

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABDERRAHMANE MIRA
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences naturelles de l'environnement



**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en
biologie**

Option : environnement et sécurité alimentaire

**Isolement et purification des bactéries
symbiotiques et l'étude de l'influence des
microorganismes (bactéries et
champignons) sur le stress hydrique chez
les Légumineuses**

Membres du jury :

Président: M^r Boulila A.

Promoteur : M^r Hamlat M.

Co-promotrice: M^{me} Boulila F.

Examineurs: M^r Laissaoui M.

M^{lle} Benmouhoub H.

Réalisé par :

M^{lle}: Allaoua Samia.

M^{lle} : Abdelli Meriem.

Année universitaire 2012 / 2013

REMERCIEMENTS

🌸 *Tout d'abord, nous tenons à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce modeste travail.*

🌸 *Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance à Mr. Hamlat, notre promoteur, et à Mme Boulila, notre co-promotrice, pour leurs qualités humaines, leur patience et leur dynamisme . et pour nous avoir guidé et conseillé afin de mener à bien ce travail.*

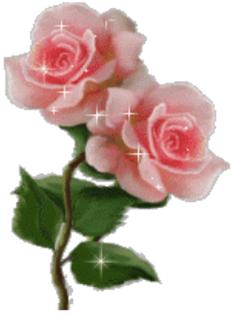
🌸 *Nous tenons à remercier aussi les membres de jury d'avoir accepté de juger notre travail.*

Mr. Boulila A. maitre assistant classe A, à l'université de Bejaia, d'avoir accepté de présider le jury.

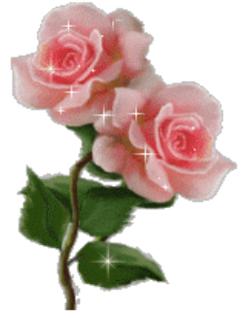
Mr. Laissaoui M. maitre assistant et Melle. Benmouhoub H. maitre assistant, à l'université de Bejaia, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

🌸 *Nous remercions Mr. Bekdouche F. maitre de conférence classe A et Mr. Sahnoune M. professeur, à l'université de Bejaia, pour leurs précieuses aides.*

🌸 *Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



Dédicaces



Tout au début, je tiens à remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir donné du courage et de patience afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Ma très chère maman Malika et ma sœur jumelle Akila pour leurs sacrifices, leurs multiples soutiens et pour leur affection quotidienne, merci d'être présentes dans toutes circonstances, je pris le tout puissant de vous donner une très belles vie et m'aider à être toujours votre fierté.

La mémoire de ma très chère tante Taklitt qu'ALLAH l'accueil dans son vaste paradis, amine.

Mon cousin Mostapha qui m'a été un vrai père et mon oncle Abdelaziz qui m'a aidé à tous moment.

Mon très cher le petit Mami.

Mes cousins Nabil qui a été très patient avec moi, Hamid qui m'a toujours encouragé à aller loin, Sofiane qui m'a été le frère que je n'avais pas, Yacine, Fares, Rachid, Bilal, Mouloud, Aissa, Hakim et Djamel.

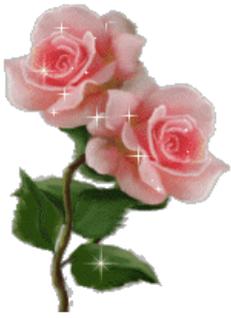
Mes cousines Maborouka, Zoulikha, Souhila, Nora qui ont toujours été là pour moi. Mes médecins Dr. Cheurfa H qui m'a toujours considéré comme sa fille, Dr. Allaoua N qui a toujours été noble et très patient avec moi, Mouloud qui a toujours été compétent et Dr. Kechrid S qui a été généreuse avec moi.

Mes très chères amies Nadra qui m'a toujours soutenu depuis six ans, Siham qui a été la grande sœur que j'ai souhaité d'avoir, Zeineb, Leila, Nawel, Adouda, Miada qui ont toujours été là pour moi.

A toute ma promotion : enseignants et étudiants.

A tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Samia



Dédicaces



Au nom de dieu le tout puissant

Je dédie ce travail

*A la mémoire de mon père que l'absence n'exclue pas sa présence en moi, que dieu
l'accueille dans son vaste paradis.*

A ma très chère maman qui m'a toujours soutenue, que dieu la garde pour moi.

*A mes frères et sœurs qui me comblent tous les vides et me rendent le difficile
facile.*

A mes chers petits neveux : Dziri, Adem et Dahlia.

A mes très chères copines : Faiza, Amina, Warda, Samia

A tous ceux qui valorisent la science et nous ont aidés.

