

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
UNIVERSITE DR. TAHER MOULAY SAIDA



**Faculté des Sciences.
Département de biologie**

2^{ème} année Master

Thème

**Contribution à l'étude des symbioses rhizobiennes et
mycorhiziennes pour améliorer la productivité de
*Médicago Sativa***

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie

Présenté par :

M^{elle} Rekia TAHIR

M^{elle} Saadia DAOUDI

Membres du jury :

Président : M^{me} Sabine AMARA

Examineur : Mr Abdelkader AMMAM

Encadreur : Soria FARES

Année universitaire 2018/2019.

Remerciements

À l'issue de ce travail, nous tenons à adresser nos vifs remerciements :

À Monsieur BERGUIG.M. Responsable de formation, pour ses enseignements «enthousiasmants » en Microbiologie.

À Madame FARES.S. Notre encadreur, qui nous a permis de développer un intérêt particulier pour la biotechnologie appliquée, qui nous a accordé tout le temps pour son aide morale et scientifique.

À Monsieur BENHMED. Chef de laboratoire, pour ses conseils et son aide.

À nos parents, pour leurs encouragements continus.

À tous les professeurs qui nous ont suivis tout au long de nos études au sein du département des sciences à l'université de Saida.

Aux membres du jury d'avoir accepté de lire notre travail et de l'évaluer.

Tables des matières

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I : Etude bibliographique.

I. Interactions plantes-symbiotes	03
I.1 symbiose Rhizobienne	03
I.1.1.1 Description microbiologique de rhizobia.....	03
I.1.1.2 Habitat	04
I.1.1.3 Caractères physiologiques et culturaux	05
I.1.1.4 Taxonomie des rhizobia.....	06
I.1.1.5 Critères de résistance	08
I.1.1.5.1 La résistance aux contraintes abiotiques	08
I.1.1.5.2 La résistance d'un agent biologique.....	09
I.1.1.6 Antagonisme entre <i>Rhizobium</i> et flore microbienne	09
I.1.1.7 Spécifié d'hôte... ..	10
I.1.1.8 Établissement de la symbiose	10
I.1.1.9 Les bases moléculaires de la symbiose.....	16
I.1.1.10 Autres facteurs symbiotiques	18
I.1.1.11 Fixation biologique de l'azote.....	20
I.1.1.12 Les intérêts de la symbiose Rhizobienne	21
I.2 Symbiose mycorhizienne	22
I.2.1 Principaux types de la Symbiose mycorhizienne	22
I.2.1.1 Ectomycorhizes (ECM)	22
I.2.1.2 Ectendomycorhizes	23
I.2.1.3 Endomycorhizes.....	23
I.2.2 Symbiose mycorhizienne à arbuscule(MA)	24
I.2.2.1 Taxonomie et phylogénie des CMA actuelle	25
I.2.2.2 Ecologie et distribution géographique des CMA.....	27
I.2.2.3 Structure des champignons mycorhizes à arbuscules	28
I.2.2.4 Etablissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules	32
I.2.2.4.1 Colonisation des racines par les CMA	32

I.2.2.4.2	Fonctionnement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire	33
I.2.2.5	Spécificité d'hôte	35
I.2.2.6	Effet et protection du champignon mycorhizien à arbuscule.....	36
I.3	Les partenaires végétaux	39
I.3.1	Généralités des légumineuses.....	39
I.3.2	Présentation de la plante d'étude	40
I.3.2.1	<i>Medicago sativa.L</i> (La luzerne cultivée)	40
I.3.2.1.1	Origine de la plante.....	40
I.3.2.1.2	Caractéristique botanique de la plante	40
I.3.2.1.3	Systématique	41
I.3.2.1.4	Ecologie	41
I.3.2.1.5	Intérêts	42
I.3.2.1.6	Cycle de développement la luzerne cultivée	42
I.4	Inoculation pour l'agriculture et l'environnement	43

Chapitre II : Matériels et méthodes

II. 1	Matériel biologique.....	46
II.2	Méthodes	46
II.2.1	Méthodologie suivie pour l'étude des <i>Rhizobium</i>	46
II.2.1.1	Isolement des rhizobia à partir de nodosités récoltées <i>in-nature</i>	46
II.2.1.1.1	Collection des nodosités	46
II.2.1.1.2	Isolement de souches de <i>Rhizobium</i>	47
II.2.1.1.3	Purification des isolats	48
II.2.1.1.4	Identification des souches de <i>Rhizobium</i>	48
II.2.1.1.4.1	Examen microscopique.....	48
II.2.1.1.4.2	Examen mobilité	49
II.2.1.1.4.3	Tests biochimiques	49
II.2.1.1.4.3.1	Vitesse de croissance sur YMA + Bromothymol	49
II.2.1.1.4.3.2	Recherche de certaines enzymes	49
II.2.1.1.5	Conservation des souches	50
II.2.1.1.6	Etude des paramètres symbiotiques	51
II.2.1.1.6.1	Test d'infectivité des souches	51

II.2.1.1.6.1.1 Stérilisation, germination et mis en culture des plantules de <i>Médicago</i>	51
II.2.1.1.6.1.2 Inoculation des plantules <i>in Vitro</i>	52
II.2.1.1.6.1.3 Estimation de la croissance des plantes <i>in-vitro</i> et observation du phénotype des plantes inoculées	52
II.2.2 Méthodologie suivie pour l'étude des Mycorhizes	53
II.2.2.1 Piégeage des endomycorhizes	53
II.2.2.2 Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes.....	54
II.2.2.2.1 Echantillonnages.....	54
II.2.2.2.2 Lavage.....	54
II.2.2.2.3 Eclaircissements et coloration des racines	55
II.2.2.2.4 Montage et observation des racines	56
II.2.2.3 Estimation de la colonisation MA des racines	56
II.2.2.4 Extraction des spores	58
II.2.2.5 Observation et Caractérisation morphologique des spores	59
II.2.2.6 Traitement des données	59
II.2.2.7 Essais d'inoculations des plantes de <i>Médicago sativa</i> en pots	59

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 Présentation de la zone d'étude	61
III.2 Etude de la Symbiose rhizobienne.....	62
III.2.1 Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats	62
III.2.2 Caractéristiques biochimiques	64
III.2.2.1 Vitesse de croissance sur YEM +BTB	65
III.2.2.2 Hydrolyse de l'urée	65

III.2.2.3 Réduction des nitrates	66
III.2.2.4 Activité cellulolytique.....	67
III.2.3 Etude symbiotique.....	68
III.2.3.1 Analyse phénotype des nodules	70
III.2.3.2 Evaluation des parties aériennes et racinaires	71
III.3 Etude de la Symbiose mycorhizienne	74
III.3.1 Piégeage des endomycorhizes	74
III.3.2 Estimation de la colonisation MA du maïs	78
III.3.3 Diversité spécifique et répartition des CMA dans le site d'étude.....	80
III.3.4 Essai en pots.....	82
Conclusion	85
Référence bibliographique.....	87
Annexe	101

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Classification récente des BNL (Berrada et Benbrahim, 2014).	07
Tableau 02	. Caractéristiques macroscopiques des cultures des souches autochtones isolées de <i>Medicago sativa</i> .	63
Tableau 03	Résultats des tests biochimiques réalisés sur les isolats.	68

Liste des figures

N°Figure	Titre	Page
Figure 01	Morphologie de <i>rhizobium trifoli</i> .	04
Figure 02	<i>Bactéries du genre Rhizobium vues au microscope (x 1 000).</i>	04
Figure 03	Aspects macroscopique des rhizobiums (ASMA ,2008)	06
Figure 04	les nodules chez légumineuses.	11
Figure 05	Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses. D'après Brenner et Winans (2005).	12
Figure 06	<i>Schema représenté</i> Infection par les poils absorbants	13
Figure 07	<i>La structure du nodule..</i>	16
Figure 08	Schéma de la surface d'une paroi de <i>Rhizobium</i> . (Chataigné ,2007).	19
Figure 09	Fixation biologique de l'azote lors d'une relation symbiotique	21
Figure 10	Principaux types de mycorhize représentés sur une coupe transversale de racine	24
Figure 11	Phylogénie actuelle des <i>Glomeromycota</i> , tirée de (Redecker et al ; 2013).	27
Figure 12	les différentes structures des champignons mycorhiziens à arbuscules (Whiffen ,2007), (Berutti et al. 2014).	29
Figure 13	Arbuscule de <i>Glomerus</i> développe dans une cellule racinaire (Bredrett MC ,2008).	30
Figure 14	Aspect des vésicules dans une coupe de racine mycorhizée (Dexheimer, 1997).	30
Figure 15	Aspect des cellules auxiliaires (AC) (Bago et Cano, 2005).	31
Figure 16	Schématisation de l'établissement de la symbiose mycorhizienne.	32

N° Tableau	Titre	page
Figure 17	Vue schématique du développement d'un champignon à travers les différentes couches cellulaires d'une racine	34
Figure 18	Cycle simplifié du P dans les agro-systèmes montrant la répartition de stock total de P du sol entre les différents pools de P.	37
Figure 19	Aspect de <i>Medicago sativa</i> .	42
Figure 20	Cycle de développement de la luzerne pérenne (PROLEA, 2002).	43
Figure 21	Les nodules de la plante <i>Medicago sativa</i> .L	47
Figure 22	Couleurs de bleu bromothymol	49
Figure 23	Germination des grains de <i>Médicago sativa</i> .	51
Figure 24	Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisé <i>in-vitro</i> .	52
Figure 25	Schéma représentatif des étapes d'éclaircissement et coloration des racines..	53
Figure 26	Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l'identification microscopique.	55
Figure 27	Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire.	56
Figure 28	Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules.	58
Figure 29	dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton et Walker(1992).	58
Figure 30	Extraction des spores des champignons endomycorhiziens selon la méthode de Gerdemann et Nicolson (1963).	59
Figure 31	Localisation géographique des zones de prélèvement.	60
Figure 32	Aspect macroscopique des colonies de rhizobia après sa culture sur milieu YEM à 28°C.	62
Figure 33	Croissance de l'isolat SR3 Sur YEM +RC.	64
Figure 34	Aspect des isolats sur le milieu mannitol- mobilité.	64
Figure 35	Croissance des isolats sur milieu YEM+BTB.	65
Figure 36	test d'uréase positif (+).	66
Figure 37	Résultats de réduction des nitrates par les isolats.	67
Figure 38	Résultats de teste Activité cellulolytique.	68
Figure 40	Différents croissance de <i>Medicago sativa</i> L inoculée avec des souches de rhizobium.	70

Figure 41	Détermination la partie racinaire et aériennes.	70
Figure 42	L'effet des souches bactériennes sur le nombre des nodules.	71
Figure43	Biomasse sèche racinaire de la luzerne.	72
Figure44	Biomasse sèche aérienne de la luzerne.	73
Figure45	les plantes de maïs après 42 jours de culture.	74
Figure46	Aspetc des hyphes extra et intra-racinaire de CMA du maïs. Gr :(x40).	75
Figure47	Aspetc d'appressorium de CMA du maïs. Gr : (X40)	75
Figure48	Racine de maïs colonisée par les vésicules différents grossissement.	76
Figure49	Aspect des arbuscules des CMA à l'intérieur des racines de maïs	77
Figure 50	Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne de Maïs.	78
Figure51	Aspect des arbuscules des CMA à l'intérieur des racines de maïs.	79
Figure52	différents morphotypes des spores isolées de la rhizosphère de maïs.	81
Figure53	Resultats de la double inoculation.	82

Résume :

Dans le but d'application d'une double inoculation (Rhizobium-Mycorhize) pour la croissance et le développement durable. Notre étude a porté sur la diversité des champignons endomycorhiziens et des bactéries fixatrices d'azote associés au *Medicago sativa* L (luzerne) repartis en deux sites différents Ain hadjar et Rebbahia localisé dans une zone aride de l'Ouest Algérien (Saida), ont été retenus et échantillonnés.

La luzerne s'associe avec des bactéries fixatrices d'azote, les rhizobiums. Six à huit souches de rhizobiums ont été isolée à partir de nodules récoltés. la meilleure croissance et développement des nodules vis-à-vis le nombre de nodule, la quantité des matières sèche des parties aérienne et racinaires est observé chez les sept isolats

En plus de cette symbiose, la symbiose mycorhizienne a été menée pour L'isolement de spore des CMA indigène du sol rhizosphérique de *Medicago sativa* a permis d'identifier morphologiquement ainsi que la colonisation endomycorhizienne des racines ont révélé un taux de mycorhization très élevé 83% comparée aux racines des plantes temoins. Il ressort alors que la luzerne est une plante très mycorhizogène.

La double inoculation chez *Medicago sativa* avec (rhizobium+complexe mycorhizien) a stimulé de manière très importante sa croissance par rapport aux autres inocula, en augmentant son poids sec aérien et racinaire. Il serait intéressant d'exploiter cette double symbiose chez la luzerne pour améliorer la productivité de la plante au champ.

Mots clés : Rhizobium, mycorhize ,*Medicago sativa* L , nodule,CMA, zone aride,endomycorhizienne.

Abstarct:

In the purpose of applying double inoculation (Rhizobium+ Mycorrhiza) For increasing the productivity and sustainable development. Our study was conducted with arbuscular mycorrhiza fungi, and bacterium nitrogen fixing associate with *Medicago sativa L* from two site (Ain hadjar –Rebbahia) located in an aride zone of western Algeria (Saida) ,were restrained and sampled them.

The Luzerne associate with bacterium nitrogen fixing, the Rhizobia.six to height strains of rhizobia have been used from the nodules. The results achieved at the isolation of native rhizobia (...) have shown a good response to the tests nodulation recommended to test the infectivity of these strains vis à vis the host plant namely *Medicago sativa*:the number of nodules, the amount of dry matter and root parts.

The symbiosis mycorrhiza was conducted to estimate the natural colonization rate of *Medicago sativa L* and to isolate spores of native AMF from the rhizosphere soil by trying to identify them morphologically. The result showed that most of the observed were strongly mycorrhized by the AMF at high levels 83% compared to the root of the control plants which showed no fungal colonization. This is a guide that Luzerne is plant high mycorrhized.

The double inoculation in *Medicago sativa* with (Rhizobium+mixture of mycorrhiza) has stimulated significantly the growth of this plants by increasing its dry shoot and root weight and number of nodules too ,it would be exploit this double symbiotic in Luzerne in order to increase the productivity.

Keywords: Rhizobia, Mycorrhia, *Medicago sativa L*, nodule arid zone, AMF, rhizosphere,endomycorrhizal

بهدف تطبيق المعارف حول تعايش الريزوبيا و الفطريات الجذرية من اجل التنمية المستدامة قد اجريت دراستنا حول تنوع الفطريات الجذرية و البكتيريا المثبتة من موقعين في منطقة قاحلة من غرب (سعيدة) عين الحجر رباحية من خلال محاولة اخذ عينات ودراستها .

يتراوح بين الريزوبيوم العقيدات
وتطوير العقيدات حيث العقيدات،
يلاحظ كمية الجوية والجذرية

.....

هذا الفطريات الجذرية CMA
يسمح لتحديد المورفولوجية،
الاندوميكوز الفطريات الجذرية عالية
الشاهدة . هذا دليل على هذا ال
83
ميكوريزي .

التعايش (ريزوبيا - مجمع ميكروزي)
كبير نموها وزيادة الهواء . سيكون المثير
للاهتمام هذا البرسيم لتحسين إنتاجية هذا

الرئيسية: ريزوبيا ميكروز العقيدات، اندوميكوريز

Introduction

L'utilisation de fertilisants chimiques au niveau mondial a augmenté de façon alarmante. Il y a encore un demi-siècle, les agriculteurs appliquaient 17 Tg (1012g) de fertilisant chimique par hectare, mais aujourd'hui, ce volume a été multiplié par huit (FAO, 2005).

Par ailleurs, Les engrais chimiques permettent d'obtenir un plus grand rendement agricole, mais sont responsables d'une pollution massive des sols et de l'eau. Les nitrates et phosphates notamment, présents dans les engrais chimiques, atteignent les cours d'eau et les nappes phréatiques par infiltration.

De plus Une synthèse des instituts américains de la santé suggèrent que les concentrations élevées de nitrates dans l'eau de boisson sont en partie responsable de pathologies y compris de cancers. La solution de lutter contre les pollutions générées par les engrais chimiques est le développement de l'agriculture biologique au détriment de l'agriculture intensive.

Cependant, les techniques agricoles utilisées ces dernières décennies ont provoqué une raréfaction, voire une élimination de certains micro-organismes symbiotique tel que les champignons mychoriziens et les *rhizobium*. Ce qui a contribué à la perte de productivité de sols. Ces micro-organismes jouent un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris. C'est pour ces raisons que la recherche scientifique préconise des stratégies basées sur l'utilisation des engrais biologiques ou biofertilisants [Döbereiner, 1994].

Le développement et l'amélioration des légumineuses nécessitent l'installation d'une microsymbiose, cette approche implique une sélection des deux partenaires de la symbiose, d'une autre part, d'après les travaux réalisés sur l'effet bénéfique des champignons mychorhiziens à arbuscules(CMA) sur le microsymbiote rhizobien,, l'interaction de ces microorganismes sont des relations impliquant un échange bidirectionnel de ressources entre la plante et microsymbiose. Dans cette association à bénéfice réciproque, le champignon mycorhizien arbusculaire améliore la nutrition hydrominérale en particulier la nutrition phosphatée, la réduction sensible de la pression parasitaire, alors que les rhizobiums accroissent la nutrition azotée en fixant l'azote atmosphérique. En retour, ces micro-organismes reçoivent de leurs plantes hôtes, les produits de la photosynthèse nécessaires à leur développement.

A travers cette étude, nous chercherons d'abord à apporter une petite contribution à des recherches consacrées à ce mouvement scientifique, nous voulons étudiée la symbiose rhizobienne et la symbiose mycorhizienne de *Medicago sativa*. Et testé la réponse de cette plante à la double inoculation.

Pour atteindre cet objectif, la stratégie à mener consiste à :

- Sélectionner un couple performant de Rhizobium-Champignon mycorhizienne afin d'améliorer la croissance et la production de cette légumineuse fourragée.
- Déterminer la réponse de *Medicago sativa.L* à double inoculation.

Notre travail est organisé en trois chapitres.

Le premier chapitre bibliographique s'articule en trois volets. En premier lieu, un état des connaissances générales sur la symbiose rhizobienne , Un deuxième volet a été consacré à une revue bibliographique sur la symbiose champignon mycorhizienne associatives avec diverses plantes, et Un accent particulier est ensuite porté sur l'état des connaissances sur les légumineuses ,Ce chapitre inclut aussi une synthèse sur les légumineuses fourragée qui ont fait l'objet de cette étude : *Medicago sativa.L*

Le deuxième chapitre est consacré au protocole expérimental, la présentation du matériel biologique ainsi que les différents techniques d'analyses utilisées au cours de cette étude.

Dans lune troisième partie à l'analyse des données et l'interprétation des résultats. Cette partie est constituée de trois sous parties. Nous étudierons dans la première, l'aspect macroscopique, microscopique et l'analyse biochimique, nous déterminerons l'infectivité (aptitude à noduler) et l'efficacité des souches testées, nous analyserons dans la deuxième, évaluation la symbiose champignon mycorhizienne sur le maïs, dans la troisième partie nous déterminerons la réponse de *Medicago sativa .L* à l'inoculation double.

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

Notons que parmi les difficultés rencontrées dans la recherche le manque des produits en laboratoire et le manque des ouvrages scientifiques.

Il est vrai que ce n'est pas un travail facile mais il a le bénéfice de nous avoir placées dans l'univers de la microbiologie.

Chapitre I

Etude bibliographique

I. Interactions plantes-symbiotes

Il existe une multitude d'interactions entre les plantes et leur environnement biotique et abiotique depuis l'émergence de celles-ci. (Simon, et *al* ; 1993, Brundrett, 2002), les plantes ont adopté des stratégies en relation avec leur survie, leur évolution et leur pouvoir d'adaptation. Parmi celles-ci, les systèmes racinaires ont établi des relations, avec des microorganismes telluriques. (Simon *et al* ; 1993).

Parmi ces interactions, les associations entre les *Rhizobium* et les légumineuses aussi les associations entre les mycorhizes et les légumineuses. De ce fait nous présentons une synthèse sur les deux symbioses telluriques rhizobienne et mycorhizienne dans la section suivante.

I.1 symbiose Rhizobienne

Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote par ce qu'ils ne possèdent pas la machinerie biochimique appropriée. La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes particulièrement des rhizobia, cette bactérie fournissent à la plante des substrats azotés, sous forme d'ammoniac, En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie. L'établissement de la symbiose implique le développement d'un nouvel organe, le nodule, qui est le site de la fixation d'azote atmosphérique par le microorganisme symbiote (Silar et *al* ; 2016).

Le rhizobium (grec : Rhiza = racine, Bios = vie), signifie étymologiquement « ce qui vit dans les racines » (Frank, 1889). Le terme BNL désigne également les bactéries nodulants les légumineuses. Ces bactéries ont la capacité de reconnaître, d'infecter et de noduler les racines des légumineuses pour établir une interaction symbiotique dans le but de fixer l'azote biologiquement. **I.1.1 Caractéristiques des rhizobia**

I.1.1.1 Description microbiologique de rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries telluriques à gram négatives, non sporulé (Pelmont, 1993). Les rhizobia peuvent exister sous deux formes (Dommergues et Mangenot ,1970 ; Vincent, 1974):

- La forme libre (végétative) ; Elles apparaissent se forme bâtonnet régulier 0,5 à 0,9 de largeur sur 1,2 à 3µm de longueur, Ce sont des petits organismes mobiles avec ciliature péritricheux, ceux à croissance lente sont mobile par un seul flagelle polaire. Cette bactérie que l'on trouve dans la rhizosphère et dans le cordon d'infection.

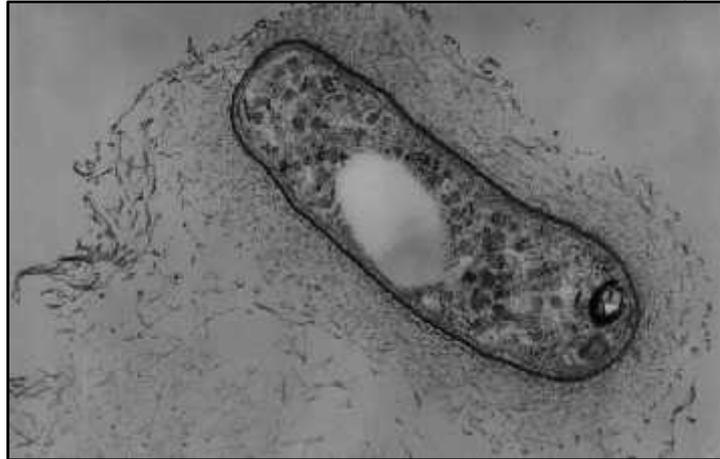


Figure 01: Morphologie de *rhizobium trifoli*

(<https://docplayer.fr/33113805-Les-symbioses-racinares.html>)

- **La forme bactéroïde ;** les rhizobia à l'intérieur des nodules se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en masse, régulière ou irrégulière. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que celle de la forme végétative (NEYRA, 1989).

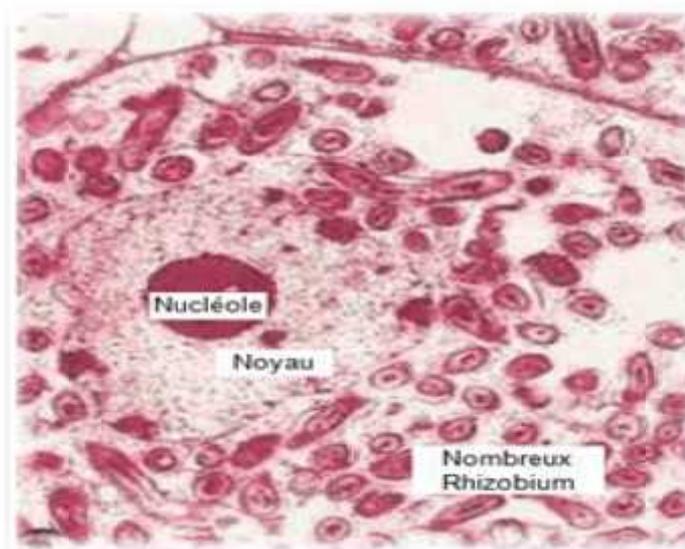


Figure 02 : Bactéries du genre *Rhizobium* vues au microscope (x 1 000)
Schéma montrant nombreux bactéroïdes dans une cellule d'une nodosité racinaire.

(<http://biosol.esitpa.org/liens/rhizo2003/nodulation.htm>).

I.1.1.2 Habitat :

Les bactéries du genre *Rhizobium* vivent dans le sol ; à la proximité des racines dans la rhizosphère, Ce dernier est un habitat particulièrement favorable à croissance des rhizobia

et l'on a pu démontrer une augmentation sensible de la population de *Rhizobium* dans la zone rhizosphérique comparé au sol sans racines. Ils peuvent également exister comme des cellules viables dans l'eau où ils sont capables d'infecter et de noduler des légumineuses aquatiques telles qu'*Aschynomene spp.*, et *Sesbania* (Grouzis et Le flo'c' H, 2003).

La survie des souches *Rhizobium* dépende de l'environnement, et la nature du sol des plantes légumineuses.

I.1.1.3 Caractères physiologiques et culturaux

Les rhizobia ont un métabolisme chimioorganotrophe ; ils utilisent un large spectre de sucres et d'acides organiques. (Le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés) comme source d'énergie. Effectivement (Somasegaran et Hoben, 1994), les *Rhizobiums* sont aérobies stricts ou microaérophiles. Leur croissance est optimale à une température de 28 °C et un pH entre 6 et 7, précisément 6.8, mais certaines souches peuvent tolérer un milieu acide de pH 4 comme *Rhizobium japonicum* (Somasegaran et Hoben, 1994).

L'observation macroscopique montre différentes caractéristiques des colonies développées d'une culture de 24h - 48h à 28°C sur le milieu Yeast Extract Mannitol (YEM) solide. Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, humides et translucides. Elles peuvent être brillantes (Somasegaran et Hoben, 1994). Les colonies jaunes et pâles sont rencontrées surtout dans les cultures âgées. Autre critère de différenciation, Le genre de *Rhizobium* regroupant les *Rhizobium* à croissance rapide ; le *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* et les souches *Allorhizobium* sont généralement des colonies gommeuses sur milieu YEM, de 4-6 mm de diamètre après 3 à 7 jours d'incubation ,ils produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h. Les souches de *Bradyrhizobium* ont une Croissance plus lente, elles produisent des colonies plus petites, généralement 1-2 mm de diamètre après 7-10 jour d'incubation et produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).



Figure 03 : Aspects macroscopique des rhizobiums (ASMA ,2008)

I.1.1.4 Taxonomie des rhizobia

Les Rhizobia ou bactéries nodulant les légumineuses sont classées au début sur la base des spécificités de l'hôte. Cette classification comportait un seul genre, le genre *Rhizobium* avec six espèces qui sont *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupiniand* et *R. japonicum* (Neyra, 1992).

Actuellement, Les rhizobia comportement 14 genre et 98 espèces fait partie de la classe protéobactéries et du sous classes α - β - γ -, forment l'ensemble de BNL. (Zakhia et De Lajudie, 2006 ;Ruberg et al . ,2001 ;Nogom et al . ,2004 ;Benhizia et al . ,2004).

La plupart de ces espèces bactériennes appartiennent de l'ordre *Rhizobial* rassemblées au sein du sous classes aux alpha-protéobactéries et regroupe des genres différents : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Devosia*, *Cupriavidus* (Zakhia et de Lajudie, 2006).

Tableau 01 : Classification récente des BNL (Berrada et Benbrahim, 2014).

Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
proteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	<p><i>R. leguminosarum</i> (symbiovar <i>viciae</i>, symbiovar <i>trifolii</i>, symbiovar <i>phaseoli</i>)-<i>R. galegae</i></p> <p>(symbiovar <i>officinalis</i>, symbiovar <i>orientalis</i>)-<i>R. tropici</i>-<i>R. leucaenae</i>-<i>R. tropici</i>-<i>R. endophyticum</i>-<i>R. phaseoli</i>-<i>R. fabae</i>-<i>R. etli</i>(symbiovar <i>mimosae</i>, symbiovar <i>phaseoli</i>)-<i>R. undicola</i>-<i>R. gallicum</i>(symbiovar <i>phaseoli</i>, symbiovar <i>gallicum</i>)-<i>R. giardinii</i>(symbiovar <i>phaseoli</i>, symbiovar <i>giardinii</i>)-<i>R. hainanensis</i>-<i>R. huautlense</i>-<i>R. mongolense</i>-<i>R. yanglingense</i>-<i>R. larrymoorei</i>-<i>R. indigoferae</i>-<i>R. sullae</i>-<i>R. loessense</i>-<i>R. cellulosityticum</i>-<i>R. miluonense</i>-<i>R. multihospitium</i>-<i>R. oryzae</i>-<i>R. pisi</i>-<i>R. mesosinicum</i>-<i>R. alamii</i>-<i>R. alkalisoli</i>-<i>R. tibeticum</i>-<i>R. tubonense</i>-<i>R. halophytocola</i>-<i>R. radiobacter</i>-<i>R. rhizogenes</i>-<i>R. rubi</i></p> <p><i>R. vitis</i>-<i>R. nepotum</i></p>
			<i>Ensifer</i>	<p><i>E. meliloti</i>-<i>E. fredii</i> (symbiovar <i>fredii</i>, symbiovar <i>siensis</i>)-<i>E. sahelense</i>-<i>E. teranga</i> (symbiovar <i>acacia</i>, symbiovar <i>sesbania</i>)-<i>E. medicae</i>-<i>E. arboris</i>-<i>E. kostiense</i>-<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i>)-<i>E. adhaerens</i>-<i>E. kummerowiae</i>-<i>E. americanum</i>-<i>E. mexicanus</i>-<i>E. numidicus</i></p>
			<i>Shinella</i>	<i>S. kummerowiae</i>
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<p><i>M. loti</i>-<i>M. huakuii</i>-<i>M. ciceri</i>-<i>M. tianshanense</i>-<i>M. mediterraneum</i>-<i>M. plurifarium</i>-<i>M. amorphae</i></p> <p><i>M. chacoense</i>-<i>M. septentrionale</i>-<i>M. temperatum</i>-<i>M. thiogangeticum</i>-<i>M. albiziae</i>-<i>M. caraganae</i>-<i>M. gobiense</i>-<i>M. tarimense</i>-<i>M. australicum</i>-<i>M. opportunistum</i>-<i>M. metallidurans</i>-<i>M. alhagi</i>-<i>M. camelthorni</i>-<i>M. abyssinicae</i>-<i>M. muleiense</i>-<i>M. hawassense</i>-<i>M. qingshengii</i>-<i>M. robiniae</i>-<i>M. shonense</i>-<i>M.</i></p>	

				<i>shangrilense-M. silamurunense-M. tamadayense</i>
			<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>
		<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>
			<i>Microvirga</i>	<i>M. lupini-M. lotononidis-M. Zambiensis</i>
		<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>O. cytisi-O. lupini</i>
		<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans-A. dobereinereae-A. oxalatophilum</i>
			<i>Devosia</i>	<i>Devosia neptunia</i>
		<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum-B. elkanii-B. liaoningense-B. yuanmingense-B. betae-B. canariense-B. iriomotense-B. jicamae-B. lablabi-B. huanghuaihaiense-B. cytisi-B. daqingense-B. denitrificans-B. oligotrophicum-B. pachyrhizi</i>
- Proteobacteria	<i>Burkholderiales</i>	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>B. caribensis-B. cepacia-B. tuberum-B. phymatum-B. nodosa-B. sabiae-B. mimosarum-B. rhizoxinica-B. diazotrophica-B. endofungorum-B. heleia-B. symbiotica</i>
			<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>
- Proteobacteria	<i>Pseudomonadales</i>	Pseudomonaceae		<i>Pseudomonas sp.</i>

I.1.1.5 Critères de résistance

I.1.1.5.1 La résistance aux contraintes abiotiques

Les bactéries du genre *Rhizobium*, possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans le sol avec une quantité suffisante pour fournir la nodulation efficace qui se dépend du type de sol (milieux arides et semi-arides), c'est pour

cela que l'étude des facteurs inhérents de sol tels que le pH ; la température et le stress salin.

Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols :

a. Le stress hydrique :

Le potentiel hydrique du sol peut influencer la symbiose entre les légumineuses et les rhizobia, dans les conditions de sécheresse élevée, la nodulation peut être faible et /ou inefficace, la sécheresse peut aussi influencer la survie des rhizobia pendant leur vie saprophytique. En outre, l'aridité peut inhiber la fixation d'azote, la nitrogénase étant très sensible à des variations, même faibles, du potentiel osmotique du sol. (Sinclair et al ; 1987).

b. La température

Les températures élevées (65-70 °C) peuvent empêcher la nodulation et inhiber la fixation d'azote (DAY et al ; 1978), et inhibent généralement la croissance des micro-organismes. Une tolérance à 42,5 °C a été fréquemment signalée pour *R. melilot* (Michel, Le Floc'H ,2003).

c. La salinité

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia indirectement qui provoque réduction de l'activité de la nitrogénase et l'inhibition de la synthèse leghémoglobine. Se manifeste par une diminution croissante du nombre des nodules par plante au fur et à mesure que la salinité augmente dans le milieu. Mais certaines souches de rhizobia capables de croître en présence de 2 % de NaCl (Hua et al ; 1982 ; Zhang et al ; 1991 ,Ghittoni et Bueno, 1995).

I.1.1.5.2 La résistance d'un agent biologique

Le *Rhizobium* est capable de persister dans le sol de manière saprophytique même en absence de sa plante hôte. Sa survie est possible grâce à l'expression de certains traits compétitifs, nécessaires pour la protection de sa niche écologique (Michel, Le Floc'H ,2003).

I.1.1.6 Antagonisme entre *Rhizobium* et flore microbienne :

Les *Rhizobiums* capables d'inhiber certains champignons sont phytopathogènes pour les légumineuses (*Penicillium Sp*, *Rhizopus stolonifère*, *Trichoderma* et *F. oxysporum*).

a. Antibiose

Les *Rhizobium* capable de produire des rhizobactine telle *Rhizobium meliloti* (produire un acide aminopolycarboxylique avec une substitution éthylène diamine dicarboxyle et hydro carboxyle) comme groupements chélateurs), le *R. leguminosarum* (l'anthralinate)(Smith et al;1985) ,Les *Rhizobium* utilisent des acides comme des agents pour lutter contre les phytopathogènes et les ravageurs des légumineuses (Rioux et al ;1986) , Ces rhizobactin permettre de protégeant la plante hot contre la tumeur du collet (Ryder, 1990).

b. . Hydrolases

Ce sont des enzymes extracellulaires sont associées à l'inhibition des champignons phytopathogènes On a démontré la lyse de chitine et les 13-glucanes, sont des composants majeurs de la paroi cellulaire de plusieurs champignons (Kobayashi *et al.* 1974; Sietsrna et Wesel, 1979; .Skujins *et al.* ; 1995).

R. meliloti, *R. leguminosarum* et *B. japonicum* ont réduit la sévérité de l'infection par *M. phareofina*, *R. solani* et *Fusarium spp*, de certaines légumineuses et non légumineuses. Ainsi des *Rhizobium* transgéniques, *R. legminosarium biovar Viciae* et *R. leguminosarum biovar Trifolii* ont protégé les nodules du petit pois et de la fèverole de l'attaque des larves de *Sitona flavescens* (Skat *et al.* ; 1999).

I.1.1.7 Spécifié d'hôte

Les bactéries du genre *Rhizobium* établir une association symbiotique avec légumineuses (pois, haricot, luzerne, etc.) et fixer l'azote au bénéfice du plant, cette association symbiotique implique Une reconnaissance spécifique entre les deux partenaires. En effet, chaque espèce de rhizobium possède un spectre d'hôte bien définie. Ce spectre peut être très étroit. Comme dans le cas de *R. meliloti*, qui n'est capable de noduler que des légumineuses des genres *Medicago*, *Melilotus* au *Trigonella*, au plus large, comme pour la souche de *Rhizobium* (De Jean-François al ; 1997).

I.1.1.8 Établissement de la symbiose

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont capables d'infecter les plantes de la famille des légumineuses, par leur aptitude à induire la formation de nodules sur la partie racinaire de la plante hôte comme c'est le cas chez les deux Légumineuses modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* , au formation de nodules au niveau des tiges (Figure 04) comme dans le cas de l'interaction *Sesbania rostrata* - *Azorhizobium caulinodans*, et à réduire l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par la plante. Dans cette section,

les données relatives à l'infection des légumineuses et au développement des nodules racinaires ou caulinaires sont brièvement présentées (Selami, 2017).

Deux mécanismes d'infection des légumineuses par les *Rhizobium* ont été décrits à ce jour (Sprent et Raven, 1992 ; Sprent, 1993).

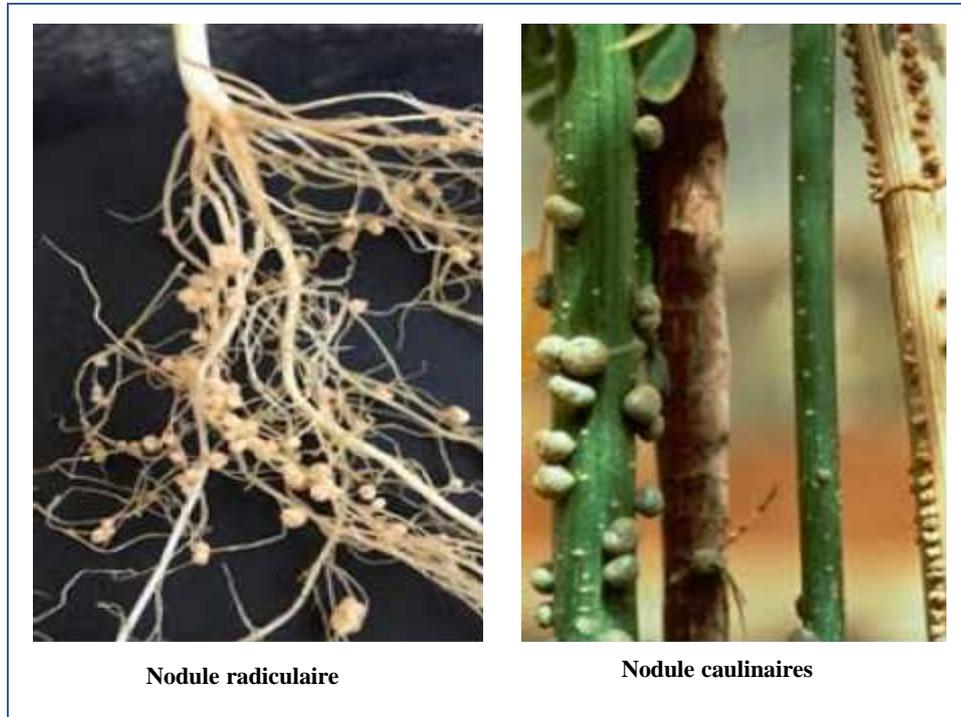


Figure 04: les nodules chez légumineuses

(<https://agriculture-de-conservation.com/Legumineuse-fixation-d-azote-et.html>).

La formation d'une nodosité se déroule ont une séquence d'événements dans les étapes suivante :

a. Pré infection

L'interaction commence avec la colonisation des jeunes *Rhizobium* au niveau des poils absorbant, où ils catabolisent des substances racinaires excrétées. Après une phase de multiplication active dans la rhizosphère, les bactéries se trouvant en contact avec la plante hôte, s'adsorbent aux poils absorbants. Des glycoprotéines végétales appelées lectines, permettant leur adhésion au poile absorbant de la racine (Selami, 2017).

A cette étape ; débute un échange des signaux moléculaires entre les deux partenaire, principalement des flavonoïdes (Long, 1996), Ces molécules sont sécrétées par la plante hôte , qui sont capables d'activer la transcription des gènes Nod chez les rhizobia. Les facteurs NOD sont des lipo-chitooligosaccharides (LCO) émis par la bactérie, à l'origine de

la reconnaissance spécifique entre les deux symbiotes et du déclenchement du programme d'organogenèse nodulaire chez le végétal par une cascade d'expression de gènes spécifiques (Miklashevichs *et al* ; 2001).

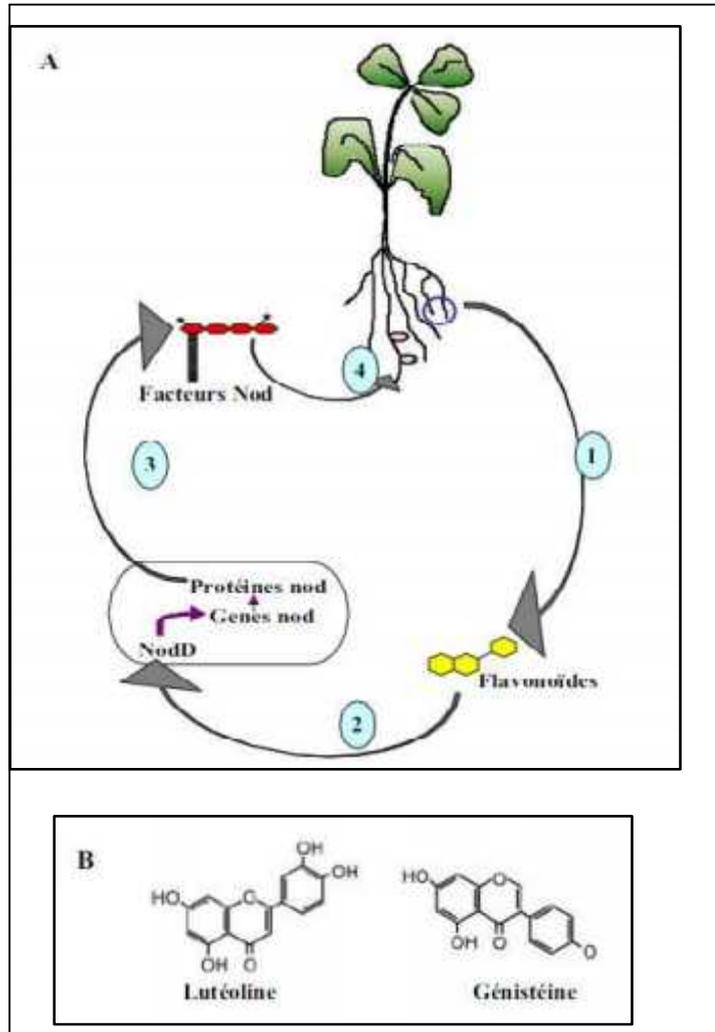


Figure 05: Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses. D'après Brencic et Winans (2005).

A :(1) Les racines de la plante hôte secrètent des flavonoïdes. (2) Les flavonoïdes sont perçus par les rhizobia et activent la protéine NodD à l'origine la transcription des gènes nod. (3) Les gènes nod permettent la synthèse et l'excrétion des facteurs Nod. (4) Les facteurs Nod sont perçus par les racines de la plante et induisent les premières réponses morpho- génétiques à l'origine de la formation des nodules.

B. Structure de deux flavonoïdes : la luteoline, secrétée par *Medicago truncatula* et la genisteine, secrétée par *Glycine max*. B. D'après Brencic et Winans (2005).

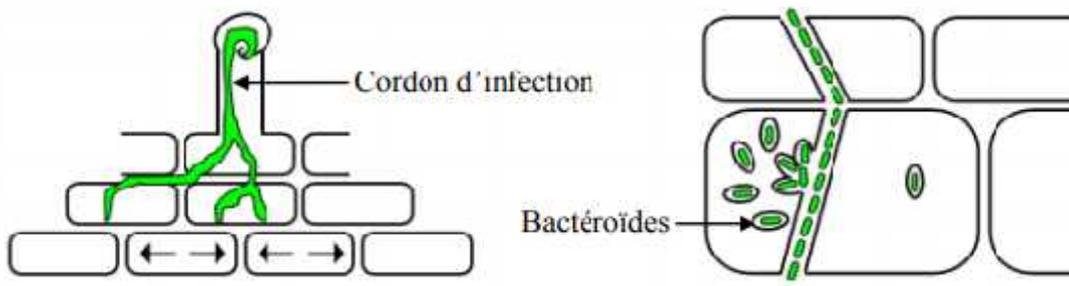
Les facteurs NOD provoquent des réactions, elle élicite la déformation des poils absorbants, et provoque une forte dépolarisation membranaire, accompagnée d'une alcalinisation du cytoplasme et d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, sous forme d'oscillations de calcium, une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en «crosse de berger» qui enferme les *Rhizobia*.

b. L'infection

- **La voie intra-cellulaire « Infection par les poils absorbants »**

Les bactéries s'attachent au niveau des ces poils absorbants déformés et leur paroi pecto-cellulosique à l'intérieur de la courbure est dégradée par des enzymes hydrolytiques de l'hôte, le plasmalemme s'invagine et du nouveau matériel pariétal est déposé conduisant à la formation d'une structure tubulaire appelée cordon d'infection qui contient les bactéries et progresse de cellule en cellule en direction du cortex (Gage, 2004).

L'infection de la plante par les rhizobia induit des divisions cellulaires au niveau du cortex, en face d'un pôle de protoxylème. Ces divisions conduisent à la formation d'un méristème à l'origine d'un primordium nodulaire. A cette étape les bactéries se différencient alors en leur forme endosymbiotique « les bactéroïdes » et libérées à certains endroits des cordons d'infection dans le cytoplasme des cellules végétales. Les cordons d'infection ne sont plus délimités par de la paroi, permettant ainsi l'invagination de la membrane plasmique et la formation de vésicules d'endocytose enfermant une ou plusieurs bactéries, la membrane qui les entoure et appelée membrane péri-bactéroïdienne et l'ensemble forme le symbiosome. L'endocytose est probablement la conséquence d'interactions physiques entre lipopolysaccharides sur la surface des bactéries et des composés glycoprotéiques et glycolipidiques sur la surface de la membrane cellulaire de la plante (Brewin et al., 1992).



A**B**

Figure : 06 .A : Ramification du cordon d'infection et progression vers le cortex interne qui est en cours de division pour former le primordium puis le méristème nodulaire. Les flèches représentent l'initiation de la mitose dans ces cellules.

B : Formation des symbiosomes et libération des bactéries dans une cellule du nodule où elles sont entourées d'une membrane provenant de la plante.

(https://www.univ-usto.dz/images/coursenligne/as_sym_SN).

- **Infection par pénétration intercellulaire ("crack entry")**

Le mode d'infection par pénétration intercellulaire des racines des légumineuses est le plus souvent observé chez les comme *Sesbania rostrata* qui forment des nodules au niveau des tiges la pénétration des bactéries se fait par des fissures ; l'infection a lieu au niveau de l'émergence des racines latérales et des racines adventives. Chez certaines Légumineuses, l'entrée se fait à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme. Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection (Pawlowski et Bisseling, 1996).

c. Développement des nodules

La prolifération des bactéroïdes enfermés dans le membrane péribactéroïdienne et des cellules corticales de la racine produit des excroissances tumorales appelées nodules ou nodosité (Davet, 1996 ; Raven et *al* ; 2007).

Le nodule mature se compose de deux parties : les tissus internes, où l'on trouve les cellules infectées par les bactéries et où la fixation d'azote à lieu ; et les tissus externes qui assurent les échanges avec le reste de la plante et la protection des tissus internes.

Les tissus périphériques nodulaires sont aux nombres de trois : le cortex nodulaire, à l'extérieur, qui dérive de l'épiderme racinaire ; L'endoderme et le parenchyme nodulaire (ou cortex interne) (Hirsch, 1992). Au sein du parenchyme nodulaire se trouvent les traces vasculaires connectées au cylindre central de la racine (Hirsch, 1992). Ces vaisseaux périphériques assurent la nutrition du nodule et permettent l'exportation de l'azote fixé vers le reste de la plante.

Dans la famille des légumineuses, la morphologie des nodules et le type de nodosité développée est déterminé par la plante hôte (Dart, 1975; Newcomb *et al* ; 1979; Newcomb et Tandom, 1981). Deux types majeurs de nodosités :

1. Les nodules à croissance indéterminés retrouvés parmi les espèces des climats tempérés (pois, luzerne, trèfle...), leur type caractérisé par des divisions cellulaires à l'origine du primordium nodulaire ont lieu au niveau du cortex externe. Chez *M. sativa*, les premières divisions des cellules du cortex internes apparaissent entre 18h et 24h après inoculation avec les bactéries. Cela mène à la formation d'un primordium nodulaire ou pré-nodule. Chez *Medicago sp.*, une distinction est faite entre le primordium initial et le primordium nodulaire. La persistance du méristème chez ces espèces est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules qui contiennent déjà des rhizobia. Ce processus se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules.
2. Les nodules à croissance déterminés caractéristique des espèces tropicales (soja, haricot...), ces espèces définies par des divisions cellulaires ont lieu au niveau du cortex interne, la zone méristématique qui produit le nodule est persistante (Hirsch, 1992). De ce fait, ces nodules ont une croissance indéfinie, ce qui se traduit par une forme allongée.

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

d. La structure du nodule

Toutes les étapes de développement nodulaire sont présentes au sein d'un même nodule selon un gradient de différenciation, ainsi, le nodule est typiquement divisé en cinq zones (Pawlowski et Bisseling, 1996).

-La zone méristématique (I) : située à l'apex du nodule et contient des cellules dépourvues de bactéries

-La zone d'infection (II) (où les bactéries sont libérées) : ou zone de préfixation contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens. Les bactéries sont déversées dans les cellules, entourées par la membrane pér bactéroidienne, et leur différenciation en bactéroides commence. Et leur différenciation en bactéroides commence. À ce stade, elles ne fixent pas encore l'azote

-L'interzone (II-III) riche en amyloplastés : dans laquelle la différenciation des bactéroides se poursuit et la fixation de l'azote commence.

-La zone de sénescence (IV) : où bactéroïdes et cellules végétales dégèrent.

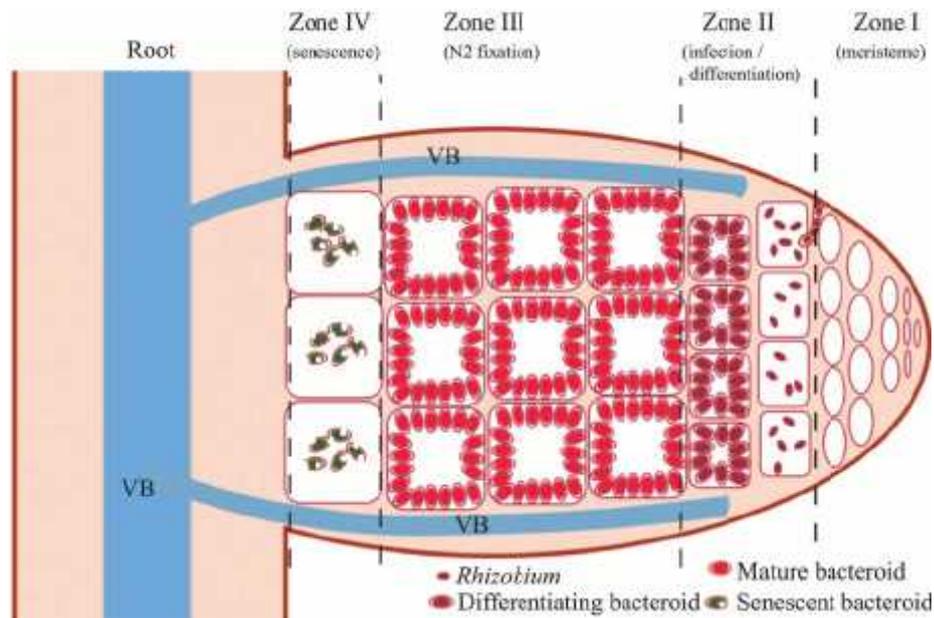


Figure 07:La structure du nodule.

(http://svt.ac-dijon.fr/IMG/pdf/ppt_interactions_plantes-mo.pdf).

I.1.1.9 Les bases moléculaires de la symbiose

L'établissement de la symbiose légumineuse-*rhizobium* est le résultat d'interactions complexes, impliquant un dialogue moléculaire, qui exige une collaboration génétique intime entre la bactérie et son hôte. Plusieurs groupes de gènes du microsymbiote et de la plante hôte contribuent à la nodulation et à la fixation biologique de l'azote (Franssen et al ; 1992).

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes se sont des substances chimiques qui se trouvent chez les végétaux, elles sont composées de trois cycles aromatiques et classées suivant l'arrangement des cercles aromatiques qui les composent et des substitutions qu'ils portent. Les principales classes de flavonoïdes sont les Chalcone, Flavanone, Flava-3-ol, Flavone, Isoflavone, Flavonol et Anthocyanine (Taylor et Grotewold, 2005). Elles participent au dialogue moléculaire qui s'établit entre l'hôte et les bactéries. Ces exsudats qui sont émis par les cellules des racines de légumineuses vont attirer la bactérie, qui en retour relâche des lipopolysaccharides (LPS) provenant de sa membrane (Taylor et Grotewold, 2005).

Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes, Ce sont généralement des flavonoïdes dont lechrysoériol et la lutéoline chez la luzerne, l'apigénine et l'ériodictyol chez le pois ou des isoflavonoïdes comme la daidzéine du soja ou la formononétine-7-O-(6''- O-malonylglucoside) des exsudats racinaires de la Luzerne (Macheix et al., 2005). Ces signaux ont un effet chimiotactique et, d'autre part, activent la transcription d'un ensemble de gènes de nodulation (gènes nod) (Davet, 1996).

- **Les facteurs Nod**

Les facteurs NOD sont des lipo-chitooligosaccharides (LCOs), des dérivés, un polymère de N-acétyl-Dglucosamine avec des liaisons (1-4). Elles sont des polymères similaires sauf un acide gras remplace un groupement acétyle à l'une des extrémités de la molécule (Hopkins, 2003). Par conséquent les facteurs Nod sont des lipo-chitino-oligosaccharides (Terefework, 2002 ; Hopkins, 2003).

Dans les premiers stades de nodulation, avant l'infection de la racine, un groupe de gènes de rhizobium, les gènes nod sont activés par les flavonoïdes; des exsudats racinaires émis par l'hôte; les gènes nod sont localisés sur un grand fragment d'ADN circulaire (plasmide) du rhizobium appelée plasmide Sym (pour symbiose). Trois gènes nod (nodA, nodB, nodC) sont des gènes de nodulation communs à tous les Rhizobiums; ils codent pour le squelette chimio-oligosaccharidique des facteurs Nod (Werner, 1992).

- **Les gènes nif**

La synthèse du complexe enzymatique la di-nitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes nif. Deux gènes *nif* : *nifD* et *nifK* ; par exemple, codent respectivement pour les deux sous-unités de la protéine MoFe. La protéine Fe et la ferrédoxine sont codées respectivement par les gènes *nifH* et *nifF*. D'autres gènes nif sont impliqués dans l'insertion du cofacteur de la protéine MoFe ainsi que dans l'activation et l'assemblage du complexe enzymatique (Hopkins, 2003 ; Pelmont, 1995).

- **Les gènes fix**

Les gènes fixes 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 L'un d'eux au mois (fixX), code pour une ferrédoxine ; d'autres pourraient être impliqués dans le transport des éléments vers la di-nitrogénase,

- **La nitrogénase**

La nitrogénase est un complexe enzymatique particulier, elle contient du molybdène, du fer et de sulfure dans ces groupements prosthétiques. Ces éléments sont donc indispensables à la fixation de l'azote. Le complexe nitrogénase est très conservé chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure, la transformation fondamentale de cette enzyme, constitué de deux protéines :

1. Une dinitrogénase réductase: (la nitrogénase I) la Fe-protéine qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, renferme deux sous unités identiques, elle contient du fer et se comporte comme une réductase de 64 KDa (Leclerc et *al* ; 1995 ; Hopkins, 2003).
2. Une nitrogénase : appelée aussi molybdoprotéine (MoFe protéine) c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramériques) 2 2 de 220 KDa, chaque monomère contient un centre (4Fe - 4S) reliés entre eux deux par deux. Ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise cet électron pour réduire N₂ en NH₃ (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003).

- **La leghémoglobine**

La leghémoglobine, protéine de coloration rouge (présence de fer) et présentant des similitudes avec les hémoglobines animales, permet aux *Rhizobium* de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule. ; que se fixé par la leghémoglobine n'est plus libre dans les nodules et ne peut donc plus interagir avec la nitrogénase pour l'inhiber (Hopkins, 2003).

I.1.1.10 Autres facteurs symbiotiques

Il existe à la surface des rhizobia d'autres composés dont le rôle est de succéder aux facteurs Nod : les polysaccharides de surface. La majorité de ces molécules sont des hétéropolysaccharide spécifique aux souches de *rhizobiums*.

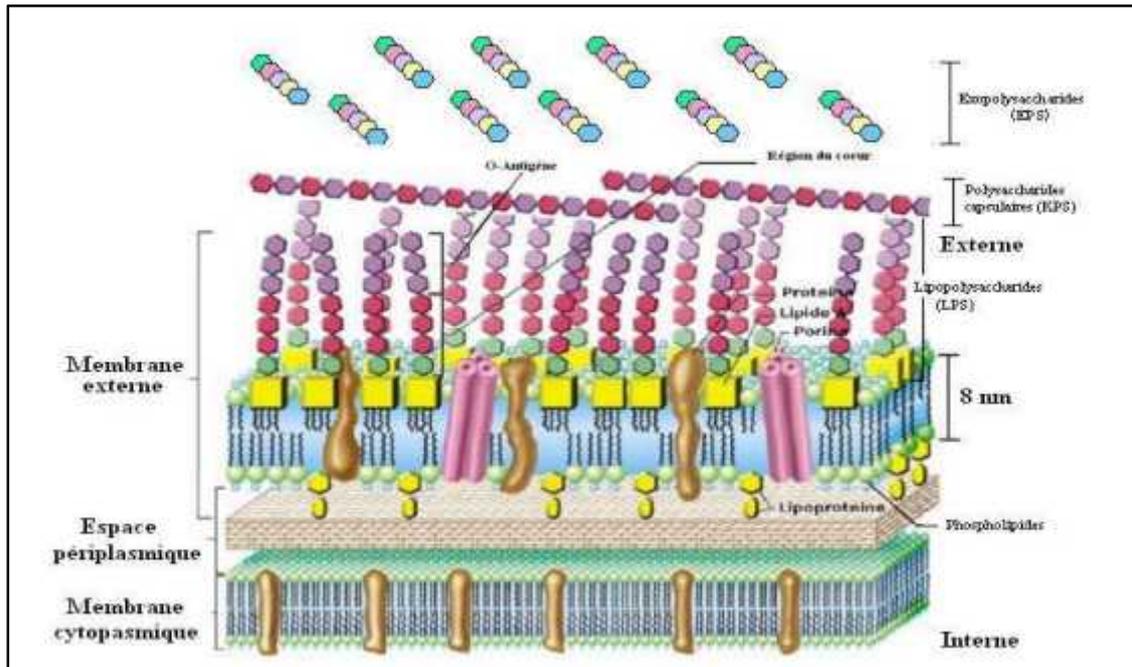


Figure 08 : Schéma de la surface d'une paroi de *Rhizobium*. (Chataigné ,2007).

