les bactéries isolées à partir des nodules de ces légumineuses sont caractérisés par une étude morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique. La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée pour déterminer le profil des plasmides des isolats.

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, *Scorpiurus*, *Hedysarum*, *Rhizobium*, mycorhize.

## Summary

The objective of this work was to make a contribution to the study of bacterial and mycorrhizal symbioses in the two legume plants *Scorpiurus* and *Hedysarum* in the region of Guelma.

Bacteria isolated from nodules of these legumes are characterized by morphological study followed by phenotypic characterization. The agarose gel electrophoresis technique is performed to determine the plasmid profile of the isolates.

The study of the micro-symbiosis mycorrhizal is carried out by the detection and estimation of mycorrhizal colonization in both plants.

We have also done a soil study by physico-chemical analyses of soils in study areas.

The results show that the bacterial isolates have the description of the Rhizobia and possess the symbiotic plasmid characteristic of these bacteria.

Mycorrhizal colonization is of the type Endomycorhize arbuscular, with high frequency and arbuscular content.

The results of the soil analysis explain the distribution of the plant species as well as the type of the associated partners.

**Key words:** Symbiosis, legumes, *Scorpiurus*, *Hedysarum*, *Rhizobium*, Mycorrhiza.

## المخلص

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

*Scorpiurus* و *Hedysarum* المتواجدة في منطقة قالمة.

دراسة المتعايش الدقيق البكتيري تم عن طريق دراسة مرفولوجية متنوعة 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، البقوليات، *Hedysarum*، *Scorpiurus*، *Rhizobiums*، Mycorrhizes

# Sommaire

<b>Introduction</b> -----	1
<b>Chapitre1 : Revue bibliographique</b>	
1. Les interactions microbiennes-----	3
1.1. Les interactions négatives -----	3
1.1.1. Le parasitisme-----	3
1.1.2. La compétition -----	3
1.2. Les interactions positives-----	4
1.2.1. Le mutualisme -----	4
1.2.2. Le commensalisme -----	4
1.2.3. La symbiose -----	4
2. Interactions symbiotiques : plantes légumineuses -microorganismes -----	5
2.1. Les plantes légumineuses-----	5
2.1.1. Classification des légumineuses -----	5
2.1.1.1. Les Caesalpinoideae-----	5
2.1.1.2. Les Mimosoideae -----	6
2.1.1.3. Les Faboideae -----	6
2.1.2. La plante légumineuse <i>Scorpiurus</i> -----	6
2.1.3. La plante légumineuse <i>Hedysarum</i> -----	7
2.2. Le partenaire microbien mycorhizien-----	9
2.2.1. Les ectomycorhizes -----	9
2.2.2. Les ectendomycorhizes -----	10
2.2.3. Les endomycorhizes-----	10
2.3. Interaction plantes légumineuses – Mycorhizes-----	11
2.3.1. Les molécules signal dans l'établissement de la symbiose mycorhizienne -----	12
2.3.2. Les différents stades de développement de l'interaction-----	13
2.3.2.1. La phase a-symbiotique -----	13
2.3.2.2. La phase pré-symbiotique-----	13
2.3.2.3. L'étape symbiotique -----	13
2.3.3. Facteurs limitant la mycorhization-----	14
2.4. Le partenaire microbien bactérien-----	15
2.5. Interaction plantes légumineuses – Bactéries-----	17
2.5.1. Caractéristiques du couple : infectivité, efficacité et spécificité -----	18
2.5.2. La nodulation-----	19
2.5.2.1. Morphologie des nodules-----	19



2.5.2.2. Génétique de la nodulation chez la bactérie -----	20
2.5.2.3. Génétique de la nodulation chez la plante -----	22
2.5.2.4. Les étapes de la nodulation -----	22
3. La symbiose tripartite : légumineuse mycorhizes et bactéries -----	24
3.1. Historique de la symbiose tripartite-----	24
3.2. Intérêt de la symbiose tripartite-----	25

## **Chapitre 03: Matériel et Méthodes**

1. Site d'échantillonnage des plantes-----	27
2. Analyse physico-chimique de sol-----	27
2.1. Détermination de l'humidité relative -----	27
2.2. Potentiel d'Hydrogène (pH)-----	28
2.3. Conductivité électrique (CE) et Salinisation-----	28
2.4. Potentiel d'oxydoréduction -----	28
2.5. L'oxygène dissout -----	28
3. Isolement et caractérisation des bactéries à partir des nodules des plantes légumineuses <i>Scorpiurus</i> et <i>Hedysarum</i> -----	28
3.1. Collecte des nodules -----	28
3.2. Conservation des nodules -----	29
3.3. Stérilisation des nodules -----	29
3.4. Isolement des bactéries à partir des nodules -----	30
3.5. Conservation des souches -----	31
3.6. Les caractères cultureux et morphologiques-----	31
3.7. Examen microscopique par la coloration de Gram -----	31
3.8. Examen de la mobilité -----	31
3.9. Test du 3-cétolactose (Bernaerts et De Ley, 1963) -----	32
3.10. Caractérisation phénotypique des isolats -----	33
3.10.1. Tests nutritionnels-----	33
3.10.1.1. Utilisation de la source de carbone (Jordan, 1984)-----	33
3.10.1.2. Source d'azote-----	33
3.10.2. Hydrolyse de l'urée-----	33
3.10.3. Tests physiologiques-----	33
3.10.3.1. Tolérance au NaCl -----	33
3.10.3.2. Température de croissance -----	33
3.10.3.3. Effet de pH-----	34

3.10.4. Résistance aux antibiotiques-----	34
3.11. Extraction de l'ADN plasmidique des isolats-----	34
3.12. Electrophorèse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose -----	35
3.12.1. Préparation du gel d'agarose -----	35
3.12.2. Dépôt des échantillons et migration électrophorétique -----	36
4. Etude des mycorhizes associées aux plantes légumineuses <i>Hedysarum et Scorpiurus</i> -----	36
4.1. La collecte des racines -----	36
4.2. Coloration des racines (Philips et Hayman, 1970)-----	36
4.2.1. Coloration au bleu de Méthylène-----	37
4.2.2. Coloration à l'encre noire -----	37
3.2. Estimation de la mycorhization-----	37

### **Chapitre 03: Résultats et Discussions**

1. Caractères physico-chimiques des sols -----	40
2. caractérisation des bactéries à isolées partir des nodules des plantes légumineuses <i>Scorpiurus et Hedysarum</i> -----	41
2.1. Les caractères culturaux et morphologiques des isolats -----	41
2.2. Examen microscopique par la coloration de Gram -----	42
2.3. Examen de la mobilité -----	43
2.4. Test du 3-cétolactose-----	43
2.5. Caractérisation phénotypique des isolats-----	44
2.5.1. Tests nutritionnels -----	44
2.5.1.1. Utilisation de la source de carbone-----	44
2.5.1.2. Source d'azote -----	45
2.5.2. Hydrolyse de l'urée -----	45
2.5.3. Tests physiologiques -----	46
2.5.3.1. Tolérance au NaCl-----	46
2.5.3.2. Température de croissance -----	46
2.5.3.3. Effet de pH -----	47
2.5.4. Résistance aux antibiotiques -----	48
2.6. Détermination du profil plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose-----	49
3. Etude des mycorhizes associées aux plantes légumineuses <i>Hedysarum et Scorpiurus</i> -----	50
<b>Conclusion et perspectives</b> -----	40

## Liste des figures

<b>N de figure</b>	<b>Titre de figure</b>	<b>La page</b>
<b>1</b>	La plante <i>Scorpiurus muricatus ssp</i>	<b>7</b>
<b>2</b>	La plante <i>Hedysarum coronarium</i>	<b>8</b>
<b>3</b>	Principaux types de mycorhizes représentés sur une coupe transversale de la racine	<b>9</b>
<b>4</b>	Structures caractéristiques des champignons mycorhiziens arbusculaires	<b>11</b>
<b>5</b>	Schéma des différents étapes de colonisation des champignons MA	<b>14</b>
<b>6</b>	Structure des nodules de légumineuses.	<b>20</b>
<b>7</b>	Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse.	<b>23</b>
<b>8</b>	Localisation géographique du site d'échantillonnage(Guelma).	<b>27</b>
<b>9</b>	Conservation des nodules	<b>29</b>
<b>10</b>	Ensemencement par la technique des quatre cadrans	<b>30</b>
<b>11</b>	Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire.	<b>39</b>
<b>12</b>	Echelle d'évaluation de la présence arbusculaire.	<b>39</b>
<b>13</b>	croissance sur le milieu YMA de la souche A1 de <i>Scorpiurus</i> et de la souche C3 d' <i>Hedysarum</i>	<b>41</b>
<b>14</b>	croissance sur le milieu YMA-RC	<b>41</b>
<b>15</b>	croissance sur le milieu YMA-GPA/BCP	<b>42</b>
<b>16</b>	croissance des souches sur le milieu BTB	<b>42</b>
<b>17</b>	Examen microscopique par la coloration de Gram.	<b>43</b>
<b>18</b>	test de 3-cétolactose	<b>44</b>
<b>19</b>	Utilisation des sucres	<b>44</b>
<b>20</b>	Utilisation de la source d'azote	<b>45</b>
<b>21</b>	Effet de PH sur la croissance des souches	<b>48</b>
<b>22</b>	le profil électrophorétique des plasmides symbiotiques	<b>49</b>
<b>23</b>	Quelques aspects de la colonisation par les champignons endomycorhiziens colorés en bleu de méthylène	<b>50</b>
<b>24</b>	Quelques aspects de la colonisation par les champignons endomycorhiziens colorés en ancre noire	<b>51</b>
<b>25</b>	les calculs de différents paramètres des mycorhizes chez <i>Scorpiurus</i>	<b>51</b>
<b>26</b>	les calculs de différents paramètres des mycorhizes chez <i>Hedysarum</i>	<b>51</b>

## Liste des Tableaux

<b>N de tableau</b>	<b>Titre de tableau</b>	<b>La page</b>
<b>1</b>	Classification courante des rhizobia	<b>16</b>
<b>2</b>	Les souches utilisées dans cette étude	<b>30</b>
<b>3</b>	les différents paramètres de sol mesurés	<b>40</b>
<b>4</b>	résultats de test Mannitol Mobilité	<b>43</b>
<b>5</b>	résultats sur le milieu urée d'Indole	<b>45</b>
<b>6</b>	Effet de NaCl sur la croissance des souches	<b>46</b>
<b>7</b>	Effet de la température 22°C, 30°C, 37°C et 44°C	<b>47</b>
<b>8</b>	Résistance des souches nodulant <i>Hedysarum et Scorpiurus</i> à différents types d'antibiotiques testés.	<b>48</b>

## Les abréviations

<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AM</b>	Endomycorhizes Arbusculaire
<b>ATB</b>	Antibiotiques
<b>BET</b>	Bromure d'éthidium
<b>BTB</b>	Bleu de Bromothymol
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calcium Chloride
<b>CaCo<sub>3</sub></b>	Carbonate De Calcium
<b>CE</b>	Conductivité Electrique
<b>CMA</b>	Champignon mycorhiziens à arbuscules
<b>Cu<sub>2</sub>O</b>	Oxyde cuivreux
<b>EDTA</b>	Ethyl Diamine Tétra acétyle
<b>GPA – BCP</b>	Pourpre de Bromocrésol
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de Mercure
<b>KOH</b>	Hydroxyde de potassium
<b>Myc</b>	Gènes de mycorhization
<b>Nod</b>	Gènes de nodulation
<b>PPA</b>	Appareil De Pré-Pénétration
<b>RC</b>	Rouge Congo
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate De Sodium
<b>TBE</b>	Tris/Borate/EDTA
<b>YMA</b>	Yeast-Mannitol-Agar
<b>YMB</b>	Yeast Mannitol broth



# **Introduction**

## Introduction

Dans la nature, plus que 90 % des végétaux vivent de façons symbiotiques. Il s'agit d'une association durable entre deux ou plusieurs êtres vivants hétérosécifiques et dont chacun tire bénéfice. Au cours des dernières années, une multitude de travaux ont clairement démontré l'intérêt scientifique et pratique de ces symbioses pour l'ensemble des végétaux (Fortin *et al.*, 2008). Les symbiotes s'aident mutuellement à se nourrir, se protéger ou se reproduire (Taktek, 2015).

La majorité des espèces de plantes terrestres possèdent la capacité de former des racines endosymbioses avec plusieurs types de micro-organismes du sol. Ces relations symbiotiques sont bénéfiques pour les deux partenaires et sont basées sur l'amélioration de la nutrition minérale des plantes fournies par les micro-organismes notamment l'azote et phosphore. Les micro-organismes reçoivent en retour des composés contenant du carbone nécessaire à l'appui de leur vie et la croissance, qui sont produits par la photosynthèse de la plante (Denison et Kiers, 2011). Les deux plus importantes symbioses sont formées entre les différentes espèces de légumineuses et les champignons mycorhiziens arbusculaires, et de bactéries rhizobia fixatrices d'azote (Parniske, 2008).

L'interaction plante-bactérie présente un haut niveau de spécificité d'hôte basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires. Les plantes produisent des molécules-signal (flavonoïdes) au niveau de leurs racines. Ce signal, une fois perçu par la bactérie induit l'expression des gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod. Ceux-ci sont des signaux de la nodulation ciblant le programme organogénique de la plante et conduisant à la formation des nodules (Gage, 2004).

Actuellement, on définit les mycorhizes comme étant des associations symbiotiques entre la racine d'une plante verte et un champignon filamenteux. Cette association mutualiste joue un rôle prépondérant dans le fonctionnement des écosystèmes végétaux (Fortin *et al.*, 2008). On les trouve dans de nombreux environnements et leur succès écologique reflète une forte diversité des capacités génétiques et physiologiques des champignons endophytes (Bonfante et Anca, 2009). L'association racine-champignon est basée sur des profits réciproques et des échanges bilatéraux d'éléments nécessaires au bon développement des deux partenaires. Les symbioses mycorhiziennes jouent un rôle essentiel dans l'absorption des nutriments dans les écosystèmes terrestres : en effet, les champignons, grâce à leur structure



mycélienne, fournissent des éléments minéraux et de l'eau à la plante, en échange de squelettes carbonés issus de la photosynthèse (Taktek, 2015).

Depuis des millions d'années, ces deux types de symbioses présentés ci-dessus jouent un rôle considérable dans le fonctionnement des écosystèmes naturels et dans la nutrition phosphatée et azotée des plantes. Ces dernières années, des 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).

L'objectif de notre étude est l'identification des bactéries associées aux nodules de la légumineuse fourragère *Hedysarum et Scorpiurus* et la détection des champignons mycorhizienne arbusculaire présentent dans les systèmes racinaires de ces plantes.

Ce travail est structuré en quatre parties : La première partie est une synthèse bibliographique regroupant les principales informations sur la symbiose racinaire légumineuses - *Rhizobiums* - mycorhizes. La deuxième partie concerne le chapitre Matériel et méthodes. Les principaux résultats et leur discussion sont regroupés dans la troisième partie et la dernière partie présentera une conclusion qui récapitule les connaissances acquises lors de ce travail ainsi que les perspectives.

# **Chapitre 1**

## **Revue bibliographique**

## **1. Les interactions microbiennes**

Un écosystème regroupe l'ensemble des organismes de la faune et de la flore vivants au sein d'un milieu, ainsi que les différentes composantes abiotiques avec lesquelles ils interagissent. Au sein de l'écosystème, les organismes vont interagir entre eux et avec le milieu, impliquant un réseau de flux de matières (eau et nutriments) et d'énergie (chaleur, CO<sub>2</sub>) dépendants des conditions abiotiques (Legay, 2013).

Il s'instaure deux types des relations ou interactions microbiennes : interactions négatives et autre positives [1].

### **1.1. Les interactions négatives**

#### **1.1.1. Le parasitisme**

Il s'agit d'une relation où l'un des deux partenaires tire profit de l'autre, et où l'hôte est habituellement lésé. Cela peut comprendre un prélèvement de nourriture sur l'hôte, et/ou l'installation physique dans ou sur l'hôte. Dans le parasitisme, parasite et hôte coexistent en association jusqu'à un certain degré. Selon l'équilibre établi entre les deux organismes, cette coexistence peut varier et passer d'une relation parasite stable à une relation pathogène qui peut être considérée comme une prédation (Prescott et *al.*, 2003).

#### **1.1.2. La compétition**

Signifie la lutte pour une même ressource (nourriture, habitat) présente en quantité insuffisante dans le milieu pour satisfaire les espèces concernées (Renouf, 2006). Chez les microorganismes, la compétition concerne bien d'avantage les éléments nutritifs que l'espace vital. On peu considérer cependant qu'il y a bien compétition pour l'espace lorsque des parasites ou des symbiotes sont en concurrence pour des sites de pénétration, à la surface d'un organe végétal : la compétition entre souches de *Rhizobium* pour la nodulation des racines d'une légumineuse (Branger, 2012).

## **1.2. Les interactions positives**

### **1.2.1. Le mutualisme**

Du latin *mutus* signifie réciproque, définit la relation dans laquelle un certain bénéfice réciproque revient aux deux partenaires. Il s'agit d'une relation obligatoire, où le mutualiste et l'hôte dépendent métaboliquement l'un de l'autre (Prescott et *al.*, 2003).

### **1.2.2. Le commensalisme**

Est une relation dans laquelle une espèce tire profit de l'association, alors que l'autre n'y trouve ni avantage ni inconvénient (mousse sur les troncs d'arbres) (Prescott et *al.*, 2003).

### **1.2.3. La symbiose**

Est une association indissociable entre deux espèces (Branger, 2012). Le mot symbiose fut utilisé pour la première fois par l'allemand Frank (1877) pour qualifier la coexistence d'organismes différents.

La définition de la symbiose a toujours fait l'objet de débats dans la communauté scientifique. En 1876, Anton de Bary définit la symbiose comme une association spécifique durable entre deux espèces, cette notion incluant le mutualisme (les deux partenaires tirent bénéfice de l'association), le commensalisme (seulement un des deux partenaires tire bénéfice de l'association, l'autre n'en tire aucun avantage ni inconvénient) et le parasitisme (seulement un des deux partenaires tire bénéfice de l'association, l'autre en tire un inconvénient).

De nos jours, les notions de mutualisme et de symbiose sont d'ailleurs largement confondues. Récemment, de nouvelles tentatives de définition ont vu le jour. Douglas (1994) affirme que le dénominateur commun de la symbiose n'est pas un bénéfice mutuel mais une nouvelle compétence métabolique, acquise par l'un des partenaires. D'autre, ajoute que la symbiose est l'acquisition par un organisme d'un ou plusieurs autres organismes, qui lui confèrent un avantage, si bien que l'association est maintenue par la sélection naturelle. Cette acquisition aboutit à un nouveau métabolisme, et induit la formation d'une nouvelle structure ou organe, dédiée à héberger le symbiote [2].

Actuellement, de très nombreuses études ont démontré que la symbiose est un phénomène universellement répandu au travers des règnes biologiques. Les deux partenaires de la symbiose sont appelés l'hôte (le plus gros des deux) et le symbiote (le plus petit des

deux) [2]. L'un des exemples de cette relation est la symbiose racinaire des plantes légumineuse et microorganismes (Mycorhizes et *Rhizobiums*).