Meriem



Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

Introduction.....01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les légumineuses.....03

I.1. Généralités et historique sur les légumineuses.....03

I.2. Intérêts des légumineuses.....03

I.3. Caractéristiques botaniques et classification des légumineuses.....04

I.4. Le genre *Hedysarum*.....05

I.5. Présentation et description botanique de l'espèce *Hedysarum coronarium*.....05

I.6. Systématique de l'*Hedysarum coronarium*.....06

Chapitre II : Les rhizobiums.....08

II.1. Généralités sur les rhizobiums.....08

II.2. Caractéristiques des rhizobiums.....09

II.3. Classification des rhizobia.....10

II.4. Effets des facteurs abiotiques sur la croissance des rhizobiums.....14

II.5. Le microsymbiote de Sulla.....16

Chapitre III : Les champignons

III.1. Généralités sur les champignons.....17

III.2. Mode de vie des champignons.....18

III.3. Mode de reproduction des champignons.....19

III.4 .Classification des champignons.....	20
III.5. Exigences nutritives des champignons.....	21
III.6. Conditions de croissance des champignons.....	22
Chapitre IV : Notion de symbiose.....	24
IV.1. Définition de la symbiose.....	24
IV.2. La symbiose bactérienne.....	24
IV.2.1. L'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuses.....	25
IV.2.2. Facteurs influençant la symbiose bactérienne.....	26
IV.3. La symbiose mycorhizienne.....	30
IV.3.1. Définition.....	30
IV.3.2. Types de mycorhizes.....	30
IV.3.3. Rôle des mycorhizes.....	32
Chapitre V : Stress chez les plantes.....	34
V.2. Stress salin.....	34
V.3. Stress thermique.....	35
V.4. Stress hydrique.....	35
V.4.1. Importance de l'eau pour la plante.....	35
V.4.2. Définition du stress hydrique.....	35
V.4.3. Effets du déficit hydrique sur la plante.....	36
V.4.4. Effet de déficit hydrique au niveau cellulaire.....	37
V.4.5. Effet du déficit hydrique sur le système racinaire.....	37
V.4.6. Adaptation des plantes au stress hydrique.....	37
V.4.6.1. Définition.....	37
V.4.6.2. Mécanismes d'adaptation.....	38

Matériels et méthodes

I.1. Matériels.....	42
I.2. Méthodes.....	42
I.2.1. Multiplication des champignons.....	42
I.2.1.1. Préparation du milieu de culture des champignons PDA.....	42
I.2.1.2. Repiquage des champignons.....	42
I.2.1.3. Incubation.....	43
I.2.1.4. Choix de l'inoculum fongique pour notre étude.....	43
I.2.2. Préparation des bactéries symbiotiques.....	43
I.2.2.1. Collecte des nodules.....	43
I.2.2.2. Stérilisation des nodules.....	45
I.2.2.3. Isolement et purification des bactéries symbiotiques.....	45
I.2.2.4. Conservation des isolats.....	46
I.2.2.5. Authentification des isolats présumés Rhizobium.....	47
I.2.2.6. Caractéristiques des bactéries.....	49
I.2.3. Etude du stress hydrique.....	50
I.2.3.1. Stérilisation du sol et des pots.....	50
I.2.3.2. semis des graines stérilisées.....	50

Résultats et discussions

II.1. choix de l'inoculum fongique.....	55
II.2. L'étude des bactéries symbiotiques.....	56
II.2.1. Authentification des isolats.....	56
II.2.2. Caractéristiques des bactéries.....	57

II.3. l'étude du stress hydrique	60
II.3.1. La croissance.....	60
II.3.2 Teneur en eau.....	70
II.3.3. Teneur en sucre.....	74
<hr/>	
Conclusion	78

Références bibliographiques

Glossaire

Annexes

Liste des photos

Photo N°1 : Plantule de sulla avec graine et gousses.....	06
Photo N°2 : Tubes Eppendorf contenant les nodules.....	45
Photo N°3 : mise à nodulation au phytotron.....	49
Photo N°4 : semis des graines dans les différentes conditions.....	51
Photo N°5 : <i>Dreschlera sp2</i>	55
Photo N°6 : témoin I début de stress.....	62
Photo N°7 : témoin II sans stress.....	62
Photo N°8 : plante+champignon sous stress.....	64
Photo N°9 : plante+champignon témoin (sans stress).....	64
Photo N°10 : plante+bactérie sous stress.....	66
Photo N°11 : plante +bactérie témoin (sans stress).....	66
Photo N°12 : plante+ champignon + bactérie sous stress.....	78
Photo N° 13 : plante + champignon + bactérie témoin (sans stress).....	78

Liste des figures

Figure N°1 : dialogue moléculaire (échange de signaux chimiques) entre <i>Rhizobium</i> et racine de légumineuse.....	26
Figure N°2 : formation d'un nodule.....	28
Figure N°3 : illustration schématique des trois principaux types de mycorhizes.....	31
Figure N°4 : Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide.....	46
Figure N°5 : évolution de la croissance des plantes des conditions témoin I et témoin II....	61
Figure N°6 : évolution de la croissance des plantes des conditions champignon et Champignon témoin.....	63
Figure N° 7 : évolution de la croissance des plantes des conditions bactérie et bactérie témoin.....	65
Figure N°8 : évolution de la croissance des plantes des conditions champignon+bactérie Et champignon+bactérie témoin.....	67
Figure N° 9 : évolution de la croissance des plantes de toutes les conditions sous stress.....	69
Figure N° 10 : évolution de la croissance des plantes de toutes les conditions sans stress.....	70
Figure N°11 : teneurs en eau des plantes des conditions sans stress.....	72
Figure N°12 : teneurs en eau des plantes des conditions sous stress.....	73
Figure N°13 : teneurs en sucres solubles des plantes des conditions sans stress.....	75
Figure N° 14 : teneurs en sucres solubles des plantes des conditions sous stress.....	76