- **Les exopolysaccharides (EPS)**

Les exopolysaccharides rhizobiens sont des hétéropolymères spécifiques de l'espèce, Les *Rhizobium* possèdent la propriété de former une grande quantité de polysaccharides extracellulaires. Ces molécules sont essentielles dans la reconnaissance des partenaires symbiotiques et le processus de l'invasion des racines inhibant la réponse défensive de la plante (Frayse et *al* ; 2003)

L'absence des exopolysaccharides bactériens provoque chez la plante la production excessive de composés phénoliques, qui colorent en brun les racines et provoquent une apoptose des cellules infectées, ainsi que la mort des bactéries.

- **Les polysaccharides capsulaires (KPS)**

Les polysaccharides capsulaires sont une classe de polysaccharides qui demeure attachée à la surface bactérienne, ces molécules possèdent une structure généralement commune entre les souches de la même espèce. Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote est à ce jour inconnu. Peu d'études ont été réalisées pour comprendre leur mode d'action (Skorupska et *al* ; 2006). Ils pourraient avoir un simple rôle passif de protection lors des changements brusques d'environnement (passage du sol à la plante) et faces aux défenses de la plante (antibiotiques de nature peptidique) et au choc alcalin (Frayse et *al* ; 2003)

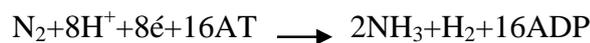
- **Les lipopolysaccharides (LPS)**

Ces molécules jouent un rôle important dans le processus de nodulation, c'est un élément nécessaire dans la pénétration des bactéries à travers les cellules nodulaires, lorsqu'elles sont libérées du cordon d'infection. Les composés sont aussi des agents de cohésion membranaire. Pour cette raison, les LPS semblent nécessaires à la survie de la bactérie lors de sa transformation en bactéroïde (Chataigné, 2007). Joueraient aussi un rôle dans l'inhibition des réactions de défense de la plante dans les étapes les plus tardives de l'infection, lorsque les EPS ne sont plus synthétisées, en empêchant la mise en place du choc oxydant.

I.1.1.11 Fixation biologique de l'azote

Les nodules sont des organes hautement spécialisés où d'importants échanges ont lieu entre la plante et les bactéries ; Les acides organiques fournis par la plante sont une source d'électrons permettant au *Rhizobium* d'obtenir son énergie (réduction O₂ en H₂O) et de fixer l'azote (réduction N₂ en NH₃). L'ammoniac produit est cédé à la plante qui le convertit en acides aminés, une partie étant rétrocédée aux bactéroïdes (Hopkins, 2003).

. La fixation de l'azote est assurée par un complexe enzymatique composée d'une nitrogénase réductase (passage de l'ATP à l'ADP) et d'une nitrogénase vraie (réaction permettant la fixation de l'azote de l'air) (Dommergues et al ; 1999). :



Cette réaction nécessite une très forte consommation d'énergie (16 ATP) et produit également de l'hydrogène qui peut être recyclé, avec augmentation de l'azote total chez la plante.

Ces enzymes extrêmement sensibles à l'oxygène. Dans le nodule, ce complexe protégé par la leghémoglobine qui maintient la pression de l'oxygène au niveau assez bas.

L'activité glutamine synthétase cytoplasmique et le glutamate synthase (GOGAT) plastidique très importantes dans les nodules, le NH₄⁺ convertie en glutamine par la glutamine synthétase et en asparagine, Chez certaines espèces, la glutamine est exportée directement vers le reste de la plante (Pawlowski, 1997 ; Kahn et coll., 1998).

Des études récentes ont cependant montré que c'est plutôt un échange d'acides aminés entre le bactéroïde et le cytoplasme (Glu/Gln ,Asp/Asn) qui permet d'exporter l'azote vers la cellule végétale et le xylème (Lodwig et coll, 2003).

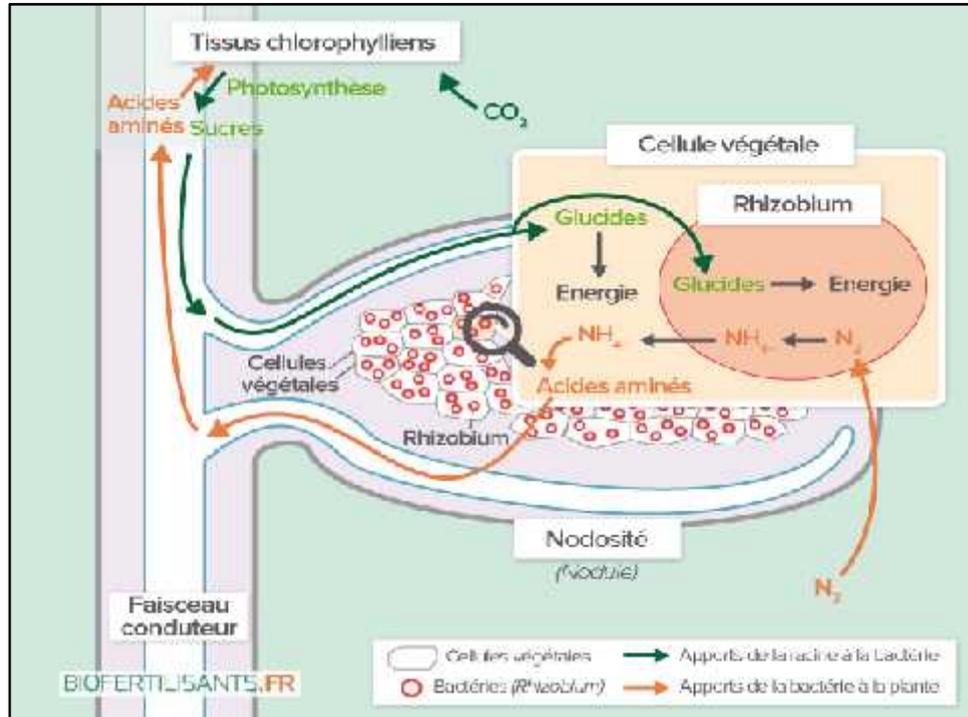


Figure09:Fixation biologique de l'azote lors d'une relation symbiotique (<http://www.biofertilisants.fr/zoom-les-bacteries-fixatrices-dazote/>).

I.1.1.12 Les intérêts de la symbiose Rhizobienne

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. Cette interaction est le résultat d'un équilibre délicat entre une plante supérieure et une bactérie.

La quantité d'azote fixée par la symbiose Rhizobienne peut être très importante (de l'ordre de 60 kg d'N par ha et par an pour de l'arachide, ou même de 150 kg d'N par ha et par an pour un champ de luzerne) mais elle est aussi très variable en fonction des conditions environnementales.

Les rhizobia jouent un rôle important dans la protection des légumineuses contre les stress abiotique et biotique par une compétition nutritive entre les rhizobia et l'agent pathogène envers la source de carbone (Bordeleau, 1989 ; Ehteshamul-haque et al ; 1992) et par la production par certains Rhizobia des sidérophores (Kloepper et al ; 1980 ; Moore ,1988).

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).

I.2 Symbiose mycorhizienne

Dans la nature la majorité des végétaux terrestres vit en symbiose avec des champignons .cette étroite relation entre les plantes supérieurs et les micro-organismes que sont les champignons s'élaborent au niveau des racines. Les organes résultants de cette association sont appelés mycorhizes.

Le terme « mycorhize » a été proposé par (Frank, 1885), il vient de la combinaison de deux mots, l'un grec mukes (champignon) et l'autre latin rhiza (racine), il désigne donc essentiellement l'association symbiotique entre des champignons et les racines des plantes presque, toujours chlorophylliennes (Smith et Read, 1997).

La plante fournit au champignon des composés carbonés produit par la photosynthèse et en retour, le champignon approvisionne la plante en éléments minéraux et en eau provenant du substrat.

Il s'agit donc là d'un phénomène fondamental et universel chez les plantes vasculaires et les bryophytes, lequel existent depuis le tout début de la vie terrestre, il y a plus de 450 millions d'années (ANDRE et al ; 2004). La plante verte effectue la photosynthèse et le champignon approvisionne le couple en eau et en éléments minéraux à partir du sol.

I.2.1 Principaux types de la Symbiose mycorhizienne

Selon leurs critères écologique, morphologique, physiologique et l'espèce végétale et fongique, plusieurs types d'association mycorhyzienne sont distingués (Delian et al ; 2011). Actuellement, sept types de mycorhizes sont reconnus. Mycorhize à arbuscules (MA), ectomycorhizes ectoendomycorhizes, mycorhize arbutoides, mycorhize monotropoides, mycorhize éricoïdes et orchidoïdes (Garbaye,2013).

La classification des mycorhizes est basée donc sur le type de champignon associe, selon que celui est asepté, c'est à dire zygomycète de l'ordre des *glomales*, ou septé, comme les ascomycètes ou basidiomycètes (Smith et Read, 1997).

I.2.1.1 Ectomycorhizes (ECM)

Il existe environ 6000 espèces de plantes à ectomycorhize, (Rinaldi et al; 2008 ;Brundrett, 2009 Tedersoo, et al ; 2010) ces plantes appartiennent aux angiosperme (environ 6500 espèces) Gymnosperme (285 espèces), les ectomycorhizes bien qu'elles ne concernent que 3% des taxons végétaux, revêtent une importance particulière.

ce sont des symbioses formées par des champignons colonisant principalement les arbres et arbustes (en majorité pinaceae, Betulace , Fagaceae ,Salicaceae ,Myrtiliaceae)des régions boréales, tempérées et montagneuse ,qui produisent souvent des carpophores à la surface des sols forestiers (Mille et louppe,2015).. Ce sont majoritairement des ascomycètes et des basidiomycètes. Ils se développent de manière intercellulaire. En effet le mycélium progresse entre les cellules du cortex racinaire mais ne pénètre pas dans les cellules vivantes. Les ectomycorhizes se caractérisent par la formation de tissus spécialisés. Outre les hyphes extramatrixiels se propageant dans le milieu extérieur et assurant le rôle d'exploration et d'absorption, on distingue les hyphes agglomérés autour de la racine, formant un manchon fongique pseudo parenchymateux ou manteau gainant, et les hyphes qui s'insinuent entre les cellules du cortex formant un réseau appelé réseau Hartig. C'est un niveau de ce réseau que se font les échanges d'éléments nutritifs entre le champignon et la plante (Fortin et al.,2008)..

I.2.1.2 Ectendomycorhizes

Il arrive que les ectomycorhizes et les endomycorhizes soient présents en même temps sur une racine, on parle alors d'ectendomycorhize, le premier type est minoritaire et concerne surtout les arbres, le second est majoritaire et concerne presque tous les végétaux. Ils montrent simultanément, un manteau réduit ou absent qui possède un réseau de Hartig bien développés, des structures des structures des ectomycorhizes et des hyphes qui pénètrent dans les cellules racinaires, des structures des endomycorhizes.

I.2.1.3 Endomycorhizes

Les champignons endomycorhiziens ne sont pas spécifiques est sont normalement associés aux plantes comme les plantes forestières agricoles.

Ces symbiotes à colonisation intracellulaire corticale, forment des arbuscules, des vésicules ou des hyphes, ne se cultivent pas et ne sont pas visibles qu'après coloration.

Ils existent trois types d'endomycorhizes ; Les endomycorhizes arbutoides des Ericacées et, qui forment des pelotons intracellulaires et Les endomycorhizes à arbuscules qui colonisent l'intérieur des cellules sous forme des arbuscules

Parmi ces types de mycorhizes, nous nous sommes intéressés aux MA qui sont de loin les plus répandues en milieu tropicales champignons responsables de ce type de symbiose comptent actuellement plus de 152 espèces (Walker & Trappe, 1993) que l'on trouve sous tous les climats, les latitudes et les habitats. Et qui sont maintenant incapables de survivre sans plante hôte (ce sont des symbiontes obligatoires).

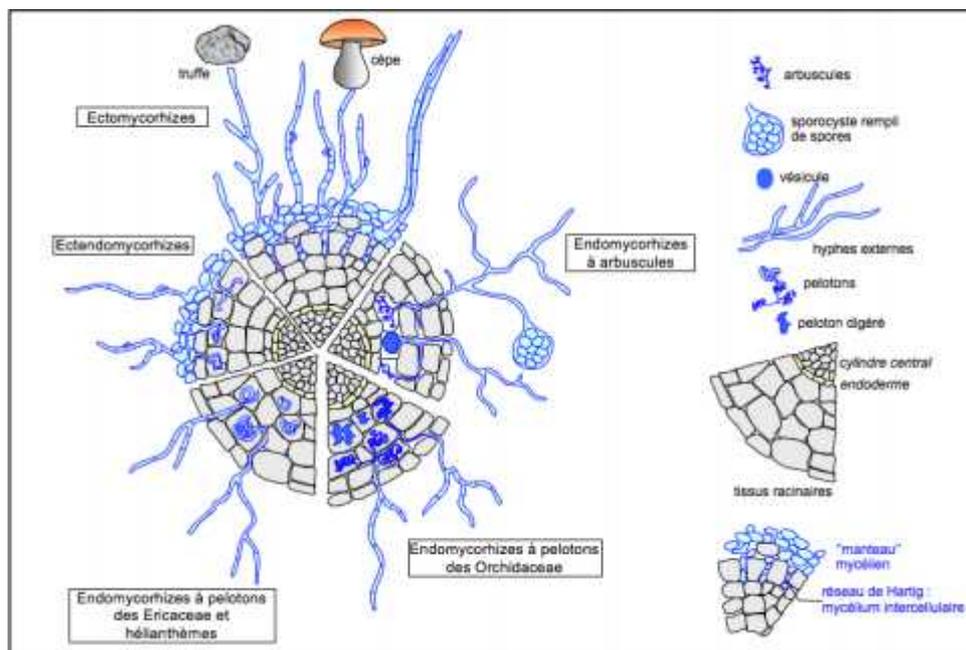


Figure 10 : Principaux types de mycorhize représentés sur une coupe transversale de racine d'après (Selosse and Le Tacon 1998) repris par (F. Halle dans le livre Aux origines des plantes, Ed. Fayard 2008).

I.2.2 Symbiose mycorhizienne à arbuscule(MA)

Parmi les associations endomycorhiziennes, ce 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 (Smith et Read, 1997). Ligneuses, herbacées, les mousses, fougères, gymnospermes et angiospermes plusieurs conifères et la majorité des plantes à fleurs, mono et dicotylédones.

Le champignon mycorhizien à arbuscule (CMA) forme plusieurs structures à l'intérieur des racines principalement des arbuscules, des vésicules des spores et des hyphes non spécialisés (Tommerup, 1984). On utilise le terme propagule pour les désigner puisque toutes ces structures servent à propager l'espèce (Fortin *et al.* ; 2008).

I.2.2.1 Taxonomie et phylogénie des CMA actuelle

Selon l'historique approfondi de la taxonomie et de la systématique des *Glomeromycota* (Stürmer, 2012), l'évolution de taxonomie et la phylogénie des CMA peut se décrire en quatre phases :

- Le premier est une période descriptive (1845 à 1974) est caractérisée par une description de la formation des espèces à sporocarpes et la proposition d'une classification de ces champignons,
- la seconde est basée sur la morphologie (1975-1989).
- La troisième est cladistique, à savoir fondée sur la mise en place d'outils moléculaires alliés aux méthodes morphologiques (1990-2000).
- Enfin, la quatrième est phylogénétique (2001-actuel) car s'appuyant uniquement sur des techniques moléculaires et informatiques.

Après de nombreux changements de la classification des *Glomeromycota* ces dernières années (Oehl *et al.*, 2008; Morton et Msiska, 2010; Schüßler et Walker, 2010; Oehl *et al.*, 2011a; Oehl *et al.*, 2011b; Oehl *et al.*, 2011c), la classification la plus récente prend en compte les aspects de phylogénie moléculaire et de morphologie (Redecker *et al.*, 2013).

Ces symbiotes fongiques sont actuellement classés dans le phylum des *Glomeromycota* le phylum des *Glomeromycota* fait mention d'environ 240 espèces décrites à ce jour, réparties en quatre ordres, onze familles et vingt-cinq genres (Redecker *et al.* ; 2013) (Figure 11).

L'ordre des *Paraglomerales* (Schüßler *et al.*, 2001) compte une famille comprenant un seul genre : *Paraglomus* (Morton et Redecker, 2001b). Ce genre serait le clade qui a divergé en premier selon les études phylogénétiques basées sur l'ADN ribosomal (

Les trois espèces de référence décrites à ce jour forment des spores de petites tailles.

L'ordre des *Archaeosporales* (Walker et al., 2007) comprend trois familles, incluant chacune un seul genre qui sont nommés : *Archaeaospora*, *Ambispora* et *Geosiphon*. Au total, cet ordre présente environ une dizaine d'espèces décrites.

Les deux ordres les plus fournis en espèces décrites sont les *Diversisporales* et des *Glomerales*.

L'ordre des *Diversisporales* (Walker et Schüßler, 2004) est peut être le plus complexe puisqu'il regroupe cinq familles différentes. Trois d'entre elles, *Acaulosporaceae*, *Pacisporaceae* et « *Sacculosporaceae* », ne contiennent qu'un genre chacune tandis que les deux familles restantes, *Diversisporaceae* et *Gigasporaceae*, en présentent un nombre incertain, comme le montre les astérisques de la (Figure 11) . Parmi les cinq genres de la famille des *Diversisporaceae*, seuls deux s'appuient sur des données moléculaires : les *Redeckera* comptant environ Trois espèces et les *Diversispora* environ une dizaine. La famille des *Gigasporaceae*, quant à elle, est composée de sept genres totalisant 35 espèces. Outre, les deux genres qui ont une position incertaine (lignes pointillées dans la (Figure 11), les cinq autres se nomment: les *Scutellospora*, les *Gigaspora*, les *Dentiscutata*, les *Cetraspora* et les *Racocetra*.

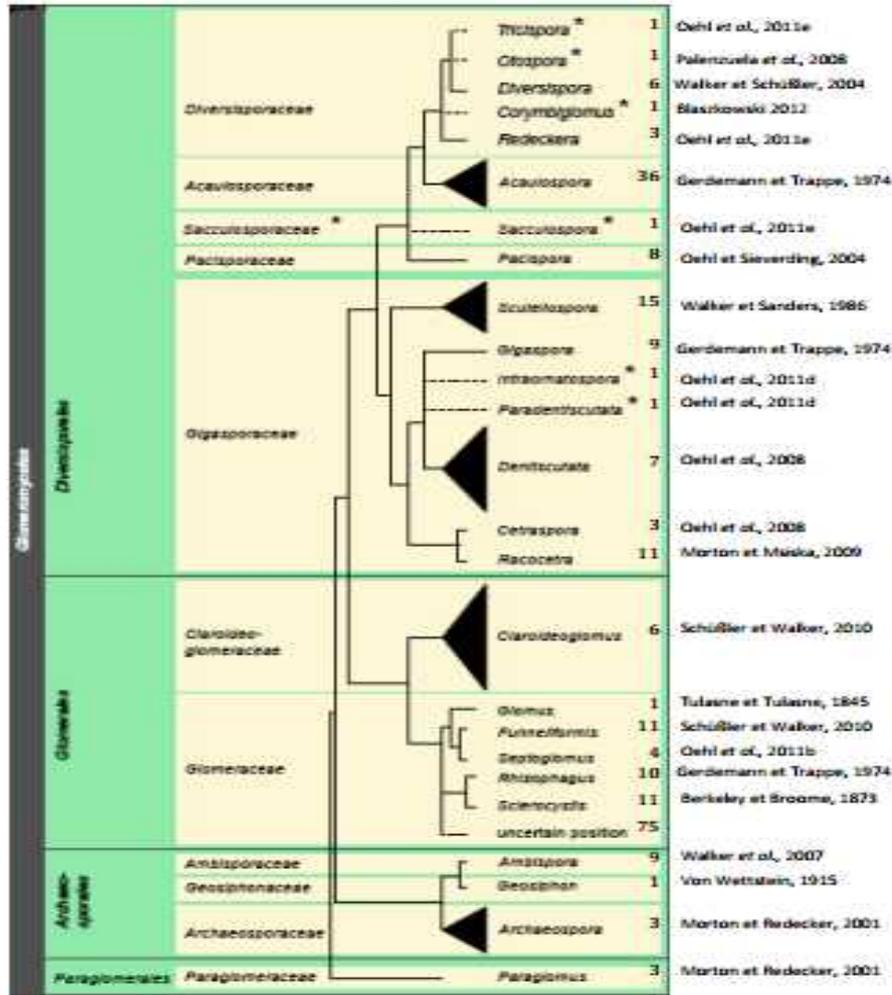


Figure 11: Phylogénie actuelle des *Glomeromycota*, tirée de (Redecker et al ; 2013). Les traits pointillés indiquent une position phylogénétique incertaine. Les astérisques, quant à eux, soulignent les genres pour lesquels il manque des données mais qui n'ont pas été remaniés. Le nombre d'espèces décrites par genre ainsi que les auteurs ayant décrit ces genres pour la première fois sont indiqués à droite.

L'ordre des *Glomerales* (Morton et Benny, 1990) comprend deux familles, les *Claroideoglomeraceae* et les *Glomeraceae*. La première présente un seul genre qui correspond à environ six espèces ; tandis que la deuxième famille comporte une centaine d'espèces réparties en au moins six genres. Ces deux familles ont longtemps été confondues au sein des *Glomeraceae* puisque ce n'est que récemment que les *Claroideoglomeraceae* ont été séparés des *Glomeraceae* (Schüßler et Walker, 2010).

I.2.2.2 Ecologie et distribution géographique des CMA :

On les trouve dans de nombreux environnements et leur succès écologiques reflète une forte diversité des capacités génétiques et physiologiques des champignons endophytes. (Bonfante et Anca, 2009).

Le champignon mycorhizien n'existe aucun site naturel où il y a absence d'endomycorhize sauf dans des zones tourbeuses, des dunes récentes et des dépôts morainiques (dépôt de sable, de cailloux et d'argile). La diversité et la distribution des CMA résultent des processus écologiques temporaires agissant sur les communautés végétales et fongiques, la température, le pH et le niveau de P dans le sol ainsi que le génotype des plantes constituent des facteurs limitant la distribution des espèces des CMA tels que *Glomus sp* et *Acaulospora Leavis*. (Johnson et al ; 2004).

Les *Glomeromycetes* sont des mycosymbiotes obligatoires dont le cycle biologique dans le sol repose entièrement sur la présence des racines vivantes de la plante hôte (Fortin et al ; 2008), qui leur fournit les éléments carbonés indispensables à leur développement.

La connaissance de l'écologie des CMA est fondamentale pour comprendre la coexistence des différentes espèces, l'exploration par ces champignons des ressources disponibles en nutriments et leur reproduction (Pringle et Bever, 2002 ; Hart et Klironomos, 2002). Ces connaissances ont permis de déterminer les différences dans les familles d'espèces.

I.2.2.3 Structure des champignons mycorhizes à arbuscules :

Au cours de leur cycle de vie, les CMA forment donc des structures différentes (des arbuscules, des vésicules, des cellules auxiliaires, mycélium interne / externe) et des spores (Morton, 1990). Ces structures possèdent chacune une fonction plus ou moins propre.

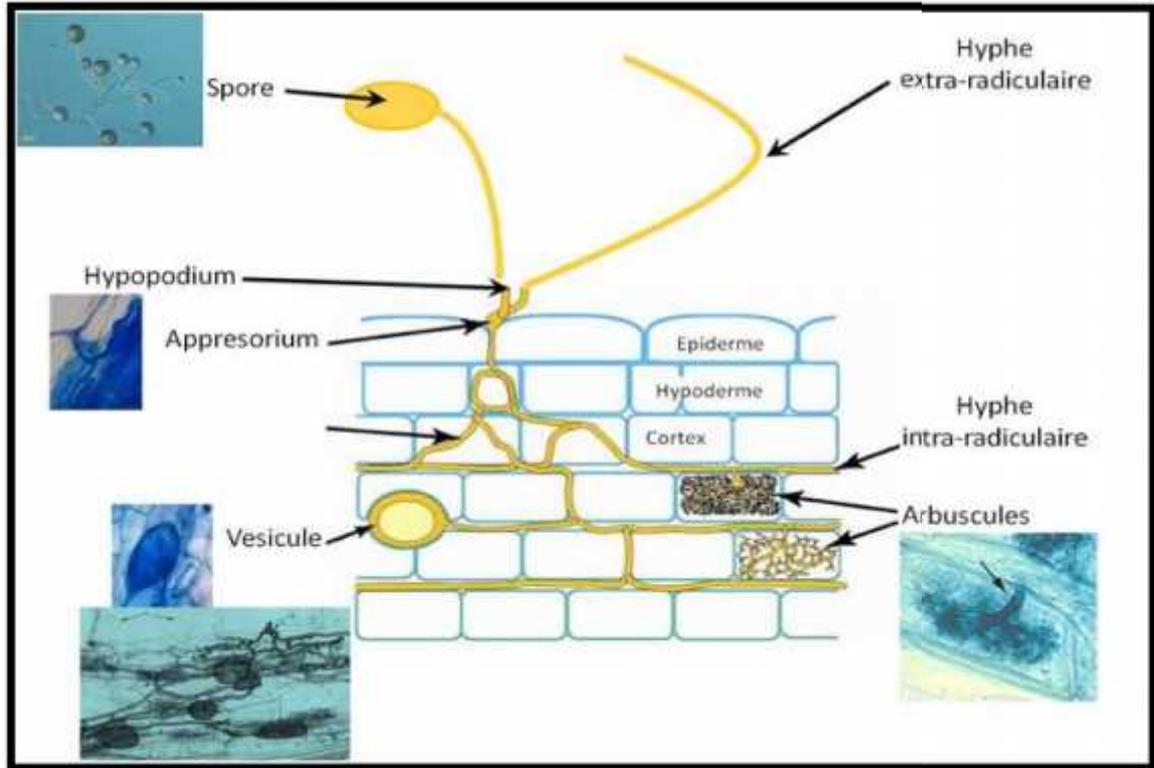


Figure 12: les différentes structures des champignons mycorhiziens à arbuscules (Whiffen ,2007), (Berutti et al. 2014).

> **spores**

La spore sert d'organe de stockage et de propagation des CMA. Elle germe et donne naissance à des filaments mycéliens. Lorsque les hyphes entrent en contact avec une jeune racine, ils forment un appressorium, entre et se propagent rapidement, ils se différencient à l'intérieur des racines en arbuscules et dans certains cas en vésicules

Elles atteignent des dimensions imposantes de 40 à plus de 500µm. Ces spores possèdent également des parois ou enveloppes extrêmement épaisses qui les protègent contre les stress environnementaux. (Garbaye, 2013).

> **Arbuscules**

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



Figure 13 : Arbuscule de *Glomerus* développe dans une cellule racinaire (Bredrett MC ,2008).

> **vésicules :**

La vésicule est une structure de stockage à paroi fine, a contenu lipidique et apparait généralement dans les espaces intercellulaires. Les vésicules ont une forme ovoïde, globulaire ou ellipsoïde et contiennent une à deux parois minces (1 à 2,5 μ m de diamètre). En effet, elles sont ellipsoïdes chez *Glomus spp.* (Webet et al .2003), tandis qu'elles ont des formes variables chez *Acaulospora spp* et *Kuklospora spp.*(Blaszcowski et al.2006).

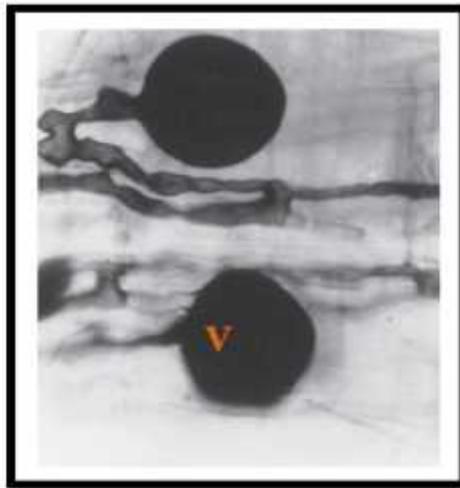


Figure14: Aspect des vésicules dans une coupe de racine mycorhizée (Dexheimer, 1997).

> **Cellules auxiliaires :**

Sont des formes globulaires regroupées en grappe, attachées aux hyphes extra-matriciels et souvent ornementées. Les cellules auxiliaires sont riches en noyaux, en organites et en lipides leurs surface est lisse rugueuse.