## **2. Interactions symbiotiques : plantes légumineuses - microorganismes**

Les interactions entre les microorganismes et la plante dans la rhizosphère sont nombreuses et variées. Les microorganismes en présence exercent une grande influence sur plusieurs mécanismes responsables de la santé et de la croissance des plantes (Harrison, 2005). L'interaction entre la plante et les microorganismes, au sein de la rhizosphère, est donc basée sur des échanges trophiques impliquant des coûts et des bénéfices pour chaque partenaire. En effet, les composés échangés entre les deux partenaires représentent des coûts pour celui qui les produit mais un bénéfice pour celui qui les reçoit (Lepinay, 2013). Les plus connus sont les interactions microbiennes bénéfiques avec les champignons mycorhiziens (80% de toutes les espèces de plantes terrestres forment des relations symbiotiques avec les mycorhizes), et les bactéries *Rhizobiums* (Harrison, 2005).

### **2.1. Les plantes légumineuses**

Les légumineuses représentent une des familles les plus importantes et les plus variées des Angiospermes avec 750 genres et environ 20 000 espèces réparties sur une aire géographique diversifiée (Cronk et al., 2006). Ce sont des plantes Eudicotylédones appartenant à l'ordre des Fabales, ordre appartenant à la famille des Fabacées (Cheriet, 2016).

#### **2.1.1. Classification des légumineuses**

Les Fabacées sont divisées en trois sous-familles: Caesalpinoideae, les Mimosoideae et les Papilionoideae ou Faboideae (Doyle et Luckow, 2003).

##### **2.1.1.1. Les *Caesalpinoideae***

Sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. 23 % seulement des espèces parmi celles examinées, sont connues pour être nodulées par les rhizobia (Sebihi, 2008).

### 2.1.1.2. Les Mimosoideae

Elles ont de très nombreuses petites fleurs en grappes serrées à nombreuses étamines saillantes en dehors des petits pétales (Young *et al.*, 2011). Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (Glycine, Acacia,...) (Maxted et Bennett, 2001).

### 2.1.1.3. Les Faboideae

Elles regroupent la plus grande diversité avec plus de 12 000 espèces de Légumineuses tropicales ou tempérées, dont celles présentant un intérêt agronomique majeur comme Glycine max (Soja), *Phaseolus vulgaris* (Haricot) (Sebihi, 2008). Parmi les 21 % d'espèces déjà examinées la grande majorité (97%) est nodulées (pois, haricot, fève,...) par les rhizobia (Maxted et Bennett, 2001).

### 2.1.2. La plante légumineuse *Scorpiurus*

*Scorpiurus* est une plante dicotylédone appartenant à la famille des légumineuse et la sous famille des Papilionacées, et au genre *Scorpiurus*. La classification du *Scorpiurus* étudiée par plusieurs auteurs, indique que jusqu'à nos jours, pas de nomenclature claire concernant ces espèces et reste cependant très confuse, en particulier pour l'espèce *Scorpiurus muricatus* en raison de l'existence d'un polymorphisme morphologique. De ce fait de nombreuses classifications sont proposées se basant essentiellement sur l'étude de caractères morphologiques (Hamdani, 2001).

*Scorpiurus* est une plante annuelle, autogame. Elle présente au stade plantule de grands cotylédons qui prennent l'aspect d'un axe dressé, lancéolé et atténué progressivement en pétiole. Les premières feuilles qualifiées de primordia foliaires sont entières et sont disposées sur une courte hypocotyle en rosette lâche. La tige est rampante et dont la taille peut atteindre les 40 à 50 cm de longueur avec un large recouvrement végétal. Les feuilles sont grandes, entières et de forme ovales (Bensalem *et al.*, 1990). La floraison débute vers le mois de mars et s'étend jusqu'à mai. Les graines en nombre de (9 à 11) sont pourvues d'un tégument très dur causant ainsi la dormance tégumentaire (Battandier et Trabut, 1890). La différenciation morphologique entre les espèces est généralement décelable au moment où les plantes atteignent le stade adulte.

Bien que l'origine de *Scorpiurus* soit obscure et sa classification peu claire. C'est une espèce très connue par les agriculteurs communément appelés cheniettes, Tagourit ou El

ghagfa. Elle est citée comme mauvaise herbe. On signale sa répartition dans le monde entier. On la rencontre, en plus du Nord africain, en Australie, en Amérique du nord et aussi sur le bassin méditerranéen (les Iles Canaries, Sud du Portugal, l'Espagne, Centre de l'Italie, Malta, Sud-ouest de la France, la Grèce) ; dont les conditions pédoclimatiques diffèrent d'une espèce à une autre (Hamdani, 2001).

En Algérie, certains auteurs comme Battandier et Trabut, (1890) trouvent que les espèces *Scorpiurus vermiculatus* et *Scorpiurus muricatus ssp subvillosus* sont présent pratiquement dans toute la partie Tell de l'Algérie. Ils poussent préférentiellement bien dans les régions bien arrosées, de faibles altitudes, sur sol à texture fine et pauvre en calcaire total. Alors que d'autres, limitent leurs présence aux zones de pâturages de type argileux, et sablonneux des plaines et plus rarement sur les régions des bases montagnes (Hamdani, 2001).

C'est un genre qui possède d'énormes qualités et fait actuellement l'objet de nombreuses études (Saadi et Hamdani, 2007). Selon M'hammedi Bouzina (1992), les espèces du genre *Scorpiurus* L., très recherchées par le cheptel, jouent un rôle important dans l'amélioration des parcours et concourent au maintien de la fertilité des sols. à cela s'ajoute aussi la qualité nutritive de ces graines.



**Figure 01** : la plante *Scorpiurus muricatus ssp* [3]

### **2.1.3. La plante légumineuse *Hedysarum***

Le genre *Hedysarum* L. est un groupe d'espèces fourragères spontanées appartenant à la famille des Fabaceae, il renferme des espèces annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames. Ce genre regroupe diverses espèces qui se différencient entre autres par la morphologie, le mode de reproduction, le cycle biologique, les aires de répartition ainsi que les caractéristiques bioclimatiques (Abdellaoui, 2014).

Les plantes de ce genre sont d'une manière générale constituée d'un appareil souterrain robuste portant de nombreuses nodosités fixatrices d'azote et d'un système aérien à rameaux dimorphes : tige principale « orthotrope » et ramification latérales « plagiotropes ».

Selon Quezel et Santa (1962), le genre *Hedysarum* L (sainfoin), se caractérise par : calice en cloche, à 5 dents égales ou inégales. Pétales à onglet très court. Carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité. Etamines diadelphes (9- 1), à tube fendu en dessus. Gousse aplatie, divisée en articles monospermes ovales, orbiculaires ou quadrangulaires, se séparant à maturité. Feuilles imparipennées à deux stipules latérales.

L'aire de distribution du genre *Hedysarum* est l'Europe tempérée, les régions méditerranéennes de l'Afrique du nord (Abdellaoui, 2014). En Algérie ce genre comporte dix espèces, parmi lesquelles sont des endémiques très localisés, comme *Hedysarum perrauderianum* et *H. naudinianum* qui ne se trouve qu'en Algérie (Quezel et Santa, 1962 ; Torche, 2014), l'exploitation de *Hedysarum*, en Algérie, en tant que plante de pâturage, est restée très limitée ; alors que dans les autres pays, tels que l'Italie et l'Espagne, des programmes d'amélioration conduisent à la sélection de certaines variétés. Ces espèces d'intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Sebihi, 2008).



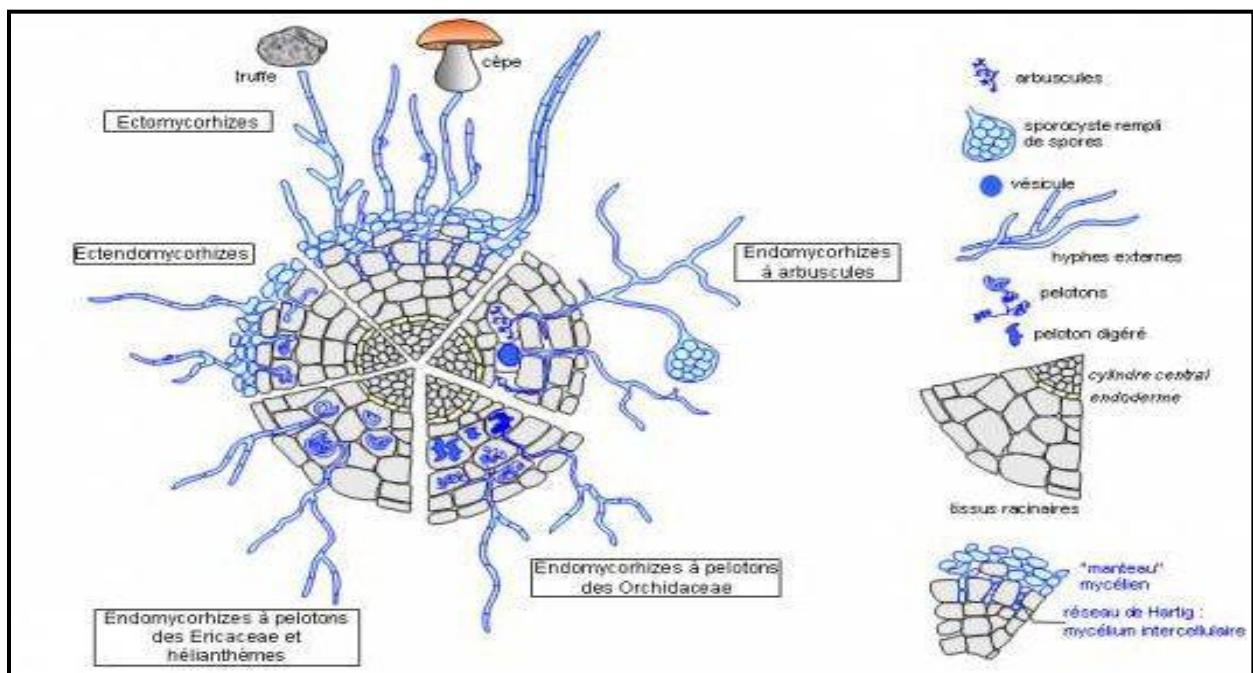
**Figure 02** : la plante *hedysarum coronarium* [4]



## 2.2. Le partenaire microbien mycorhizien

Les mycorhizes sont des micro-organismes du groupe des champignons vivant en symbiose avec les racines aussi bien des plantes supérieures que des herbacées comme les légumineuses. Ce sont des organismes asexués et symbiontes obligatoires qui, 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 (Agnoro, 2008).

D'après la morphologie, on distingue différents types de mycorhizes (figure 03) :



**Figure 03** : Principaux types de mycorhizes représentés sur une coupe transversale de la racine (D'après LeTacon, 1985).

### 2.2.1. Les ectomycorhizes

Du grec *ektos* : à l'extérieur chez lesquelles les champignons se développent essentiellement autour de la racine, en formant un manchon mycélien; de ce manteau part un réseau d'hyphes qui se développe entre les cellules corticales de la racine (réseau de Hartig) sans jamais entrer à l'intérieur de ces dernières (Abbas, 2014). Ce type d'association est représenté surtout chez les essences forestières des régions tempérées et de la forêt boréale, mais il a été décrit aussi chez quelques espèces tropicales (Redhead, 1980). Les champignons

ectomycorhiziens appartiennent surtout aux Basidiomycètes (Bolets, Russules, Laccaire, etc) mais aussi aux Ascomycètes et rarement aux Zygomycètes (Endogone) (Abbas, 2014).

### **2.2.2. Les ectendomycorhizes**

Il arrive que les ectomycorhizes et les endomycorhizes soient présents en même temps sur une racine, on parle alors d'ectendomycorhizes, caractérisées à la fois par la présence du manteau mycélien et le développement d'hyphes inter et intracellulaires ; elles se rencontrent chez les Arbutacées, les Monotropacées et sont formées par des Basidiomycètes (Cortinarius, Boletus, etc) (Abbas, 2014).

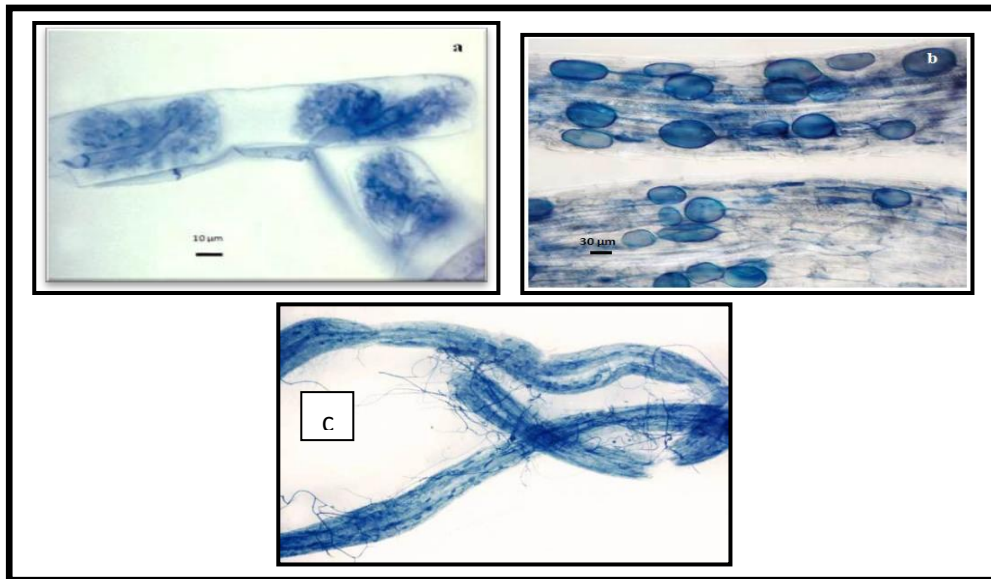
### **2.2.3. Les endomycorhizes**

Du grec endon : à l'intérieur, sont caractérisées par l'absence de manchon mycélien externe et par la pénétration des hyphes fongiques dans les cellules corticales (Abbas, 2014), ne se cultivent pas et ne sont pas visibles qu'après coloration.

Il existe trois types d'endomycorhizes (Hamza, 2014) :

- Les endomycorhizes arbutoides des Ericacées.
- Les endomycorhizes orchidoides des Orchidées.
- Les endomycorhizes à arbuscules.

Parmi les associations endomycorhiziennes, sont les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) qui sont de loin les plus répandues à la surface du globe. Ils se sont adaptés à de nombreux environnements et différentes plantes hôtes. Ils peuvent former des associations mutualistes avec les racines fines d'environ 80 % de toutes les plantes terrestres. Le terme arbuscule réfère à une structure microscopique unique que développent ces champignons dans les cellules corticales des racines. Le champignon mycorhizien à arbuscule forme plusieurs structures à l'intérieur des racines, principalement des arbuscules, des vésicules des spores et des hyphes non spécialisés (Figure 04) (Hamza, 2014).



**Figure 04** : Structures caractéristiques des champignons mycorhiziens arbusculaires. (a) Arbuscules intercellulaires (b) vésicules intraradiculaires (c) hyphes extraradiculaires [5]

### 2.3. Interaction plantes légumineuses – Mycorhizes

La symbiose mycorhizienne ou la mycorhization est une association entre les plantes de la famille des légumineuses et des mycorhizes. Littéralement, il veut dire "champignon/racine" (du grec mukês : champignon, et rhiza : racine) (Abbas, 2014). La mycorhization est un phénomène universel présent dans tous les types de sol et sous tous les climats (Laurence, 2014).

Les mycorhizes contribuent à l'absorption des éléments nutritifs par les plantes, particulièrement du phosphore, qui est un élément nutritif indispensable à la croissance des plantes, il s'agit donc d'un avantage nutritif très significatif pour le développement des végétaux. Les mycorhizes permettent à la plante de bénéficier d'une meilleure absorption du phosphore grâce au réseau d'hyphes du champignon qui colonisent le sol et qui offrent un plus grande surface d'absorption avec le substrat. Le réseau d'hyphes s'étend donc à la zone d'appauvrissement de phosphore biodisponible qui se forme rapidement autour des racines, ce qui permet à la plante d'accéder à un grand réservoir de phosphore (Laurence, 2014).

Les mycorhizes jouent un rôle bénéfique dans la fixation de l'azote atmosphérique, en effet les mycorhizes sont souvent associés à d'autres microorganismes bénéfiques pour les plantes, comme les bactéries fixatrices d'azotes ainsi, les champignons mycorhizien

favorisent l'infection des racines par ces bactéries et la formation des nodules qui permettront à la plante d'accéder à l'azote atmosphérique (Laurence, 2014).

L'augmentation de la surface d'absorption du système racinaire par la présence du réseau d'hyphes des champignons mycorhiziens favorise l'absorption de l'eau. Le mycélium des champignons permet à la plante de puiser l'eau de petits interstices qui ne sont habituellement pas accessibles aux racines des plantes, ainsi, les plantes mycorhizées ont tendance à être moins affectées par les périodes de sécheresse (Laurence, 2014).

La présence du mycorhize modifie plusieurs aspects de la plante hôte et de l'environnement qui permettent une meilleure résistance aux stress environnementaux. Les bienfaits apportés par les mycorhizes sur les plantes et leur environnement laissent entrevoir un apport positif pour l'agriculture (Laurence, 2014).

Pour les champignons, il a été démontré qu'il y a un apport des carbohydrates par la plante hôte sous forme de photosynthétats, 4 à 20% de la quantité totale des composés photosynthétisés (Soualmia, 2010).

### **2.3.1. Les molécules signal dans l'établissement de la symbiose mycorhizienne**

L'établissement de la symbiose mycorhizienne passe par la reconnaissance de molécules signal par les deux partenaires. Ces molécules sont des métabolites secondaires et plus particulièrement des composés de type flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont considérés comme les meilleurs candidats car ils sont impliqués dans d'autres types d'interactions plante/micro-organismes, comme dans le cas de la symbiose *Rhizobium*/Légumineuses. Ce sont des composés qui sont, la plupart du temps systémiques des plantes supérieures, retrouvés dans toutes les parties de la plante et donc notamment dans les racines et pouvant être exsudés. Par ailleurs, ils 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 mycorhizien *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. Toutefois, les flavonoïdes ne sont pas les seules molécules pouvant être considérées comme des molécules signal de la symbiose mycorhizienne, les strigolactones appartenant à la classe des terpènes, sont également des composés pouvant induire une germination des spores et une ramification des hyphes fongiques (Vincent, 2010).

Le Champignon va émettre aussi des signaux qui sont reconnus par les racines de la plante hôte et essentiels au succès de l'interaction. Ces signaux sont appelés facteurs Myc, en analogie avec les facteurs Nod des *Rhizobia*. Toutefois, la structure de ces facteurs, au contraire des facteurs Nod, ne sont pas déterminés structurellement. La perception des facteurs Myc par la plante hôte induit des oscillations calciques dans les cellules de l'épiderme racinaire, activant ainsi les gènes liés à la symbiose par l'intermédiaire de canaux calciques pour rétablir la charge à l'intérieur du noyau (Parniske, 2008).

### **2.3.2. Les différents stades de développement de l'interaction**

Il existe trois phases de développement de l'interaction :

#### **2.3.2.1. La phase a-symbiotique**

Sans contact ni échange entre les deux partenaires. Dans des conditions favorables, les spores peuvent germer spontanément et produire un tube germinatif et quelques ramifications primaires sans même avoir besoin de puiser dans leurs réserves lipidiques. De nouvelles germinations peuvent alors être observées, augmentant ainsi les chances du champignon de rencontrer une racine (Bécard *et al.*, 2004).