Liste des planches

Planche N°1 : Etapes de la collecte des nodules	44
Planche N°2 : étapes d'imbibition des graines.....	47
Planche N°3 : Dispositif de nodulation.....	48
Planche N°4 : nodulation chez les trois souches bactériennes.....	57
Planche N°5 : caractères cultureux des trois souches bactériennes.....	58
Planche N° 6 : résultats de la coloration Gram (A-HC2, B-HC7, C-HC9).....	59

Liste des tableaux

Tableau N°1 : classification botanique de l'espèce <i>Hedysarum coronarium</i>	07
Tableau N°2 : taxonomie courante des rhizobia (2 Mai 2013).....	11 à 14
Tableau N°3 : classification des champignons.....	21
Tableau N°4 : représentation des différentes conditions réalisées.....	52
Tableau N°5 : influence des différentes conditions sur la teneur en eau.....	71
Tableau N°6 : influence des différentes conditions sur la teneur en sucre solubles.....	74



Introduction

INTRODUCTION

De nos jours on constate avec inquiétude une hausse des prix des matières premières agricoles dans un contexte de pénurie alimentaire ; et les causes de ces dernières sont multiples dont on peut citer : maladies des cultures, baisse de la biodiversité, réchauffement climatique, baisse des ressources en eau et dégradation de l'environnement par différentes pollutions notamment celles engendrées par l'apport d'engrais chimiques.

Dans les régions arides, le choix d'une méthode culturale visant à développer chez les plantes des mécanismes de résistance au stress hydrique revêt un intérêt économique important.

Les biotechnologies végétales ont déjà beaucoup apporté et elles apporteront très certainement un certain nombre de réponses aux problèmes actuels de l'agriculture, et ce en développant de nouvelles techniques telles que le mécanisme symbiotique entre légumineuse- et microorganismes.

Il est largement reconnu que c'est l'une des plus importantes contributions des microorganismes du sol au développement des plantes et la fourniture des éléments essentiels à la croissance de celles-ci .Parmi ces interactions, la symbiose mycorhizienne qui constitue le lien entre les plantes et les champignons et stimule l'absorption de l'eau et des éléments minéraux.

Ainsi que la symbiose bactérienne, qui est un processus de première importance pour la fixation biologique de l'azote atmosphérique par le *Rhizobium* dans les racines des légumineuses.

Les légumineuses constituent l'une des familles végétales les plus importantes. Elles contribuent pour une large part à la nourriture humaine et animale et à la lutte contre la dégradation des sols (ABDELLAOUI et KADI, 1997 ; MATHIEU, 1994).

La plante fourragère *Hedysarum coronarium* est un exemple de légumineuse qui illustre parfaitement l'interaction symbiotique avec les bactéries (rhizobia) et les champignons mychoriziens, et constitue donc un patrimoine d'un grand intérêt agronomique pouvant être exploité dans la revalorisation des régions dégradées.

L'amélioration des interactions symbiotiques et la sélection de couples performants (plante- microorganisme) permettent d'augmenter le rendement en biomasse des plantes, et

une meilleure fertilisation naturelle du sol qui peut remplacer les intrants chimiques. Elles confèrent également une forte aptitude à supporter des conditions écologiques stressantes.

Par inoculation artificielle, nous avons essayé de mieux préciser les interactions entre les microorganismes et les plantes, leur conséquence sur la croissance d' *Hedysarum coronarium* et leur contribution contre l'action néfaste des facteurs de l'environnement. Dans ce présent travail, nous avons abordé l'effet du stress hydrique sur la teneur des osmorégulateurs (sucres solubles).

Ce travail consiste d'abord en l'isolement et l'étude des bactéries nodulant la légumineuse *Hedysarum coronarium*, puis la préparation des inocula, fongique et bactérien.

Dans un deuxième temps, on a procédé au semis puis l'inoculation des plantes.

Enfin, nous avons étudié comparativement le comportement des plantes, du point de vue croissance, teneur en eau et teneur en sucres solubles, et ce dans les conditions optimales d'hydratation et lors de la mise en place d'un stress hydrique.

Notre étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche piloté par le laboratoire d'écologie microbienne, et qui concerne les interactions entre légumineuses et microorganismes, ayant pour finalité la remédiation des sols dégradés.



Synthèse bibliographique



Chapitre I

I.1. Généralités et historique sur les Légumineuses

Les graines des Légumineuses sont connues et utilisées depuis 8000 ans et furent parmi les premières cultures vivrières consommées par l'homme.