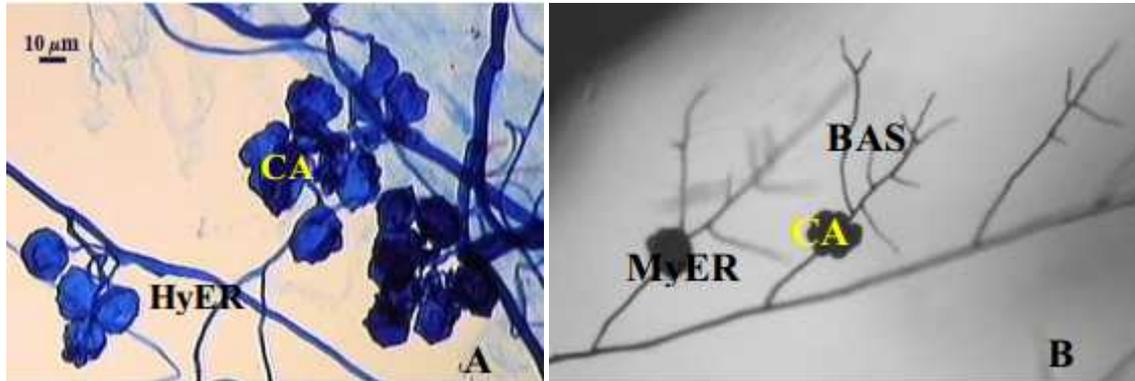


Figure 15: Aspect des cellules auxiliaires (AC) (Bago et Cano, 2005).

A : morphologie des cellules auxiliaires attachées aux hyphes extra-racinaires (HyER).

B : Développement des cellules auxiliaires de *Gi. margarita* sur tronc des (BAS).

➤ **Hyphes :**

D'un point de vue morphologique, les hyphes des CMA sont coenocytiques (hyphes dépourvus de septa) (Reinhardt, 2007). la plupart des noyaux bougent ainsi librement dans les hyphes bien que certains situés en position latérale semblent immobiles (Bago et al., 1999). Les hyphes intra-radiculaires sont reliés aux arbuscules et se prolongent de façon extra-radiculaire dans le sol. Elles se propagent dans le sol créant ainsi un réseau mycélien qui peut atteindre des longueurs importantes allant jusqu'à plusieurs dizaines de mètres par gramme de sol (Leake et al., 2004). La capacité des différents CMA à former ces réseaux mycéliens peut différer (Voets et al ; 2006). Les CMA étant des biotrophes obligatoires, l'exploration du sol par le réseau mycélien participe à la survie du champignon car cela leur permet de rencontrer d'autres plantes hôtes. De plus, le réseau mycélien absorbe les éléments nutritifs du sol (azote, phosphore notamment) agissant comme une extension du système racinaire des plantes dans le sol (Newman et Reddell, 1987), fonction sine qua non au statut symbiotique des CMA.

En fonction de leur activité principale, on peut distinguer plusieurs types d'hyphes extra-racinaires:

- Les hyphes d'absorption, très ramifiées et minces, elles prélèvent les molécules du sol.
- Les hyphes conductrices ayant un diamètre plus important et un cytoplasme peu abondant.
- Les hyphes d'infection qui peuvent coloniser de nouvelles racines.
- Les hyphes sporogènes qui donneront naissances aux spores.

I.2.2.4 Etablissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules :

I.2.2.4.1 Colonisation des racines par les CMA

L'établissement de la symbiose entre la plante et le CMA s'effectue via un échange de signaux Moléculaires. La reconnaissance entre le champignon et la plante-hôte met en jeu les exsudats racinaires et fongiques (Figure16) : les flavonoïdes et les strigolactones, substances chimiques émises par la plante-hôte, vont stimuler l'activité métabolique du champignon (Stevenin, 2011 ; Gavériaux, 2012). Elles vont induire chez le CMA l'expression du gène Myc puis de facteurs Myc. Ces facteurs Myc vont induire des déformations dans les cellules de l'hôte pour l'établissement de la symbiose, ainsi que la croissance des hyphes colonisant les racines (Stevenin, 2011). Une spore de champignon germe, le mycélium croît en direction de la racine, et lorsque le champignon perçoit la présence d'une plante hôte, il manifeste une réaction typique de ramification intense des hyphes appelée « branching » (Figure 16).

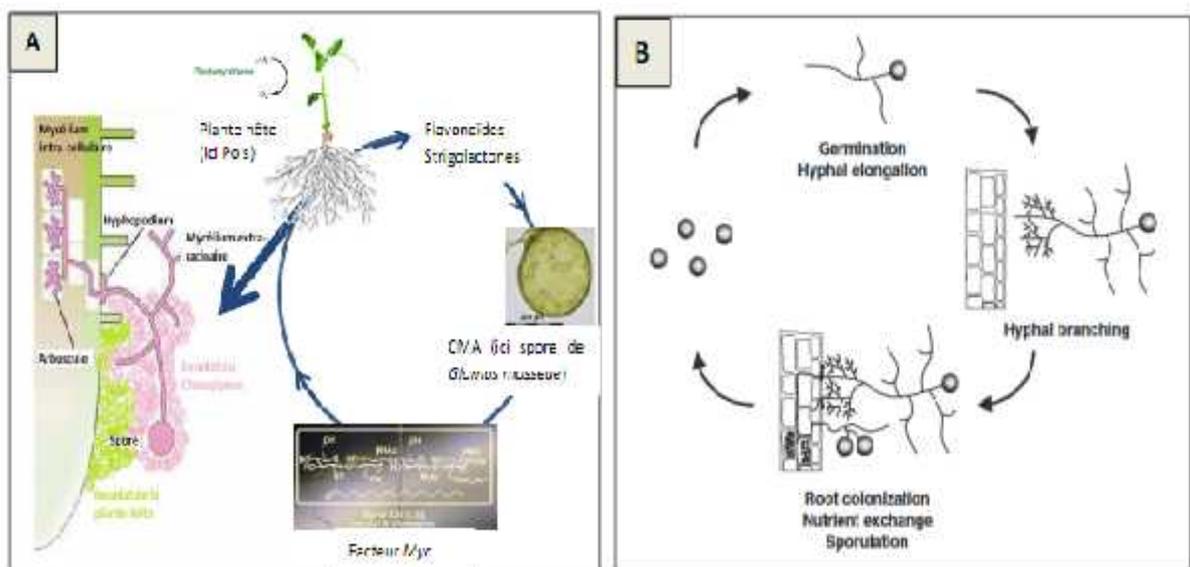


Figure 16: Schématisation de l'établissement de la symbiose mycorhizienne (A) et du cycle de vie des CMA ((B), modifié d'après Akiyama, 2007).

Les hyphes adhèrent ensuite aux parois externes des cellules de la racine, formant un hyphopodium, avant de les perforer en sécrétant des enzymes qui vont détruire la cellulose, les hémicelluloses et les pectines constituant ces dernières. Une fois à l'intérieur de la cellule, les hyphes se ramifient par dichotomie en donnant des hyphes ayant un diamètre de plus en plus petit ; à partir d'une hyphe initiale de 10 µm de diamètre, les dernières ramifications peuvent atteindre moins de 1 µm de diamètre. L'ensemble de ces ramifications prend une forme de petit arbre : les arbuscules, lieux des échanges symbiotiques, qui donnent le nom à ces champignons (Gavériaux, 2012 ; Garbaye, 2013).

Les arbuscules sont des structures spécialisées dans le transfert de l'eau et des éléments nutritifs entre le champignon et la plante; pour le phosphore le transfert s'effectue sous forme d'ions orthophosphates via des transporteurs spécialisés insérés dans les membranes cellulaires à l'interface entre la plante et le champignon. Les sucres provenant de la plante sont conduits en sens opposé par des transporteurs d'hexoses qui sont d'autres canaux spécialisés (Karandashov et Bucher, 2005 ; Garbaye, 2013). Après différenciation des structures intra-racinaires, le champignon produit des spores à partir de son mycélium extra-racinaire (Akiyama *et al.*; 2007). Tous ces mécanismes de communication moléculaires sont encore peu connus mais la recherche progresse régulièrement grâce notamment aux progrès de la génomique (Garbaye, 2013).

I.2.2.4.2 Fonctionnement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire :

La symbiose mycorhizienne arbusculaire (MA) joue un rôle important dans le cycle des nutriments dans les écosystèmes terrestres. Néanmoins, la nature souterraine et une partie de la biomasse fongique étant incluse à l'intérieur des racines font que certains aspects du fonctionnement de cette symbiose restent encore inconnus même si de gros progrès dans la compréhension de ces mécanismes ont été faits avec le développement des techniques de biologie moléculaire et d'analyses génétiques. L'établissement de la symbiose MA commence par la colonisation d'une racine compatible par les hyphes produites par les propagules de champignons MA (spores asexuées ou racines déjà mycorhizées). Si l'hyphe ne rencontre pas de racine après 2 à 4 semaines de croissance le champignon ne peut pas se développer et compléter son cycle de vie. Dans ce cas, les spores peuvent se remettre en dormance après rétractation du protoplasme et réallocation des ressources en attendant de meilleures conditions (Logi *et al.*, 1998). Suite à ce stade asymbiotique du champignon, le premier stade de la colonisation mycorhizienne est la formation d'un appressorium à la surface de la racine à partir duquel le champignon peut pénétrer dans l'épiderme et le

cortex racinaire pour former les structures intracellulaires spécialisées que sont les pelotons et les arbuscules (Requena et al, 2007). Lors du stade pré-symbiotique, c'est un dialogue chimique entre le champignon et la racine compatible qui permet la rencontre des deux partenaires. Des exsudats racinaires (« branching factor ») de la plante hôte induisent la germination des spores, la croissance et la ramification de l'hyphe (Buée et al., 2000), ce qui augmente les chances du champignon d'entrer en contact avec une racine. Ce composé induisant la ramification de l'hyphe a été isolée et identifié par Akiyama et al. (2005) comme étant une strigolactone, mais ce n'est pas le seul composé induisant cette réaction, les flavonoïdes peuvent aussi avoir des effets sur la croissance du champignon même si cet effet est variable selon le couple plante-champignon (Scervino et al., 2005). Par contre, ces signaux chimiques ne semblent pas concerner la formation des appressoria qui serait plutôt liée à un signal thigmotropique (induit par le contact). En effet, la seule présence physique de cellules épidermiques suffit à la formation d'appressoria (Nagahashi et Douds, 1997). La perception de ces signaux chimiques et physiques par le champignon laisse supposer l'existence de récepteurs sur la membrane plasmique du champignon pour la transmission du signal et dont Ca^{2+} pourrait jouer le rôle de 2nd messager (Requena et al., 2007). Par ailleurs, Kosuta et al. (2003) ont montré que le champignon aussi émet une molécule signal qui active un gène de réponse à la symbiose (ENOD11) chez la plante hôte. Dans cette communication complexe entre le champignon MA et la plante, il faut aussi citer les phytohormones (cytokinines, gibberellines, éthylène, acide abscissique, auxines et acide jasmonique), dont les concentrations dans les plantes peuvent varier selon la présence ou non du champignon, mais dont les fonctions ne sont pas toujours bien connues (Hause et al ; 2006).

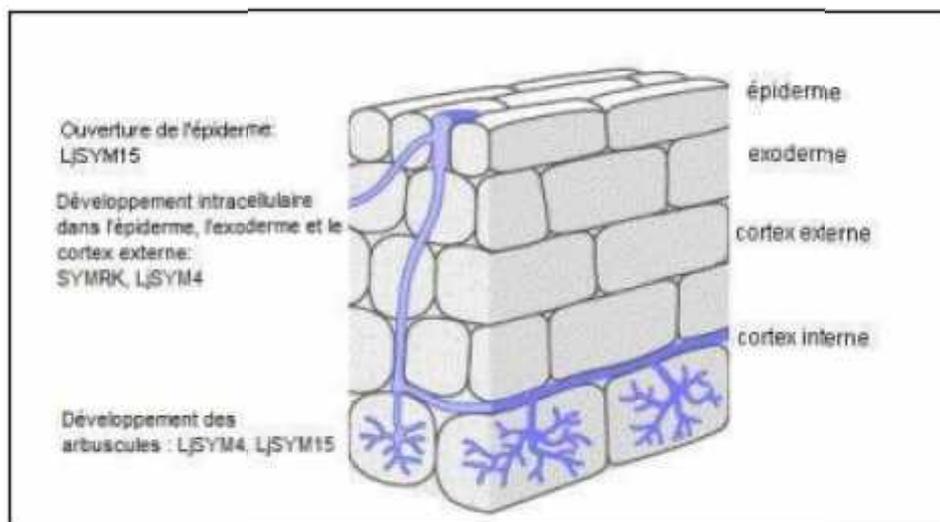


Figure 17: Vue schématique du développement d'un champignon à travers les différentes couches cellulaires d'une racine et gènes de la plante impliqués dans la régulation des différentes étapes de la colonisation (d'après Parniske, 2004).

Les structures intracellulaires que sont les arbuscules constituent le lieu d'échanges de nutriments entre la plante et le champignon. Au niveau de ces structures bien ramifiées, le champignon reçoit des produits carbonés issus de la photosynthèse (sucres et lipides) lui permettant de croître et de former du mycélium à l'extérieur des racines (extra radriculaire) à la recherche d'éléments nutritifs (phosphore, azote) qu'il transporte jusqu'à la plante (Figure17).

Le cycle du champignon est complété lorsqu'il forme de nouvelles spores dans ce mycélium externe. L'échange et le transport des nutriments mettent en jeu un certain nombre de transporteurs membranaires. Le transport des phosphates par des plantes mycorhizées a ainsi particulièrement été étudié (Requena, 2005 ; Javot et *al.*, 2007) et un certain nombre de transporteurs de phosphate ont pu être identifiés sur la membrane périarbusculaire (Harrison et *al.*, 2002 ; Poulsen et *al.*, 2005) ainsi que sur le mycélium extra radriculaire (Maldonado-Mendoza et *al.*, 2001 ; Benedetto et *al.*, 2005). Enfin, récemment, une attention particulière s'est portée sur le rôle des aquaporines en ce qui concerne le transport de l'eau et des nutriments entre les deux partenaires de la symbiose mycorhizienne arbusculaire (Uehlein et *al.*, 2007). Les aquaporines, présentes dans de nombreux systèmes biologiques, constituent un système de diffusion facilitée à travers les membranes qui sont ainsi perméables à différentes molécules de petites tailles (CO_2 , $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) pouvant être échangées entre le champignon et les racines.

I.2.2.5 Spécificité d'hôte

Largement présentes dans la nature, les mycorhizes sont indispensables à la survie des végétaux. La symbiose mycorhizienne à arbuscule ne présente pas une spécificité d'hôte nette (selosse et *al.*, 2006). généralement une espèce de CMA est capable de mycorhizer une grande variété de plantes n'appartenant pas au même taxon. de la même Façon, une plante peut être mycorhizer par différentes espèces de CMA n'appartenant pas obligatoirement au même genre .de plus il a été montre qu'un même individu fongique est capable de mycorhizer simultanément deux plantes adjacentes d'espèces différentes (Newman et *al.*, 1994).

Il existe quelques exceptions : certains végétaux ne développent pas de mycorhizes et n'en ont d'ailleurs pas besoin. C'est par exemple le cas de l'épinard, de la rhubarbe ou encore du navet et du blé.

Dans les milieux dégradés comme les jardins urbains ou les terrains cultivés à outrance, il est nécessaire de procéder à un apport en mycorhizes.

De nombreuses plantes ont besoin de cette symbiose mycorhizienne pour se développer dans les meilleures conditions. Par exemple, c'est le cas des :

- Arbres fruitier, Légumes du potager, dans la grande majorité, Rosier, Plantes à bulbes, Plantes annuelles et vivaces, Arbustes d'ornement, Plantes vertes d'intérieur.

Il est donc indispensable de « mycorhize » les plantes en pots et jardinières pour qu'elles puissent bénéficier d'un sol suffisamment riche en nutriments et être plus vigoureuses, mais aussi bien d'autres plantes et arbres du jardin.

I.2.2.6 Effet et protection du champignon mycorhizien à arbuscule :

Si la symbiose mycorhizienne arbusculaire est autant répandue dans le monde végétal, c'est parce qu'elle est bénéfique à la plante sous plusieurs aspects : en fournissant des nutriments à la plante, les champignons MA ont un effet fertilisant, ils jouent aussi un rôle dans la stabilité du sol.

- **Amélioration de la croissance et de la nutrition des plantes :**

L'effet majeur des champignons mycorhiziens dans les écosystèmes non perturbés est l'amélioration de la croissance des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non mycorhizées (Plenchette et *al*; 1983 ; Karagiannidis et Hadjisavva-Zinoviadi, 1998). L'accroissement de la biomasse végétale est lié à l'apport de nutriments limitant par le champignon. En effet, en explorant un plus vaste volume de sol que les racines, le mycélium des champignons MA permet de suppléer la nutrition de la plante en éléments limitant. Dans certains cas de sols acides ($\text{pH} < 5$), où ce sont des éléments comme Ca, Mg ou K qui sont déficients, les plantes mycorhizées montrent ainsi des concentrations foliaires en ces éléments supérieures aux plantes non mycorhizées (Clark, 1997). Mais le plus souvent, ce sont les composés azotés et les phosphates qui sont les facteurs limitant pour la croissance de la plante et il a été bien montré.

Le phosphore est un composé essentiel du vivant. Il se retrouve notamment dans les acides nucléiques et les protéines. Par conséquent, c'est un élément génétique, énergétique et plastique de la matière vivante. Dans le monde agricole, le phosphore joue un rôle physiologique à plusieurs niveaux. Il favorise la croissance de la plante, son action étant conjuguée à celle de l'azote, le développement des racines, la rigidité des tissus, la reproduction et la qualité des produits végétaux. Dans le sol, le phosphore est lié à la matière organique et à la fraction minérale du sol : les ions phosphates sont retenus dans les colloïdes ou souvent immobilisés sous forme de phosphate de fer ou d'aluminium (Gavériaux, 2012). Seule une infime partie se trouve sous forme d'ions orthophosphates (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-), unique forme assimilable par les racines des plantes, dans la solution du sol. La concentration en phosphore de la solution du sol est faible, de l'ordre de 0.2 mg de P/L (UNIFA, 2016). Cette réserve doit donc être constamment renouvelée afin de satisfaire la nutrition phosphatée de la culture (Figure 18). Pour ce faire, les plantes ont évolué pour élaborer des mécanismes facilitant l'absorption du phosphate ; la formation d'associations symbiotiques avec les champignons du sol est une de ces stratégies (Karandashov et Bucher, 2005).

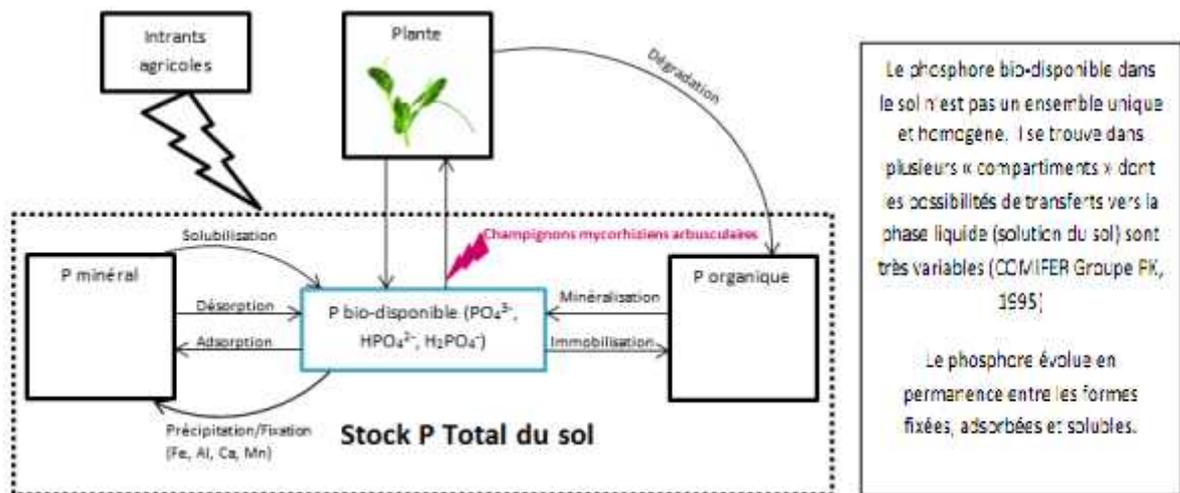


Figure 18: Cycle simplifié du P dans les agro-systèmes montrant la répartition de stock total de P du sol entre les différents pools de P, et le rôle des CMA dans le transfert de P biodisponible à la plante, modifié et adapté d'après Plassard *et al* ; 2015.

La contribution des CMA à la fertilité phosphatée des sols vient principalement de leur capacité à explorer un plus grand volume de sol grâce à l'établissement de nombreux hyphes donnant ainsi accès à une ressource en P supérieure pour la plante. . Les CMA semblent donc potentiellement bénéfiques à la plante hôte en augmentant le prélèvement des ions phosphates pour la plante (Gosling *et al* ; 2006).

Les mycorhizes à arbuscules n'ont pas de propriétés ligninolytiques permettant de minéraliser les éléments nutritifs dans les sols très organiques, ce qui indique une certaine adaptation des différents types de champignons mycorhiziens à leur habitat (Read et Perez-Moreno, 2003). L'amélioration du prélèvement des éléments limitants est ainsi associée à une augmentation de la biomasse des plantes mycorhizées, néanmoins l'efficacité de cet effet est variable selon les conditions de sol (teneur en P, C organique, pH, CEC, texture...) mais aussi selon l'association plante– champignon (Monzon et Azcón, 1996 ; Jakobsen *et al* ; 1992).

- **Absorption des éléments minéraux**

C'est la fonction première des mycorhizes, notamment le phosphore, le cuivre, le calcium, le potassium, le magnésium, le zinc, etc. L'altération des minéraux par les champignons en association avec les bactéries a été mise en évidence chez les champignons ectomycohriziens des arbres forestiers, cependant il est fort probable que les autres types de mycorhizes en soient également capables.

Les champignons mycorhizes interviennent également dans la décomposition de matières organiques, qu'elles soient végétales ou animales ; et ainsi donnent accès aux plantes à d'autres minéraux, l'azote en premier .Les mycorhizes s'associent à des bactéries du sol pour dissoudre des minéraux et rendre accessible le phosphore aux plantes.

Cette capacité de réguler le flux de phosphore du sol à la plante est la principale fonction du mycorhize dans les échanges symbiotiques. Dans le cas des légumineuses, la symbiose mycorhizienne et l'association avec les bactéries du genre rhizobium (fixation de l'azote), sont en fait indissociables.

- **Lutte contre des agents pathogènes**

Le sol héberge de nombreux organismes qui entrent directement en compétition avec les CMA pour la colonisation des racines et du sol. Le système racinaire des plants est donc

l'objet d'attaques d'agents parasites de nature très variée: champignons, bactéries, nématodes. L'association mycorhizienne bien établie dans les cultures réduit dans bien des cas la sévérité des symptômes des maladies racinaires en diminuant l'agressivité des parasites (Dehne, 1982;Filion et al ; 1999). Les CMA permettent une réduction de la gravité des pourritures racinaires produites par *Phytophthora spp* (Garcia-Garrido & Ocampo, 1989). Des travaux ont aussi montré un effet protecteur du CMA à l'égard de *Fusarium* et *Verticillium*, agents de fonte de semis et de nécroses racinaires (Liu, 1995; Garcia-Romera et al ; 1998). Ces résultats montrent qu'en pépinière le principal avantage attendu de la mycorhization contrôlée peut être un effet protecteur contre les agents parasites en particulier vis-à-vis des *Fusarium* contre lesquels la lutte chimique est souvent inopérante. Bien que les mécanismes de l'interaction entre bactéries pathogènes et CMA soient très peu connues, la plupart des études concluent à une réduction des dommages causés par les maladies bactériennes dues à *Pseudomonas* et *Agrobacterium* (Marschner et al., 1997; Nemeč, 1997). Garcia-Garrido & Ocampo (1989) notent cependant des pertes de poids consécutives aux attaques de *Pseudomonas* chez la tomate en présence des CMA. Les nématodes sont des parasites obligatoires des racines dont l'influence peut être atténuée par des CMA (Jaffee & Muldoon, 1997; Pandey et al ; 1999).

L'effet bénéfique des CMA sur le contrôle des agents parasites du sol dépend principalement du niveau du phosphore dans le sol. En effet, la fertilisation phosphatée augmente les risques d'infections et stimule surtout la prolifération des nématodes à galles (Smith, 1987 et 1988 ~ Carling et al., 1996). Cela se comprend bien car l'efficacité des CMA est réduite ou supprimée lorsque la teneur en phosphore dans le sol augmente (Habte & Byappanahalli, 1994; Plenchette & Morel, 1996). Comme l'a souligné Dehne (1982), la mycorhization précoce des plants leur assure une meilleure protection contre l'infection des parasites. L'inoculation de CMA à des plants cultivés en pépinière et destinés au reboisement permettrait de réduire considérablement l'incidence de certaines maladies et du coup réduire les pertes à la transplantation.

I.3 les partenaires végétaux

I.3.1 généralités des légumineuses

La famille des légumineuses ou Fabacées est la troisième plus grande famille d'angiospermes (après les orchidées et les astéracées). Les classifications modernes se subdivise en trois sous familles assez homogènes : les *Papilionoideae*, et les

Mimosoideae et *Caesalpinioideae*, ces sous familles comprend environ 650 genres et près de 20 000 espèces (Guignard et Dupont *et al* ; 2005).

La plupart des espèces fixatrices d'azote qui sont importantes sur le plan économique, font partie des *Papilionoideae*. Cette dernière étant la sous famille la plus diversifiée (environ 430 genres et 12000 espèces) (Renier, 2008), dont 97 % des espèces testées (21 % du total) sont nodulées par des *rhizobia* (Godfroy, 2008).

Aujourd'hui, selon les réglementations européennes distinguées deux grandes catégories sont couramment utilisées :

- a- Les légumineuses cultivées pour leurs graines : les agricultures sélectionnées des légumineuses, d'abord pour se nourrir ; Les espèces à graines riches en protéines regroupé comme protéagineux (pois, féverole ...) ou légumes secs (haricot, lentille, pois chiche...). Et les espèces à graines riches en protéines et en huiles, sans amidon, classées comme oléagineux (soja, arachide, ...). Ce groupe de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques.
- b- Les légumineuses fourragères (la luzerne, trèfles, sainfoin, vesce) sont cultivées essentiellement pour l'alimentation animale ; principalement des ruminants ; soit par pâturage, soit après conservation des fourrage (déshydrations, foin, ensilage), ou parfois pour des utilisations industrielle (la production d'engrais).

I.3.2 présentation de la plante d'étude

I.3.2.1 *Medicago sativa.L* (La luzerne cultivée)

I.3.2.1.1 Origine de la plante

La luzerne cultivée est une plante originaire de l'Ouest de l'Asie (Afghanistan, Iran, Turquie), les espèces de la famille de cette plante sont présentes à l'état spontané sur tous les continents, Aujourd'hui, La luzerne est la légumineuse la plus cultivée au monde.

I.3.2.1.2 Caractéristique botanique de la plante

La luzerne est une plante pérenne, qui appartient de la famille des Fabacée, de taille 30 à 80 cm de hauteur, à systèmes racinaires pivotante, de tiges dressés, ramifiées, les feuilles sont en général de type trifoliées, à folioles obovales ou oblongues, dentées au sommet, mucronées ; Stipules longuement acuminées, dentées à la base. Ses fleurs sont violacées ou bleues, groupées en grappe oblongue pédonculée.

La fécondation est allogame. Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, en forme spiralée. La graine est plus ou moins réniforme (Camille, 1980 ; Mauriés, 2003).

I.3.2.1.3 Systématique

Sous l'appellation luzerne cultivée, on classe deux espèces botaniques et leurs hybrides, *Medicago sativa* L., *Medicago falcata* et *Medicago media* (ou *Medicago varia* Mortyn) hybride entre les deux espèces précédentes (La pevronie, 1982 ; Mauries, 2003). *Medicago sativa*, provient des zones sèches des hauts plateaux iraniens. A l'inverse, *Medicago falcata* vient de la Sibérie, elle résiste au froid (Prosperi *et al* ; 1993 ; Mauriès, 1994).

Selon Small et Jomphe, 1989, la position systématique du genre *Medicago* est la suivante :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermatophytes
- Sous- embranchement : Angiospermes
- Classe : *Dicotylédones*
- Sous- classe : *Rosidées*
- Ordre : *Fabales*
- Famille : *Fabaceae*
- Sous-famille : *Faboideae*
- Tribus : *Trifolieae*
- Genre : *Medicago*
- Espèce : *Medicago sativa* L.

I.3.2.1.4 Ecologie :

La luzerne elle préfère les climats de type méditerranéen et les sols fertiles, surtout en phosphore, en potassium, calcium et autres oligo-éléments, profonds, bien drainés, légèrement acides à neutres (pH de 6,0 à 6,5). Elle ne supporte pas les sols compactés, piétinés ou inondés. Elle est résistante à la chaleur estivale et à la sécheresse une fois que son système racinaire est bien installé. Elle supporte bien le froid hivernal lorsqu'elle est en dormance. C'est une plante de fauche qui peut tolérer le pâturage si celui-ci est réalisé sur un sol porteur.