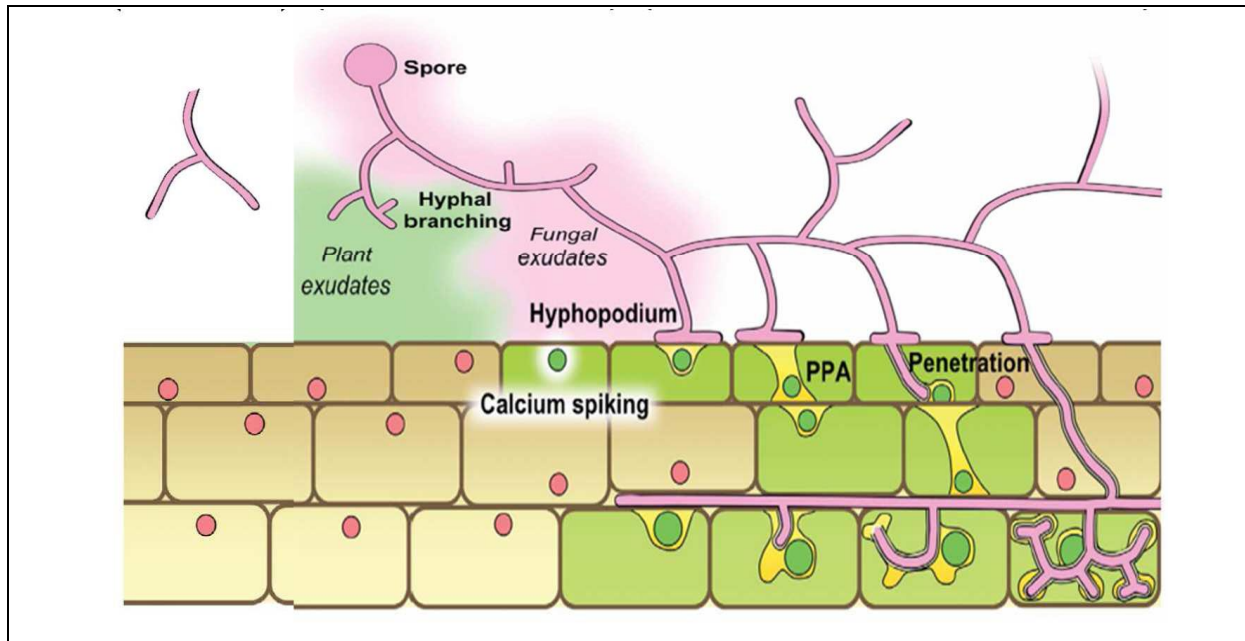
#### **2.3.2.2. La phase pré-symbiotique**

L'échange de signaux moléculaires entre le champignon et la plante hôte par libération de molécules de reconnaissance par les racines flavonoïdes, strigolactones qui induisent la ramification des hyphes fongiques (Bécard *et al.*, 2004).

#### **2.3.2.3. L'étape symbiotique**

Le champignon forme un hyphopode au contact de l'épiderme. Ce dernier représente le point d'accroche du champignon à la racine et son futur point de pénétration. Dans la cellule épidermique située sous l'hyphopode, un appareil de pré-pénétration (PPA) est mis en place qui correspond à un réarrangement polarisé du cytoplasme et du cytosquelette. Il 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 (Genre *et al.* 2005 ; 2008). 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 (figure5)



**Figure 5 :** Schéma des différents étapes de colonisation des champignons MA (adapté d'après Bonfante & Genre 2010)

### 2.3.3. Facteurs limitant la mycorhization

La germination des spores, la formation et le développement des mycorhizes sont influencées par un ensemble de facteurs notamment le pH, l'aération, l'humidité, la température, la lumière, la texture du sol, les éléments minéraux et la matière organique (Abbas, 2014).

L'application d'engrais ou de pesticides peut avoir aussi des effets néfastes sur les populations des champignons à arbuscules (CMA). Cette action est fonction de la substance active, du mode d'action, de la dose utilisée et de la date d'application. Egalement, les métaux lourds peuvent réduire et éliminer, dans certains cas, la colonisation par CMA et la germination des spores de ces champignons au champ (Abbas, 2014). Les travaux de Boyle et Paul (1988) montrent qu'il existe une corrélation négative entre la concentration du Zinc et la colonisation des racines par les CMA dans des sols traités par des boues industrielles.



## 2.4. Le partenaire microbien bactérien

Les rhizobia sont des fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique dans les nodules des racines ou des tiges des plantes légumineuses où ils se différencient en bactéroïdes (Gage, 2004 ; Fossou, 2011).

Les rhizobia sont des bactéries Gram négative (Sato et *al.*, 2005) , strictement aérobies dont l'oxygène est l'accepteur final des électrons d'une longueur de 1,2 à 3,0 µm et une largeur de 0,5 à 0,9 µm, non sporulant. Ces bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire ou deux à six flagelles péritriches (Jordan, 1984) Sur la base de la matière sèche, les cellules des rhizobia contiennent 52 à 55% de carbone et 4 à 5% d'azote (Allen et Allen, 1950).

Les bactéries du genre *Rhizobium* se trouvent sous deux formes :

- **Une forme végétative** (non bactéroïdes) : ce sont des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et/ou dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes (Torche, 2006).
- **Une forme bactéroïdes** : chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différentes enzymes telles que glutamate déshydrogénase, glucose 6-phosphate déshydrogénase, indole-phénol oxydase, nitrate réductase, uréase, adénylate kinase ainsi que d'autres enzymes impliqués dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés. (Cheriet, 2016)

Les critères physiologiques regroupent le taux de croissance de la bactérie sur le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970), la capacité d'utiliser différents carbohydrates et différentes sources d'acides aminés, la tolérance à différentes concentrations en sels et aux variations du pH, la croissance à différentes températures, la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds,...

Parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des rhizobiums, figure la croissance dans le milieu YEM (Vincent, 1970). La première classification des bactéries symbiotiques fixatrices de l'azote en deux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* s'était basée sur ce critère (Jordan, 1984). En fait, les souches à croissance

rapide du genre *Rhizobium* possèdent un temps de génération inférieur à 4 heures et forment des colonies circulaires convexes généralement translucides avec un diamètre de 2 à 4 mm après 3 à 5 jours sous des conditions optimales d'incubation. En revanche, les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* possèdent un temps de génération de 6 à 8 heures et forment des colonies circulaires convexes et rarement translucides avec un diamètre de 1 à 2 mm après 5 à 7 jours d'incubation.

En culture, une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH 6,0 à pH 7,0 (Somasegaran et Hoben, 1994). Les températures extrêmes sont de 4°C et 42,5°C (Cheriet, 2016).

Selon le Bergey's Manuel (Jordan, 1984) les rhizobia appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Gracilicutes, au domaine des Bactérie, à l'embranchement des Proteobacteria, à la classe Alpha, à l'ordre Rhizobiales et à la famille Rhizobiaceae (Tableau 01).

**Tableau 01:** La classification courante des rhizobiums (Weir, 2016)

<i>Rhizobium alamii</i>	Berge et al. (2009)
<i>Rhizobium alkalisolii</i>	Lu et al. (2009b), See note <b>B</b>
<i>Rhizobium azibense</i>	
<i>Rhizobium calliandrae</i>	
<i>Rhizobium cauense</i>	
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	García-Fraile et al. (2007)
<i>Rhizobium daejeonense</i>	
<i>Rhizobium endophyticum</i>	López-López et al. (2011)
<i>Rhizobium etli</i>	
<i>Rhizobium fabae</i>	
<i>Rhizobium freirei</i>	
<i>Rhizobium galegae</i>	See note <b>B</b>
<i>Rhizobium gallicum</i>	
<i>Rhizobium giardinii</i>	
<i>Rhizobium grahamii</i>	
<i>Rhizobium hainanense</i>	
<i>Rhizobium halophytocola</i>	
<i>Rhizobium herbae</i>	Ren et al. (2011b)
<i>Rhizobium huautlense</i>	See note <b>B</b>
<i>Rhizobium indigoferae</i>	
<i>Rhizobium jaguaris</i>	
<i>Rhizobium laguerreae</i>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Type species. See note <b>A</b>
<i>Rhizobium leucaenae</i>	formerly <i>Rhizobium tropici</i> type A strains



<i>Rhizobium loessense</i>	formerly <i>Rhizobium huanglingense</i>
<i>Rhizobium lusitanum</i>	
<i>Rhizobium mayense</i>	
<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin et al. (2009)
<i>Rhizobium miluonense</i>	Gu et al. (2008)
<i>Rhizobium mongolense</i>	
<i>Rhizobium multihospitium</i>	Han et al. (2008)
<i>Rhizobium oryzae</i>	Peng et al. (2008)
<i>Rhizobium paranaense</i>	
<i>Rhizobium petrolearium</i>	
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Confirmed as a species. Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium pisi</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou et al. (2009)
<i>Rhizobium sophorae</i>	
<i>Rhizobium sophoriradicis</i>	
<i>Rhizobium sphaerophysae</i>	
<i>Rhizobium sullae</i>	formerly <i>Rhizobium hedysari</i>
<i>Rhizobium taibaishanense</i>	
<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium tubonense</i>	Zhang et al. (2011)
<i>Rhizobium undicola</i>	formerly <i>Allorhizobium undicola</i>
<i>Rhizobium vallis</i>	
<i>Rhizobium vignae</i>	Ren et al. (2011)
<i>Rhizobium yanglingense</i>	

Note A : *Rhizobium trifolii* est un synonyme ultérieur de *R. leguminosarum*. *R. phaseoli* est une espèce distincte, et certains isolats autrefois connu sous le nom de *R. leguminosarum* sont maintenant *R. pisi*.

Note B : le genre *Neorhizobium* a été créé par Mousavi et al. 2013 y compris *R. alkalisoli*, *R. galegae*, et *R. huautlense*.

## 2.5. Interaction plantes légumineuses – Bactéries

L'association symbiotique entre une plante et la bactérie à bénéfice réciproque donne lieu à une fixation d'azote. La plante fournit les conditions anaérobies et les éléments nutritifs à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qui intégrera les protéines végétales (Torche, 2006). La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine (ou parfois sur la tige) de la plante hôte des structures nommées nodules (Hopkins, 2003).

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. A titre d'exemple, le pois d'Angole (*Cajanus cajan*) qui est cultivé sous les tropiques incluant les régions semi-arides peut satisfaire jusqu'à 96% de ses besoins azotés par le biais de celle-ci (Fossou, 2011). 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).

### **2.5.1. Caractéristiques du couple : infectivité, efficacité et spécificité**

La capacité des bactéries d'infecter les racines de légumineuses et de former des nodules s'appelle "infectivité", alors que le terme "efficacité" donne une indication de la capacité des plantes nodulées à fixer l'azote (Fossou, 2011). Selon les mêmes auteurs, l'infectivité est le résultat de l'interaction de la légumineuse hôte et la souche envahissante.

Toutes les légumineuses ne sont pas capables de noduler et l'efficacité de la nodulation concerne 88 % des espèces examinées (Fossou, 2011). Par ailleurs, les espèces déjà étudiées pour leur aptitude à la nodulation représentent 20 % de l'effectif total des légumineuses connues (Noel, 2009).

La spécificité peut être définie par la diversité taxonomique des partenaires auxquels l'autre symbiote peut s'associer. La spécificité peut être stricte (une seule espèce de bactérie pour un seul genre de légumineuse) ou large, c'est-à-dire concerner plusieurs taxons bactériens ou de légumineuses (Fossou, 2011). En général, chaque légumineuse ne peut être infectée que par un nombre restreint de souches de rhizobia. Concernant les rhizobia, si certains ont une spécificité très restreinte, d'autres par contre ont une très large spécificité d'hôtes.

## 2.5.2. La nodulation

L'association entre les *Rhizobium* et les légumineuses conduit à la formation d'un véritable organe, le nodule encore appelé nodosités au niveau des racines de la plante hôte (Duhooux et Nicole, 2004). La formation de ces nodosités survient quand les rhizobia pénètrent leur hôte d'une manière coordonnée et contrôlée. De nombreux gènes appartenant aussi bien aux bactéries qu'à la plante hôte interviennent au cours de ce processus. La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Figueiredo *et al.*, 2008 ; Lohar *et al.*, 2009 ; Gresshoff *et al.*, 2009 ; Khan *et al.*, 2010).

La présence de nodosités chez les légumineuses est historiquement bien connue, mais leur origine était controversée. Woronin (1866) fut le premier à signaler l'observation des micro-organismes ressemblant aux bactéries dans les nodosités de *Lupinus mutabilis*.

Beyerinck (1888) fournit la première preuve que les bactéries sont à l'origine de la formation de nodosités, en préparant des cultures pures d'organismes provenant de nodosités de *Vicia faba* L. et en infectant avec ces mêmes cultures des plants de fève cultivés sur un sol stérile.

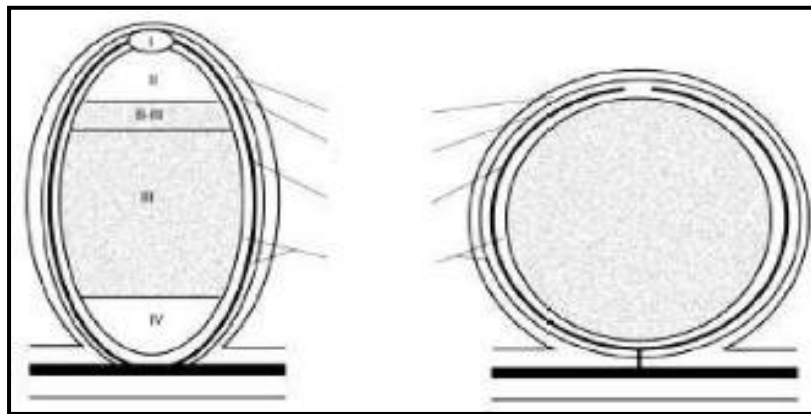
### 2.5.2.1. Morphologie des nodules

Dans la famille des légumineuses, la morphologie des nodules et le type de nodosité développée est déterminé par la plante hôte (Fitouri, 2011). Deux types majeurs de nodosités (Figure 06) sont souvent distingués en se basant sur l'existence ou non du méristème persistant:

- **Nodosités à forme indéterminée** où l'activité méristématique se maintient. De nouvelles cellules apicales sont continuellement infectées. Cela résulte en une forme cylindrique de la nodosité. Ces nodosités sont connues chez les légumineuses des zones tempérées (sulla, pois, *Vicia sp.*, *Medicago sativa* L., etc...).
- **Nodosités à croissance déterminée** où l'activité méristématique cesse tôt. Les cellules infectées engendrent d'autres cellules infectées et la nodosité en grandissant par expansion acquiert une forme sphérique. Ce type de nodosité existe seulement chez les légumineuses des zones tropicales telles que le soja et le haricot (Hirsch *et al.*, 2001).

Les deux types de nodosités partagent la même organisation générale se basant sur l'existence d'un tissu central entouré par plusieurs tissus périphériques. Le tissu central contient à la fois les cellules infectées par les rhizobiums et d'autres non. Les tissus périphériques sont formés essentiellement par un cortex interne et un autre externe séparés par l'endoderme nodulaire (Fitouri, 2011).

Un troisième type intermédiaire a été identifié chez les espèces du genre *Lupinus* et *Sesbania*. Les divisions cellulaires se font dans le cortex externe ou interne, conduisant à la formation de nodosités déterminées ou indéterminées (Hirsch *et al.*, 2001).



**Figure 06:** Structure des nodules de légumineuses. A: nodule de type indéterminé. B: nodule de type déterminé. I: zone méristématique; II: zone d'infection; II-III: interzone II-III; IV: zone de sénescence. (Fitouri, 2011).

### 2.5.2.2. Génétique de la nodulation chez la bactérie

En général, trois types de gènes symbiotiques interviennent dans le processus de nodulation et de fixation azotée chez la bactérie. Il s'agit des **gènes *nod*** nécessaires à la nodulation, des **gènes *nif*** codant pour la nitrogénase et des **gènes *fix*** indispensables pour la fixation de l'azote. Chez la plupart des rhizobia (*Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Sinorhizobium* *etc.*), ces gènes symbiotiques sont situés sur un plasmide symbiotique appelé **pSym** (Noel, 2009 ; Khan *et al.*, 2010). La taille et le nombre des **méga plasmides** varient entre les espèces (Hartmann et Amarger, 1991; Al Hilali, 2006 ; Laranjo *et al.*, 2014).

Les premières méthodes d'extraction plasmidique utilisées chez *Rhizobium* (Facon, 1983) ont mis en évidence des plasmides dont les masses moléculaires sont comprises entre 30 et 200 Méga daltons. Mais les contraintes physiques inhérentes à ces méthodes excluaient la détection de tout ADN plasmidique de grande taille. Certaines souches de rhizobium semblaient dépourvues de plasmide, d'autres présentaient de manière irrégulière des

plasmides dont les masses moléculaires dépassaient celles que l'on observait habituellement. Des méthodes beaucoup plus douces ont depuis révélé la présence de "Mégaplasmides" (masse moléculaire > 500 Mdal.) chez *Rhizobium meliloti* (Facon, 1983 ; Young et al., 2006 ; Laranjo et al., 2014).

### **A- Gènes *Nod***

Trois ensembles de gènes semblent négocier les premières étapes de la nodulation :

- **Les gènes *Nod* communs** : Les gènes *Nod* communs (*Nod* A, B, C, I et J) sont des gènes de nodulation communs à tous les rhizobia jusqu'ici étudiés. Ils sont situés sur un opéron duquel les *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. (Torche, 2006 ; Fossou, 2011)
- **Les gènes *hsn*** : (host specific nodulation), 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).
- **Les gènes *nodD*** : gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoides (Torche, 2006).

### **B- Gènes *nif***

La synthèse de la dinitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif* (Fossou, 2011). Ces gènes comprennent les gènes structuraux de la nitrogénase ; le gène *nif* H code pour la réductase et *nif* D et *nif* K pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo. Aussi les gènes *nif* B, *nif* E sont impliqués dans la synthèse du cofacteur FeMo qui est nécessaire pour le fonctionnement de la nitrogénase (Torche, 2006 ; Saoudi, 2008).

### **C- Gènes *fix*** :

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (Torche, 2006 ; Noël, 2009 ; Fossou, 2011).

Les gènes affectant les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides (*exo* et *lps*) et les déterminants pour la prise d'acide dicarboxilique par les bactéroïdes (*dct*) peuvent être nécessaire pour la symbiose mais pas uniquement exprimés en état symbiotique (Torche, 2006).