Le terme « légumineuse » est d'origine confuse. En latin « légumière » signifie gousse puis le sens du mot s'est élargi progressivement pour désigner tous les légumes, en anglais « vegetables » (GALLAIS et BANNEROT, 1992).

Les Légumineuses ou Fabaceae représentent une famille importante et variée des angiospermes. En effet il s'agit de la troisième plus grande famille chez les plantes supérieures (VERNIE, 2008).

Ce sont des plantes herbacées, arbustives, arborescentes ou plantes grimpantes à métabolisme azoté élevé (ZAHKAN, 2001). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (GUIGNARD, 1982).

Les Légumineuses sont adaptées à des conditions climatiques très variées en utilisant deux voies de nutrition azotée complémentaires : la fixation de l'azote avec les rhizobies et l'assimilation de l'azote minéral du sol par le système racinaire de la plante (DELPHINE, 2004).

I.2. Intérêts des Légumineuses

Les Légumineuses sont importantes du point de vue économique, agronomique et nutritionnel (OUELLET, 2001).

Elles constituent une part importante de l'alimentation mondiale, particulièrement dans les pays en développement où elles représentent la principale source de protéines pour l'homme (LAZRAN BEN FRIHA, 2008), elles contribuent également dans la nutrition des animaux par les fourrages qu'elles fournissent (OUELLET, 2001).

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée, d'où leur intérêt également dans le cadre d'une « agriculture durable » (JOURNET et *al.*, 2001).

Les Légumineuses ont aussi un intérêt scientifique, notamment les Légumineuses alimentaires qui tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (BAUDOIN, 2001).

Cette famille présente également un intérêt économique majeur. En effet, de nombreuses espèces de cette famille constituent une importante ressource de fourrage et de bois à usage domestique, elles sont aussi utilisées pour leurs fruits comestibles, leurs propriétés médicinales et leur production de gomme arabique (SEBBANE, 2001).

I.3. Caractéristiques botaniques et classification des Légumineuses

Les légumineuses représentent la famille la plus évoluée dans la classe des dicotylédones.

Elles ont subi une évolution selon des voies qui leur sont propres :

- Réduction du nombre des étamines.
- Et création d'une fleur à corolle zygomorphe (GUIGNARD, 1982).

Selon GUIGNARD (2001), la famille cosmopolite des Légumineuses, avec ses quelques 17000 espèces réparties en 750 genres, est subdivisée en trois sous familles :

- Les Cesalpinioideae.
- Les Mimosoideae.
- Les Papilionoideae.

I.4. Le genre *Hedysarum*

C'est un Genre réunissant environ 70 espèces, surtout herbacées de l'hémisphère nord. (BOSSARD et CUISANCE, 1986).

Le genre *Hedysarum* est bien distribué en Europe tempérée, en Afrique du nord, en Asie mineure, en Sibérie et en Amérique du nord, aussi bien que dans les régions arctiques. Neuf espèces existent en Algérie, trois d'entre elles sont endémiques (ISSOLAH et *al.*, 2006).

I.5. Présentation et description botanique de l'espèce *Hedysarum coronarium*

La plante *Hedysarum coronarium* L., appelée aussi sulla ou sainfoin d'Italie, est une plante herbacée, annuelle, droite ou rampante, peut atteindre 1,5 m (GHARZOULI, 2006) et constitue un patrimoine d'un grand intérêt agronomique qui peut être exploitée dans la valorisation des régions dégradées (GHARIANI, 2004).

C'est une espèce allogame (GRIMALDI, 1961), diploïde ($2n = 16$ chromosomes) (QUEZEL et SANTA, 1962 et FRAME, 2000) à pollinisation croisée de type entomophile et les principaux pollinisateurs sont les abeilles qui facilitent aussi l'autofécondation (FREE, 1993).

L'espèce *Hedysarum coronarium*, appréciée pour son fourrage et son effet réducteur de l'érosion hydrique des sols en pente (SLIM et BEN JEDDI in FITOURI et al., 2012), se localise dans les sols argileux-limoneux (TERRIL et al., 1992 ; BURKE et al., 2002) et peut se trouver à des altitudes variables de 1000 à 2000 mètres (LAPEYRONIE in AMIROUCHE et KHETTAL, 2012).

Elle occupe une large aire de répartition dans les régions méditerranéennes (SQUARTINI et al., 2002). En Algérie elle est très rencontrée dans le Tell Constantinois et très peu dans les autres régions (ISSOLAH et al., 2006) en raison de la forte dégradation voire même de la disparition des prairies naturelles (ABDELGUERFI, 1989).

La graine d'*Hedysarum coronarium* est réniforme ou discoïde avec un tégument lisse et luisant et uniformément coloré en jaune clair parfois noir ; il brunit en vieillissant (SEMADENI, 1976) (Photo N°1).

Au stade plantule, les cotylédons de sulla sont ovales, arrondis, presque sessiles de dimensions 10 x 7,8 mm et glabres. Les trois ou quatre premières feuilles sont longuement pétiolées, entières, orbiculaires ou elliptiques (BAATOUT et al., 1976).