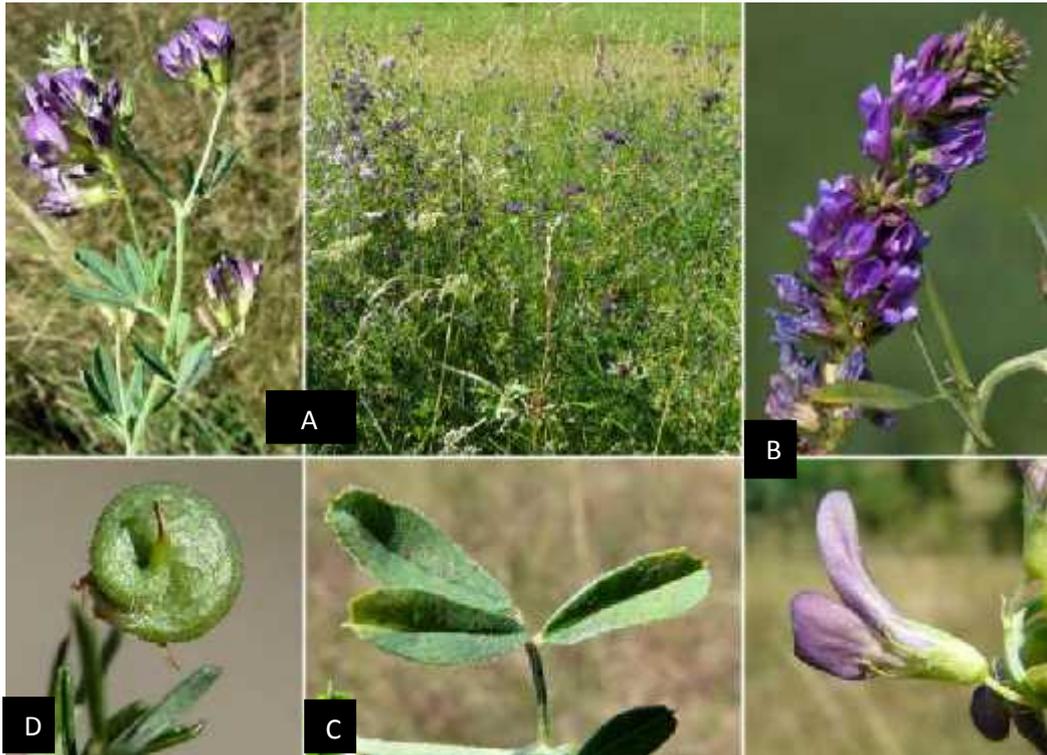


Figure 19 : Aspect de *Medicago sativa* A : Plante de *M. sativa*. B : Fleurs de *M. sativa*.

C : Feuilles de *M. sativa*. D : Gousses de *M. sativa*.

I.3.2.1.5 Intérêts :

La luzerne est considérée dans tous les pays comme une plante fourragère destinée à l'alimentation des animaux, soit à l'état frais, pâturée ou fauchée, soit sèche sous forme de foin, car elle est riche en protéines, minéraux et vitamines mais un peu moins en énergie et car elle est concurrentielle vis-à-vis des autres espèces une fois installée.

Elle joue un rôle important dans l'amélioration de la structure des sols liée à son important système racinaire.

I.3.2.1.6 Cycle de développement la luzerne cultivée

La luzerne est une plante Pérennité (03 à 06 ans), la durée de vie globale de la luzerne est liée à différents paramètres : la variété (persistance), le climat, le sol, la conduite de la culture (et en particulier le nombre de coupes). Dont le cycle de développement luzerne dépend des hydrates de carbones stockés dans les racines. Après chaque coupe, la plante utilise ces réserves pour croître à nouveau. Ce cycle se répète jusqu'à ce que le rendement chute, il faut alors enfouir la culture ou la semer à nouveau (Soria ,2007).

- Au cours de son développement, la plante passe par différents stades végétatifs (Prolea, 2002):

Stade 1 : cotylédons ; à la levée vont d'abord émerger 2 cotylédons, et émission des premières feuilles cotylédonaires ou unifoliées.

Stade 2 : feuilles trifoliées : les feuilles suivantes sont composées de 3 folioles rattachées la tige par un pétiole.

Stade 3 : Développement ; Les bourgeons axillaires situés à la base des tiges et à l'aisselle des feuilles permettent d'assurer le développement végétatif ou la repousse après une coupe. Chaque pied émet progressivement plusieurs tiges.

Stade 4 : Fructification ; la date de début bourgeonnement dépend de la température et de la conduite culturale (avec ou sans précoupe). La floraison s'étale sur 4 à 6 semaines avec un chevauchement des différentes phases croissance végétative, mise à fleur, nouaison et maturation des gousses.

Stade 5 : Maturité ; la maturation des graines nécessitent 1100 degrés-jours après la pollinisation soit environ 55 jours. La récolte a lieu de fin août à septembre.

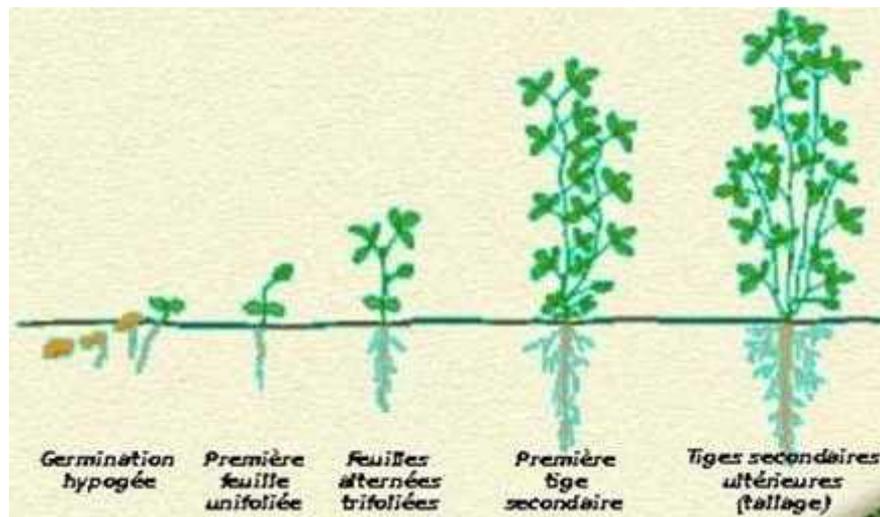


Figure 20: Cycle de développement de la luzerne pérenne (PROLEA, 2002).

I.4 Inoculation pour l'agriculture et l'environnement

Une production végétale de qualité sous-entend des produits finis de haute gamme et l'utilisation de technologies qui préservent au mieux l'environnement. Toute approche réaliste visant à réduire l'apport de pesticides et de fertilisants chimiques et à protéger les cultures et la qualité des sols mérite d'être exploitée (Smith et Read 1997).

Une multitude de travaux ont clairement démontré l'intérêt scientifique et pratique des biofertilisants pour faire face à ces différentes contraintes. Les biofertilisants sont généralement préparés comme inoculants à base de support contenant des micro-organismes (Senoo et Narumi, 2006), telle que les champignons mycorhiziens de type arbusculaire(MA) les *rhizobia*.

La capacité de fixation symbiotique de l'azote des légumineuses peut être améliorée en inoculant le sol avec des souches performantes de rhizobia. Des techniques de sélection ont permis de mettre sur le marché de nombreuses souches utilisables pour améliorer la fixation symbiotique de l'azote par les légumineuses (Dakora, 1985). Cette technique de l'utilisation d'apport d'inoculum à contribuer à la mise en place d'une intense activité de production d'inoculum s'est améliorée ces dernières années. A cette effet on note que la quantité d'inoculum à base de *Rhizobium* produite dans le monde est de l'ordre de 2000 tonnes / année, pour une superficie d'environ 20 millions d'hectares cultivée par des légumineuses à graines et fourragères (Herridge, Gemell et al ; 2002).

Par ailleurs L'application d'inoculants mycorhiziens commerciaux dans l'agriculture vise à entrainer une meilleure mycorhization des cultures par introduction d'une ou plusieurs souches étrangères de CMA qui ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des effets bénéfiques sur les plantes (augmentation de la nutrition, réduction des maladies, etc.). Les espèces qui sont couramment utilisées pour les inoculums commerciaux sont du genre des *Glomus*. Ces espèces sont naturellement très répandues dans les écosystèmes et ont comme avantage de coloniser une grande variété de plantes hôtes (Dalpé et Monreal, 2004 ; Fortin et al ; 2008).

A ce sujet il important de rappeler qu'il ya Une autre voie de la production végétale est la double inoculation des légumineuses avec des rhizobia et des champignons mychorhiziens. La synergie entre inoculant mychorhiziens et les rhizobiums sont étroitement liés à la plante car ils ne peuvent utiliser pour leur croissance que les composés carbonés simples. . Ils ont un intérêt pour la plante en améliorant en particulier leur nutrition minérale ; il a d'ailleurs été observé que, lorsque utilisé seule, l'inoculent mychorhizien permettait d'augmenter les rendements de 27% alors que s'il était couplé au rhizobium, les rendements pouvaient augmenter de 50% à 55% dans un sol ayant reçu 50% de la dose normale de phosphore (Rivera et al ;2014).Généralement la stimulation est a accompagnée par une augmentation de la biomasse totale, du nombre et poids des nodules ,de plus on

constate une augmentation de l'activité de nitrogénasique et de taux de colonisation mycorhizienne chez les plante inoculé Le couple mycorhizie et rhizobiums on permit de mettre en évidence une synergie qui se traduite par une augmentation de rendement chez fève (Jia et Gray,2004),chez l'haricot (Daft et El Giahni ,1974 ;Tchameni *et al* ;2008).

Pour la réussite de l'inoculation, la sélection de souches effectives avec la plante cible est donc primordiale. Les souches destinées à l'inoculum doivent en plus des propriétés symbiotiques présenter un certain nombre de caractéristiques :

- Les souches doivent être compétitives avec les souches indigènes.
- Les souches doivent aussi être persistantes dans le sol et avoir un bon taux de survie pendant la préparation de l'inoculum et dans le sol.

Pour leur commercialisation, les inoculums rhizobiennes se présentent sous trois formes : solide, liquide ou lyophilisés. Les inoculant en poudre sont disponibles pour tous les types de légumineuses et sont les moins coûteux à utiliser.

Les espèces qui sont couramment utilisées pour l'inoculum des mycorhizes (commerciaux) sont du genre des *Glomus*.ces espèces sont naturellement très répandues dans les écosystèmes et ont comme avantage de coloniser une grande variété de plantes hôtes (Dalpe an Monreal, 2004 ; Fortin et autres, 2008).

L'inoculum de mycorhizes trouvent sous forme solide (granuleux ou poudreux) ou en suspension liquide pourra se composer de différents types de propagules : spores, mycélium fongique, fragments de racines mycorhizées. Un ou plusieurs types de propagules peuvent être formulés dans un même inoculum endomycorhizien. De plus, les inoculums de champignons ectomycorhiziens ou endomycorhiziens peuvent contenir une ou plusieurs espèces fongiques mélangées. Les produits multi-espèces sont plus proches des conditions naturelles car dans les écosystèmes il est rare de ne rencontrer qu'une seule espèce de champignon mycorhizien. La présence de plusieurs espèces fongiques permet à l'inoculum de répondre à une plus grande diversité de conditions de culture (Haimet, 2013).

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel biologique

Nous avons effectué deux campagnes de prospection dans la région de Saida. Deux située à Rebahia et l'autre située à Ain Hadjar. Au cours de ces prospections nous avons identifié et prélevé des échantillons de légumineuses entières (racines et tiges) avec leur sol rhizosphérique.

- **Matériel végétal**

La plante hôte utilisée est *Medicago sativa* L. (LUZERNE) ; Le choix de cette plante son été dicté d'une part par son utilisation importante en tant que plante fourrager pour l'alimentation du bétail ; et d'autre part son étude entre dans le cadre de la valorisation de ressources fourragères dans les zones arides et semi-arides.

- **Sol**

Les échantillons de sol sont collectés de la rhizosphère de la plantes *Medicago sativa* L ; les prélèvements de sol sont collectés sur une profondeur de 0-20 cm et qui ont été conservés jusqu'à leur utilisation dans le protocole de piégeage. Parallèlement au sol rhizosphérique nous avons ramenés le sable pour la réalisation du même protocole.

II.2 Méthodes

II.2.1 Méthodologie suivie pour l'étude des *Rhizobium*

II.2.1.1 Isolement des rhizobia à partir de nodosités récoltées *in-nature*

II.2.1.1.1 Collection des nodosités

Afin de procéder à la récolte des nodules; Les plantes déterrés avec leur système racinaires, les racines sont délicatement rincées à l'eau courante et les nodosités sont ensuite coupées à environ 1 à 2 mm du site d'attache, puis rincées et séchées avec du papier filtre selon la méthode de Gourret et Rubulier (1985). Les nodosités été utilisée directement pour l'isolement.



Figure 21: Les nodules de la plante *Medicago sativa.L*

II.2.1.1.2 Isolement de souches de *Rhizobium*

L'isolement a été réalisé selon la méthode de Vincent (1970), c'est la technique classique d'isolement de souches de *Rhizobium* partir des nodosités ; les nodules fraîchement lavés sont immergés pendant 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 95%, puis transférés immédiatement dans une solution de chlorure de mercure (HgCl_2) à 0,1% pendant 3 minutes(annexe 01). La désinfection est suivie directement par un abondant rinçage ; les nodules sont rincés 5 fois à l'eau distillée puis nous avons effectués trois nouveaux rinçage en laissant les nodosités au moins 15 minutes dans chaque récipient.

Cette désinfection superficielle des nodules a pour but d'éliminer la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules.

Une nodosité désinfectée est ensuite écrasée aseptiquement à l'aide d'une pince flambée à l'alcool, dans une boîte de Pétri, contenant le milieu YEM (Yeast Extrat Mannitol), et puis incubée à 28°C pendant 72h.

- **Milieu YEM (Vincent., 1970) :**

YEM (Yeast Extract Mannitol) est le milieu utilisé pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée (Annex01). Le milieu de culture doit contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries. L'autoclavage de milieu se fait à 120°C pendant 20 minutes. Donc le milieu YEM est un milieu utilisé pour la culture des souches de BNL.

II.2.1.1.3 Purification des isolats :

La pureté des souches est vérifiée par repiquage successif sur milieu YEM gélosé au rouge Congo à la concentration finale de 0.025g/l (Jordan ,1984 ; Somasgaran et Hoben, 1994) (Annexe 01). Notons que le rouge Congo est utilisé afin d'éviter toute contamination par les bactéries (Actinomycètes ...).

II.2.1.1.4 Identification des souches de Rhizobium

L'identification des souches de Rhizobium a été faite par un examen macroscopique (caractères culturels sur milieu YEM gélosé au rouge Congo) et par une observation microscopique (coloration de Gram et examen à l'état frais des cellules vivantes), et d'autres tests biochimiques.

II.2.1.1.4.1 Examen microscopique

a) Coloration de Gram

C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries d'après leur forme et leur propriété de la paroi bactérienne. Technique de coloration qui est la plus utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Selon le médecin danois Gram en 1884, le principe de cette méthode est :

-Préparer un frotti à partir de culture pure.

-Recouvrir la lame par solution de violette gentiane, laissait agir 1minut. Rincer à l'eau distillée.

- Etaler le lugol et laisser agir 20 secondes puis rincer à l'eau distillée.

-Incliné la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Puis rincer à l'eau distillée.

L'alcool pénétré dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

- Recouvrir la lame par fuchsine et laissait agir 45 secondes à 1minute. Rincer à l'eau distillée.

-Sécher la lame par papier absorbant.

-Examiner à l'objectif x100, avec une goutte d'huile à l'immersion.

II.2.1.1.4.2 Examen mobilité

Le milieu utilisé est le Mannitol-mobilité(Annexe01), nous permettant d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

L'ensemencement du milieu se fait par piqûre centrale avec la souche à tester. Incubation à 30 C° durant 24 heures. Puis l'observé.

II.2.1.1.4.3 Tests biochimiques

II.2.1.1.4.3.1 Vitesse de croissance sur YMA + Bromothymol

Pour vérifier la vitesse de croissance des isolats pour la distinction entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente, elles ont ensemencé sur un milieu YMA additionné de bleu de bromothymol (Jordan ,1984 ; Vincent, 1970) (Annexe 01). L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les bactéries à croissance rapide qui vires le milieu au jaune (bactéries acidifiante) les autres souches provoquant un virage au bleu et alcalinisantes le milieu.

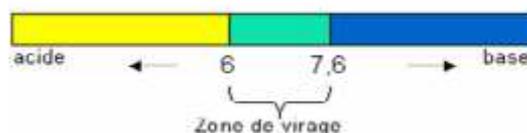


Figure22 : Couleurs de bleu bromothymol

II.2.1.1.4.3.2 Recherche de certaines enzymes

- **Réduction des nitrates**

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide TY contenant 0.1% KNO₃ (p/v) (Behringer, 1974) (Annexes 01), Après 05 jours d'incubation avec agitation à 28°C, Au terme de l'incubation à chaque tube on ajoute les réactifs nitrate réductase 1 et nitrate réductase 2 (Annexes01). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et observer après quelques minutes la teinte obtenue.

- **Hydrolyse de l'urée**

Les bactéries possédant une uréase transforment l'urée en carbonate d'ammonium entraînant une alcalinisation qui provoque une coloration rouge violacé du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH) (Jarvis et al, 1977).

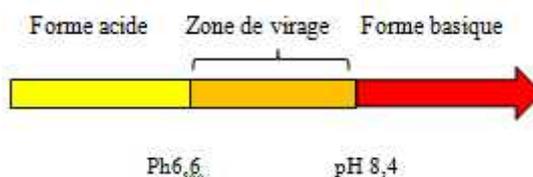


Figure 23 : virage de couleur après hydrolyse de l'urée.

Les isolats sont cultivés sur le milieu YEM, contient 0,0012g/L de rouge phénol et la solution d'urée à 2%(PV), celle si stérilisée par filtration(0,22 μ m) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45C°. Les boites sont incubées 48h à 28C°.

- **Activité Cellulosique**

Les souches sont cultivées dans les tube à essai continent chacun 5ml du bouillon YEM et une bandelette 0.5x8cm de papier filtre stérile, comme unique source de carbone et d'énergie (Boulahrouf et al ; 1986), un tube non ensemencé sert de témoin.

Les cultures sont incubées à 28°C pendant 21 jours. L'activité cellulolytique est mise en évidence par la digestion du papier filtre.

II.2.1.1.5 Conservation des souches

Les isolats purifiés sont conservés selon le procédé suivant :

- Pour une courte durée, nous les repiquons sur le milieu YEM incliné ; en effectuant des stries régulières sur la surface de leur gélose. Après 48h d'incubation selon les isolats, les tubes sont conservés au réfrigérateur à 4°C, à raison de plusieurs exemplaires par souche selon la méthode de Vincent, (1970). Des repiquages réguliers tous les 6 mois est recommandés.

II.2.1.1.6 Etude des paramètres symbiotiques

II.2.1.1.6.1 Test d'infectivité des souches

Les isolats extraits des nodosités de *Médicago Sativa* ne peuvent être identifiés comme *Rhizobia* qu'après avoir effectué le test de nodulation, montrant leur capacité à former des nodosités sur leur plante hôte, en conditions bactériologiques contrôlées. Pour réaliser ce test les étapes suivantes ont été effectuées :

Nous avons utilisé les graines de *Médicago Sativa* qui proviennent d'une variété commercialisée (Saida), qui ont servi au test de nodulation.

II.2.1.1.6.1.1 Stérilisation, germination et mise en culture des plantules de *Médicago sativa*

Les graines de *M. sativa* sont désinfectées avec de l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 5 min et rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile et laissées dans de l'eau distillée, toujours, pendant 30 mn après le dernier rinçage. Les graines désinfectées sont mises à germer aseptiquement dans l'eau gélosée à 1% (annexe 02) et incubées à 25°C à l'obscurité. Après 4 à 5 jours, les plantules sont transférées dans des tubes de Gibson (18 cm de longueur, 2 cm de diamètre et une capacité de 35 ml) contenant une solution nutritive dépourvue d'azote (Bertrand, 1997) (annexe 6). La culture est conduite dans une chambre de culture contrôlée

(une température de 25°C ± 1, une photopériode de 14 heures et une luminosité de 200 lux).

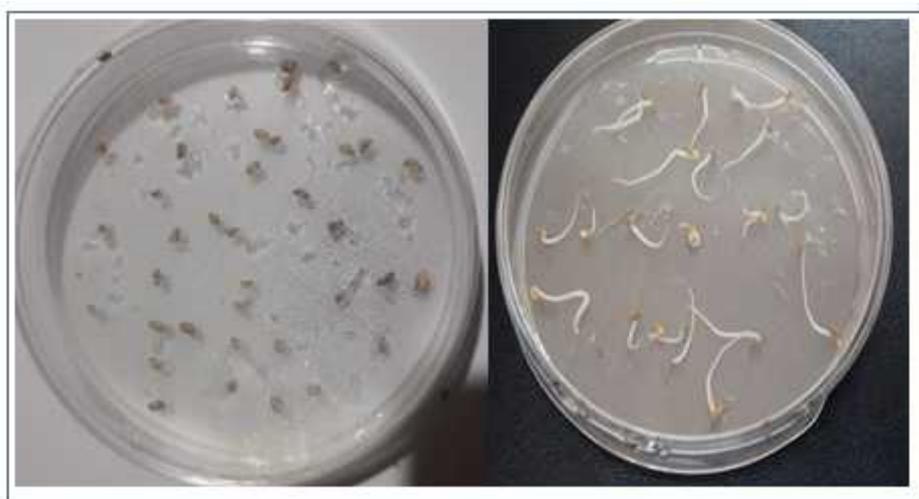
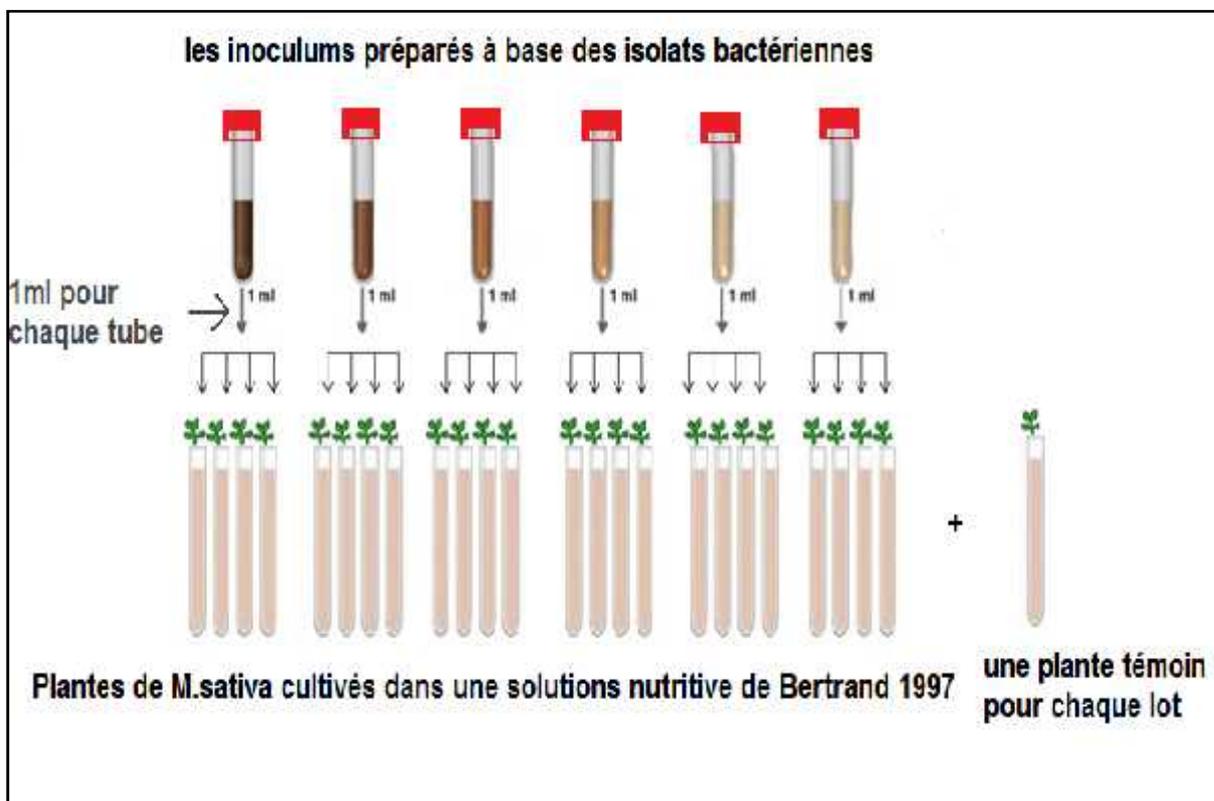


Figure 24: Germination des grains de *Médicago sativa***II.2.1.1.6.1.2 Inoculation des plantules *in Vitro***

L'inoculum est préparé par l'introduction d'une colonie pure de chaque isolat dans des tubes contenant le milieu YEM liquide. Les tubes sont incubés à 28°C et agités pour assurer l'aération des isolats. Après deux jours de leur mise en culture, les jeunes plants sont inoculés avec 1 ml d'une suspension liquide de l'isolat avec une concentration de 3×10^8 (Mac Farland N°1) (annexe 01). Pour chaque isolat, cinq répétitions sont réalisées avec un témoin négatif non inoculé (Fig. 25). L'infectivité de chaque isolat est appréciée par la présence et le nombre de nodosités formées sur la racine de chaque plant.

**Figure 25 :** Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisé *in-vitro*.**II.2.1.1.6.1.3 Estimation de la croissance des plantes *in-vitro* et observation du phénotype des plantes inoculées :**

L'observation de la couleur verte des plantes inoculées, de leur croissance (parties racinaires et aériennes) en comparaison aux plantes non inoculées (témoin) dans les mêmes conditions de cultures et déterminer leur couleur et leur forme.

II.2.2 Méthodologie suivie pour l'étude des Mycorhizes

II.2.2.1 Piégeage des endomycorhizes

La méthode de piégeage de Morton et Walker(1992) est utilisée pour la mise en évidence de la diversité des CMA dans les sites d'études. Elle consiste à cultiver une plante piège dans un substrat pauvre en éléments nutritifs et utiliser comme inoculum le sol des sites contenant des propagules viables (spores, hyphes et fragments de mycorhize).

L'inoculum est constitué du sol rhizosphérique de la plante d'intérêt *Medicago Sativa L* contenant des racines de la même plante coupée en petits fragments et soigneusement mélangée avec ce sol.

Le substrat est constitué du sable autoclavé 3 fois 120°C pendant une heure pour tout risque de contamination par d'autres champignons.

La variété de maïs HYBRIDE PICO a été utilisée comme plante piège. Les graines de maïs sont désinfectées avec de l'hypochlorite de sodium 12°C pendant 15 min et rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile. Ensuite elles ont été transférées dans des boîtes de pétrie contenant de l'eau gélosée à 1%(Annexe 02), puis placées dans un incubateur à l'obscurité à 25°C pendant 3 jours.

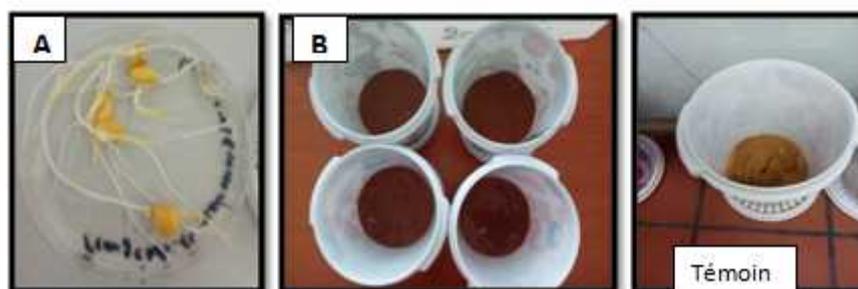


Figure 26: dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton et Walker(1992).

A : plantules de maïs après 3 jours de germination.

B : plantules de maïs transplantés.

Des pots en plastique de 1 L de volume, préalablement lavés et désinfectés avec de l'eau de javel 12°C, ont été remplis à moitié avec le substrat sableux sur lequel 200g de l'inoculum y ont été déposés. Les pots ont été ensuite recouverts du substrat sableux autoclave afin de limiter les risques de contamination. Les graines pré-germées de maïs ont été semées à raison de trois plantules par pot. Deux répétitions sont réalisées pour chaque sol. Un témoin sans inoculum est réalisé dans les mêmes conditions avec seulement du

substrat autoclave afin de vérifier que les conditions de culture soit exemptes de contamination (figure 26).

Les pots ont été déposés en chambre de culture contrôlée (une température de 25°C et une photopériode de 16 heures) et arrosés quotidiennement à l'eau distillée stérile. la fertilisation n'est appliquée que lorsque les plantes montrent des signes de carence en phosphore ou en azote, en utilisant la solution nutritive de Hoagland et Arron (1938) (annexe04).

Après 42 jours de culture, les plantes de maïs ont été dépotées, leur système racinaire est utilisé pour l'estimation de taux de colonisation MA. et le substrat de chaque sol est récolté, sèche à température ambiante pour l'extraction de la caractérisation phénotypique des spores.

II.2.2.2 Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes

Les différentes méthodologies utilisées pour observer les structures formées par les MA respectent les étapes suivantes : nettoyage, blanchissement, acidification, teinte et élimination des excès de colorant.

II.2.2.2.1 Echantillonnages

Comme les racines peuvent être récoltées à tout moment de l'année pour l'estimation de la colonisation endomycorhizienne (Schenck, 1982), nous avons réalisé notre échantillonnage de racines le mois de février en 2019 au niveau des sites précédemment décrits. Trois plantes de la luzerne ont été récoltées.

Les prélèvements ont été réalisés sur une profondeur allant de 10 à 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son système racinaire. Puis les blocs de terre prélevés ont été placés dans un sachet en plastique fermés très serrés pendant le transport.