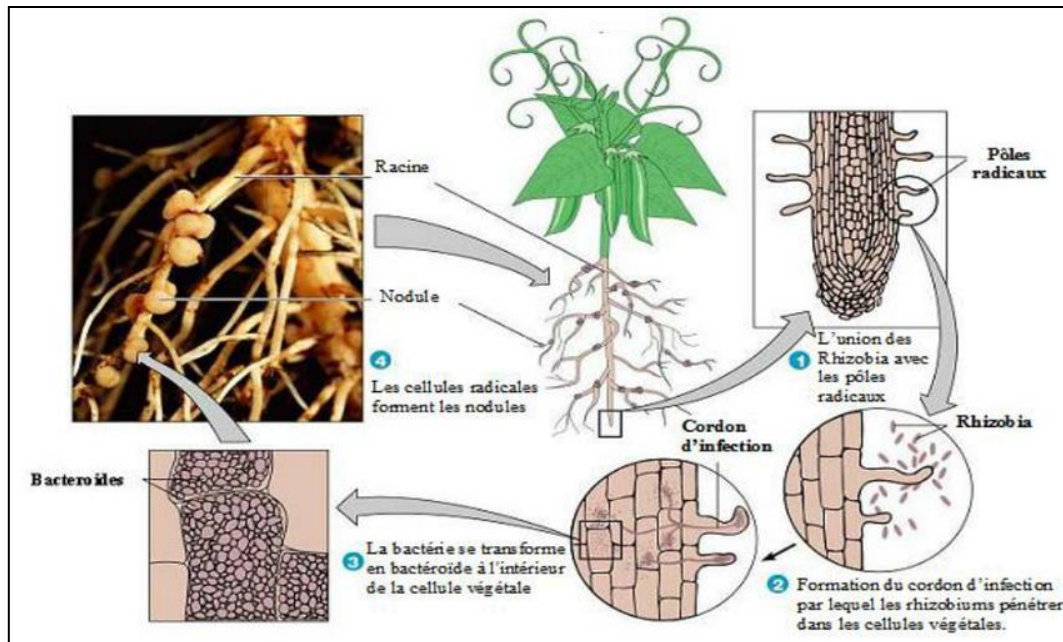
### 2.5.2.3. Génétique de la nodulation chez la plante

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**. Ces derniers 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 (Fossou, 2011).

En plus de ces composés émis seuls, la légumineuse participe aussi à la synthèse d'un certain nombre de protéines essentielles au développement de nodules fonctionnels. Il s'agit par exemple de la production **des nodulines** en réponse à des stimuli provenant des bactéries symbiotiques. La plus connue est une protéine (la globine) qui, associée à l'hème produit par les bactéroïdes, constitue la **leghémoglobine**, protéine fixatrice d'oxygène et indispensable à la fixation du N<sub>2</sub> (Fossou, 2011).

### 2.5.2.4. Les étapes de la nodulation

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte. (Foucher et Kondorosi, 2000; Limpens et Bisseling, 2003) (Figure 07).



**Figure07:** Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse. (Torche, 2006)

- **Echange de signal d'infection :** Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances de type flavonoïdes (Rasanen, 2002; Saoudi, 2008 ; Fitouri, 2011). Ce signal, une fois perçu par le *Rhizobium*, induit la production de facteurs Nod (Patriarca *et al.*, 2004 ; Fitouri, 2011).

- **Infection :** Les facteurs Nod induisent des événements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte, les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse de berger qui enferme les *Rhizobium* (Esseling *et al.*, 2003 ; Saoudi,2008). Les rhizobia envahissent donc la racine en digérant la paroi des cellules du poil absorbant et forment un fil infectieux qui croît comme intrusion dans les cellules hôtes (Torche, 2006).

- **Développement du nodule et maturation des bactéroïdes** Les bactéries prolifèrent à l'intérieur du cordon et vont se libérer dans le cytoplasme des cellules corticales, via ce cordon, provoquant ainsi l'apparition du méristème dont l'activité est à l'origine de la formation du nodule, dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en bactéroïdes ou endosymbiose. Ces dernières, de forme irrégulière, ont un volume supérieur à celui des formes libres. Ils ne se divisent plus et ne synthétisent plus de protéines Nod, par contre les bactéroïdes se concentrent dans la production des nitrogénases indispensables à la fixation de l'azote atmosphérique (Fitouri, 2011).



Le nodule prend forme avec la multiplication des cellules du cortex. Il se charge de pigments : leghémoglobine, synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (Fitouri, 2011). L'action de la leghémoglobine est de maintenir l'oxygène à faible concentration dans l'environnement de l'enzyme, compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote (Rasanen, 2002).

Le passage à l'état symbiotique s'accompagne d'une forte répression des gènes du métabolisme basal et d'une surexpression de ceux impliqués dans la fixation et l'assimilation de l'azote (Becker *et al.*, 2004). Quelques rares cellules bactériennes quiescentes, de forme bacillaire, sont présentes dans le nodule; ce sont les cellules qui survivront et se multiplieront dans le sol après la mort de la plante. Elles pourront alors infecter les racines des plantes introduites dans le même site (Perry *et al.*, 2004).

### **3. La symbiose tripartite : légumineuse mycorhizes et bactéries**

Au niveau de la symbiose fixatrice d'azote, la plante parvient, grâce aux bactéries qui convertissent l'azote diatomique en une forme assimilable et en retour les bactéries reçoivent de la plante les photosynthétats nécessaires à leur développement. Dans les zones tropicale et méditerranéenne, les carences en phosphore dans les sols constituent le principal facteur limitant l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote. La symbiose mycorhizienne, connue pour sa capacité à améliorer la nutrition phosphatée de la plante-hôte, assure ainsi un apport de phosphore nécessaire au fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote (Duponnois *et al.*, 2013).

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. En contrepartie, cette absorption accrue d'azote permet un meilleur développement du champignon via une meilleure croissance racinaire [6].

#### **3.1. Historique de la symbiose tripartite**

Depuis des millions d'années, ces deux types de symbioses présentés ci-dessus jouent un rôle considérable dans le fonctionnement des écosystèmes naturels et dans la nutrition phosphatée et azotée des plantes. 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 (Xie et *al.*, 1995).

Cornet et Diem (1982) ont montré que la double inoculation *Glomus mosseae*-*Rhizobium* chez *Acacia holosericea* et chez *A. raddiana* a amélioré la croissance, la nodulation et les teneurs en phosphore et en azote des parties aériennes des plantes. Des effets similaires ont été obtenus par de la Cruz et *al.* (1988) chez *A. mangium* et *A. auriculiformis* inoculés avec une souche de *Rhizobium* et quatre souches de champignons mycorhiziens à arbuscules (*Glomus fasciculatus*, *Gigaspora margarita*, *Scutellospora persica* et *Sclerocystis clavispora*).

En 1993, Ianson et Linderman ont découvert que les Fabacées établissaient des associations intimes avec les Mycorhizes et les *Rhizobium*. Cette association est une véritable symbiose mutualiste tripartite. La portée de cette association tripartite est double : les avantages accrus pour la plante et l'acheminement du carbone vers les partenaires hôtes (de manière importante pour les champignons et moins importante pour les bactéries).

Il existe entre les deux partenaires symbiotiques ; Mycorhizes et *Rhizobium*, une association assez proche et des chercheurs ont découvert qu'il y avait une influence des champignons mycorhiziens sur la formation des nodules sur les racines des Fabacées (Ianson et Linderman 1993). Des études récentes (Dénarié et *al.*, 2004) ont permis de démontrer que les deux types de symbioses partageaient des étapes communes dans la cascade de traduction des signaux symbiotiques.

### 3.2. Intérêt de la symbiose tripartite

Les mycorhizes développent un réseau qui explore le sol et accède à plus de nutriments et d'eau pour les transférer au plante; le rhizobium fixe l'azote qu'il met à la disposition de la plante. En travaillant ensemble, ils influencent positivement la plante et augmentent ainsi le rendement [6].

- **Aider à nourrir la plante :** L'azote et le phosphore constituent des nutriments majeurs pour la plante. Les associations tripartites des plantes hôtes avec le *Rhizobium* et le champignon mycorhizien bénéficient la plante hôte par l'augmentation de l'absorption du phosphore grâce à l'association avec les mycorhizes, équilibrant ainsi la forte teneur en azote suite à la fixation de l'azote par le *Rhizobium* (Koele et *al.*, 2014 ; Stefano et *al.*, 2017). En outre, les mycorhizes atteignent plus d'eau et de nutriments nécessaires aux légumineuses

telles que le B, Ca, Cu, Fe, K, Mn, Mo et le Zn, composantes clés pour la production d'énergie [6].

- **Photosynthèse plus élevée :** Lorsqu'elles sont utilisées en combinaison, les mycorhizes et le *Rhizobium* augmentent le taux de photosynthèse de 51% (Kaschuk et al., 2009 ; Püschel et al., 2016).

- **Meilleure productivité :** Une meilleure efficacité de l'utilisation des nutriments et une plus grande biomasse entraînent un rendement plus élevé pour chaque plante de légumineuse (index de récolte).

Il a été découvert que les plantes de pois coinoculés avec *Rhizobium leguminosarum* et le champignon mycorhizien ont montré de meilleurs résultats en ce qui concerne la hauteur des plantes, le poids sec des plantes, le poids frais des nodules, le nombre de graines, le poids des graines, le rendement des graines, le nombre de nodules des racines, le nombre de gousses par plante, le poids moyen des gousses et la longueur de celles-ci (Shinde et al., 2016 ; Signorelli et al., 2016).

Chaque phase de la croissance des plantes nécessite beaucoup de nutriments et d'énergie afin d'obtenir un rendement plus élevé. Les interactions tripartites entre les légumineuses, le champignon mycorhizien et *Rhizobium* entraînent une augmentation de la productivité des légumineuses; et le ratio N: P: C de la plante influencé par les associations tripartites symbiotiques joue un rôle fondamental dans le contrôle du taux photosynthétique et de la productivité de la biomasse» (Koele et al., 2014 ; Stefano et al., 2017).

# **Chapitre 2**

## **Matériel et Méthodes**

## 1. Site d'échantillonnage des plantes

Les deux plantes légumineuses *Scorpiurus* et *Hedysarum* utilisées dans cette étude, sont situées dans la région de Guelma, Est de l'Algérie.

Guelma se situe au cœur d'une grande région agricole à 290 m d'altitude, entourée de montagnes (Maouna, Dbegh, Houara). Guelma a pour coordonnées géographiques suivantes : 36° 28' 00" Nord et 7° 26' 00" Est. Leur climat se caractérise par :

- La pluviométrie est d'environ 450 à 600 mm/an.
- Subhumide.



Figure 08 : Localisation géographique du site d'échantillonnage (Guelma). [7]

## 2. Analyse physico-chimique de sol

### 2.1. Détermination de l'humidité relative (Baise, 2000)

L'humidité d'un sol est la quantité d'eau contenue dans un sol. Elle est mesurée par rapport à la quantité de terre sèche contenue dans ce sol et exprimée en pourcent.

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.

L'humidité relative du sol est ainsi calculée selon la formule suivante :

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

La mesure des paramètres suivants a été effectuée sur un extrait de sol 1/5 (poids/volume) à l'aide d'un appareil **multi paramètre HI9829** de laboratoire.

## 2.2. Potentiel d'Hydrogène (pH)

Le pH mesure le niveau d'acidité ou d'alcalinité d'une solution. Il fournit une valeur sur une échelle de 0 à 14 [8].

## 2.3. Conductivité électrique (CE) et Salinisation

La conductivité électrique quantifie l'aptitude d'une solution à laisser passer un courant électrique, elle augmente avec la salinité de cette dernière. La salinisation est la quantité des sels dans les sols en psu (practical salinity unit) [9].

## 2.4. Potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel d'oxydoréduction, ou potentiel rédox, est une mesure en millivolts (mV) qui indique le degré auquel une substance peut oxyder ou réduire une autre substance [8].

## 2.5. L'oxygène dissout

La quantité d'oxygène qui est en solution dans l'eau, et est disponible pour la respiration végétale et animale. L'oxygène dissout (O.D.) est mesuré en nombre de milligrammes d'oxygène (O<sub>2</sub>) par litre d'eau (mg/L) ou en pourcentage de saturation. Le pourcentage de saturation exprime la quantité d'oxygène présente dans l'eau par rapport à la quantité totale d'oxygène que l'eau peut contenir à une température donnée [10].

# 3. Isolement et caractérisation des bactéries à partir des nodules des plantes légumineuses *Scorpiurus* et *Hedysarum*

## 3.1. Collecte des nodules

La collecte des plantes légumineuses *Scorpiurus* et *Hedysarum* été réalisées en période de floraison des plantes au mois de mars selon les techniques préconisées par Vincent, (1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

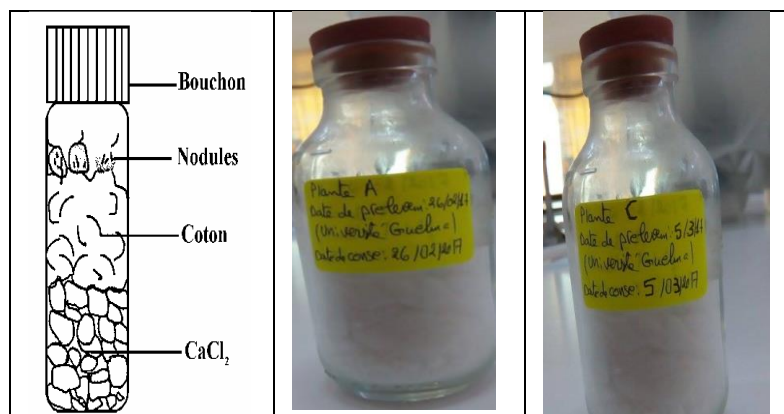
Les plantes sont collectées, en creusant environ 15 cm au tour de la plante et 20 cm de profondeur à l'aide d'une pioche afin de récupérer tout l'appareil racinaire; retirer ensuite délicatement le sol entourant les racines avec les mains et les transporter immédiatement au laboratoire.

Pour des raisons de stockage, et d'isolement, les racines sont délicatement lavées à l'eau puis, les nodules sont détachées à 1 à 2 mm du site d'attache, en fin séchées avec du papier filtre avant leur conservation.

### 3.2. Conservation des nodules

Les nodules prélevés sont conservés selon deux procédés. Pour une conservation de courte durée et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 h. Pour une période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par Somasegaran et Hoben (1994), qui consiste à remplir  $\frac{1}{4}$  des flacons stériles par du  $\text{CaCl}_2$ . Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules et refermer hermétiquement jusqu'au moment d'utilisation.

Il est recommandé de placer dans un seul tube les nodosités issues d'une même plante. Les flacons sont étiquetés en indiquant le nom de la plante hôte, la date de conservation, et date et lieu de prélèvement (Figure 9).



**Figure 09** : Conservation des nodules.

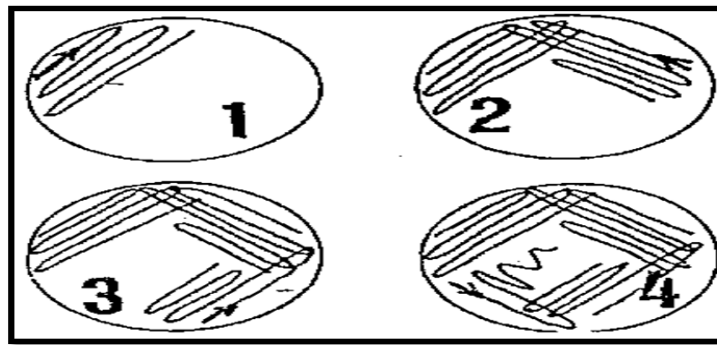
### 3.3. Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau distillée stérile au réfrigérateur toute une nuit, puis une heure à la température ambiante. Devant le bec Bunsen et dans des conditions microbiologiques, les nodules sont immergés 5 à 10 secondes dans l'éthanol 95% puis transférés dans une solution de Chlorure de Mercure acidifié 0.1% (1g  $\text{Hg Cl}_2$  + 5 ml  $\text{HCl}$  + 1l d'eau distillée) pendant 3min, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile, puis on les laisse dans l'eau distillée stérile pendant 1heure après le dernier rinçage.

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

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent (1970) : Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale.

A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant les milieux spécifiques, le milieu Yeast-Mannitol-Agar additionné de rouge Congo (YMA-RC) et le milieu Glucose peptone agar additionné de pourpre de Bromocrésol (GPA-BCP). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures. (Figure 10)



**Figure 10** : 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 02** : Les souches utilisées dans cette étude

Souches	Nom	Plante- hôte	Origine géographique	Source
A1	Isolat	<i>Scorpiurus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
A2	Isolat	<i>Scorpiurus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
A3	Isolat	<i>Scorpiurus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
A4	Isolat	<i>Scorpiurus</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
C1	Isolat	<i>Hedysarum</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
C2	Isolat	<i>Hedysarum</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
C3	Isolat	<i>Hedysarum</i>	Guelma, Algérie	Notre étude
SAM	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Constantine, Algérie	S.dakkiche, Constantine
F	<i>R. sulae</i> RHF	<i>H. coronarium</i>	Pise, Italie	S. Casella- Pise
A6	<i>Rhizobium sulae</i> sp. nov. RHA6	<i>H. coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar-Constantine

### 3.5. Conservation des souches

La méthode utilisée pour la conservation des souches bactériennes est la conservation sur YMA additionné de 3 g/l de CaCO<sub>3</sub> Comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes à essai en formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 30 °C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4 °C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

### 3.6. Les caractères cultureux et morphologiques

Toutes les souches sont ensemencées dans des tubes à essai contenant 9ml du milieu YMB (Yeast mannitol broth) puis incubées à 30 °C pendant 24 à 48 heures. L'ensemencement sur les milieux solides (YMA (Yeast mannitol agar), YMA+RC (Yeast mannitol agar + rouge Congo), YMA+BTB (Yeast mannitol agar + bleu de bromothymol) et GPA+BCP (Glucose peptone agar + Bromocrésol pourpre)) se fait selon la méthode des trois cadrans, puis les boîtes sont incubés a 30°C pendant 24 heures.

### 3.7. Examen microscopique par la coloration de Gram

Devant le bec Bunsen et dans des conditions microbiologiques, nous avons réalisé une coloration de Gram sur des frottis à partir des cultures bactériennes fraîches en milieu YMB. Les lames sont déposées sur un support. La coloration est réalisée selon les étapes suivantes :

- Recouvrir le violet de gentiane, laisser agir 1minute.
- Verser sur la lame la solution iode et laisser agir 30 secondes.
- Incliner la lame et laisser tomber la goutte à goutte l'alcool-acétone.
- Laver avec de l'eau distillée.
- Recolorer avec de la fuschine, laisser agir 1minute.
- Laver avec de l'eau distillée.
- Observer à immersion sous le microscope optique.

### 3.8. Examen de la mobilité

Ce test permet de déterminer si les bactéries sont mobiles, il est réalisé sur le milieu Mannitol-mobilité en ensemencant par piqure centrale.



Incuber à 30°C pendant 24-48 heures.

### 3.9. Test du 3-cétolactose (Bernaerts et De Ley, 1963)

Ce test permet de distinguer les colonies de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* dont seul ce dernier produit l'enzyme 3-cétoglucosidase. Il se base sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides.

Les souches sont mises en culture à 28°C pendant trois jours sur le milieu contenant:

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Carbonate de calcium	20g
Agar	18g
Eau distillée	1000 ml

Une anse de ce milieu est repiquée sur un deuxième milieu solide contenant :

Lactose	10g
Extrait de levure	1g
Agar	18g
Eau distillée	1000 ml

Les boîtes sont incubées 48 heures à 28°C.

La révélation est mise en évidence par l'inondation des 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	1000 ml

La présence de cet enzyme se manifeste après environ 1 heure par la formation d'un halo jaune de Cu<sub>2</sub>O de 2 à 3 cm de diamètre autour des colonies sur un fond bleu du réactif de Benedict.

## **3.10. Caractérisation phénotypique des isolats**

### **3.10.1. Tests nutritionnels**

#### **3.10.1.1. Utilisation de la source de carbone (Jordan, 1984)**

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D- Arabinose, D- Fructose, D- Galactose, D- Saccharose, D- Glucose, D- Xylose, Sorbitol, Lactose. Les tubes sont incubés à 28°C pendant 24 heures.