Les feuilles caduques sont alternes disposées en 3 à 5 paires de feuillettes (BEN JEDDI, 2005) ovales ou arrondies et un feuillet terminal, ces feuilles se caractérisent par une surface lisse et une face inférieure poilue (FRAME, 2000).

Les tiges du sulla du nord sont robustes, dressées ou rampantes, de 10 à plus de 100 cm de long (BAATOUT *et al.*, 1976).

Les fleurs sont longues de 14 à 20 mm, regroupées en grappes allongées, denses et longuement pédonculées (QUEZEL et SANTA, 1962). La corolle est de 10 à 15 mm de long.

La floraison est répartie entre Mars et Juin selon l'étage bioclimatique (CLARDE, 1990).

Les gousses sont droites, larges de 4-5 mm, à articles couverts d'aiguillon (QUEZEL, 1962).



Photo N°1 : Plantule de sulla avec graines et gousses (BEN JEDDI, 2005).

I.6. Systématique de l'*Hedysarum coronarium*

Elle est classée selon QUEZEL et SANTA (1962); OZENDA (2006) ; GUIGNARD et DUPONT (2007) comme suit :

Tableau N° 1 : Classification botanique de l'espèce *Hedysarum coronarium*.

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphyta
Sous embranchement	Angiosperme = Magnoliophyta
Classe	Dicotylédone = Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Fabale
Super famille	Legumineusae
Famille	Papilionoideae
Genre	<i>Hedysarum</i>
Espèce	<i>Hedysarum coronarium</i>



Chapitre II

II.1. Généralités sur les rhizobiums

Si on déracine une légumineuse on observe des protubérances racinaires, appelées nodosités (MEYER et *al.*, 2008) qui n'apparaissent qu'après infestation par des bactéries. Ces bactéries ont été isolées pour la première fois par le Hollandais Beijerinck en 1888 : les rhizobiums (HELLER et *al.*, 1989) qui sont des bactéries collectivement connues rhizobia (JARABO-LORENZO, 2003) capables d'absorber le diazote et de le réduire en ammonium (MEYER et *al.*, 2008).

Depuis leur isolement des nodules des Légumineuses par Franc en 1889, les rhizobia révèlent une grande diversité tant taxinomique qu'écologique, en étroite relation avec la diversité des Légumineuses auxquelles ils sont associés (BENSAID, 2003).

➤ Diversité taxinomique des rhizobia

Dans la taxonomie bactérienne, l'identification d'une bactérie à une espèce donnée reste un des aspects les plus délicats mais aussi les plus importants. En effet si les animaux et les plantes sont riches en détails morphologiques qui constituent la base de leur classification, les bactéries de leur côté possèdent des caractéristiques morphologiques simples qui ne peuvent pas être utilisés pour les classer (WOESE, 1987).

Les rhizobia appartiennent au règne des procaryotes, à la division des *Gracillicutes*, de la classe des *alpha* ou *béta Proteobacteria*. Ils sont repartis dans 06 différentes familles (SAWADA et *al.*, 2003 ; GARRITY et *al.*, 2004).

Avec la recherche continuelle sur les ressources rhizobiales et l'application des techniques biologiques moléculaires modernes, six genres avec environ 30 espèces ont été décrits, comprenant *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*. Phylogénétiquement, ces bactéries appartiennent aux *α-Proteobacteria*. Les genres *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* sont phylogénétiquement divergents des autres rhizobia. Les genres restants, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium* sont étroitement liés et certains d'entre eux sont mélangés avec les bactéries pathogènes des plantes appartenant au genre *Agrobacterium*. Le besoin d'avantage de révision taxinomique du groupe de *Rhizobia-agrobacteria* est évident (TAN et *al.*, 1999 ; VAN BERKAN et TEREFWORK, 2003).

➤ Diversité écologique

Les rhizobia sont des bactéries telluriques qui vivent à l'état libre ou en symbiose avec les Légumineuses. Ce sont des organismes chimioorganotrophes exigeant des conditions d'aérobiose (BENSAID, 2003). Leur présence dans les sols pauvres et dégradés des climats arides et semi-arides témoigne de leur parfaite adaptation aux conditions défavorables de l'environnement. La caractéristique phénotypique et les techniques moléculaires (profil protéique, polysaccharide, plasmide, hybridation ADN/ADN, ARN16S) ont montré qu'une minorité de rhizobia présente une étroite spécificité vis-à-vis des Légumineuses. Cependant, la majorité présente une large gamme d'hôtes (ZAHARAN, 2001).

II.2. Caractéristiques des rhizobiums

Les rhizobiums ne présentent aucune caractéristique culturelle, morphologique, physiologique ou biochimique permettant de les distinguer des autres bactéries telluriques. Seule la capacité d'induire la formation de nodules racinaires chez la plante hôte, constitue le critère absolu pour leur reconnaissance ainsi que leur classification (ELKAN, 1992 ; PIETERNELL et VANDERLEYDEN, 1995).