II.2.2.2.2 Lavage

Pour déloger facilement la terre des racines, celles-ci ont été trempées dans des bassines d'eau pendant 24h, puis elles ont été lavées sous un léger filet de l'eau de robinet et très délicatement frottées avec les doigts parce que les racines fines qui nous intéressent sont extrêmement fragiles.

A l'aide de ciseaux, les racines fines ont été séparées de racine pivotante et versées dans un bocal pour moitié remplie d'eau, puis agiter délicatement pendant quelques minutes, afin de les débarrasser de toute particule de terre.

Les racines fines doivent être maintenues en permanence dans l'eau : en effet, ces dernières se dessèchent rapidement à l'air libre et elles doivent être conservées au réfrigérateur avant d'être observées directement ou traitées ultérieurement.

II.2.2.2.3 Eclaircissements et coloration des racines

Pour mettre en évidence la présence de structures endomycorhiziennes, les racines fines ont été éclaircies et colorées selon la technique de Phillips et Hayman (1970) modifiée. Ainsi, elles ont été placées dans des tubes à essai contenant la solution fixatrice FAA durant 30 minutes qui sert à la conservation des racines. Après plusieurs rinçages à l'eau courante. Elles ont été plongées dans une solution d'hydroxyde de potassium KOH à 10 % et chauffées au bain-marie à 90°C pendant 1 h afin de les vider de leur contenu cytoplasmique. Ensuite les racines ont été transférées dans une solution de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 10 % et chauffées au bain-marie à 90°C pendant 20 minutes pour les blanchir. Après plusieurs rinçages à l'eau courante, les fragments racinaires éclaircis ont été submergés d'acide lactique à 10 % durant 10 minutes qui permet de neutraliser l'hydroxyde de potassium KOH restant.

Enfin, les racines ont été transférées dans une solution de bleu de trypan de 1 % et chauffées au bain-marie à 90°C pendant 1h qui permet la coloration de la chitine des parois du champignon. Les structures fongiques, tels que les arbuscules, les vésicules et le mycélium apparaissent en bleu. Les racines ont été à nouveau rincées à l'eau courante, puis conservées dans des tubes à essai contenant du glycérol 60 %.

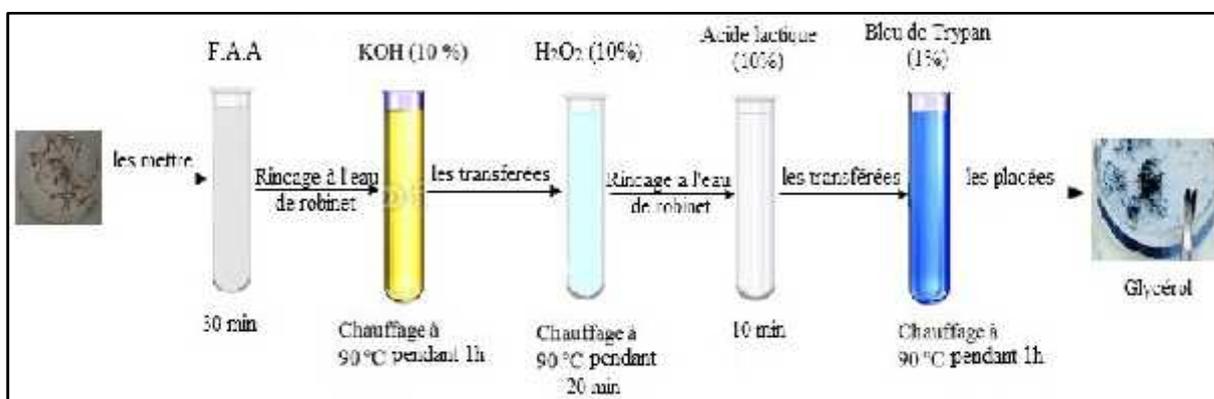


Figure 27: Schéma représentatif des étapes d'éclaircissement et coloration des racines.

II.2.2.2.4 Montage et observation des racines

Après la coloration les racines de chaque plante *Medicago Sativa L* ont été découpées en fragments de 1cm de longueur environ et monté parallèlement à raison de 10 fragments par lame dans le glycérol, puis observer au microscope photonique à différentes grossissement. La plante est jugée mycorhizée lorsque le système racinaire présente au moins un point de colonisation (pénétration d'un hyphes dans la racine ; présence des structure de colonisation).

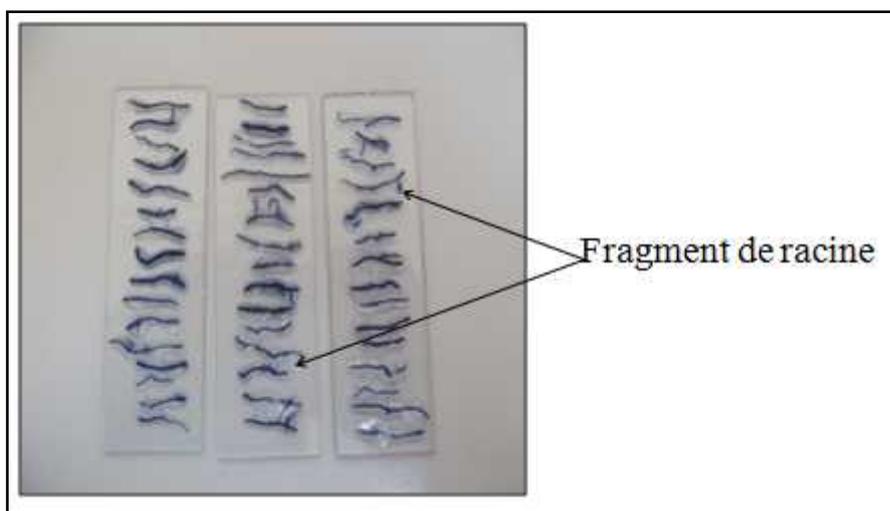


Figure 28 : Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l'identification microscopique.

II.2.2.3 Estimation de la colonisation MA des racines

Le pourcentage de colonisation des racines est calculé selon la méthode de Trouvelot *et al.*, (1986). Les fragments racinaires observés ont été notés dans un tableau (annexe), selon un barème de notation (Fig.) qui permet d'estimer rapidement le degré de colonisation mycorhizienne et la richesse en arbuscules.

Cette technique calcule 5 paramètres de la colonisation mycorhizienne arbusculaire qui est réalisée en utilisant les formules de calcul suivantes :

- **Fréquence de la colonisation mycorhizienne (F%) :** qui reflète le degré de la colonisation du système racinaire.

$$F\% = (\text{nombre de fragments mycorhizés} / \text{nombre des fragments totaux}) * 100$$

- **Intensité de la colonisation développée dans le système racinaire (M%)** : qui exprime la portion du cortex colonisée par rapport à l'ensemble du système racinaire.

$$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / (\text{nombre des fragments totaux})$$

Avec n_5, n_4, n_3, n_2, n_1 sont les nombres de fragments respectivement notés dans les cinq classe d'infection marquant l'importance de la mycorhization à savoir :

5	→	plus de 95%
4	→	de 50% à 95%
3	→	de 30% à 50%
2	→	de 1% à 30%
1	→	1% du cortex

- **Teneur arbusculaire de la colonisation dans la partie endomycorhizée du système racinaire (a%)** : est l'abondance en arbuscules dans les parties mycorhizées des fragments racinaires.

$$a\% = (100m_{A3} + 50m_{A2} + 10m_{A1}) / 100$$

- ou m_{A3}, m_{A2}, m_{A1} = % de m, classés A1, A2, A3 respectivement. Avec :

$$m_{A3} = ((95n_5A_3 + 70n_4A_3 + 30n_3A_3 + 5n_2A_3 + n_1A_3) / \text{nombre de fragments mycorhizes}) * 100 / m$$

$$m\% = M\% * (\text{nombre de fragments totaux}) / \text{nombre de fragments mycorhizes}$$

- **A%** : teneur arbusculaire de la colonisation ramené au système racinaire entier :

$$A\% = a * (M\% / 100)$$

Ces cinq paramètres sont fonction de la teneur en spore, vésicule et hyphes de la racine.

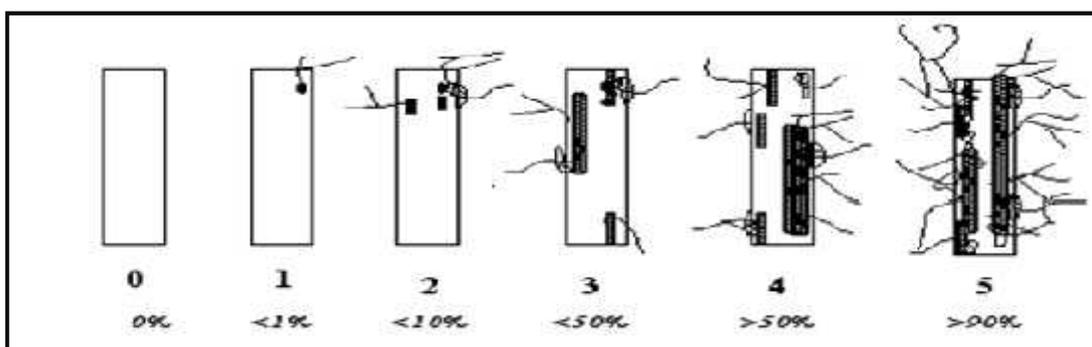
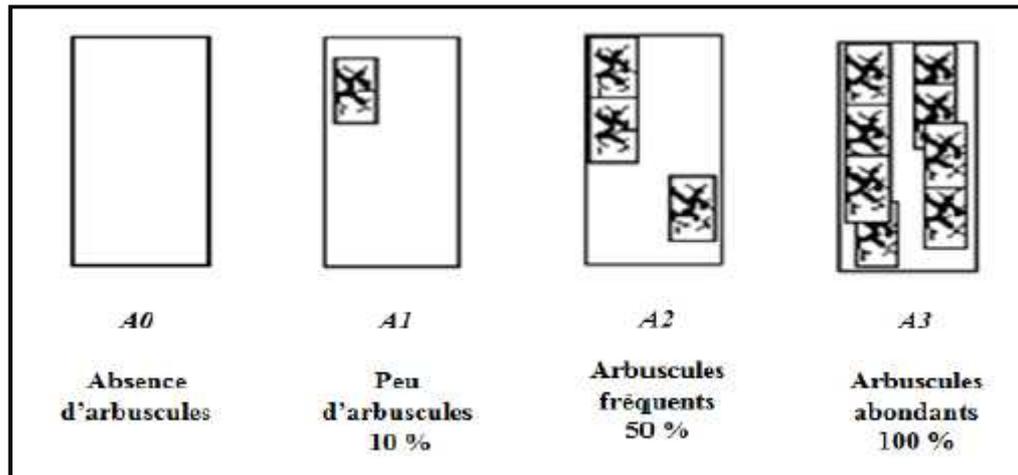


Figure 29: Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire**Figure30 :** Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules

II.2.2.4 Extraction des spores :

Les spores de CMA ont été extraites par la technique de tamisage humide de Gerdemann et Nicolson (1963) suivie d'une centrifugation sur gradient de saccharose selon la méthode décrite par Giovannetti *et al.*(1991).

En effet, 100g de sol rhizosphérique sèche issus de la culture de maïs sont prélevés et mis dans 1000ml d'eau, la suspension est ensuite vigoureusement agitée pendant 1min puis filtrée dans une série de tamis à mailles décroissantes (500 -250- 125 et 45 μ m) sous un jet d'eau de robinet jusqu'à ce que l'eau qui en ressorte devienne claire et limpide. Les tamisât contenant les spores des CMA sont mélangés et mis en suspension dans de l'eau distillé.

Les particules retenues dans le tamis des 45 μ m de diamètre ont été récupérées dans des tubes de centrifugation remplis à 1/3 d'une solution de saccharose a 60%(P/V). ces tubes ont été soumis à une première centrifugation à 1750 tr /mn pendant 5min pour réduire les particules de sol et les fragments racinaires, le surnageant et les particules flottantes ont été éliminés. Les spores et les particules sédimentées au fond des tubes ont été reprises dans une solution de saccharose a 60%(p/v). le mélange sédiments-saccharose a été de nouveau centrifugé à 1750tr/mn pendant 15 secondes. Le surnageant est filtré sur un tamis de 45 μ m puis rincées avec l'eau distille pour éliminer l'excès de saccharose. les suspensions sporales obtenus ont été conservés à 4°C pour l'observation et l'identification morphologique (figure31).



Figure 31: Extraction des spores des champignons endomycorhiziens selon la méthode de Gerdemann et Nicolson (1963).

II.2.2.5 Observation et Caractérisation morphologique des spores :

Les spores des champignons mycorhiziens sont souvent libres dans le sol et peuvent donc être séparées des fines particules de sol par tamisage humide par les méthodes précédemment décrite. Chaque fraction de sol retenue dans chaque tamis est récupérée dans une boîte de Pétri et observée à la loupe binoculaire. Ainsi les spores détectées ont été récoltés au moyen d'une micropipette et leur morphologie décrite par observation microscopique. Les spores de chaque morphotype ont été montées entre lames et lamelles dans une goutte de glycérol afin d'être examinées au microscope photonique sur la base de leur caractères phénotypiques. Les mesures ont été effectuées au différent grossissement qui permet de mieux distinguer le pourtour de la spore. Ces dernières ont été pré-identifiées sur base des paramètres systématiques des spores.

II.2.2.6 Traitement des données

Les variables de réponse telles « fréquence de colonisation, intensité de la colonisation intensité arbusculaire, mesure de la hauteur » ont été représentées via Microsoft Excel 2007.

II.2.2.7 Essais d'inoculations des plantes de *Médicago sativa* en pots

Après l'isolement des souches de bactéries et de champignons, Nous avons opté à les tester et faire un essai d'inoculation en pots pour évaluer la réponse de *Médicago sativa* à la simple et la double inoculation. Pour réaliser cet essai les étapes suivantes été effectuées :

- **Inoculation des plants**

Les graines de *Médicago sativa* ont été désinfectées selon la méthode citée précédemment, Après 03 jours, les plantules sont transplantées dans des pots contenant 200 g de sable autoclavé trois fois à 120C° pendant une heure, à raison de 3 plantules par pot.

Les plantules subissent soit une simple inoculation soit une double inoculation. Sachant que Pour chaque essai nous avons inclus un témoin négatif non inoculé.

- **Simple inoculation rhizobienne**

Nous avons opté pour l'utilisation d'un inoculum liquide, La souche la plus effective à été sélectionné en fonction des résultats du test de nodulation. Après l'étape de la sélection par l'évaluation de la symbiose en chambre de culture (nombre de nodules, hauteur des plantules, couleur des nodules et des feuilles) ; nous avons sélectionné la souche **SRP1**. L'inoculum est préparé par l'introduction d'une colonie pure dans un tube contenant milieu YEM liquide, puis incubé à 28C° et agités pour assurer l'aération de la souche. Les plantes sont inoculées avec 1ml de suspension bactérienne de turbidité équivalente au niveau 1 sur l'échelle de Mc Farland, trois jours après la mise en pots des graines.

- **Simple inoculation mychorizienne**

La technique la plus utilisée pour augmenter le nombre de propagules consiste en la multiplication des champignons MA sur une plante hôte mycotrophe appropriée dans un sol stérilisé en utilisant des cultures en pot.

L'inoculum est constitué du sol et des fragments de racines de Maïs issus de piégeage. , l'inoculum est placé à l'extrémité des racines des plantes le jour ou ils sont transplantés et sur lequel une couche de sables stérilisé est déposée pour éviter la contamination.

- **Double inoculation**

Les plantes sont inoculées avec CMA (30 fragments racinaires) de sol issu de la même culture de multiplication de propagules en association avec la souche SRP1. Dans les conditions d'écrites précédemment.

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1 Présentation de la zone d'étude

Nous avons choisi deux sites dans une même région semi aride (Saida) dans le bût de constituer une collection de souches (souchier).

Le site appartient à l'étage bioclimatique semi-aride. La wilaya de Saida située dans la partie Ouest de l'Algérie, sa superficie actuelle est estimée à 6613 km², le territoire de la wilaya est délimité comme suit :

- Au Nord : wilaya de Mascara.
- Au Sud : wilaya d'El-Bayadh.
- Au Est : wilaya de Tiaret.
- Au l'Ouest : wilaya de Sidi Bel Abbés.

- Rebahia c'est une commune qui se trouve au Nord de la wilaya ; ces coordonnées géographiques : **Latitude**: 34.8766, **Longitude**: 0.15282 34° 52 36 Nord, 0° 9 10 Est.
- Ain-El-Hadjar c'est une commune qui se trouve au Sud de la wilaya ces coordonnées géographiques : **Latitude** 34° 45 31 Nord ; **longitude** 0° 08 40 Est. (Figure31)

III.2 Etude de la Symbiose rhizobienne

L'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires récoltés *in nature* nous a permis d'obtenir une collection de 8 isolats issus de *Medicago sativa* de deux sites différents localisés dans une zone semi-arides de l'Ouest Algérien (Saida) :

- ✓ 7 isolats issu de Ouled Khaled et
- ✓ 1 isolats issu de Ain-El-Hadjar.

III.2.1 Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats:

Après purification des différents isolats sur milieu YEM, Après purification des différents isolats sur milieu YEM, les colonies obtenues présentent les mêmes caractéristiques macroscopiques, elles apparaissent homogènes le long des stries, elles sont circulaires de 2 à 5mm de diamètre, de couleur blanchâtre, compactes pour la plupart, opaques, de surface lisse et visqueuse à contour régulier et marquées par une très forte viscosité qui augmente avec le temps d'incubation (Figure32). Cette viscosité est due à une production massive d'exopolysaccharide (Zahran, 1994). Ces caractéristiques morphologiques obtenues sont semblables à ceux des rhizobiums décrits par de Lajudie *et al.*, (2004).

L'aspect microscopique des isolats visualisé après coloration de Gram : montre que les isolats présentent des formes coccobacilles (bâtonnets courts), généralement isolés et à Gram-négatif. L'observation microscopique permet aussi de vérifier que nos cultures bactériennes sont pures (fig.32).

Tableau 6 : caractéristiques macroscopiques des cultures des souches autochtones isolées de *Medicago sativa*

Les souches	Caractère macroscopique	Caractère microscopique	Le temp d'incubation
SRP1	Colonie circulaire volumineuse a couleur blanchâtre brillent, très visqueuse,	Gram - bâtonnets court, isolé	48h
SAC	Colonie circulaire, a couleur blanchâtre brillent, visqueuse	Gram - bâtonnets court, isolé	48h
SR2	Petite colonie circulaire transparente visqueuse	Gram- Petite Cocci, isolé	Après une semaine
SR3	Colonie circulaire volumineuse blanchâtre, translucide visqueuse	Gram - bâtonnets court, isolé	48h
SR4	Colonie circulaire beige brillent, visqueuse	Gram - bâtonnets court, isolé	48h

SR5	Colonie circulaire blanchâtre semi translucide	Gram - bâtonnets court, isolé	48h
SR6	Colonie circulaire volumineuse beige visqueuse	Gram - bâtonnets court, isolé	48h
SR7	Colonie circulaire volumineuse, blanchâtre très visqueuse	Petite Cocci, isolé	72h

➤ **Croissance sur le milieu YEM+ Rouge Congo**

Sur le milieu YEM additionne 0.025 le rouge Congo à donné au bout de 48h-72h, Les colonies absorbant très peu ou pas le rouge Congo restant ainsi rose à transparent.

Mobilité des isolats

Sur le milieu mannitol- mobilité, la fermentation du mannitol provoquent une acidification du milieu avec virage de couler vers le jaune oronge, La diffusion dans la gélose a eu lieu confirmant ainsi la mobilité de l'isolat. (Gerhardt et al., 1994).

III.2.2 Caractéristiques biochimiques

III.2.2.1 Vitesse de croissance sur YEM +BTB

Sur milieu YMA + bleu de bromothymol (BTB) ; Nos isolats, SRP1, SR3, SR4, SR5, SR6, SR7, SAC acidifie le milieu après 24h d'incubation ; elles devraient changer la couleur du BTB vert le jaune, contrairement la souche ST2 après 72h alcalinisent le milieu ; elle devrait changer la coloration du BTB vert le bleus.

Ce résultat permette classer les isolas, SRP1, SR3, SR4, SR5, SR6, SR7, SAC parmi les bactéries à croissance rapide, la souche ST2 classée parmi les bactéries à croissance lente.

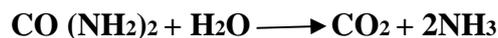
La souche SRP1

la souche SR3

III.2.2.2 Hydrolyse de l'urée

L'activité de l'uréase joue un rôle essentiel dans le métabolisme d'azote des plantes, algues, quelques invertébrés, des mycètes ainsi que des procaryotes (bactéries) (Palinska *et al.*, 2000) D'après Jarvis *et al.* ; (1977), rhizobium possèdent une uréase qui transforme l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium et en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH.

Après 72h d'incubation, les souches SR2, SR6, acidifie le milieu avec virage de couler vers le jaune, concernant les souches SRP1, SR3, SR4, SR5, SR7, SAC alcalinisent le milieu en observant un virage de la couleur de l'indicateur de pH du rouge vers le rose, ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Guiraud, 1998), selon la réaction qui suit :

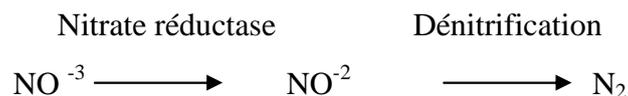


III.2.2.3 Réduction des nitrates

Selon Joffin et Lyval *et el.* (2006), la réduction de nitrate ou des nitrites constitue un caractère taxonomique important, La variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents rhizobia (Mc Neil, 1982 ; Zahran, 1991).

les souches SRP1,SR3,SR4,SR5,SR6,SR7,SAC réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs nitrates (I et II), ce qui signifie qu'elles possèdent une enzyme nitrate réductase , concernant la souche SR2 qui a donné une réaction négative(après l'addition de la poudre de zinc apparaît incolore).(Figure37)

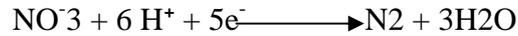
L'activité de l'enzyme nitrate-réductase qui catalyse la réaction suivante:



La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade nitrites selon :



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



III.2.2.4 Activité cellulolytique

Les résultats de ce teste montrent qu'il y a eu dégradation du papier dans le milieu de culture inoculé par les souches SRP1, SR2, SR5, SR6, SR7 qu'indique ces isolats sont capables d'hydrolyser la cellulose qui représente le constituant fibreux de la paroi végétale, c'est ainsi que les bactéries pénètrent et infectent les racines. Par contre SR3, SR4, SAC n'ont pas l'hydrolyser qui est expliqué par une activité cellulolytique négative.

Selon Benhizia et al. (2006), Les bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hédysarum* laissent apparaître une activité cellulolytique négative, Par ailleurs José *et al.* (2001) confirment la présence de l'activité cellulolytique chez toutes les microsymbiontes appartenant au *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

Tableau: Résultats des tests biochimiques réalisés sur les isolats

Les souches	Nitrate réductase	cellulase	Urease	Mannitol mobilité	Croissance milieu BTB
SRP1	+	+	+	+	+
SR2	-	+	+	+	-
SR3	+	-	+	+	+
SR4	+	-	+	+	+
SR5	+	+	+	+	+
SR6	+	+	+	+	+
SR7	+	+	+	+	+
SAC	+	-	+	+	+

(+) : Activité enzymatique positive

(+) : acidification sur YEM+BTB

(-) : Activité enzymatique négative

(-) : alcalinisent le milieu YEM +BTM

III.2.3 Etude symbiotique

La mise en évidence de l'association symbiotique, entre la plante hôte et le micro-symbionte qui est une relation spécifique. Cette propriété est limitée à un groupe spécifique de rhizobium et l'hôte sur lequel infection est induite (Beck, 1993).

Dans notre étude, nous avons testées les isolats SRP1, SR3, SR4, SR5, SR6, SR7, SR7, SAC. Pour évaluer la capacité de la formation des nodules sur les racines de leur plante hôte (infectivité) (Beck, 1993), sous des conditions bactériologiques contrôler en respectant des conditions d'asepsie totale lors de l'inoculation. Tant disque le pouvoir efficient des isolats est repéré par l'état de développement de la partie aérienne de chaque pied de plante hôte.

À partir des résultats de ce test, nous avons constaté que la plupart des souches isolées (7/8) ont formé des nodules fixateurs rougeâtres sur les racines de la luzerne et ont été répertorié : SRP1, SR3, SR4, SR5, SR6, SR7, SAC.

Le temps d'apparition des premiers nodules sur les racines est différent entre les sept isolat ; la souche SRP1 forme des nodules après 27 jours, et après Cinq semaines pour les autres souches, SR3, SR4, SR5, SR6, SR7, SAC.

Dans cette expérience, Les plantes (*Medicago sativa*) inoculées par les souches SRP1, SR3, SR4, SR5, SR6, SR7, SAC ont eu la meilleure augmentation significative de la hauteur et du diamètre des plantes; la partie aérienne et développée avec de grande nombre des feuilles vertes et de taille importants , la partie racinaire présents stimulation. (Figure).

III.2.3.1 Analyse phénotype des nodules

L'efficience d'une symbiose est déterminée à partir de la taille, la couleur et le nombre des nodosités (VILIN, 1999). Les nodules observés sur le système racinaire sont de type indéterminé indiquant la présence d'une zone méristématique à croissance continue (Vasse et al., 1990). Ils sont de formes allongées, formes typiques de la luzerne (Corby, 1981 ; Duhoux et Nicole, 2004). La plupart des nodules des plants examinés ont présenté une couleur blanchâtre, quelques nodules avaient une couleur rose révélatrice de la présence de leghémoglobine, composé indispensable à la fixation d'azote (Blandeau, 1981).

La taille des nodules des plantes traitées, montre que la majorité est de petite taille, se développent en grappes.

Selon Dommergue et al ; (1999), le nombre des nodules est l'une des méthodes qui permet l'évaluation de l'activité fixatrice d'azote.

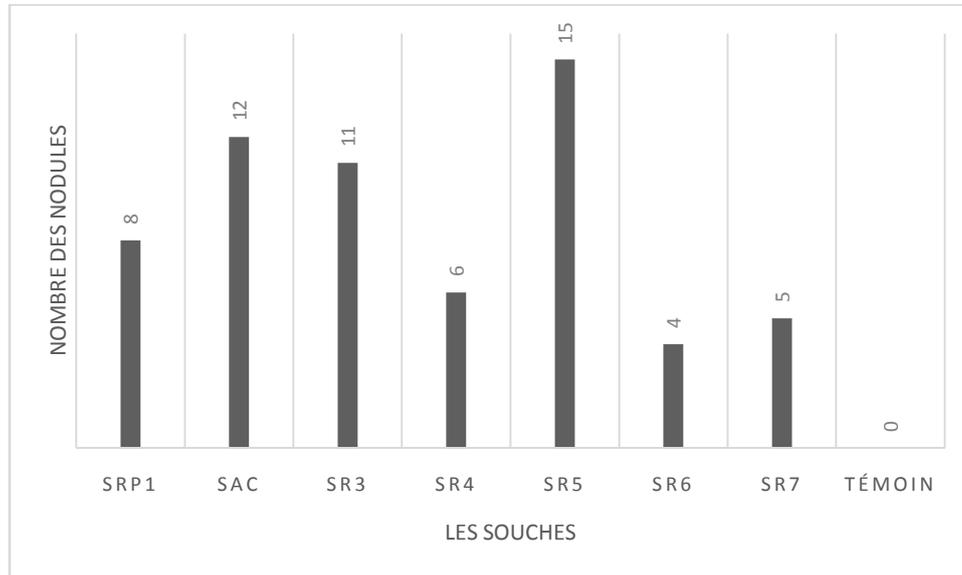


Figure42 : L'effet des souches bactériennes sur le nombre des nodules.

Le graphe ci-dessus, montre que sur les plantes de *Medicago sativa* testées les souches SR1, SAC, SR3, SR4, SR6, SR7 favorisé la nodulation par rapport le témoin non inoculé (aucun nodule).

Les souches les plus performantes : SR5, SR3, SAC SRP1 ont conduit à la formation, respectivement, de : 15,11, 12,8 nodules / plante. Suivies par les souches SR4, SR7 à moindre nombre avec 6,5. La souche SR6 est celle qui a présenté le nombre faible de nodule (4 nodules).

Nous avons observé des nodules sur les racines principales et secondaires. Ils sont répartis majoritairement au niveau des racines principales ; les plantes de *Medicago sativa* inoculées par les souches SR1, SR6. Présents des nodules uniquement sur les racines principales, Concernant les autres souches, nous avons observé des nodules sure les racines principales et les racines secondaire.

III.2.3.2 Evaluation des parties aériennes et racinaires

A partir des résultats de la figure ci-dessus, nous avons remarqué que les plantes inoculées par les souches SR1, SR3, SR4, SR5, SR6, SR7, SAC ont eu une bonne croissance la partie racinaire en comparaison aux la plante témoin, avec une longueur moyenne égale à : 13,11, 12, 11,15 ,8 ,11. D'après Glick (1995) a démontré que la synthèse des auxines par les rhizobactéries est impliquée dans l'élongation racinaire.

Contrairement, SRP1 et SCA développement faible, par rapport plantes inoculées, avec de longueurs de partie raciner 7cm et partie aérienne 3cm.