L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'estimation de la croissance en mesurant la densité optique à 600 nm.

#### **3.10.1.2. Source d'azote**

**Le milieu utilisé pour ce test est le milieu défini 8 (Lindstrom et Lehtomaski, 1988) (annexe) où le glutamate de sodium est remplacé par l'un des acides aminés suivants : Valine, Tyrosine, Leucine, proline, Lysine, Alanine.**

Les tubes sontensemencés puis incubés à 28°C. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique à 600 nm.

### **3.10.2. Hydrolyse de l'urée**

L'activité uréasique est déterminée par l'ensemencement des souches sur le milieu Urée-indole. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24-48 heures. S'il y a virage de couleur du milieu du rouge vers le rose, la bactérie est uréase positif.

### **3.10.3. Tests physiologiques**

#### **3.10.3.1. Tolérance au NaCl**

Les souches sont cultivées sur le milieu YMA avec différentes concentrations de NaCl qui sont : 0.5%, 2%, 10%.

Incuber à 28°C pendant 24 heures.

#### **3.10.3.2. Température de croissance**

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu YMA solide à différentes températures : 4 ; 22 ; 30; 37; 44.

Les lectures sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

### **3.10.3.3. Effet de pH**

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide YMB aux différentes valeurs du pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9. Les tubes sontensemencés puis incubés à 28 °C avec agitation pendant 24 heures. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique à 600 nm.

### **3.10.4. Résistance aux antibiotiques**

La résistance intrinsèque des souches bactériennes est déterminée sur le milieu Muller Hinton. Nous avons utilisé les disques des antibiotiques suivants: Amoxicilline, gentamicine, pénicilline, Cliprofloxacine.

Ensemencer les boites par écouvillonnage sur toute la surface de la gélose en tournant la boîte 3 fois de 60°. Après on dépose des disques des antibiotiques à la surface de la gélose et on incube à 28°C pendant 24-48 heures.

## **3.11. Extraction de l'ADN plasmidique des isolats**

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

L'extraction d'ADN plasmidique se fait généralement par la technique de la lyse alcaline. Elle permet d'isoler spécifiquement l'ADN plasmidique en éliminant l'ADN du chromosome bactérien :

- Ensemencer les souches dans 2ml du milieu YMB, puis incuber 24h à 30°C pour obtenir une culture en phase stationnaire.
- Centrifuger 1.5ml de culture pendant 2 min à 9000rpm à température ambiante.
- Jeter le surnageant et mettre le culot dans la glace.
- Resuspendre le culot dans 100µl de solution I (Tris: 25mM, EDTA: 10mM, Glucose: 5Mm à pH 8) et agiter avec le vortex,
- Ajouter 200µl de la solution II (SDS: 1%, NaOH 0.2N) fraîchement préparée, mélanger délicatement en inversant doucement les tubes.

- Laisser les tubes 3min avant d'ajouter 150 $\mu$ l de la solution III (Acétate de potassium: 3M à PH 5.5) froide, mélanger délicatement en versant doucement les tubes 2à3fois (un caillot blanc d'ADN, protéine, SDS doit être formé).
- Incubé sur la glace 20min.
- Centrifuger 10 min à 9000 rpm à température ambiante et transférer le surnageant (400 $\mu$ l) dans un tube propre.
- Ajouter 1ml d'Ethanol 95% et agiter avec le vortex,
- 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 $\mu$ l d'éthanol 80%.
- Centrifuger 10min à 9000rpm à température ambiante, et éliminer le surnageant rapidement en retournant le tube.
- Laisser le culot sécher à l'air pendant 5à10min
- Ajouter 100 $\mu$ l de TE.
- Conserver au frigo jusqu'au moment d'utilisation.

### **3.12. Electrophorèse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose**

#### **3.12.1. Préparation du gel d'agarose**

Le gel est constitué d'agarose 1 g dans 100ml de tampon TBE (Tris/Borate/EDTA) à pH 7,9.

- Faire fondre le mélange sur une plaque chauffante. Il doit être parfaitement transparent, sans particules d'agarose.
- Laisser refroidir avant d'ajouter 10 $\mu$ l de la solution de 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 gel dans la cuve à électrophorèse avec son support en veillant à ce que les puits du gel soient orientés du côté de l'électrode négative de la cuve et remplir la cuve avec le tampon de migration TBE1X de façon à ce que le gel soit immergé sous environ 1 mm du tampon.

### **3.12.2. Dépôt des échantillons et migration électrophorétique**

- Dans un tube à Eppendorf mélanger 20µl d'échantillon (ADN plasmidique) avec 4µl de bleu de bromophénol.

- Remplir les puits avec 12µl de mélange 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 en laissant migrer jusqu'à ce que les tâches de bleu de bromophénol arrivent à 1 cm de l'extrémité du gel.

- Récupérer le gel délicatement et le mettre sur table UV pour la révélation des bandes.

On a répété cette expérience 2 fois pour confirmer les résultats avec un changement de tampon de charge dans la deuxième par le suivant : TRIS, EDTA, Bleu de Bromophénol, Saccharose et Glycérol (mélanger 10 µl de ce tampon avec 35 µl d'ADN).

## **4. Etude des mycorhizes associées aux plantes légumineuses** *Hedysarum et Scorpiurus*

Les endomycorhizes ne sont observables qu'au microscope, mais il faut au préalable leur faire subir une série de traitements pour qu'elles soient visibles.

### **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 (Philips et Hayman, 1970)**

- Mettre le bloc de la terre dans 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. Par la suite laver les racines avec de l'eau distillée ou l'eau acidifiée (1% acide acétique).

#### **4.2.1. Coloration au bleu de Méthylène**

- Dans des récipients mettre les racines avec 2ml de bleu de méthylène et porter au bain marie (95°C) pendant 15min.
- Laver à l'éthanol 70% puis à l'eau acidifier (1% acide acétique).
- Mettre les échantillons entre lame et lamelles dans une goutte du lactoglycérole ou une goutte d'eau distillée.  
(Lactoglycérole = 1 volume acide lactique+1 volume glycérol+1 volume d'eau distillée).
- Observer au microscope optique (×10, ×40, ×100).

#### **4.2.2. Coloration à l'encre noire**

- Recouvrir les racines de la solution d'encre noire diluée à 8% dans du vinaigre blanc, fermer le pilulier et placer 15 min à l'étuve à 90°C.
- Bien rincer à l'eau déminéralisée additionnée de quelques gouttes d'acide acétique (prévoir au moins 5 rinçage, les 2 premiers rapides pendant 1 ou 2min et les 3 derniers environ 5min pour éliminer l'excès de coloration),
- Déposer les racines dans une boîte de pétri avec un peu d'eau.
- Monter les échantillons entre lame et lamelle dans une goutte d'eau ou de Lactoglycérole et observer au microscope optique aux grossissements ×10, ×40.

### **3.2. Estimation de la mycorhization**

Afin d'estimer la colonisation par les CMA 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 lactoglycérole. Nous avons pris trente fragments racinaires pour chaque plante que nous avons ensuite distribué sur 5 lames (6 fragments par lame).

Les lames sont ensuite observées au microscope photonique au grossissement x10 puis x 40. L'estimation de la colonisation endomycorhizienne est exprimée dans une grille d'évaluation. Cette grille est remplie selon deux échelles :

- une première échelle : elle se compose cinq (05) classes notées de 0 à 5. Chaque classe traduit le degré d'intensité de la colonisation du cortex racinaire de chaque fragment racinaire observé (Figure 11).
- La deuxième échelle permet d'évaluer la présence des arbuscules et des vésicules. Cette échelle comporte quatre (04) classes allant d'A0 à A3 qui indiquent leur fréquence (Figure 12).

La méthode de Trouvelot *et al.* (1986) permet de calculer trois paramètres de l'infection mycorhizienne (pourcentage du nombre de fragments racinaires endomycorhizés) qui sont :

**F fréquence de mycorhization :**

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

N : nombre de fragments observés

n : nombre de fragments mycorhizés

**M intensité de mycorhization :**

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

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

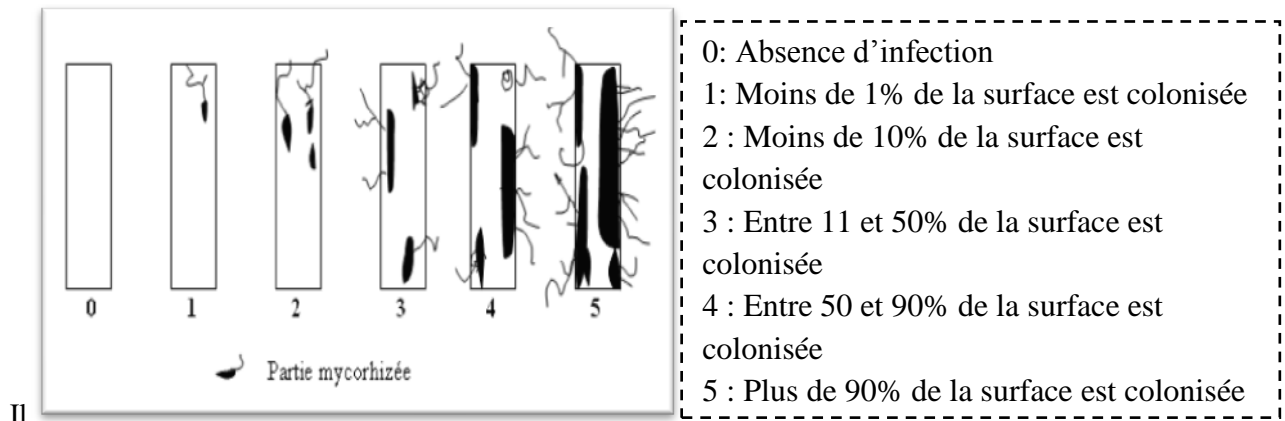
$n_1, n_2, n_3, n_4, n_5$  sont les nombres de fragments notés de 1 à 5 respectivement.

**A intensité arbusculaire :**

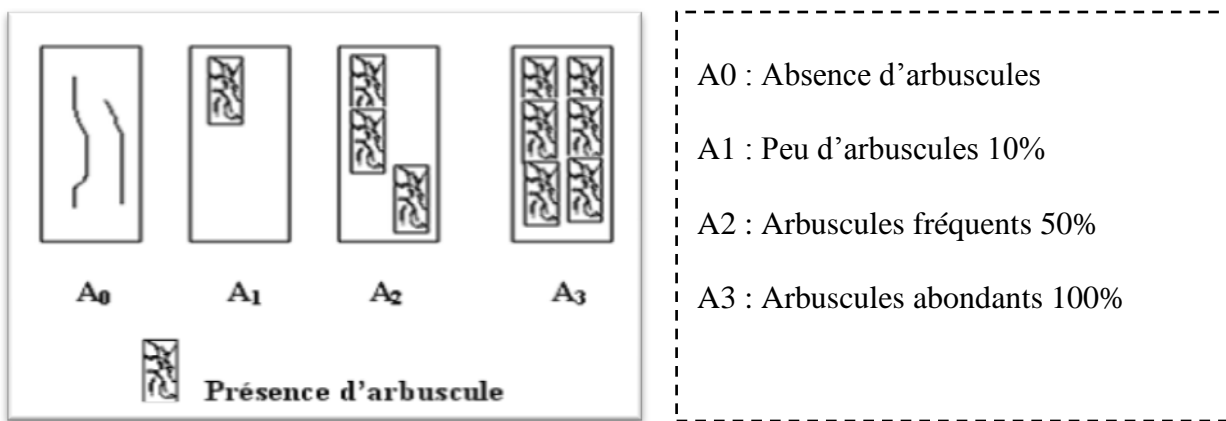
$$\text{Partie mycorhizée } A\% = (100mA_3 + 50 mA_2 + 10 mA_1)/100$$

$mA_3, mA_2$  et  $mA_1$  représentent le % de mycorhization de qualité arbusculaire donnée

$$\text{Respectivement pour chaque classe A1, A2 et A3 selon : } mA = ((95n_5A + 70 n_4A + 30 n_3A + 5n_2A + n_1A_1)/N) \times 100/m$$



**Figure11:** Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire.



**Figure 12:** Echelle d'évaluation de la présence arbusculaire.

Nous avons toute fois, fait appel à un programme informatique appelé « mycocalc » [11] pour calculer tous ces paramètres, et ceci en introduisant les résultats de chaque grille dans le programme en question.



# **Chapitre 3**

## **Résultats et Discussion**



## 1. Caractères physico-chimiques des sols

Les caractéristiques physico-chimiques des échantillons des deux sols de *Scorpiurus* et d' *Hedysarum* sont représentées dans (tableau3).

**Tableau 3** : les différents paramètres de sol mesurés

Paramètres	<i>Hedysarum</i>	<i>Scorpiurus</i>
Humidité du sol (%)	2.25	3.84
pH	8.23	8.10
Température du sol (°C)	21.33	20.91
CE (µs/cm)	422	803
Oxygène dissout % (DO%)	7.3	7.3
Potentiel redox nVPH	63.3	55.8
Potentiel Oxydoréduction(ORP)	127.9	129.5

En ce qui concerne le pH nous avons enregistré les valeurs suivantes : 8.10 et 8.23. Dans les régions arides, les sols sont généralement alcalins ( $7,5 < \text{pH} < 8,5$ ) (annexe 01) (Daoud et Halitim, 1994).

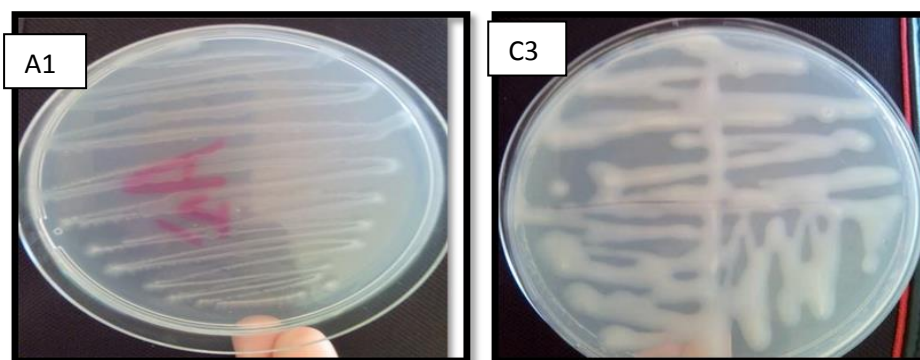
La conductivité électrique des solutions de sols étudiés est 422 µs/cm et 803 µs/cm pour le sol de *Hedysarum* et *Scorpiurus*. Ces valeurs nous conduisent à classer le sol cultivé d' *Hedysarum* parmi les sols non salé et peu salé pour le sol de *Scorpiurus* d'après l'échelle de la salinité d'Aubert (annexe 01). Cette salinité enregistrée dans les sols cultivés est justifiée par la forte évaporation due aux températures élevées.

Un taux d'humidité faible dans le sol de *Hedysarum* et *Scorpiurus* pourrait être dû essentiellement à l'irrigation. En effet, la faible teneur en eau peut s'expliquer d'une part par : l'aridité du climat (le taux d'évaporation est supérieur à celui des précipitations), d'autre part, la capacité de rétention en eau de ce sol est faible, celui-ci peut stocker qu'une petite quantité d'eau, le reste s'infiltré rapidement vers le sous-sol (Duchaufoure, 1948).

## 2. caractérisation des bactéries à isolées partir des nodules des plantes légumineuses *Scorpiurus* et *Hedysarum*

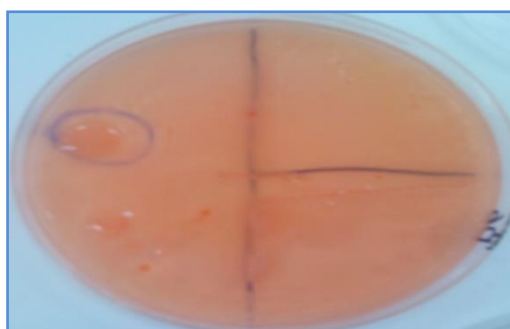
### 2.1. Les caractères culturaux et morphologiques des isolats

Les colonies des isolats d'*Hedysarum* apparaissent en 24heures sur le milieu YMA, et sont circulaires légèrement élevées lisses, opaques, avec une texture translucide crémeuse. Pour les colonies des isolats de *Scorpiurus*, on observe qu'elles apparaissent après 48 heures, et se caractérisent par une couleur blanche, forme homogène et un aspect granuleux avec une texture translucide, tel que décrit par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994), Jordan (1984) et Torche (2006) (Figure13).



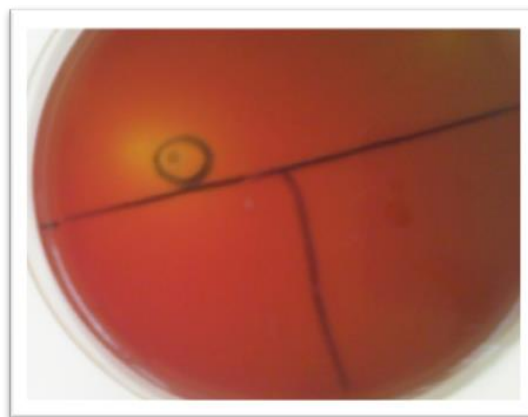
**Figure13:** croissance sur le milieu YMA de la souche A1 de *Scorpiurus* et de la souche C3 d'*Hedysarum*

Sur le milieu YMA-RC, on trouve qu'au bout de 72 heures d'incubation à 30°C, les souches isolées à partir des nodules des deux plantes absorbent très peu le rouge Congo. Ceci est observé chez la majorité des *rhizobia* (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970). Cette propriété est commune avec le genre *Bradyrhizobium* ; par contre le genre *Agrobacterium* et les formes contaminants absorbent fortement ce colorant (Jordan, 1984). De même Shetta et *al.*, (2011); Vishal et Abhishek, (2014) ont mentionné que les souches de *Rhizobia* n'absorbent pas le rouge Congo (figure 14).



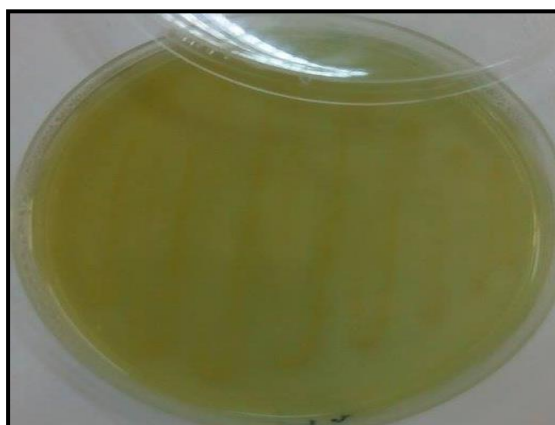
**Figure 14 :** croissance sur le milieu YMA-RC

La plupart de nos isolats ne modifient pas le pH sur le milieu GPA-BC contrairement aux contaminants qui modifient le pH et provoquent une modification de la couleur de l'indicateur du pH du violet vers le jaune (Somasegaran et Hoben, 1994) (figure 15).