➤ Caractères phénotypiques

En général, les rhizobia sont des bâtonnets gram négatif, mobiles, avec des dimensions approximatives de 0,5 à 0,8 μm de largeur et 1,3 à 3 μm de longueur (BLONDEAU, 1980 ; VANS *et al.*, 1988 ; VANCE 1991).

Parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des rhizobiums, figure la croissance dans le milieu YMA (VINCENT, 1970). Leur croissance est optimale à une température de 28 °C et un pH entre 6 et 7 (BURTON in FITOURI, 2011).

On distingue deux formes :

- **Forme végétative** : les rhizobiums sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches (WERNER, 1992) et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers (SOMASEGARAN et HOBEN, 1994).

- **La forme bactéroïde :** à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobiums se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (PERRY *et al.*, 2004).

L'infectivité d'un rhizobium s'exprime par sa spécificité à travers sa capacité de noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées.

➤ **Caractères biochimiques**

Les rhizobiums sont des bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leur croissance (SOMASEGARAN et HOBEN, 1994).

➤ **Caractères physiologiques**

Le rhizobium est un microorganisme aérobie ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm) (SOMASEGARAN et HOBEN, 1994).

➤ **Caractérisation moléculaire des rhizobiums**

Le génome des bactéries est constitué en plus de l'ADN chromosomique, d'ADN plasmidique qui peut constituer jusqu'à 50 % du génome entier. Les méthodes d'analyse impliquent par conséquent des gènes d'origine chromosomique et d'autres d'origine plasmidique comme les gènes symbiotiques dans le cas des rhizobiums (SQUARTINI *et al.*, 2002).

II.3. Classification des rhizobia

La taxonomie des rhizobiums est en changement permanent. Ceci est dû aux progrès technologiques dans chacun des trois critères utilisés en taxonomie : la morphologie, la physiologie et l'analyse des séquences.

Nous avons adopté la classification de WEIR (2013) qui comporte 98 espèces dans 13 genres.

Tableau N°2 : Taxonomie courante des rhizobia (2 Mai 2013)
(<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>)

Rhizobium

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Rhizobiaceae*

<i>Rhizobium alamii</i>	Berge et al. (2009)
<i>Rhizobium alkalisoli</i>	Lu et al. (2009b)
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	García-Fraile et al. (2007)
<i>Rhizobium daejeonense</i>	
<i>Rhizobium endophyticum</i>	López-López et al. (2011)
<i>Rhizobium etli</i>	
<i>Rhizobium galegae</i>	
<i>Rhizobium gallicum</i>	
<i>Rhizobium giardinii</i>	
<i>Rhizobium hainanense</i>	
<i>Rhizobium herbae</i>	Ren et al. (2011b)
<i>Rhizobium huautlense</i>	
<i>Rhizobium indigoferae</i>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Voir note A
<i>Rhizobium loessense</i>	Formerllement <i>Rhizobium huanglingense</i>
<i>Rhizobium lusitanum</i>	
<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin et al. (2009)
<i>Rhizobium miluonense</i>	Gu et al. (2008)
<i>Rhizobium mongolense</i>	
<i>Rhizobium multihospitium</i>	Han et al. (2008)
<i>Rhizobium oryzae</i>	Peng et al. (2008)
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Confirmée comme espèce Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium pisi</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou et al. (2009)
<i>Rhizobium sullae</i>	formellement <i>Rhizobium hedysari</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium tubonense</i>	Zhang et al. (2011)
<i>Rhizobium undicola</i>	formellement <i>Allorhizobium undicola</i>
<i>Rhizobium vignae</i>	Ren et al. (2011)
<i>Rhizobium yanglingense</i>	

A — *Rhizobium trifolii* est le nouveau synonyme de *Rhizobium leguminosarum* (Ramirez-Bahena et al. 2008).

Mesorhizobium

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Phyllobacteriaceae*

<i>Mesorhizobium albiziae</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium alhagi</i>	Chen et al. (2010)
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	
<i>Mesorhizobium australicum</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Chen et al. (2011)
<i>Mesorhizobium caraganae</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Formellement <i>Rhizobium ciceri</i>
<i>Mesorhizobium gobiense</i>	Han et al. (2008)
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	formellement <i>Rhizobium huakuii</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	formellement <i>Rhizobium loti</i>
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Formellement <i>Rhizobium mediterraneum</i>
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	Vidal et al. (2009)
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	
<i>Mesorhizobium robiniae</i>	Zhou et al. (2010)
<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	Lu et al. (2009)
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	
<i>Mesorhizobium tarimense</i>	Han et al. (2008b)
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	formellement <i>Rhizobium tianshanense</i>

Ensifer (formellement *Sinorhizobium*)

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Rhizobiaceae*

Ensifer abri

Sinorhizobium americanum

Ensifer arboris

Ensifer fredii formellement *Rhizobium fredii*, ancien type de *Sinorhizobium*

Ensifer garamanticus Merabet et al. (2010)

Ensifer indiaense

Ensifer kostiensis

Ensifer kummerowiae

Ensifer medicae

Ensifer meliloti formellement *Rhizobium meliloti*

Ensifer mexicanus Lloret et al. (2007)

'*Sinorhizobium morelense*'

Ensifer adhaerens

Ensifer numidicus Merabet et al. (2010)

Ensifer saheli **B**

Ensifer sojae Li et al.