Nous avons observé que les plantes inoculées par les souches SR1, SR3, SR4, SR5, SR7, SAC, un développement très un important de la partie aérienne avec des hauteurs moyennes de 8cm, 6cm (pour 3 souches), et 5cm pour (2souches). En comparaison aux autres plantes inoculé par la souche SR6 ont eu une hauteur faible (4cm), mais possédaient plus grande nombre de feuille.

a) Poids sec de la partie souterraine

Le poids sec de la partie souterrain le plus élevée a été obtenu chez les plantes nodules par les souche SR1 et SCA avec 120 mg, 100mg, en comparaison aux autres plantes inoculé par les souches SR6 SR7 SR4 SR5 ont enregistrées les poids secs faible, Concernant la plante témoin ont eu un poids sec plus faible avec 9mg.

D'prés MEZNI et SIFI, (1998), le rendement en matière sèche c'est un critère principal dans l'évolution de l'activité fixatrice d'azote atmosphérique dont il est influencé significativement par l'effet de l'inoculation et le type de la souche.

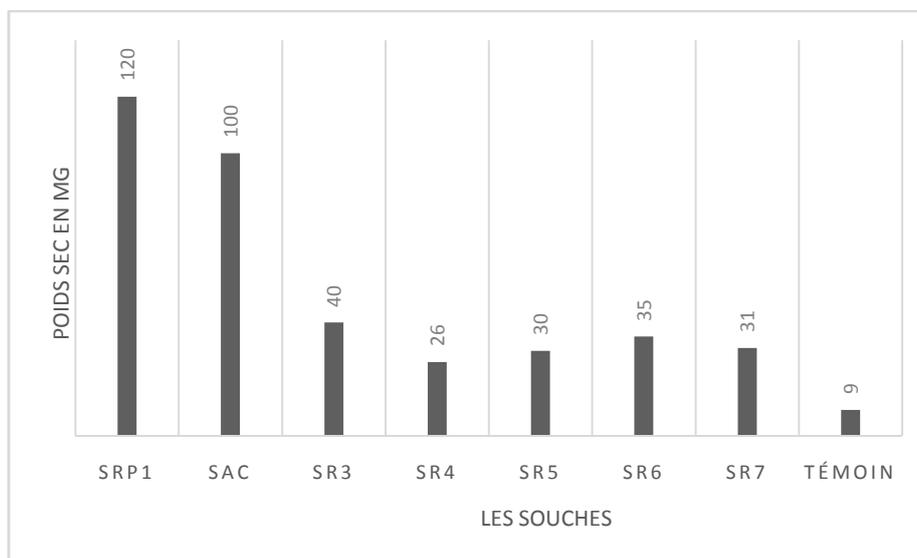


Figure43 : Biomasse sèche racinaire de la luzerne.

b) Poids sec de la partie aérienne

L'évolution de la matière sèche est en augmentation au cours de cycle de croissance pour les plantes inoculée par les souches SRP1 et SCA avec 100mg. La biomasse aérienne présentée par les plantes inoculées par les souches SR3, SR4 SR5 SR6 SR7, faible par rapport SRP1 et SCA, La plus faible production de biomasse aérienne moyenne est présentée par témoin avec

9mg. Le teste de nodulation ont abouti à une augmentation des biomasses aériennes par apport aux témoins.

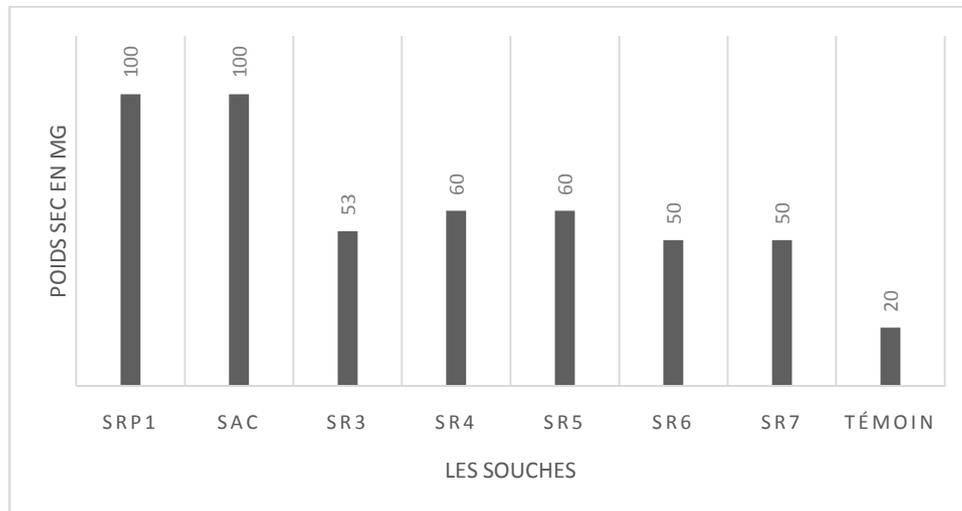


Figure44. Biomasse sèche aérienne de la luzerne

La capacité de fixation biologique de l'azote par les légumineuses dépende du génotype de la plante, de souche rhizobium, et de l'interaction entre les deux partenaires (Sadiki et al ; 1992).il parait que le niveau de la fixation d'un couple symbiotique reflète un compromis entre son niveau d'infection et le niveau d'activité des nodosités (Djordjevic et al ; 1987)

A partir des résultats précédentes, nous avons constaté que les plantes de *Medicago sativa L* inoculées par les souches SRP1, SAC ont enregistrées un développement très important de la partie aérienne et racinaire avec une augmentation des biomasses (aérienne et racinaire) par rapport le témoin, ces souche ayant des nodules actifs qu'indique une activité fixatrice d'azote. Concernant les autres souches ont un nombre des nodules inactifs plus élevé par rapport les nodules actifs qui a montré une faible fixation d'azote, donc enregistrée une augmentation faible de la biomasse.

La souche SR6 ayant donné le rendement plus faible peut-être due à la perte leurs informations symbiotiques dans le nodule ou lors de leur isolement et leur culture, à l'influence utilisation des engrais chimique dans le sol rhizosphérique de *Medicago sativa*.

III.3 Etude de la Symbiose mycorhizienne

III.3.1 Piégeage des endomycorhizes

La croissance des plantes de maïs s'est déroulée, pendant les 42 jours dans la chambre de culture, jusqu'au prélèvement des racines mycorhiziennes. La colonisation MA de ces plantes a été évaluée. Les résultats de l'observation microscopique des racines de maïs (colorée au bleu de trypan) montrent que la présence (les arbuscules, les vésicules de différentes formes, des hyphes, les cellules auxiliaires...), comparée aux racines des plantes témoins cultivées sur le sable stérile qui ne présente aucune colonisation fongique.

➤ **Les hyphes :**

Les différents fragments racinaires présentent une abondance importante d'hyphes et surtout les hyphes extra-racinaires qui sont coenocytiques, d'aspect et de diamètre différents, fins ou épais et qui portent parfois des spores. Ces résultats rejoignent ceux de Zubek *et al.* (2008). (Figure 46)

➤ **L'appressorium :**

Les CMA pénètrent dans les cellules corticales de l'hôte à l'aide d'appressoriums ou par les poils absorbants, comme le décrit Ligrone *et al.* (2007). Ces structures sont considérées comme l'évènement le plus décisif dans le déroulement de la mycorhization endomycorhizienne.

Nous avons constaté que la morphologie des appressoriums est variable, certains sont lobés tandis que d'autres portent des ramifications, le champignon généralement forme une boucle dans la première cellule épithéliale qu'il pénètre puis progresse entre les cellules adjacentes pour coloniser le cortex racinaire grâce aux hyphes intra-racinaires. fig

Les vésicules :

La colonisation se manifeste par différentes structures telles que les vésicules, nous avons observé l'existence d'un nombre très élevé de vésicules intra et intercellulaires de forme globulaire ou oviides, allongées de taille variable (fig) qui confirme encore la prédominance des *Glomus*. Ces Glomeracées sporulent et développent un réseau d'hyphes plus rapidement que les autres CMA. Ces résultats rejoignent ceux de Souza, (2005) et de Wubet *et al.* (2003) qui ont rapporté que les Glomeracées infectent et colonisent plus rapidement les racines que les Gigasporacées et les Acaulosporacées.

La présence importante de vésicules ovalaire et allongées dans les sol des région semi arides indique la prédominance d'espèces appartenant surtout au genre *Glomus*. la dominance des Gmoleracées dans les zones arides et semi arides a été rapportée par de nombreux travaux (Souza et al.,1999 ;Franke-Snyder et al.,2001 ;Lovelock et al.,2003).

Comme le confirment Tchameni *et al.*,(2008).le nombre élevé de vésicules reflète probablement une importante activité symbiotique,ansi que leur présence traduit l'efficacité de la symbiose (Boullard,1968). En outre ,la présence des vésicules est signe d'une colonisation ancienne (Brundrett *et al* .,1999).leur paroi est souvent mince mais peut etre épaisse,dans le cortex des racines âgées (Gaveriaux,2012).

➤ **Les arbuscules:**

Nous avons observé quasiment dans la plus part des système racinaires de maïs examinés qui sont caractérisée par des arbuscules à tronc cylindrique et des hyphes intercellulaires plus au moins épais (Figure49),intensement colorés avec la coloration de Phillips et Hayman(1970) ,les vésicules sont peu présentes :ce morphotype est domiant il correspond aux espèces appartenant aux Gloméracées.(Dodd et al.,2000 ;Blaszcowski,2003).

L'observation de ces structures signifient que les plantes de maïs ont établie une symbiose fonctionnelle vus que les arbuscules sont considérés comme le site d'échange des nutriments (Abbott,1982 ;Gianiazzi-Pearson,1996 ;Ramos et al.,2011) .Cette amélioration observée par plusieurs auteurs (Gerdemann ,1964 ;Sylvia et al.,1993 ; Zhu et al.,2012) est liée à la nutrition minerale tel que l' azote et phosphore qui sont améliorées (Allen,1982 ;Davies et al.,1996 ;Auge,2001)

Les structure MA obsevée dans les racines de maïs reflète une diversité importante des CMA dans les deux differents sols d'étude(Ain hadjar et Rebbahia) .plusieurs auteur ont signalé l'occurrence et la diversité des CMA dans des sols sablonneux(Stahl,1900 ;Read,1989.Hu et al.,(2010)ont rapporte que le sol riche en CMA diversifiés est plus bénéfique écologiquement.

Ces résultats confirment l'effet majeur des champignon mycorhizien dans l'amélioration de la croissance des plantes mycorhiées par rapport aux Plantes non mycorhizées (Karagiannidis,1998 ;Smith et Read,2008).

Neanmoins ,Plenchette (2005) ont signalé que la réponse des plantes à la mycorhization est non seulement en fonction de l'espèce de champignon mycorhizien mais également de la

mycotrophie de la plante hôte ce qui favorise une augmentation du potentiel infectieux mycorhizogène du sol.

La croissance des hyphes des CMA et la colonisation MA des racines diffèrent un peu d'une région à l'autre (Ain Hadjar-Rebbahia). Cependant, la faible colonisation MA observée (au niveau des racines de Rebbahia) peut être due à l'effet néfaste de la salinité sur la symbiose MA (Hirrel, 1981 ; Jahroni et al., 2008). Elle influence négativement sur la croissance des hyphes des CMA et sur leur capacité de colonisation (Gerdemann, 1980, Sheng et al., 2008).

Probablement en raison de l'effet direct du NaCl sur les champignons (Juniper et Abbott, 2006) qui supprime ou réduit la formation des CMA.

III.2.2 Estimation de la colonisation MA du maïs

Les examens microscopiques effectués sur des racines de maïs de la région de Ain Hadjar et Rebbahia ont montré la présence de mycorhization chez la majorité des plantes. La fréquence, l'intensité de mycorhization et la teneur arbusculaire ont été calculées. Les résultats représentés par l'histogramme (Fig) montrent que la plante *Medicago sativa L* est mycotrophe.

➤ Fréquence de mycorhization :

La colonisation des MA est traduite par une forte fréquence de colonisation (F%), elle est de 83.33% dans la zone d'Ain Hadjar, elle est peu près similaire à celle observée dans la zone Rebbahia 76.66%, mais le degré d'intensité mycorhizienne, que ce soit dans les systèmes racinaires (M%) ou dans les fragments racinaires (m%) restent faibles ne dépassent pas 50%.

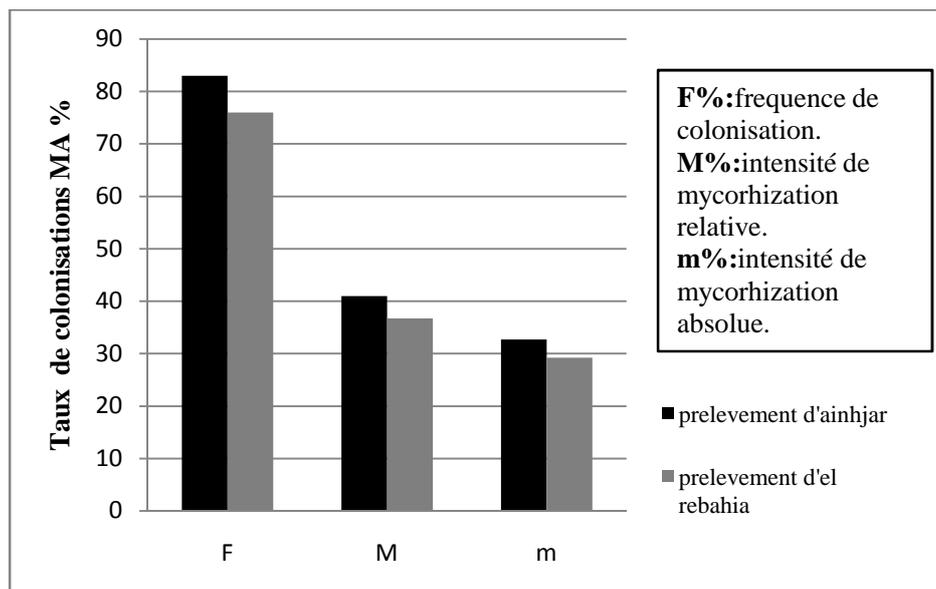


Figure50 : Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne de Maïs

➤ **Intensité de mycorhization absolue m% :**

L'intensité de mycorhization absolue n'a pas dépassé 50 pour toutes les espèces. Elle est plus élevée chez la plante prélevée du Ain hadjar 49.2% que chez la plante prélevée du Rebbahia 47.86%. L'intensité de mycorhization est réduite quand le niveau de phosphore augmente dans le sol et devient ainsi directement disponible pour la plante (Dickson et al ; 1999).

Les racines de maïs poussant sur le sol d'ain hadjar présentent les valeurs de l'intensité de colonisation M% et de la teneur arbusculaire a% les plus élevées, alors que celles poussant sur le sol Rebbahia présentent les paramètres précédents les plus faibles.

On peut observer très nettement les arbuscules au sein des cellules corticales de la racine observée, les hyphes apparaissent coenocytiques et des vésicules gonflées.

La mycorhization est représentée ici par le nombre de structures internes dans la racine. L'amélioration de ces paramètres chez la plante hôte est proportionnelle aux taux de mycorhization (75%-86%) ou l'infection mycorhizienne se caractérise par des vésicules de forme ovoïde. Cette augmentation est signe d'une bonne nutrition minérale de la plante hôte, facilitée par les champignons mycorhiziens (Jakobson et al., 1994, Jones et al., 2000).

L'amélioration de la croissance et l'observation des arbuscules signifient que les plantes de maïs ont établie une symbiose fonctionnelle vu que les arbuscules sont considérés comme le site d'échange des nutriments (Abbot, 1982 ; Ramos et al., 2011).

Nous avons enregistré des valeurs du pH comprises entre 7.5 et 8.5 dans les deux biotopes, le sol est généralement alcalin. Le pH du sol a une grande importance pour la croissance des plantes, car il influence sur la disponibilité et la mobilisation des nutriments. Il influence également sur la germination des spores MA, le développement des hyphes, le taux de colonisation MA, la formation des structures intraracinaires (Goransson et al ; 2008 ; Maria et al., 2010 ; Varga et Kytoviita, 2010).

Le taux d'arbuscules :

Les examens microscopiques des systèmes racinaires montrent dans cette période de 6 semaines est probablement nécessaire pour l'extension mycélienne intraracinaire jusqu'aux cellules

corticales internes où se forment les arbuscules.les arbuscules se trouvent dans les racines fines pendant les stades précoces de l'infection racinaire (Smith et Read, 1997 ; Harrison, 1999).

L'infection endomycorhizienne des racines de maïs de l'Ain hadjar est plus élevée avec les CMA du sol rhizosphérique que celle du sol d'Rebbahia.

Ces résultats confirment l'effet majeur des champignons mycorhiziens dans l'amélioration de la croissance des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non mycorhizées (Bansal et al ; 2000 ;Smith et Read,2008).

III.2.3 Diversité spécifique et répartition des CMA dans le site d'étude

La méthode par tamisage humide du substrat de culture de maïs pour les deux régions Ain hadjar et Rebbahia nous a permis d'isoler diverses spores qui se différencient par leur caractéristique morphologique à savoir la couleur et la taille et la forme, ets.et leur dimension.la distinction et la description des espèces sont réalisés en se référant à la clé d'identification d'international Culture collection of Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal Fungi (INVAM).

On observe aussi des spores contiennent des globules ressemblant à des spores miniatures avec attachement. D'autre spores sont aussi présentes, sessiles, sphérique de couleur brun, orange et noir parfois sombre, elles est composée de 2 couches fines transparente de type membranaire, le saccule sporifère est souvent absent en raison de son détachement lors du tamisage humide ;la morphologie de ces spores est caractéristiques de *Glomus* .Ces résultats sont en d'accord avec ceux de Abbas et al (2006) Affaf et al(2016).

Nous avons constaté la présence de spores à l'intérieur d'autres spores plus volumineuse .selon Gerdemann et Nicolson (1963), ces spores mortes sont parfois présentes chez les *Glomus*.

Nous avons remarque que la densité des spores isolées du culture de sol du maïs de la plante prélevé est plus importante certains auteurs la densité des spores de CMA augmente dans les climats secs (Uhlmann et al., 2006) ;elle est liée à leur adaptation aux écosystèmes chauds secs et arides(Mangan et al.,2004 ;Tao et ZHIWAI,2005).

La repartions et la dominance des différents morphotypes observés dans les différents sites montrent que les morphotypes marron et jaune sont communs dans tous les sites.

Ces observations indiquent que la dominance de ces spores constitue une composante majeure de la flore endomycorhizienne et que les deux zones et leur condition pédologique sont favorables et propices au développement de ces morphotypes. Plusieurs auteurs ont signalé la dominance du genre *Glomus* dans les régions arides et semi arides (Tarafdar et Kumar, 1996 ; Mathur et al., 2007). Il a été rapporté que certaines espèces telles que *Glomus intraradices* se retrouvent dans une large gamme de sols. Les différents morphotypes des spores varient énormément entre les régions, la nature de sols, les espèces végétales et les différents sites. Ceci est en accord avec plusieurs auteurs (Brundrett, 1991 ; Mohammad et al., 2003 ; Bouazza Marouf et al., 2015).

Il est impossible d'identifier les genres (ou espèces) sur la base de la morphologie des spores lorsque leurs structures caractéristiques (bouclier de germination, sacs sporifères, bulbe suspenseur...) sont absentes (Bago et al., 1998). Or certaines structures caractéristiques ont été perdues au cours du processus d'extraction des spores et par conséquent il aurait été perdues au cours du processus d'identification plus précise à un morphotype.

III.2.4 Essai en pots

Inoculation des plantes

Les premières observations 3 semaines après l'inoculation montrent que l'inoculation a amélioré le développement des plants de *Medicago sativa* L. par rapport aux plantes témoins non inoculées qui n'ont pas bien développé.

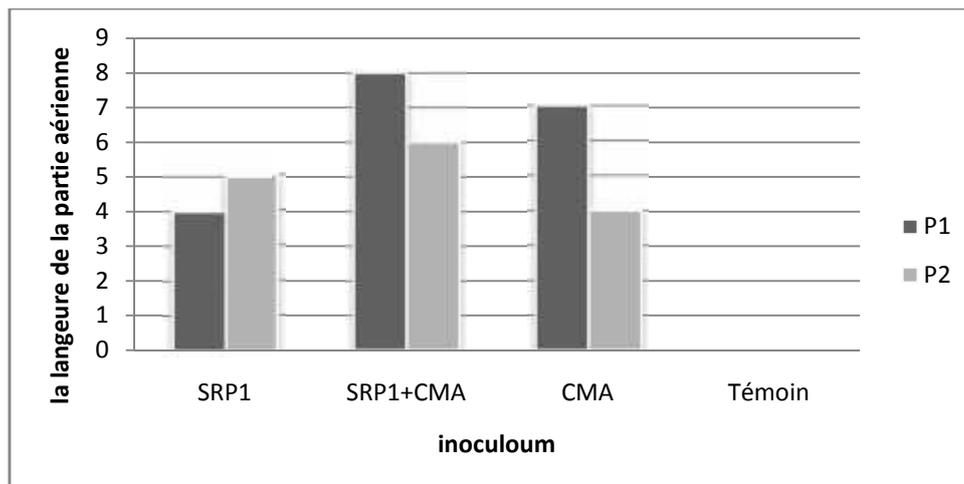


Figure 54 : Effet d'inoculation rhizobienne et mycorhizienne

À partir des résultats de la figure ci-dessus, nous avons remarqué que les plantes de *Medicago sativa* à inoculation double ont eu une bonne croissance de la partie aérienne avec des hauteurs moyennes de (PRC1 : 08cm ; PRC2 : 06cm), et possédaient plus grand nombre

de feuille. En comparaison aux autres plantes, l'inoculum moins efficace était CMA avec (pC1 : 07 ; PC2 :04). Concernant la plante inoculé par SRP1 ont eu un développement faible (PS1 :04 ; PS2 :05).

Nous avons noté que la plante inoculé n'été pas développé, nous avons suggère que l'échec de ce test est dû aussi à la période pendant laquelle a été lancé l'essai, puisque durant le mois de Juillet nous avons rencontré un problème concernant la croissance des plantules à cause de la haute température au laboratoire

Les plants ont été transplantés après une semaine, et les résultats ont montré que l'inoculation par CMA et Rhizobium permet d'obtenir des plants plus vigoureux que ceux inoculés avec Rhizobium seul, cette résultat observée lors des travaux Nouaïm *et al* ; 1997 sur *Argania spinos*, indiquent que l'inoculation par *Glomus mosseae* et *Rhizobium* permet d'obtenir une augmentation de la productivité de *Argania spinos* qui ceux inoculés avec Rhizobium ,Il s'agit la d'un effet synergétique entre le rhizobium et le champignon mycorhizien ; les bactéries ayant un effet stimulant jouent un rôle sur la croissance du mycélium de CMA (Garbay ,1994 ;Barea *et al* ;1997 ;Frey-klett *et al* ;1997). En effet l'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes par CMA favorise de développement le nombre du nodule et modifier la structure des bactéroïdes dans le nodule mais peuvent aussi augments la fixation d'azote et par conséquence le développement des plantes et amélioré.

Les résultats obtenus montré que les effets de l'inoculation microbienne sur la plante de *Medicago sativa* varient suivant les inoculums utilisés. La stimulation de sa croissance est observée avec la double inoculation CMA- SRP1 permet d'améliorer la croissance en hauteur de *medicago sativa*, Ces résultats sur la double inoculation rhizobium-CMA a été observée lors des travaux de Wang *et al* ;(2011), sur le soja et de Haro *et al* ; (2015) sur niébé. En effet, les travaux de Wang ont quant à eux montré que la co-inoculation avec les rhizobiums et les CMA améliore significativement la croissance et la biomasse aérienne du soja,et,ce conditions de faible P et/ou N HARO *et al* ; 2015 ont montré que l'inoculation avec les CMA (ORS3409+Ga) améliore plus efficacement la productivité de niébé.

L'inoculation rhizobienne seule n'a pas augmenté de façon significative la hauteur des plants et comparativement au les autre inoculoum. Cette résultat observée lors des travaux de Haro *et al* ; (2015) sur niébé.

Conclusion

Les sols sont considérés comme des systèmes dynamiques qui contiennent une variété de micro-organismes tels que les bactéries, les actinomycètes et les champignons. Le maintien de cette microflore tellurique favorable est très important pour la durabilité des sols.

Les biofertilisants à base de mycorhizes et *rhizobium* autochtones est un projet qui peut participer dans l'amélioration de la fertilité des sols cultivés et d'assurer la durabilité de la production agricole Algérienne.

À partir des résultats obtenus, nous avons constaté que les 07 souches testées montrèrent une symbiose avec la légumineuse *Medicago sativa* L ont abouti à une augmentation de longueur des racines et la hauteur de la partie aérienne, A travers le test phénotypique, nous remarquons que la souche SRP1 s'est avérée la meilleure par la nodulation, le rendement en biomasse de la partie aérienne et racinaire.

Un autre axe de notre recherche expose l'étude de la biodiversité Champignon mycorhizine. L'analyse nous a montré l'omniprésence des CMA dans les sites (rebahia ,Ain hadjar). Ainsi, sur la base des caractères microscopiques nous avons pu découvrir la présence de colonisation plus forte dans la plante *Medicago sativa* cultivée a Ain hdjar.

Par ailleurs , , nous avons procédé à l'inoculation contrôlée des plantes de *Medicago sativa* .L avec inoculation simple rhizobienne ,simple mycorhizienne ,double rhizobium et mycorhize.

Les résultats montrent que la double inoculation (Champignon mycorhizine et rhizobium) de *Medicago sativa* sont plus efficaces pour améliorer la croissance des plantes : les teneurs chlorophylles qui reflètent une amélioration de la photosynthèse ,les teneurs relatives en eau et l'effet positif des CMA dans l'amélioration de la nutrition phosphatée et hydrique de la plantes. Cette amélioration détermine la relation synergétique et bénéfique entre ces deux microsymbiotes, puisque, elle a permis le développement des nodules.

Les perspectives envisagées pour compléter cette étude sont les suivantes :

- ✓ L'isolement, la caractérisation des champignons mycorhiziens à haut pouvoir pour enrichir leur collection.
- ✓ Constitution d'une collection de souches provenant de diverses plantes.
- ✓ Le transfert des expérimentations aux champs en matière de production d'inoculum à base de souches performantes ; test de leur efficacité à échelle pilote, en pépinière et dans des parcelles d'expérimentation.

- ✓ Installation des unités de production de biofertilisants à base de microorganismes autochtones.

Références bibliographiques

Abbot, L.k. (1982). Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean cover, *Aust.J.Bot*, 30:485-490.

Akiyama ,K; Matsuzaki, K;Hayashi, H.(2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi, *Nature* ,435: 824-827.

Andre, J.F ; Planchette, C ; Piche, Y ; (2004). Les mycorhizes. La nouvelle révolution verte. Edition *multi mondes* .

Anonyme, I. (2001). Cinquième conférence des états parties chargée de l'examen de la convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes bactériologiques (biologiques) ou aux toxines et sur leur destruction. BWC/CONF.V/4, 14 Sep 2001.

Augé, R.M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Mycorrhiza* ,11: 3-42.

Bago, B; Zipfel ,W;William ,R.M; Piché, Y .(1999). Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo twophoton microscopy. *Protoplasma*.209:77-89.

Benhaizia ,Y. 2006. Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* : *H. carnosum* Desf ., *H. spinosissimum* sub sp *capitatum* Desf. et *H. pallidum* Desf. Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliqué. université Mentouri Constatine.

Beringer , J.E. (1974) .R-factor tranfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen, Microbiol*,84: 188-198.

Bolan, N.S.(1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants, *Plant and Soil*, vol. 134, pp. 189-207.

Bordeleau,L .M. (1989).potentiel du rhizobium comme agent de lut biologique *phymprotecron*.70 :1-41.

Bothe, H; Klingner ,A; Kaldorf, M; Schmitz ,O; Esch, H;Hundeshagen ,B; Kernebeck; Botanisches, H .(1994). Biochemical approaches to the study of plant-fungal interactions in arbuscular mycorrhiza Institut, Universitiit zu Kdln, Gyrhofstr. 15, D-50923 K6ln (Germany).

- Boulahrouf A.** (1986). La microflore responsable de la dégradation des polyosides pariétaux dans le gros intestin de la souris et du lapin, Thèse de doctorat, Université de Clermont-Ferrand II.
- Brencic, A; et Winans, S.C.** (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 155-194.
- Brewin, C. R.; Firth-Cozens, J; Furnham, A; et Mcmanus, C.** (1992). Self-criticism in adulthood and recalled childhood experience. *J Abnorm Psychol*, 101(3), 561-566
- Brick ,M.A.** (2002). Fertilizing dry bean .Soil and crop. In.
- Brockwell J.** (1982). Inoculation methods for field experiments and farmers P.211- 227. In J.M. Vincent (Ed), Nitrogen fixation in legumes .Academic Press. Australia.
- Brundrett ,M .C.**(2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New phytologist*.
- Buee ,M; Rossignol ,M; Jauneau ,A; Ranjeva, R;Bécard ,G,** (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates,*Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 693-698.
- Chatagné ,G.** (2007). Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*, Thèse de doctorat, université Paul Sabatier, France.
- Chataigné, G.** (2007). Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*, Thèse pour le doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatie,P18-20
- Daft, M.J;El-Giahami ,A.A.**(1974).Effect of endogen mycorrhiza on plant growth. Influence of infection on the growth and nodulation in French bean (*phaseolus vulgaris*),*New phytol*,73:1139-1174p.
- Dalpe.M.**(2004). Arbuscular Mycorrhiza Inoculum to Support Sustainable Cropping Systems.
- Davet ,P .** (1996) .Vie microbienne du sol et production végétale. Editions INRA, Paris. France. pp 145-161.