**Figure 15:** croissance sur le milieu GPA- BCP

D'autre part on constate un changement de couleur du milieu de culture YMA-BTB qui vire du bleu au jaune verdâtre. Ce changement de couleur indique une acidification du milieu. Ceci caractérise les bactéries à croissance rapide (Jordan, 1984) (figure16). Ce qui est confirmé par d'autres travaux qui ont montré que les *rhizobia* à croissance rapide sont capables d'acidifier ce milieu de culture (Lyra et *al.*, 2013).



**Figure16:** croissance sur le milieu YMA + BTB

## 2.2. Examen microscopique par la coloration de Gram

L'observation microscopique des deux isolats révèle des bâtonnets Gram négatif de différentes tailles (figure17).

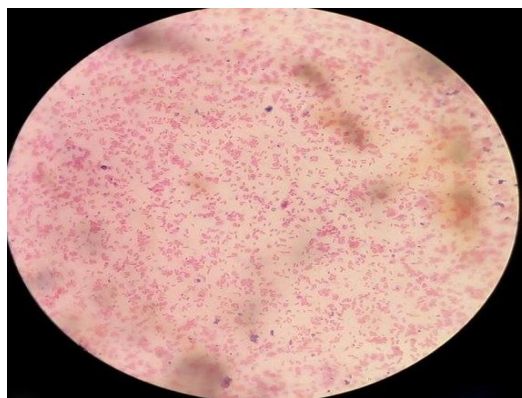


Figure 17: Examen microscopique par la coloration de Gram

### 2.3. Examen de la mobilité

Au bout de 48 heures d’incubation à 30°C nous avons tenu compte qu’il y a un envahissement de la gélose dans le lieu de la piqure centrale donc souches sont mobiles on remarque également un virage de couleur du milieu ce indique que ces bactéries fermentent le mannitol. Pour la souche C1, la croissance reste limitée au point d’inoculation donc elle n’est pas mobile (Tableau 04).

Tableau 04 : résultats de test Mannitol Mobilité

Souches		A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	SAM	F	A6
Heures											
Mobilité	24h	-	+	+	-	-	-	+	++	+	++
	48h	+	++	++	+	-	+	++	+++	+++	+++
Fermentation	24h	-	+	+	-	-	-	-	++	+	+
	48h	+	++	++	+	-	+	+	+++	++	++

### 2.4. Test du 3-cétolactose

Toutes les souches montrent un résultat négatif après l'addition du réactif de Benedict et aucun halo clair n’est observé. De ce fait les isolats n'oxydent pas le C<sub>3</sub> du glycosyl du Lactose et ne produisent pas de 3- cetoglucosidase, et confirme ainsi que nos souches appartiennent aux genres *Rhizobium*. Ces résultat sont accord avec ceux trouvés dans les travaux de Torche (2006, 2014), Saoudi (2008), Cheriet (2016), et démontré par de Lajudie (1998) pour le genre *Allorhizobium* et Lambert (1990) pour le genre *Phylobacterium* (Figure 18).

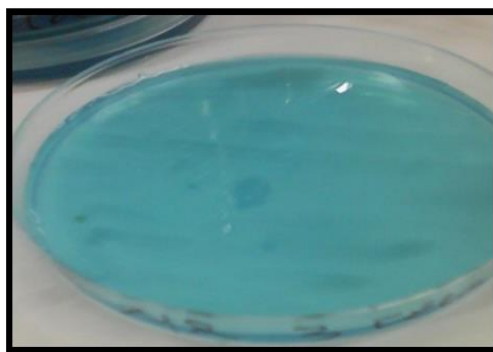


Figure 18: test de 3-cétolactose

## 2.5. Caractérisation phénotypique des isolats

### 2.5.1. Tests nutritionnels

#### 2.5.1.1. Utilisation de la source de carbone

Les mesures de la densité optique montrent que le glucose, le sorbitol, le mannitol et le galactose donnent un bon développement pour la plupart des souches. Le xylose est le moins utilisé. Nos isolats, semblent qu'ils n'ont pas de préférence particulière pour la source de carbone, mais ils utilisent faiblement le saccharose, fructose et le lactose. Les résultats de cette étude montrent que les isolats sont capables d'utiliser une grande variété de carbohydrates comme source de carbone, ce qui est confirmé par Vincent (1970), Jordan (1984), et Somasegaran et Hoben (1994) et Torche (2006) et Sebihi (2008) (Figure19).

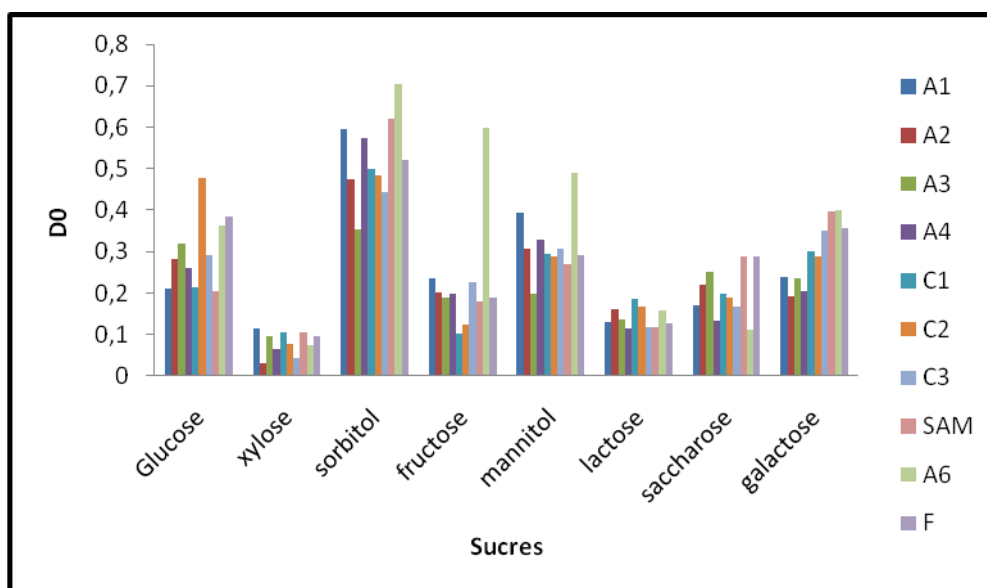


Figure19: Utilisation des sucres

### 2.5.1.2. Source d'azote

La croissance des souches sur le milieu défini 8 varie d'une source d'azote à une autre et les souches peuvent croître en présence de la majorité des acides aminés testés. Nos isolats et les souches de référence montrent une bonne croissance avec l'alanine, tyrosine, leucine, lysine, proline, valine. Pour la souche A4 la croissance reste limitée pour les acides aminés suivants : Alanine, Leucine, Lysine. Certains acides aminés peuvent être des inhibiteurs de croissance (Jordan, 1984), comme c'est trouvé par Struffi et coll. (1998) avec la thréonine (Figure 20).

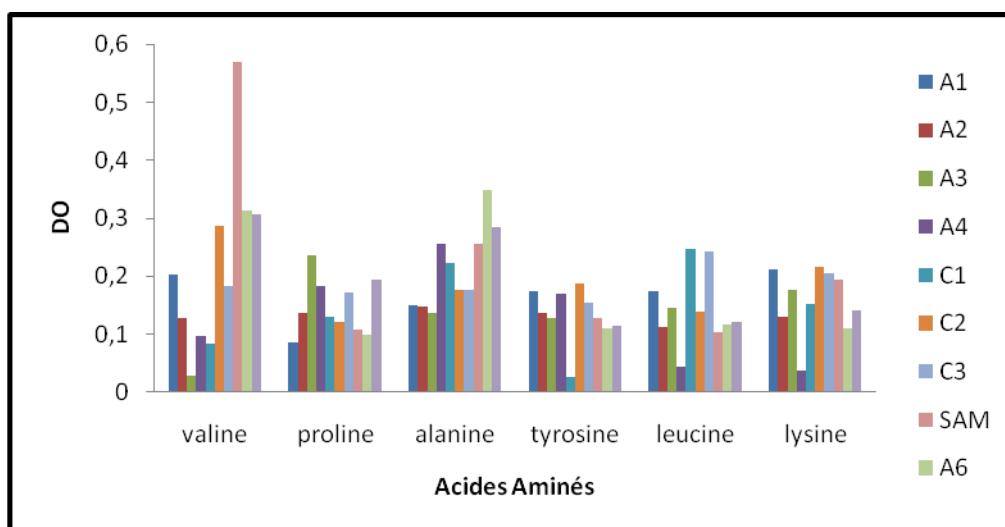


Figure 20: Utilisation de la source d'azote

### 2.5.2. Hydrolyse de l'urée

A l'exception des souches A1 et A4 qui ont donné une réaction négative pour l'hydrolyse de l'urée, les autres souches ont une activité uréasique et alcalinisent le milieu de culture en observant un virage de la couleur rouge vers le rose qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998) Le CO<sub>2</sub> et le NH<sub>3</sub> se combinent en donnant le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu (Marchal et Bourdon, 1982) (Tableau 05).

Tableau 05: résultats sur le milieu urée d'Indole.

Souches	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	SAM	F	A6
Heures										
24h	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
48h	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+



### 2.5.3. Tests physiologiques

#### 2.5.3.1. Tolérance au NaCl

Dans ce test nous avons testé la résistance au stress salin.

Les résultats montrent que les *rhizobia* nodulant présentaient une grande diversité dans leur tolérance au sel. Il y a même des souches qui tolèrent des concentrations élevées d'NaCl arrivant jusqu'à 10% (Tableau 6).

Les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre (Elsheikh et Wood, 1989 ; Rai *et al.*, 2012) et même entre les souches de la même espèce (Kassem *et al.*, 1985).

**Tableau 06:** Effet de sel (NaCl) sur la croissance des souches.

Souches	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	SAM	F	A6
Concentration										
0.5%	++	++	-	++	+	-	+	++	++	++
02%	++	++	+	++	+	++	-	++	++	++
10%	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+

#### 2.5.3.2. Température de croissance

La plupart des isolats montrent une croissance optimale dans l'intervalle de 20° à 37°C. Toutefois nos isolats sont capables de pousser à 40°C mais ils sont incapable de croître à 4°C sauf les deux souches de référence SAM et F qui ont poussé dans le 8<sup>ème</sup> jour. Ces résultats rejoignent ceux de Moawad et Beck, (1991) et Jordan (1984), Graham (1992) qui montrent que les espèces de *Rhizobium* se cultivent bien entre 20°C et 40°C (Tableau 07).

**Tableau 07:** Effet de température 22°C, 30°C, 37°C et 44°C

Température / Souches	22°C		30°C		37°C		44°C	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H	24H	48H
A1	+	++	++	+++	+	++	++	+++
A2	++	+++	++	+++	+	++	++	+++
A3	+	++	+	+++	-	+	++	+++
A4	++	+++	+	+++	+	++	+	++
C1	-	+	++	+++	+	++	++	+++
C2	-	+	++	+++	+	++	++	++
C3	++	+++	++	+++	-	+	-	+
SAM	++	+++	++	+++	+	+++	++	+++
F	+	++	++	+++	-	+	++	++
A6	+	++	++	+++	+	++	++	++

### 2.5.3.3. Effet de pH

Les souches peuvent survivre dans l'intervalle de pH 4.0 à pH 10. L'optimum de croissance de toutes les souches testées se situe entre pH 6.5 et pH 7.5. Les souches ont pu toutes tolérer la grande valeur de pH testée qui est de 9. Aux pH neutres et alcalins, toutes les souches présentent un développement optimal. 100% des souches testées sont même capables de pousser au pH 8. Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Maatallah et *al.* (2002) qui ont détecté la croissance de leurs isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4.0 et pH supérieur à 7.5. Ainsi Raza et *al.*, (2001) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10) (Figure 21).

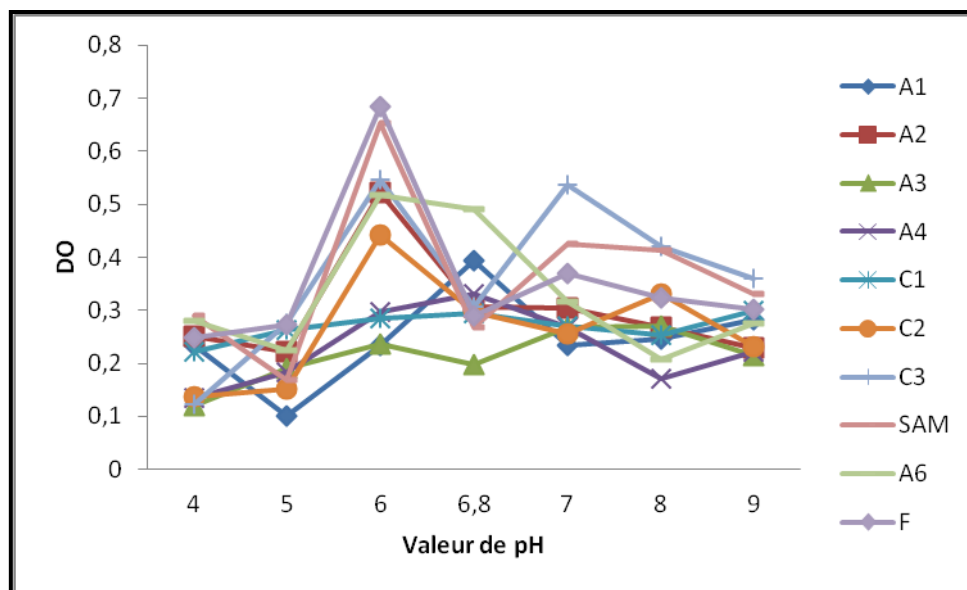


Figure21: effet de PH sur la croissance des souches.

### 2.5.4. Résistance aux antibiotiques

Les résultats indiquent que les souches montrent des réponses variables aux différents antibiotiques testés. Les marges de résistance des souches aux différents antibiotiques testés sont représentées dans le tableau8. De forte résistance a été notée avec Pénicilline et Amoxicilline .En effet, toutes les souches présentent une sensibilité pour les deux antibiotiques : Gentamicine à la concentration de 30 µg/ml et Cliprofloxacine à la concentration de 5 µg/ml, se sont révélé les plus néfastes sur la croissance des souches.

Graham *et al.* (1991) ont rapporté que l’effet inhibiteur d’un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d’inhibition est variable d’une espèce à une autre et d’une souche à l’autre.

**Tableau 8:** Résistance des souches nodulant *Hedysarum et Scorpiurus* à différents types d’antibiotiques testés.

Souche/ATB	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	SAM	F	A6
Pénicilline	R	R	R	R	R	R	Int	R	R	R
Amoxicilline	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cliprofloxacine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

**R** : Résistant                      **S** : Sensible                      **Int** : Intermédiaire

## 2.6. Détermination du profil plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose

Les techniques moléculaires adaptées aux *rhizobia* ont permis une extraction optimale de l'ADN plasmidique à partir des suspensions bactériennes. A travers le profil électrophorétique sur gel d'agarose réalisé on remarque un profil unique pour les isolats testés (A1, A2, A3, A4, C1, C2, C3) et les souches de références (SAM, F, A6). Une seule bande donc a été observée chez toutes les souches qui migrent avec une vitesse lente. Ce qui signifie que c'est un plasmide de grande taille. On peut donc suggérer que les isolats possèdent le mégaplasmide symbiotique caractéristique des rhizobia. Le même constat est observé dans les travaux de Boukerzaza (2014) (Figure 22).

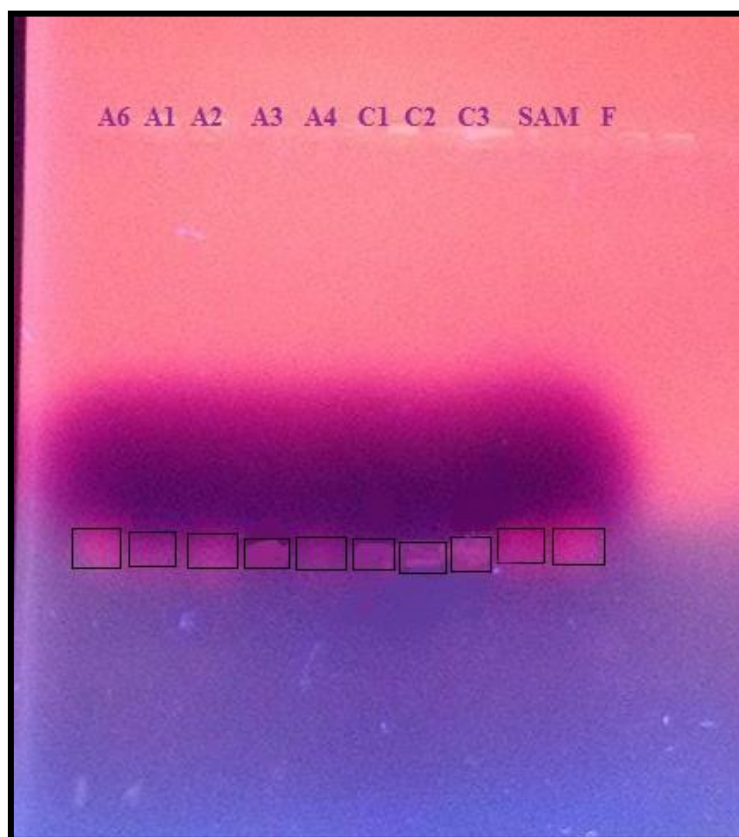
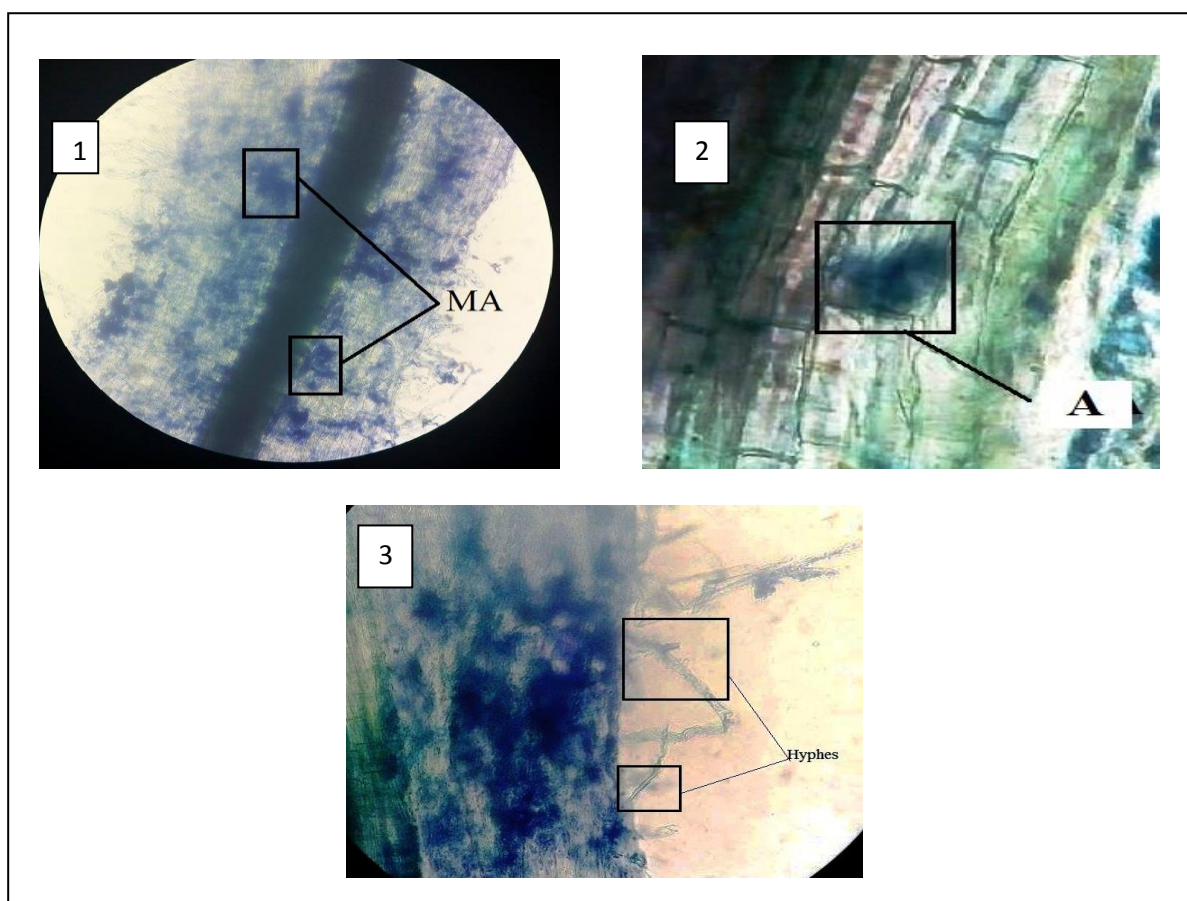


Figure 22 : le profil électrophorétique des plasmides symbiotiques

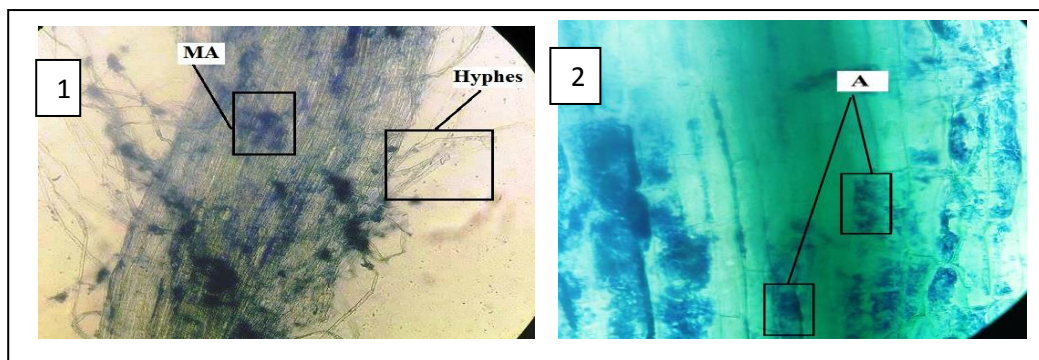
### 3. Etude des mycorhizes associées aux plantes légumineuses *Hedysarum et Scorpiurus*

L'observation des échantillons racinaires par la technique de Trouvelot *et al*, 1986 a révélé la présence d'une infection endomycorhizienne de type arbusculaire chez tous les échantillons des deux espèces : *Hedysarum et Scorpiurus*.