Ensifer teranga

C

B— cette espèce est également connue sous le nom : *Sinorhizobium sahelense*.

C — incorrectement connue : *Sinorhizobium teranga*.

Bradyrhizobium

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Bradyrhizobiaceae*

*Burkholderia caribensis**Burkholderia cepacia**Burkholderia mimosarum**Burkholderia nodosa*

Chen et al., (2007)

*Burkholderia phymatum**Burkholderia sabiae*

Chen et al., (2008)

*Burkholderia tuberum**Phyllobacterium*

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Phyllobacteriaceae*

*Phyllobacterium trifolii**Phyllobacterium ifriqiyense*Mantelin et al. (2006) **D***Phyllobacterium leguminum*Mantelin et al. (2006) **D**

D: isolée des nodules, mais ne provient pas à noduler.

Microvirga

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Methylobacteriaceae*

Microvirga lupini

Nouvelle: Ardley et al.

Microvirga lotononidis

Nouvelle: Ardley et al.

Microvirga zambiensis

Nouvelle: Ardley et al.

Azorhizobium

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Hyphomicrobiaceae*

*Azorhizobium caulinodans**Azorhizobium doebereineriae*formerllement *Azorhizobium johannae*

Ochrobactrum

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Brucellaceae*

Ochrobactrum cytisi

Zurdo-Piñeiro et al. 2007

Ochrobactrum lupini

Methylobacterium

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Methylobacteriaceae*

Methylobacterium nodulans

Cupriavidus

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Hyphomicrobiaceae*

Cupriavidus taiwanensis

Shinella

Classe: *Alphaproteobacteria* ordre: *Rhizobiales* famille: *Rhizobiaceae*

Shinella kummerowiae

Lin et al., (2008)

II.4. Effets des facteurs abiotiques sur la croissance des rhizobiums

Les souches rhizobiennes sont très sensibles aux facteurs pédoclimatiques du sol (ABOLHASANI et al., 2010). Les contraintes environnementales les plus importantes sont : la salinité, les PH extrêmes, le taux de nitrate dans le sol et l'humidité insuffisante ou excessive du sol (EL-HILALI, 2006). Chacun de ces facteurs affecte la capacité des rhizobiums à la fixation de N₂ et la diminution de la productivité des Légumineuses (ABOLHASANI et al., 2010).

➤ **Effets du pH**

L'acidité affecte la croissance et la survie des rhizobia à l'état libre dans le sol. De même, leur multiplication dans la rhizosphère, l'infection de la racine, la formation des nodules ainsi que la croissance de la plante sont très touchées par l'acidité par les facteurs qui lui sont associés (ZERHARI, 2000).

➤ **Effets de la température**

Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries, par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation, parfois irréversible des enzymes (CLOUTIER et *al.*, 1992).

KULKARNI et NAUTIYAL (1999) ont rapporté que la température optimale pour la pluparts des rhizobiums est entre 25 et 30°C.

➤ **Effets du stress hydrique**

La sécheresse influence le mouvement des bactéries mobiles comme les rhizobiums et la distribution de la microflore du sol, ce facteur affecte également la diversité des populations rhizobiales (HUSSAIN et *al.*, 2010).

La modification des cellules rhizobiennes par le stress hydrique mène à une réduction dans l'infection et la nodulation (ZAHRAN, 1999).

➤ **Effets de la salinité**

Concernant le type de sel, il a été rapporté que les chlorures sont plus toxiques que les sulfates (EL-HILALI, 2006).

La plupart des rhizobiums sont inhibés par des concentrations de 100 mM en NaCl, mais il existe des souches dont la croissance est inhibée par 300 mM en NaCl et d'autres qui supportent 500mM en NaCl (JENKINS, 2003).

II.5. Le microsymbiote de *Sulla*

Le premier isolement des bactéries à partir des nodules de *Sulla* remonte au 19^{ème} siècle. Ces rhizobiums ont été étudiés et décrits dans plusieurs travaux de recherche et il a été recommandé de les nommer provisoirement *Rhizobium hedysari* (CASELLA et al., 1984; SELENSKA-POBELL et al., 1996; TOFFANIN et al., 1996). Avec le développement des techniques moléculaires, il y a eu une meilleure caractérisation des bactéries nodulant les Légumineuses, en particulier la ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) de l'ADNr 16S et la comparaison des séquences de ADNr 16S; les bactéries nodulant le *Sulla* ont par conséquent été baptisés *Rhizobium sullea* (SQUARTINI et al., 2002).

La souche a été caractérisée comme bactérie à croissance rapide et hautement spécifique pour l'espèce *Hedysarum coronarium* (CASELLA et al., 1984 ; STRUFFI et al., 1998).