Davies, F.T; Potter, J.R; Linderman, R.G.(1992). Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf concentration-response in gas exchange and water relations, *Physiologia Plantarum*, 87: 45-53.

Davies, F.T; Potter, J.R;Linderman, R.G.(1992). Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration-response in gas exchange and water relations, *Physiologia Plantarum*, 87: 45-53.

Dehne, H. W. (1982). Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plante pathogens, *Phytopathology* 72 : 1114-1119.

Deliane, E;Chiraa,A;Chira, L;Savulescu ,E.(2011). Arbuscular mycorrhizae : an overview. *South Western Journal of Horticulture,Biologynd Environment*.2: 167-192.

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

Dickson, S; Smith, S.E; Smith, F.A. (1999).Characterization of two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Allium porum* : colonization, plant growth and phosphate uptake, *New Philologist*, vol. 144, pp. 163-172.

Dommgues, Y; Duhaux, E et G .D . HOANG. (1999).les arbre fixateur d'azote : Caractéristique fondamentales et rôles dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux ,Y . Dommgues(ed),Edition espace 34,Paris,475P.

Dommgues,Y;Mangenot,F.(1970).Ecologies microbienne du sol .Masson et Cie, paris,796p.

Drevon, J ; Sifi, B. (2003) .Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen, Quae, Paris.

Ehteshamul-haque,S ;Hashmi,R.Y ;Ghaffar,A.(1992).Biological control of root rot disease of lentil *Lens*.*Newsletter*.19:43-45

Fortin,J.A ;Plenchette,C ;Pieché,Y.(2011).Les mycorrhizes:la nouvelle révolution verte ,Québec, Multimondes.p138.

Fortin J.A., Plenchette C., et Pieché Y. (2011). Les mycorhizes : la nouvelle révolution verte. Multi monde Quae. (Eds), Québec. 131.

François, M, G. (1997). Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire, Quae, Paris, P149.

Franke, Snyder, M., Doude, D.D.J; Galvez, L; Phillips, J.G; Wagoner, P; Drinkwater, L; Morton, J.b. (2001). Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA, *Appl. Soil Ecol.*, 16:35-48.

Frayse, N; Couderc, F; Poinot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the Rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biological Chemistry.* 270:1365- 1380.

Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 280-300.

Garbaye, J. (2013). La symbiose mycorhizienne, une association entre les plantes et les champignons, Ed. Quae, Versailles, 251 p.

Garcia, G ; Ocampo, J.A. (2002). Regulation of the plant defense response in arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Exp. Bot.* 53:1377-1386.

Garcia, G; Ocampo. (1989). Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Ecophysiology, structure and systematic, Third edition, P291.

Gavériaux, J.P. (2012). Les Glomeromycota – Mycorhizes VAM et *Geosiphon pyriformis* (Kützing) Wettstein, *Bull. Soc. Mycol. Nord Fr.*, n°92, pp. 1-17.

Gerdemann, J.W; Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal endogone extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46:235-244.

Gerhardt, P; Murray, R. G. E; Wood, W.A. and Krieg, N.R. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington DC, ASM, USA.

Gosling, P; Hodge, A; Goodlass ,G; Bending ,G.D;2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming,*Agriculture, Ecosystems and Environment*, 113, pp.17-35.

Gourette, J ; Rubulier,D.(1985).La symbiose rhizobium légumineuses,Information science naturel, Ed Gredp Rennes ,France ,55p

Grouzis, Le Floc' h. (2003) .Un arbre au désert : Acacia raddiana, IRD, Marseille, p191.

Guines, F. (2002). Bases Génétiques des variations pour la structure histologique des tiges de luzerne (*Medicago sativa L.*), Thèse Doctorat, Ecole Nationale Supérieure agronomique de rennes, Lusignan.

Guiraud, J.P. (1998). Techniques d'analyses microbiologiques : Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, France.

Guissou, T ; Ba, A.M ; Plenchette, C., Guinko, S. & Duponnois, R. (2001). Effets des mycorhizes à arbuscules sur la tolérance à un stress hydrique chez quatre arbres fruitiers: *Balanites aegyptiaca (L.) Del.*, *Parkia biglobosa (Jacq.) Benth.*, *Tamarindus indica L.* et *Ziziphus mauritiana Lam.* *Sécheresse*, 12 (2): 121-127.

Harrison, M.J; Dewbre ,G.R;Liu ,J.(2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi,*The Plant Cell* 14: 2413-2429.

Hart ,M.M ; Klironomos ,J.N. (2002).Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning In:Van der Heijden MGA,Sanders IR(Eds) *Mycorrhizal ecology*,vol 157.New York.225-242.

Hause, B; Mrosk, C; Isayenkov, S; Strack, D. (2007). Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions,*Phytochemistry* ,68: 101-110.

Hirsch, A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* 122, 211-237.

Hopkins, W.G.(2003). Introduction to plant physiology. Second edition. Eds : De Boeck, De Boeck University, Belgique.

- Hua, S.S.T; Tsai v.Y; Lichens G. M.;Noma A.T.**, 1982 - Accumulation of aminoacids in *Rhizobium* sp, strain WRI 00 1 in response to sodium chloride salinity, *App/. Environ ,Microbiol*, 44 : 135-140.
- Jarvis B. D. W., T. S. Mc lean, I. G. C. Robertson, and G. R. Fanning.** (1977). Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* 20, pp42-52.
- Javot ,H ;Pumplin ,N ;Harrison ,M.J.**(2007). Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles, *Plant, Cell and Environiont*, 30:310-322.
- Jean-Pierre, G.** (2012). Mycorhizes VAM et *Geosiphon pyriformis* (Kützing) Wettstein – France, Lille, P4.
- Jia,Y.S ; Gray,V.M.**(2004).Inter relationship between nitrogen supply and photosynthetic parameter in *vicia faba L*, *photosynthetic*,41:605-610p.
- Joffin ,J.N. and Leyral ,G.**(2006). *Microbiologie Technique. Tome 1, dictionnaire des techniques.* Académie de bordeaux et crdp d’Aquitaine, France.
- Johnson ,D ;Vande nkoornhuysse, P.J ;Leake, J.R ;Gilbert ,L ; Booth ,R.E ;Grime ,J.P ;Young J. P. w ; Read, D. J.** (2004). Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms.*New phtol.***161**,2: 503-515.
- Jordan ,D.C.**(1984).Family Rhizobiaceae,In Kreig N.R.and Holt J.H.(Ed),*Bergey’s manual of systematic bacteriology*,Vol,1 the Williams and Wlikins Co,Baltimore,p234-256
- Kannaiyan, S; Govindarajan, K;Kumar ,K ; Chendrayan ,K.**(2000). Use of biofertilizers for increasing pulse production.
- Karandashov, V et Bucher, M.** (2005). Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas,*Trends in Plant Science*, 10, n°1 pp.22-29.

Kloepper, J.W ; Leong, J ; Teintze, M; Schroth, M.N.(1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria , Nature .286: 885-886.

Kobayashi, Y., Tanaka. H. Et O. Gasawara .(1974). Purification and properties of Fla, a p-glucanase which is highly lytic toward cell walls of Piriculonaoryzae E. Agric.Biol. Chem.pp. 3 8; 973-978.

Latati. (2012). Adaptation de la symbiose légumineuse haricot- rhizobium à la déficience en phosphore. Mémoire de Master de biotechnologie végétales, Ecole Nationale Supérieure Agronomique Harrach -Alger, p.19.

Leake, J.R; Johnson ,D; Donnelly ,D. P; Muckle, G.E., Boddy ,L; Read D.J.(2004). Networks of power and influence: the role mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. Canadian Journal of Botany.82:1016-1045.

Leclerc, H ; Gaillard ,J. L ; Simonet ,M., 1995 : Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien . Doin editeurs.

Lekhal, A.(2011).Effet de certains inducteurs de gènes nod (composé phénoliques) sur la croissance de rhizobium en symbiose avec *Vicia faba* caractérisation et lutte biologique , Thèse pour le doctorat, Université Abou Bakr Belkaid ,Tlemcen, P35-36.

Ligrone, R; Carafa ,A; Lumini ,E; Bianciotto ,V; Bonfante ,P; Duckett, J.G. (2007). Glomeromycotean associations in liverworts : a molecular cellular and taxonomic analysis. Am.J.Bot., 94:1756-1777.

Limam, M.A.F. (2015). Isolement et pré-identification des mycorhizes à arbuscules provenant de quelques palmeraies d'Ouargla . Mémoire Master, Université KASDI MERBAH OUARGLA, p 11.

Lodwig, E. M. A. H; Hosie, A; Bourdes, K; Findlay, D; Allaway, R ; Karunakaran, J. A. Downie, P. S. Pool. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. Nature. 17 (6933):722-6.

Logi ,C; Sbrana, C; Giovannetti ,M.(1998). Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host, Applied and Environmental Microbiology 64: 3473-3479.

Long, M. H. (1996). The role of the linguistic environment in second language acquisition. In W. C. Ritchie & T. K. Bhatia (Eds.), *Handbook of second language acquisition* (pp. 413–468). New York.

Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**, 1885-1898.

Lovelock, C.E;Andersen, K;Morton ,J.B.(2003).Influence of host tree species and environmental variables on mycorrhizal communities in tropical forests, *Oecol*, 135:268-279.

M.Neyra. (1989) .Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote, L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, P.1 /2.

Maldonado-Mendoza, I;Dewbre, G.R;Harrison ,M.J.(2001). Phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1140-1148

Mauries, M. (2003). La luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation, France Agricole, Paris.

Megueni, C ; Enama, T ; Awono et Robert ,N. 2011 .Effet simultané de la dilution et de la combinaison du Rhizobium et des mycorhizes sur la production foliaire et les propriétés physico-chimiques des jeunes feuilles de *Vigna unguiculata* (L.) Walp .Ecole Nationale Supérieures des Sciences Agro – Industrielles. Université de Ngaoundéré, B.P. 455 Ngaoundéré, Cameroun.

Messioughi, A. (2016). Etude d'une plante fourragère la luzerne *Medicago sativa.L*: importances phytochimiques, aspects thérapeutiques et essais microbiologiques, Thèse Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba,P4.

Miklashevichs, E.H., Rohrig, J., Schmidt, S.J. (2001). Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors, *Crit- Rev- Plant- Sci* **20**, 373-394.

Miklashevichs, E.H., Rohrig, J., Schmidt, S.J. (2001). Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Crit- Rev- Plant- Sci* 20, 373-394

Mille ,G ; Louppe ,D .(2015).Mémento du forestier tropical.Edition Quae.

Monzon; Azcón. (1996). Relevance of mycorrhizal fungal origin and host plant genotype to inducing growth and nutrient uptake in *Medicago* species, *Agriculture Ecosystems & Environment* 60(1):9-15.

Morton, J.B.; Benny, G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*. 37:471-491.

Morton, J.B; Benny, G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order Glomales and Gigasporineae and two new families *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae* with an emendation of Glomaceae, *Mycotaxon* 37: 471-491.

Nagahashi ,G;Douds, D.D.(1997). Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot root, *New Phytologist* 136: 299-304.

Ndoye, I ; Dreyfus,B ; Truchet,G. (1992)Infection et développement des nodules de racines de la légumineuses *sesbania restarta* par la souche ors 571 *d'azorhizobium*, Direction des Affaires Scientifiques Techniques BP 4025 Dakar Sénégal, France.

Nehela, A. (2016) .Symbiose tellurique :Rôle et mécanisme de tolérance aux stresse abiotique, Thèse pour le doctorat de laboratoire de Biotechnologie des rhizobia et Amélioration des plante , Université d’Oran, Ahmed Ben Balla, P15.

Newcomb, E.H. & Tandon, S.R. (1981) Uninfected cell of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science* 212, 1394–1396.

Newcomb,W; Sippell,D. and Peterson,R.L. (1979) *Can. J. Bot.*, 2603- 2616.

Newman, E. I;Reddell ,P. Distribution of mycorrhizas among families of vascular plants.*New phytologist*.106:745-751.

Noel,K.D.(2009).Rhizobia.M.Schaechter(ed),Encyclopedia of microbiology ,Academic press,San Diego,CA,pp,261-77.

Noura, M ; RIABI, K. (2014) .Isolement et cartérisation des bactéries nodulant la légumineuse *Hedysarum pallidum* Desf. , poussant dans deux sites différent. Mémoire de Master de Microbiologie, Université de Constantine 1.

Pawlowski k, Bisseling T. (1996). Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features, *Plant Cell* 8, 1899-1913.

Pelmont, J.1993.bactérie environnement, presse Universitaire de Grenoble, P898.

Phillips, J. M;Haymann ,D. S. (1970). Improved proceeding for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, *Trans. Br. Mycol, Soc*, 69: 275-280.

Poulsen ,K.H; Nagy ,R; Gao ,L.L;Smith ,S.E;Bucher ,M;Smith, F.A, Jakobsen I, (2005). Physiological and molecular evidence for Pi uptake via the symbiotic pathway in a reduced mycorrhizal colonization mutant in tomato associated with a compatible fungus, *New Phytologist* 168: 445-453.

Pringle ,A; Bever, J. D.(2002). Divergent phonologies may facilitate the coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi in a North Carolina grassland. *Am.J.Bot.*89:1439-1446.

Raven;Evert; Eichhorn. (2007). *Biologie végétale.* 2 e édition. Edition de boeck. Paris France.pp 653-660.

Redon, P.A. (2009).Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfer du cadmium(Cd) du sol à la luzerne .These du Doctorat (*Medicago truncatula*).Université Henri Poincaré,Nancy 1en Science du Sol.France.

Redon, P.O. (2009).Rôle de champignon mycorhiziens à arbuscule dans le transfert du cadmium(Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*) .These de doctorat.University Henri Poincaré,Nancy1.france.P :29.

Reinhardt, D. (2007) Programming good relation-development arbuscular mycorrhizal symbiosis.*Current Opinion in Plant Biology* **10**, 1:98-105.

Reinhardt, D. (2007).programing good relation-development arbuscular mycorrhizal symbiosis.*Curr Opin Plant Biol.*10:1-8.

Requena ,N. (2005).Measuring quality of service: phosphate “à la carte” by arbuscular mycorrhizal fungi, *New Phytologist* 168: 268-271.

Rigaut,J ;puppo,A.(1975).Indole-3-acetic catabolisme by soybean bacteroids.J,Gen Microbiol ;88 :223-228.

Rinaldi, A.C;Comadini ,O; Kuyper, T. W.(2008).Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff fungal Divers.33:1-45.

Rioux. C. R., Jordan. D. C. Et Raitray J. B. M. (1986).Iron requirement of Rhizobium leguminosarum and secretion of anthracitic acid during growth on an iondeficient medium. *Arch. Biochem. Biophys.*pp. 248; 175- 182.

Scervino ,J.M; Ponce ,M.A;Erra-Bassells ,R;Vierheilig ,H;Ocampo ,J.A;Godeas ,A.(2005). Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth *Gigaspora* and *Glomus*, *Mycological Research* 109: 789-794.

Schenck, N.C. and Perez, Y. (1987). Distribution and Association of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Different Cultivars of Wheat from Lalganj Pratapgarh District of Utter Pradesh, India. *Advances in Bioscience and Biotechnology*,Vol.6 No.5.

Selami, N. (2015). Etude des Associations Symbiotiques de *Retama monosperma* : Approches Morphologique, Anatomique et Ultrastructurale, Caractérisation Moléculaire des Isolats, Thèse Doctorat, Université des Sciences et de la Technologie d’Oran Mohamed Boudiaf.

Sietsma. J. A. Et Wessel H. J. G. (1979): Evidence of covalent linkages between chitin and fLglucan in a fungal wall. *J. Gen. Microbial.* pp. 114; 99- 108.

Sieverding, E. (1991). Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. GTZ, Eschborn, Germany, 371 p.

Skorupska, A; Janczarek, M; Marczak, M; Mazur ,A; Krol J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories.* vol5, 7

Skujin. J. J., Potgieter. J; M. Alexander. (1965). Dissolution of funged cell wall by a Streptomycete chitinase and p-(13)-glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* Pp.111, 300-364.

- Smith S.E;Read D.J.(1997).**Mycorrhizal symbiosis.Academic Press, San Diego, P 607.
- Smith. M.J., Shoolery. J. N., Schwyn. B., Holden. 1. AND J. B.Neilands. (1985)** .Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. J. Am.Chem. Soc. pp. 107; 1739-1743.
- Snapp, S; Rahmanian, M; Batello .C.** (2018). Légumes secs et exploitations durables en Afrique subsaharienne, organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome.
- Somasegaran, P; Hoben H, G .**1994.Handbook for *Rhizobia*,Sringer verlage ,New York.
- Souza,F.A.**(2005).Biology,ecology and evolution of the family of Gigasporaceae ,arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*),Thèse de doctorat.Leiden University, The Netherlands,55p.
- Sprent, J ; Raven, J.** (1992).Evolution of nitrogen –fixing symbioses,In :Biological nitrogen fixation ,stady,Burris,R ,Evan,eds, Chapman and hall, New York .
- Tahat ,M.M ;Sijam ,K;Othman ,R.** Mycorrhizal Fungi as a Biocontrol Agent.pathology Journal.9:198-207.
- Taylor, L. P; and Grotewold, E.**(2005). Flavonoids as developmental regulators, Curr Op Plant Biol 8: 317-323.
- Tchameni,N ;Omoloko,C ;Nana,W;Tchana,N.**(2008).Effet des champignon mycorhiziens et flavonoides sur les phosphatise ,la croissance et la valeur nutritionnelle de l'haricote vert ,science and engineering series vol .9,No.1,20-28p.
- Tommerup.**(1984). Genetics of Plant Pathogenic Fungi, The Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas. Volume 6 , Pages 81-91.
- Trouvelot A; Kough J.L; Gianinazzi,P. V.** (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire,Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes. Inera , Dijon, France. pp 217 – 221.
- Uhlmann, E;Gorke ,C; Petersen ,A . Oberwinkler, F.** (2006). Arbuscular mycorrhizae from arid parts of Namibia.J.Arid Envir,64:221-237.

- Vincent, J.M.** (1970). The manual for the practical study of nodule bacteria. Blackwell
- Vincent, J.M.** (1974).In rezki.M.A.1990.
- Voets, L; Declerck, S. (2006).***Glomeraceae* and *Gigasporaceae* differ in their ability to form hyphal networks.*New phytologist*.172:185-188.
- Walker, C. & Trappe, J.M.** (1993). Names and epithets in the Glomales and Endogonales, *Mycological Research* 97: 339-344.
- Weber, A.N;Tauszig-Delamasure, S; Hoffmann, J.A; Lelievre, E; Gascan, H., Ray, K.P; Morse, M.A., Imler, J.L;Gay, N.J.** (2003). Binding of the Drosophila cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling, *Nat, Immunol.* 4(8): 794-800.
- Werner, D.,** (1992).Symbioses of plants and microbes. Philips, University Marburg Germany. Edition Chapman & hall.
- Wubet ,T; Kottke ,J;Teketay ,D; Oberwinkler, F.**(2003).mycorrhizal status of indigenous trees in dry Afromontane forests of Ethiopia,For Ecol,Manage,179:387 399.
- Zahran, H.H .**(1991). Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil. Soils* 12: 73-80 .
- Zakhi; T, F. Et De Lajudie, P. 2001.** Taxonomy of rhizobia. *Agronomie.*, 21: p 569-576.
- Zubek, S;Turnau;Blaszkowski ,J.**(2008).Arbuscular mycorrhiza of endangered plants from the Tatra MTS,Acta Soc.Tis Bot,Polonia, 77 (2):148-156.
- <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01263138>
- <https://agriculture-de-conservation.com/LA-LUZERNE-REINE-DES-FOURRAGERES.html>
- [Http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2016/90](http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2016/90)
- <https://docplayer.fr/33113805-Les-symbioses-racinaires.html>
- <http://biosol.esitpa.org/liens/rhizo2003/nodulation.htm>
- <https://agriculture-de-conservation.com/Legumineuse-fixation-d-azote-et.html>
- http://svt.ac-dijon.fr/IMG/pdf/ppt_interactions_plantes-mo.pdf.
- <https://jardinage.ooreka.fr/astuce/voir/535343/mycorhizes>

-<https://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--Sa%C3%AFda--A%C3%AFn-El-Hadjar>

-<https://fr.db-city.com/Alg%C3%A9rie--Sa%C3%AFda--Sidi-Boubekeur--Ouled-Khaled>

-<http://www.invam.caf.wvu.edu>. 58

-https://www6.inra.fr/comite_agriculture_biologique/Les-outils-de-recherche/D-autres-programmes-de-recherche/ANR/Perfcom.

Annexes 01 :

▪ HgCl₂ 0.1%

HgCl ₂	0.1g
Eau distillée	99.9ml

▪ Composition du milieu YMA+ rouge Congo en g/l

YMB	500 ml
Solution stock de rouge Congo	0.05ml
Agar	7.5g
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 du milieu YMA + bleu bromothymol en g/l

YMB	500 ml
Solution stock de bleu bromothymol.....	5 ml
Agar	7.5g
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes Après ajustement de pH on ajoute 2.5ml de bleu bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

▪ Le milieu de culture TY (g/l)

Tryptone	2.5g
Extrait de levure	1.5g
CaCl ₂ H ₂ O	0.43g
Eau distillée	500ml
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

▪ Réactifs de GRIESS

Nitrite 1 :

Acide sulfanilique	0.8g
Acide acétique	100ml

Nitrite 2:

Alphanaphtylamine	0.5g
-------------------------	------

Acide acétique 100ml

▪ **Solution nutritive des plantes (Bertrand, 1997)**

CaCl₂(294.04g/l) 1ml

MgSO₄.7H₂O(246.48g/l) 1ml

KH₂PO₄(13.609g/l) 1ml

KCl(223.65g/l) 1ml

La solution de micro-éléments :

H₃BO₄ (6.25g/l)40μl

MnSO₄.4H₂O (6.25g/l) 40μl

ZnSO₄.7H₂O(6,25g/l) 40μl

CuSO₄.5H₂O(6.25g/l)40μl

Na₂MoO₄.2H₂O(0.625g/l)40μl

CaCo₃ (1g/l)40μl

Sequestréne de fer (solution à16.6g/l)1ml

Ca(NO₃)₂(82g/l)1ml

L'eau distillée 1000ml

Agiter ces constituants jusqu'à l'obtention d'une solution homogénéisée.

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

▪ **Milieu de culture YEM (Yeast extra Mannitol) solide (vincent1970).**

Extrait de levure.....1g

Agar-agar.....18g

Mannitol.....10g

Solution minérale de Bergensen10M.....100ml (Bergensen, 1961)

➤ KCL.....1g

➤ FeCl₃.....0,02g

➤ CaCl₂,2H₂O.....0,53g

➤ Na₂HPO₄,12H₂O.....4,5g

➤ MsSO₄,7H₂O.....1g

➤ H₂O distillée.....1000ml

pH (6,9-7)

Annexe02 :

- **Fixateur FAA** : Mélange éthanol-acide acétique-formol (Phillips et Hayman, 1970).

Formaldehyde37°C.....25ml

Acide acétique glacial.....25ml

Ethanol.....140ml

Eau distillée.....60ml

- **KoH 10%** :

KOH.....11,76ml

Eau distillée.....100ml

- **Acide lactique à 10%** :

Acide lactique.....83,33ml

Eau distillée.....250ml

- **Bleu de trypan 1%** :

Bleu de trypan.....1g

Eau distillée.....100ml

- **Glycérol à 60%** :

Glycérol.....65,2ml

Eau distillée.....100ml

- **Eau gélosé 1%** :

Agar-agar.....1g

Eau distillée.....100ml

pH 6.8 à 7.stériliser pendant 20 min à120°C.

Annexe03 : Tableau d'évaluation des paramètres de la colonisation MA

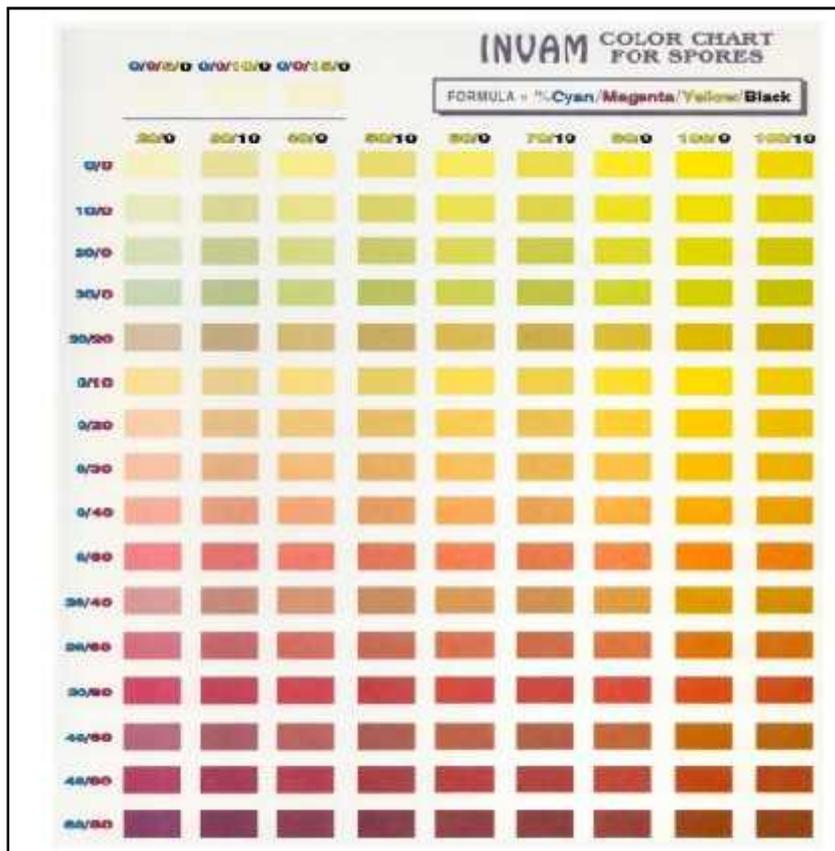
	0	1				2				3				4				5						
		A1	A2	A1	A0																			
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
11																								
12																								
13																								
14																								
15																								
16																								
17																								
18																								
19																								
20																								
21																								
22																								
23																								
24																								
25																								
26																								
27																								
28																								
29																								
30																								
Tot																								

Annexe 04 : Solution nutritif de Hoagland er Arnon, (1938).

Solution mères	Ingrédients	Quantité g/l	Solution final ml/l
A	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	236,15	5
B	KNO ₃	101,11	5
C	MgSO ₄	120,40	2
D	KH ₂ PO ₄	136,10	1
E	CaCl ₂ 2H ₂ O	183,33	1
F	Séquestrant de fer	25,00	4
Micro-éléments	H ₃ BO ₃	0,572	1
	MnCl ₂ -4H ₂ O	0,362	
	ZnCl ₂	0,110	
	CuCl ₂ -2H ₂ O	0,050	
	Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0,025	

pH 6 à 6.8

Annexe05 : Carte de couleur INVAM des spores (Blaszkowski, 2003).



Annexe06: Caractéristique morphologique d'un grand nombre de *Glomeromycota* des classes jusqu'aux genres (Oehl et al ;2011)

Classes ordres	Familles	Genres	Spores	Parois des spores	Structures mycorhiziennes		
Glomeromycetes							
Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>		1	V, A, H	Vesicles, Arbusculi, Hyphae	
		<i>Funneliformis</i>		1	V, A, H	V, A, H	
		<i>Septoglomus</i>		1	V, A, H	V, A, H	
		<i>Simiglomus</i>		1	V, A, H	V, A, H	
		Entrophosporaceae	<i>Clavotrochoglomus</i>		1	V, A, H	V, A, H
			<i>Albahypha</i>		1	V, A, H	V, A, H
			<i>Vicospora</i>		1	V, A, H	V, A, H
	Diversisporales	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>		1	V, A, H	V, A, H
			<i>Redectozia</i>		1	V, A, H	V, A, H
			<i>Otospora</i>		2	V, A, H	V, A, H
			<i>Triospora</i>		2	V, A, H	V, A, H
		Saccosporaceae	<i>Saccospora</i>		3	V, A, H	V, A, H
		Factosporaceae	<i>Factospora</i>		2	V, A, H	V, A, H
		Acaulosporaceae	<i>Kukispora</i>		3	V, A, H	V, A, H
<i>Acaulospora</i>			3	V, A, H	V, A, H		
Gigasporales	Scutellosporaceae	<i>Orbispora</i>		3	A, H	A, H	
		<i>Scutellospora</i>		3	A, H	A, H	
	Denticulataceae	<i>Fusculata</i>		3	A, H	A, H	
		<i>Denticulata</i>		3	A, H	A, H	
		<i>Quaternica</i>		4	A, H	A, H	
	Racconotraneae	<i>Racconotria</i>		3	A, H	A, H	
		<i>Racconotria</i>		2	A, H	A, H	
	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>		1	A, H	A, H	
	Archaeosporomycetes						
	Archaeosporales	Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>		3 (Ac) 1 (Gl)	V, A, H	A, H
Archaeosporaceae		<i>Archaeospora</i>		2 (Ac) 1 (Gl)	A, H	A, H	
		<i>Intraspora</i>		2 (Ac) 1 (Gl)	A, H	A, H	
Geophilosporaceae		<i>Geophilospora</i>		1		Associated with cyanobacteria	
Paraglomeromycetes							
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>		1	A, H	A, H	