L'infection endomycorhizienne s'est manifestée surtout par la présence de mycélium intra- et intercellulaire fin (figure 23). On a également observé des arbuscules (figure 24) plus ou moins importants en nombre au grossissement  $\times 100$ , ces derniers apparaissaient sous forme de tâches foncées et il fallait souvent aller aux grossissements supérieurs pour avoir plus de détails.

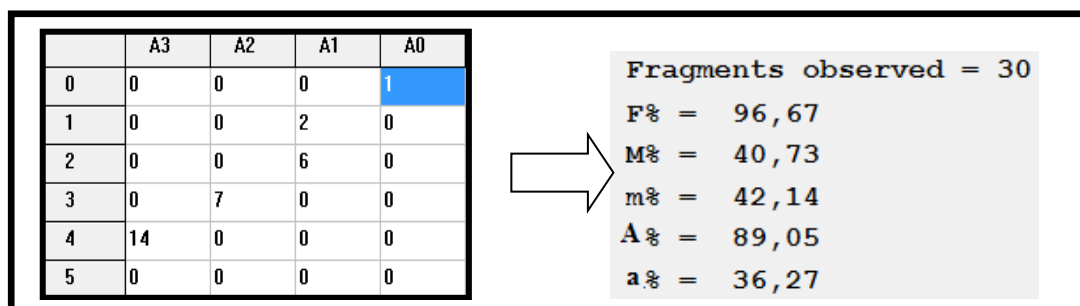


**Figure 23:** Quelques aspects de la colonisation par les champignons endomycorhiziens colorés en bleu de méthylène : **1** : Mycorhizes Arbusculaires sur la racine de *Scorpiurus* au grossissement ( $\times 10$ ), **2**: Arbuscules sur la racine de *Scorpiurus* au grossissement ( $\times 100$ ), **3** : hyphes extraradicales sur la racine de *Hedysarum* au grossissement ( $\times 40$ ).

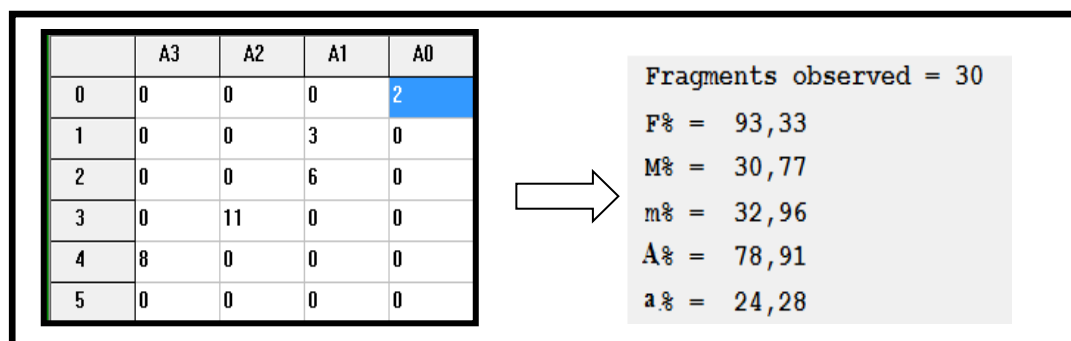


**Figure 24 :** Quelques aspects de la colonisation par les champignons endomycorhiziens colorés en ancre noire :  
 1 : Mycorhizes arbusculaires et Hyphes extraradiculaires sur la racine de *Scorpiurus* au grossissement ( $\times 10$ ), 2 :  
 Arbuscules sur la racine de *Hedysarum* au grossissement ( $\times 40$ ).

Les valeurs des différents paramètres donnés par le programme mycoCalc est :



**Figure 25:** les calculs de différents paramètres des mycorhizes chez *Scorpiurus*



**Figure 26:** les calculs de différents paramètres des mycorhizes chez *Hedysarum*

La valeur du taux d'infection AM (F%) enregistrée a été 96.67% pour *Scorpiurus* et 93.33% pour *Hedysarum*, une valeur très élevées car selon (Mosse, 1973; Beddiar, 2003) les taux les plus importants sont enregistrés durant le printemps, car cette période de l'année correspond à la reprise de l'activité végétale et une intensification de l'activité photosynthétique. avec un Teneur arbusculaire des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) égale à 89.05% pour *Scorpiurus* et 78.91% pour *Hedysarum*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Trouvelot et *al.*, (1986), Soualmia (2010), Limam (2014) et Rivaton(2016).

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

Dans cette étude nous avons essayé de caractériser et d'identifier des souches bactériennes isolées à partir des nodules des plantes légumineuses du genre *Hedysarum* et *Scorpiurus* situées dans la région de Guelma et d'étudier la colonisation mycorhizienne présente dans les systèmes racinaires des deux plantes choisies.

Dans la première partie, nous avons procédé à un isolement et une caractérisation des bactéries nodulant les deux plantes légumineuses *Hedysarum* et *Scorpiurus*, tout en suivant une démarche classique, relative à l'identification des bactéries appartenant au genre *Rhizobium*. En plus de l'étude morphologique et culturale, l'étude de la caractérisation phénotypique comporte une série des tests : tests nutritionnels, tests biochimiques, tests physiologiques ainsi que la détermination de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques.

Les résultats de l'étude des caractères phénotypiques montrent que les isolats se comportent pratiquement comme les souches de référence et ont donc la description des rhizobia

Le profil électrophorétique sur gel d'agarose, ressort une similitude entre les souches isolées et les souches de référence. Les résultats montrent que les souches possèdent un seul plasmide (mégaplasmide) de même taille. On peut suggérer donc que nos isolats possèdent le plasmide symbiotique caractéristique des rhizobia.

L'étude de la colonisation mycorhizienne est réalisée par la détection et l'estimation de cette association chez les deux plantes. Nous avons trouvé que les mycorhizes observés sont de type endomycorhizes arbusculaires. L'estimation de la mycorhization a révélé une fréquence de la colonisation très élevés 96.67% pour *Scorpiurus* et 93.33% pour *Hedysarum*, avec un Teneur arbusculaire des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) égale à 89.05% pour *Scorpiurus* et 78.91% pour *Hedysarum*.

Les résultats obtenus montrent que les sols échantillonnés ont un pH alcalin, une salinité modérée et un faible taux d'humidité.

En effet, la symbiose tripartite des plantes légumineuses avec les rhizobia et le champignon mycorhizien présente un intérêt économique et agronomique considérable. Ces



différentes symbioses sont de véritables coopérations permises par des interactions spécifiques entre un symbiote et une plante hôte, auxquelles les agricultures se sont particulièrement intéressées pour améliorer la nutrition phosphatée et azotée des plantes ainsi que leur rendement.

A la lumière de ce qui a été évoqué, plusieurs perspectives sont envisageables. En effet, nos futurs travaux de recherche pourraient être orientés vers les points suivants:

- Une étude plus approfondie concernant les champignons endomycorhizienne afin de déterminer l'espèce.
- Une étude moléculaire des isolats.
- L'étude des différents mécanismes moléculaires de la symbiose tripartite.
- Elargir l'étude des microsymbiotes associés à d'autres plantes légumineuses de l'Algérie.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

**Abbas, Younes.**, 2014. Microorganismes de la rhizosphère des Tétracélinales : un outil pour optimiser la régénération assistée du *Tetraclinis articulata* Vahl. Thèse De Doctorat. Rabat: Université Mohammed V. 30-34pp.

**Abdellaoui, Zahia.**, 2014. Contribution à l'étude de la germination et des premiers stades de développement de *Hedysarum sp.* Magister. Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri. P 95.

**Agnoro, Maliki.**, 2008. Effet de l'inoculation avec "*Bradyrhizobium japonicum*" et de l'apport de phosphore sur la productivité du soja (glycine max) en champs paysans au Bénin. Thèse d'Ingénieur Agronome. Bénin: Université d'Abomey-Calavi. 74p.

**Al Hilali, Ibtisem.**, 2006. La Symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité Des Microsymbiotes Et Mise En Evidence D'une Multi-Infection Nodulaire Chez Lupinus Luteus. Thèse De Doctorat. Rabat : Université Mohammed V – Agdal. P231.

**Allen, O. N. Allen, E.K.**, 1950. Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. Bacterial. Rev. Vol14, 273-330pp.

**Baise, D.**, 2000. Guide Des Analyses En Pédologie. INRA, Edit: Paris, 257 p.

**Battandier, J. Trabut, L.**, 1890. Flore D'Algérie (Dicotylédones). *In* : **Hamdani, F.Z.**, 2001. Sciences Régénération via l'organogénèse ou l'embryogénèse somatique chez le Scorpiurus. [Mémoire de magister]. Chef: Université Hassiba ben Bouali.17-25pp.

**Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C.**, 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can. J. Bot.* Vol 82, 1186 - 1197pp.

**Becker A., Berges H., Krol E., Bruand C., Ruberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe, F. de Bruijn, FJ. Fourment, J. Francez-Charlot, A. Kahn, D. Kuster, H. Liebe, C. Puhler, A. Weidner, S. Batut, J.**, 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* Vol 17, 292-303pp. DOI: 10.1094/MPMI.2004.17.3.292.

**Beddiar, A.**, 2003. Les symbioses racinaires chez les principales essences forestières spontanées ou introduites dans le Nord-Est Algérien (étude particulière de la symbiose quadripartite chez l'aulne glutineux). Thèse de Doctorat en Biologie Végétale. 209 p.

- Bensalem, K. Abdelguerfi, R. Abdelguerfi., A.**, 1990. Relation du genre *Scorpiurus L* avec certains facteurs du milieu en Algérie. Fourrages. Vol 124, 407 - 419 pp.
- Bernaerts, J.E., J. De Ley.**, 1963. A biochemical test for crown gall bacteria.
- Beyerinck M. W., 1888.** Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. *Bot. Zeitung.* **In :**
- Fitouri, Sana.** ,2011. Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hédysarum Coronarium L.*) et sélection de souches rhizobiales efficaces [en ligne]. Thèse de Doctorat. Tunisie : Institut national agronomique. 109p.
- Bonfante, P., Anca, I.A.**, 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual review of microbiology.* Vol 63, 363-383.
- Bonfante P, Genre A.**, 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications.* Vol 1(4), 48p.
- Boukerzaza, Sana.**, 2011. Caractérisation génétique et biochimique de glycosidases de la bactérie pathogène des plantes *Dickeya dadantii*. Thèse de doctorat. 159 p.
- Boyle M. and Paul E.A.**, 1988. Vesicular -arbuscular Mycorrhizal associations with barley on sewage -amended plots. **In :** **Abbas, Younes.**, 2014. Microorganismes de la rhizosphère des Tétracélinaires : un outil pour optimiser la régénération assistée du *Tetraclinis articulata* Vahl. Thèse De Doctorat. Rabat: Université Mohammed V. 32-34pp.
- Branger, A.**, 2012. Fabrication de produits alimentaires par fermentation : l'ingénierie, f3501, Paris-France. 17p.
- Cheriet, Dahbia.**, 2016. Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris L.*) fixatrices d'azote. Thèse de Doctorat. ANNABA : Université Badji Mokhtar. 138 p.
- Cornet, F. Diem, H.G.**, 1982. Etude comparative de l'efficacité des souches de *Rhizobium* d'Acacia isolées de sols du Sénégal et effet de la double symbiose *Rhizobium – Glomus mosseae* sur la croissance de *Acacia holosericea* et *A. raddiana*. *Bois et Forêts des Tropiques.* Vol 198, 3-15pp.
- Cronk, Q. Ojeda, I .Pennington, R.**, 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Curr Opin Plant Biol.* vol 9, 99-103pp.
- Daoud, Y. Halitim A.**, 1994. Irrigation et salinisation au Sahara algérien. *Sécheresse.* Vol 3(5), 151-160pp.

- De Bary A.**, 1879. De la symbiose. *In Olivier, Perru.*, 2006. Aux origines des recherches sur la symbiose vers 1868-1883. *Revue d'histoire des sciences*. Tome 59(1), 5-27pp.
- De la Cruz, R.E., Manalo, M.Q., Aggangan, N.S. & Tambalo, J.D.**, 1988. Growth of three legumes trees inoculated with VA mycorrhizal fungi and Rhizobium. *Plant & Soil*, 108: 111-115.
- De Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins MD, Kersters K, Gillis M.**, 1998. *Allorhizobium undicola* gen. Nov. sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Vol 48, 1277- 1290.
- Denison RF, Kiers ET.**, 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology*.vol 21(18), 775-785.
- Dénarié, J. Ané, J. M. Kiss, G. B. Riely, B. K. Penmetsa, R. V. Oldroyd, G. Ajax, C. Lévy, J. Debellé, F. Baek, J. M. Kalo, P. Rosenberg, C. Roe, B. A. Long, S. R. Cook, D. R.**, 2004. *Medicago truncatula DMII* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *In La Symbiose*, disponible sur <http://www.centrescientifique.mc/fr/BiologieMarine/recherche/symbiose.aspx>.
- Douglas, A. E.** 1994. *Symbiotic Interactions*. Oxford University Press. New York. 148p.
- Doyle, JJ. Luckow, MA.** , 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.*9–10pp.
- Duchaufour, P.** 1984. *Abrégé De Pédologie* .Masson-Edition. 220p.
- Duhoux, E. Nicole, Michel.**, 2004. *Atlas de biologie végétale : Associations et interactions chez les plantes*. IRD Éditions/Dunod, 1<sup>ère</sup> édition, Paris. 166 p.
- Duponnois, R. Sanon, A. Hafidi, M. Ndoye, I. Bâa, M.**, 2013. Généralités sur la symbiose mycorhizienne: Introduction. Researchgate. p38. Disponible sur <https://www.researchgate.net/publication/280638583>.
- 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*. Vol 8, 491- 504pp.
- El-sheikh, EAE, Wood M.**, 1989. Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* Vol 21, 889-895pp.

- Esseling, J.J. Lhuissier, FGP. Emons, AMC.**, 2003. Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant physiology*. Vol 132(4), 1982-1988pp. Doi: 10.1104/pp.103.021634.
- Figueiredo, M. Martinez, R. Burity, H.A. Chanway C.P.**, 2008. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol 24, 1187-1193pp.
- Fitouri, Sana.** ,2011. Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hédysarum Coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces [en ligne]. Thèse de Doctorat. Tunisie : Institut national agronomique. P 109.
- Fortin, J.A. Planchette, C et Piché, Y.**, 2008. Les mycorhizes : la nouvelle révolution verte. Québec, Edition Multi Mondes. 138p.
- Fossou, Kouakou Romain.** ,2011. Diversité génétique des Rhizobia associés à un champ de pois d'Angole (*Cajanus cajan* L.) à Yamoussoukro (centre de la Côte d'Ivoire) [en ligne]. Thèse de Doctorat. Yamoussoukro : Ecole supérieure d'agronomie de l'institut national polytechnique Félix Houphouët Boigny. 154p.
- Foucher F. and Kondorosi E.**, 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43:773-786.
- Frank, AB.**, 1877. On the geological conditions of the thallus of some crustaceans. *Contributions to biology of plants.* *in* Olivier, Perru., 2006. Aux origines des recherches sur la symbiose vers 1868-1883. *Revue d'histoire des sciences*, tome 59(1), 5-27pp.
- Gage D. J.**, 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol 68 (2), 280- 300 pp.
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P.**,2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant cell*. Vol 20, 1407–1420 pp.
- Genre, A. Chabaud, M. Timmers, A.C.J. Bonfante, P. Barker, D.G.**,2005. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *The Plant Cell*. Vol 17, 3489 – 3499pp.

**Graham P.H.**, 1991. What are Rhizobia? .The College of Agricultural Food and Environment Science.

**Graham, P.H.**, 1992. Stress tolerance *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. microbial.* Vol 38, 475- 484 pp.

**Gresshoff, Peter. Lohar, Dasharath. Chan, Pick-Kuen. Biswas Bandana, Qunyi Jiang. Reid, Dugald. Ferguson, Brett. Stacey, Gary.**, 2009. Ethylene insensitivity conferred by a mutated Arabidopsis ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Journal List. Ann bot.* 7-8 pp, doi:10.1093/aob/mcp132.

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

**Hamdani, Fatima-Z.**, 2001. Sciences Régénération via l'organogénèse ou l'embryogénèse somatique chez le *Scorpiurus*. [Mémoire de magister]. Chef: Université Hassiba ben Bouali.17-25pp.

**Hamza, Nabila.**, 2014. Application des mycorhizes arbusculaires en culture maraîchère cas de la pastèque (*Citrullus lanatus*). Magister. Sétif : Université Ferhat Abbas Sétif 1, p83.

**Harrison, M.**, 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 59, 19-42pp.

**Hartman, A. Amarger, N.**, 1991. La diversité génotypique d'une population de champs indigène de *Rhizobium meliloti* évaluée par des profils de plasmides, des empreintes génétiques et un typage de séquence d'insertion. *Can. J. Microbiol.* Vol 37, 600-608pp.

**Hirsch A. M., Lum M. R. and Downie J. A.**, 2001. What makes the rhizobial-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* Vol 127, 1484- 1492 pp.

**Hopkins W.G.**, 2003. Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck.

**Ianson, D. C. and Linderman, R. G.**, 1993. Variation in the response of nodulating pigeonpea (*Cajanus Cajan*) to different isolates of mycorrhizal fungi. *Symbiosis* ,vol15: 105-119.

**Jordan D. C.**, 1984. Rhizobiaceae. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. 234 - 245pp.

- Kaschuk G., Kuyper T. W., Leffelaar P. A., Hungria M., and Giller K. E.**, 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biol. Biochem.* Vol 4, 1233–1244pp.
- Kassem, M., Cappelano, A., Gounot, A.M.**, 1985 Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *Mircen Journal*. Vol 1, 63 -75pp.
- Khan, Mohammad. Saghir. Zaidi, Almas. Musarrat, Javed.**, 2010. *Microbes for Legume Improvement*. Springer Science & Business Media. P104.
- Koele N., Dickie I. A., Blum J. D., Gleason J. D., de Graaf L.** 2014. Ecological significance of mineral weathering in ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal ecosystems from a field-based comparison. *Soil Biol. Biochem.* Vol 69, 63–70pp. 10.1016/j.soilbio.2013.10.041 [Cross Ref].
- Lambert B., Joos H., Dierickx S., Vantome R., Swings J., Keresters K., Van montagu.**1990. Identification and Plant Interaction of a Phyllobacterium sp., a Predominant Rhizobacterium of Young Sugar Beet Plants. *Applied and environmental microbiology*.56 (4): 1093-1102.
- Laranjo, Marta. Alexandre, Ana. Oliveira, Solange.** , 2014. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research* Vol 169, Issue 1, 2-17pp, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>.
- 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, 26-30pp.
- Legay, Nicolas.** , 2013. Une approche fonctionnelle des relations plantes-microorganismes dans le cadre du cycle de l'azote. Cas des prairies de montagnes [en ligne]. Thèse LMC. Grenoble : Université de Grenoble. 357p. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00951131/document> consulté le 15/02/2017.
- Lepinay, Clémentine.**, 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. Thèse de doctorat. Dijon : Université De Bourgogne. 264 p.
- Le Tacon, F.** ,1985. Les Mycorhizes : une coopération entre plantes et champignons. La recherche n°166, Pp. 624–632.



- Limam, Fouad.** , 2014. Isolement et prés –identification des mycorhizes a arbuscule provenant des quelques palmeraies de Ouargla. Mémoire de Master académique .Ouargla : université Kasdi Marbah. 73p.
- Limpens E. et Bisseling T.**, 2003. Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 343-350.
- Lindstrom, K. And S. Lehtomaki.**,1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50: 277-287.
- Lohar, D. Stiller, J. Kam, J. Stacey. G. Gresshoff, P.M.**, 2009. Ethylene insensitivity conferred by the Arabidopsis *Etr1-1* receptor gene alters the nodulation response of transgenic *Lotus japonicus*. *Annals of Botany*.vol104, 277-285pp. [PMC free article] [PubMed]
- Lyra, MCCP. Freitas, ADS. Silva, TA. Santos, CERS.**, 2013. Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. *Afr. J. Biotechnol.* **12**: 2147-2156.
- M'hammedi, Bouzina. M.**, 1992. *Contribution à l'étude des graines de quelques légumineuses fourragères en Algérie.* In **Saadi, A .Hamdani, F-Z.**, 2007. Régénération *in vitro* du *Scorpiurus muricatus* ssp. *Subvillosus* via la caulogénèse. *BASE* [En ligne], Volume 11 (2007), 185-191 URL : <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=815> .
- Maatallah, J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C.**, 2002. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*. Vol 22, 321 – 329pp.
- Marchal, N. Bourdon, L. Richard, Cl.**, 1982. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris: Doin (éditeur), collection *Biologie appliquée*, 482p.
- Maxted, N. Bennett, S.J.**, 2001. Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. *Academic Publ.* vol 39. 1- 75pp.
- Moawad, H., & Beck, D. P.**, 1991. Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from uninoculated field-grown lentil. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol 23(10), 933-937pp.

- Mosse, B.**,1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual Review of Phytopathology*. Vol 11(1), 171- 196pp.
- NOEL, K.D.** ,2009. Bacteria Rhizobia. Encyclopedia of microbiology, Schaechter M. San Diego. USA : Marquette University, Milwaukee. vol 3, 877-893 pp.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA.** , 2011 .The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics*. vol. 45, 119-144.
- Parniske, M.**, 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* vol 6: 763-775pp. DOI: 10.1038/nrmicro1987.
- Patriarca, E.J. Tate, R. Ferraioli, S. Iaccarino, M.**, 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* Vol 234, 201-62pp. DOI: 10.1016/S0074-7696(04)34005-2.
- Perry J.J., Stalex J.T. et Lory S.**, 2004. Microbiologie cours et questions de revision. Edition Dunod. Paris. France. 180- 201pp.
- Phillips, J.M. Hayman, D. S.**, 1970, Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* Vol 55,158 – 160pp.
- Prescott, Lansing- M. Harley, John. Klein, Donald- A.**, 2003. Microbiologie. De boeck, 2eme édition. p1163.
- Püschel, David. Janoušková, Martina.Hujšlová, Martina. Slavíková, Renata. Gryndlerová, Hana. Jansa, Jan.**, 2016. Plant–fungus competition for nitrogen erases mycorrhizal growth benefits of *Andropogon gerardii* under limited nitrogen supply. *Ecology and Evolution*, vol 6(13): 4332–4346pp. Doi:10.1002/ece3.2207.
- Quezel, P. Santa, S.**, 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Tome1. 462 - 541pp.
- Rai R, Dash PK, Mohapatra T, Singh A.**, 2012. Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian J. Exp. Biol.* Vol 50, 340-350 pp.
- Rasanen, L.**, 2002. Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia*. Thèse de doctorat de l'université d'Helsinki. Finlan Oldroyd. p 220.

**Raza S., Jørnsgard B., Abou-Taleb H., Christiansen J.L.,** 2001. - Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology* 32 (6):379-383.

**Redhead, J.F.,** 1980. Mycorrhiza in natural tropical forest. In: *Tropical Mycorrhiza Research*, Mikola P. (ed.), Clarendon press, Oxford. 127-142 pp.

**Renouf, Vincent.,** 2006. Description Et Caractérisation De La Diversité Microbienne Durant L'élaboration Du Vin : Interactions Et Equilibres– Relation Avec La Qualité Du Vin. Partie 1, Polytechnique de Toulouse. p190.

**Rivaton, Diane.,** 2016. Etude des champignons mycorhiziens arbusculaires des sols en systèmes de grandes cultures biologiques sans élevage. Application à la nutrition phosphatée [en ligne]. Mémoire de magister. Sciences agronomiques. P69. Disponible sur <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01472700>.

**Saadi, A .Hamdani, F-Z.,** 2007. Régénération *in vitro* du *Scorpiurus muricatus* ssp. *Subvillosus* via la caulogénèse. *BASE* [En ligne], Volume 11, 185-191pp. URL : <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=815>.

**Saoudi, Mouna.,** 2008. Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Magister. Constantine : Université Mentouri. p 99.

**Sato Y., Monincová M., Chaloupková R., Prokop Z., Ohtsubo Y., Minamisawa K.,** 2005. Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Appl. Environ. Microb.* Vol 71. 4372-4379pp. DOI 10.1128/AEM.71.8

**Sebihi, F. Zohra.,** 2008. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L): caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister. Constantine : Université Mentouri. 121 p.

**Shetta ND, Al-Shaharani TS, Abdel-Aalm.,** 2011. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* Vol 10 (3), 410-418pp.

**Shinde, S. Villamor, J.G. Lin, W.D. Sharma, S. Verslues, P.E.,** 2016. Proline coordination with fatty acid synthesis and redox metabolism of chloroplast and

mitochondria. *Plant Physiol.* 1104p. [Epub ahead of print]. Disponible sur: <http://www.plantphysiol.org/content/early/2016/08/09/pp.16.01097.full.pdf+html> .16.01097 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

**Signorelli, Santiago.,** 2016. The Fermentation Analogy: A Point of View for Understanding the Intriguing Role of Proline Accumulation in Stressed Plants. *Front Plant Sci.* Vol 7, 1339pp. doi:10.3389/fpls.2016.01339.

**Somasegaran, P. Hoben, H.J.,** 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume / *Rhizobium* technology. New York: Springer-Verlag. 240-258pp.

**Soualmia, Asma.,** 2010. Biodiversité et isolement des symbiotes mycorhiziens et symbiotes fixateurs d'azote d'*Alnus glutinosa* (L.Gaertn) et d'*Acacia melanoxylon* (R.) de la station du lac Tonga (Nord-est Algérien). Mémoire de Magister. Annaba, Université Badji Mokhtar. p125.

**Stefano, Romano. Vladimir, Bondarev. Martin, Kölling. Thorsten Dittmar. Heide, N.Schulz-Vogt.,** 2017. Phosphate Limitation Triggers the Dissolution of Precipitated Iron by the Marine Bacterium *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1. *Front Microbiol.* Vol 8, p364. Doi:10.3389/fmicb.2017.00364.

**Strufi, P. Corich, V. Giacomini, A. Benguedouar, A. Squartini, A. Casella, S. Nuti, M.P.,**1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium* .*J.Appl. Microbiol.* Vol 84, 81 - 89pp.

**Taktek, Salma.,** 2015. Dissolution biologique des phosphates : Interaction bactéries – mycorhizes. Canada : Thèse Doctorat. P 123.

**TORCHE, Asma. ,** 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de Magister : Biochimie et Microbiologie Appliquée. Constantine : Université Mentouri. p 166.

**TORCHE, Asma.,** 2014. Caractérisation des souches bactériennes isolées à partir des nodules de quelques légumineuses endémiques de l'Algérie et détermination du polymorphisme génétique. Thèse de doctorat : Biochimie et Microbiologie Appliquée. Constantine : Université Mentouri. p 142.

**Trouvelot, A. Kough, J. 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. Gianinazi Pearson V et Gianinazzi S (Eds), 1st ESM, INRA Press, Paris. 217-221pp.

**Vincent, J.M.** , 1970. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. IBP Handbook. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd. No 15.

**Vincent, Walker.** ,2010. Impact de l'inoculation de micro-organismes phyto-bénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zea mays* L. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I. 146p.

**Vishal KD, Abhishek C.**,2014. Isolation and characterization of *Rhizobium leguminosarum* from root nodule of *Pisum sativum* L. J. Acad. Indus. Res. **2**: 464-467.

**Weir, B.S.**, 2016. The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.

**Woronin, M. S.**, 1866. A propos de Wur Lorsque l'aulne noir (*Alnus glutinosa*) et lupin de jardin ordinaire (*Lupinus mutabilis*) se produisant. **In Fitouri, Sana.** ,2011. Diversités phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du nord (*Hédysarum Coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces [en ligne]. Thèse de Doctorat. Tunisie : Institut national agronomique. P 109.

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

**Young, J Peter. Crossman, Lisa. Johnston, Andrew. Thomson, Nicholas. Ghazoui, Zara. Hull, Katherine. Wexler, Margaret. Curson, RJ. Todd, D. Poole, S. Mauchline, H. East, K. Quail, A. Arrowsmith, Claire. Cherevach, Inna. Chillingworth, Tracey. Paul, Davis. Audrey, Fraser. Heidi, Hauser. Jagels, Kay. Sharon, Moule. Karen, Mungall. Mandy, Sanders. Mark, Simmonds. Sally, Whitehead. Parkhill, Julian.**, 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology*, vol 7, p R34, DOI: 10.1186/gb. [CrossRef](#)

**Young, N.D. Debelle, F. Oldroyd, G.E. Geurts, R. Cannon, S.B. Udvardi, M.K. Bedito, V.A. Mayer, K.F. Gouzy, J. Schoof, H.**, 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*. Vol 480, 520-524pp.

## Sites Internet

- 01 : **Interactions entre les micro-organismes**, disponibles sur [http://biosol.free.fr/liens/micro\\_2004/intermicro.htm](http://biosol.free.fr/liens/micro_2004/intermicro.htm), consulté le 15/02/2017.
- 02 : **La Symbiose**, disponible sur <http://www.centrescientifique.mc/fr/BiologieMarine/recherche/symbiose.aspx>, consulté le 27/03/2017.
- 03: **Fleurs du Roussillon**, disponible sur <http://www.jeantosti.com/fleurs6/scorpiurus.html>, consulté le 06/03/2017.
- 04: **Hedysarum**, disponible sur :[https://www.google.dz/search?q=Le+genre+Hedysarum&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwipja7M85HTAhXM1hoKHQchBkwQ\\_AUIBigB&biw=1242&bih=580#tbm=isch&q=+Hedysarum++sans+fleurs&imgc](https://www.google.dz/search?q=Le+genre+Hedysarum&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwipja7M85HTAhXM1hoKHQchBkwQ_AUIBigB&biw=1242&bih=580#tbm=isch&q=+Hedysarum++sans+fleurs&imgc), consulté le 07/04/2017.
- 05: Mycologie environnementale : - Interactions plantes / champignon, disponible sur <http://slideplayer.fr/slide/10755219/> , consulté le 21/06/2017.
- 06: **Invam**, disponible sur: <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae>, Consulter le 20/05/2017.
- 06: **Symbiose Tripartite** disponible sur <http://www.ptagtiv.com/fr/ingredients-actifs/>, consulté le 15/05/2017.
- 08 : **Localisation géographique de Guelma**, disponible sur <https://www.google.com/maps/place/Th%C3%A9atre+Romain/@36.4671275,7.2900295,11z/data=!4m5!3m4!1s0x12f05dfdaabfefdf:0x98b2b5a591715ec5!8m2!3d36.4671275!4d7.4301052>, consulté le 20/04/2017.
- 09 : **Le pH et le potentiel d'oxydo-réduction**, disponible sur <http://www.produitsaquasante.com/le-ph-et-le-potentiel-doxydo-r%C3%A9duction>, consulté le 20/05/2017.
- 10: **la conductivité**, disponible sur : <https://www6.npc.inra.fr/las/Methodes-d-analyse/Sols/15.-Elements-extraits-a-l-eau/SOL-1504-Conductivite-totale-sur-extrait-1-25-m-v-a-25-C>, consulté le 07/06/2017.
- 11 : **Oxygène dissous**, disponible sur <https://www.vetofish.com/definition/oxygene-dissous>, consulté le 07/06/2017.
- 12: **Mycocalc**, disponible sur <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/MYCOCALC.EXE>, consulté le 21/05/2017.

# Annexes

## Annexe1 : Les paramètres physicochimiques du sol

**La salinité en fonction de la conductivité électrique de l'extrait 1/5 (LE CLECH, 2000)**

CE (dS/m) à 25°C	Degré de salinité
$\leq 0.6$	Sol non salé
$0.6 < CE \leq 2$	Sol peu salé
$2 < CE \leq 2.4$	Sol salé
$2.4 < CE \leq 6$	Sol très salé
$CE > 6$	Sol extrêmement salé

**Le potentiel hydrogène « PH » représente l'acidité du sol. Il est mesuré dans un rapport sol/solution de 2/5 (LE CLECH, 2000)**

pH	<3,5	3,5-4,2	4,2-5	5-6,5	6,5-7,5	7,5-8,7	>8,7
Classe	Hyper acide	Très acide	Acide	Faiblement acide	Neutre	Basique	Très basique

### Les résultats de L'humidité

Le sol de <i>Scorpiurus</i>	Le sol d' <i>Hedysarum</i>
135.60	140.87
135.20	140.55
134.85	139.87
134.10	139.22
133.57	138.75
133.25	138.22
132.89	138.04
132.52	137.99
131.42	137.95
130.60	137.80
130.59	137.77
130.59	137.77



130.59

137.77

## **Annexe2: 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
NaCl	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 bromothymol	5 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 (0.22 $\mu$ m).

**Solution oligoéléments : (mg/l)**

H3BO3	50
FeSO47H2O	35
CuSO45H2O	8
MnSO44H2O	40
ZnSO47H2O	16

La stérilisation de la solution oligoéléments est effectuée par autoclavage.

**Annexe3 : les résultats des différents tests**

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

**Utilisation de la source de carbone**

souches sucres	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	SAM	A6	F
Glucose	0,211	0,282	0,32	0,261	0,215	0,478	0,293	0,204	0,364	0,386
Xylose	0,114	0,031	0,097	0,065	0,104	0,079	0,043	0,106	0,075	0,095
Sorbitol	0,595	0,474	0,352	0,575	0,5	0,485	0,442	0,619	0,705	0,52
Fructose	0,237	0,201	0,189	0,198	0,102	0,124	0,225	0,18	0,599	0,189
Mannitol	0,394	0,306	0,197	0,33	0,295	0,289	0,306	0,269	0,49	0,29
Lactose	0,129	0,16	0,137	0,115	0,187	0,166	0,119	0,118	0,157	0,128
Saccharose	0,169	0,22	0,25	0,134	0,198	0,189	0,166	0,289	0,112	0,289
Galactose	0,24	0,193	0,235	0,204	0,302	0,289	0,351	0,398	0,399	0,356

**Utilisation de la Source d'azote**

souches sucres	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	SAM	A6	F
Valine	0,203	0,127	0,029	0,097	0,084	0,286	0,183	0,57	0,314	0,307
Proline	0,086	0,136	0,235	0,183	0,13	0,121	0,171	0,108	0,099	0,194
Alanine	0,15	0,148	0,137	0,256	0,223	0,177	0,177	0,255	0,349	0,285
Tyrosine	0,174	0,136	0,127	0,17	0,027	0,187	0,155	0,127	0,11	0,115
Leucine	0,174	0,113	0,146	0,044	0,248	0,14	0,242	0,103	0,118	0,122



### La croissance des souches sur YMA-BTB

souches	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	SAM	F	A6
Heures										
Après 24h	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++
Après 48h	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++

### Annexe4 : Les résultats de l'estimation du taux de colonisation par les champignons arbusculaires AM

#### Le genre *Scorpiurus*

paramètre / souches	M	A
1	2	1
2	2	1
3	3	2
4	4	3
5	3	2
6	4	3
7	4	3
8	2	1
9	4	3
10	4	3
11	4	3
12	0	0
13	3	2
14	4	3
15	4	3
16	4	3
17	4	3
18	4	3
19	3	2
20	4	3
21	2	1
22	3	2
23	4	3
24	3	2
25	4	3
26	4	3
27	4	3
28	3	2

29	2	1
30	2	1

### Le genre *Hedysarum*

paramètre souches	M	A
1	2	1
2	3	2
3	0	0
4	1	1
5	3	2
6	4	3
7	3	2
8	3	2
9	1	1
10	4	3
11	3	2
12	4	3
13	3	2
14	4	3
15	4	3
16	4	3
17	4	3
18	0	0
19	2	1
20	3	3
21	1	1
22	3	2
23	2	1
24	2	1
25	3	2
26	3	2
27	4	3
28	2	1
29	3	2
30	2	1