Plusieurs travaux ont été consacrés pour vérifier cette spécificité. Il a été observé que le microsymbiote de la plante *Sulla* peut noduler la plante *Hedysarum fluxuosum* mais il est incapable de fixer l'azote atmosphérique. Alors que la bactérie isolée des nodules de *Hedysarum fluxuosum* ne peut pas noduler *Hedysarum coronarium*. Ils ont trouvé que le *Rhizobium sullea* nodule la quasi-totalité des autres espèces du genre *Hedysarum*, mais l'activité azofixatrice est absente. D'autre part, le symbiote de *Onobrichys viciifolia* est incapable de noduler la plante *Sulla*, ce qui confirme la grande spécificité qui existe entre les deux partenaires symbiotiques (STRUFFI et al., 1998 et BENGUEDOUAR, 2000).



Chapitre III

III.1. Généralités sur les champignons

Les champignons ont presque toujours intrigué les hommes, mais c'est en 1795 qu'un botaniste nommé JEAN JACQUES PAULET (1740-1826) définit la science des champignons comme étant la mycologie.

Selon OZENDA (2000), les champignons représentent le 5^{ème} règne, à l'égal des procaryotes, des protistes, des végétaux et des animaux et dérivent d'être autotrophes par perte de chlorophylle ou bien de protiste.

Environ 40000 espèces de champignons ont été décrites jusqu'à maintenant et l'on peut supposer que ce nombre ne représente pas la moitié de toutes les espèces existantes.

En règle générale, l'appareil végétatif des champignons correspond à un thalle filamenteux et ramifié. Le filament d'un thalle est appelé hyphe. Les hyphes forment un réseau souvent très étendu qui traverse le substrat, le mycélium. Les hyphes peuvent être organisés en siphon (caractère primaire) ou segmentés par des parois cellulaires (caractère évolué). La plupart des champignons ont une paroi cellulaire constituée de chitine, substance qui n'existe autrement que dans le règne animal (exosquelette des insectes). Quelques champignons seulement possèdent une paroi cellulaire cellulosique (LUTTGE et *al.*, 2002).

La croissance du mycélium fongique est une croissance terminale, et l'extension plus ou moins rapide dépend de la vitesse d'apparition des ramifications à quelques microns de l'apex (GUIRAUD et GALZY, 1980).

D'après GALZY (1978), on rencontre chez certains champignons des formations particulières telles que :

- Les rhizoïdes : organes de fixation.
- Les stolons : relie la base des sporangiophores.
- Les sclérotés : forme de conservation.

III.2. Mode de vie des champignons

Selon ROBERT et CATESSON (2000), les champignons sont dépourvus de plastes et incapables de réaliser la photosynthèse, ce sont donc des hétérotrophes, c'est-à-dire ils dépendent d'autres êtres vivants pour la satisfaction de leurs besoins nutritifs.

Suivant leur mode de vie on peut les classer en saprophytes, parasites ou symbiotiques (STRULLU, 1991).

a- Les saprophytes

Les champignons saprophytes exploitent des substances organiques mortes dont ils provoquent la décomposition : des débris végétaux (feuilles, fruits, bois, herbes sèches) et des débris animaux (DURRIEU, 1993).

Selon MAROUF et REYNAUD (2007) les espèces saprophytes jouent un rôle essentiel au sein des cycles biologiques en « minéralisant les matières végétales ou animales mortes ».

On rencontre les champignons saprophytes dans tous les milieux terrestres, les eaux douces et les eaux marines (ROBERT et CATESSON, 2000).

b- Les parasites

D'après ROBERT et CATESSON (2000), ROLAND et *al.* (2008) et HALARY (2009) le parasitisme se définit comme une interaction dans laquelle l'un des partenaires se développe au détriment de l'autre. Les parasites prélèvent les molécules organiques dont ils ont besoins sur des organismes vivants, animaux ou végétaux.

Les champignons parasites, selon OZENDA (2000), sont des agents de mycose des animaux et des maladies cryptogamiques des plantes. Ils sont préjudiciables à l'agriculture.

c- Les symbiotes

Selon (DURRIEU, 1993) La symbiose est une association à bénéfices réciproques entre deux organismes.

Les champignons forment deux types de symbioses :

➤ **Les lichens**

Selon FORTIN et *al.* (2008) les lichens constituent des organismes complexes, résultant de l'association de deux types d'organismes, une algue microscopique et un champignon filamenteux. L'algue qui est photosynthétique, est capable de produire de la matière organique utilisée comme source nutritionnelle par le champignon (MADINGO et MARTINO, 2007). L'ensemble a une morphologie et une structure caractéristiques, permettant de définir des genres et des espèces (GENEVES, 1990).

D'après SELOSSE (2009) plus de 20% des champignons connus forment des lichens.

➤ **Les mycorhizes**

On appelle mycorhize une symbiose entre des champignons et des racines de plantes terrestres (LUTTGE et *al.*, 2002).

III.3. Mode de reproduction des champignons

Les champignons se multiplient aussi bien par voie sexuée que par voie végétative (LUTTGE et *al.*, 2002).

a-Reproduction sexuée

C'est une reproduction qui permet la recombinaison des caractères héréditaires (J-P. LARPENT et M. LARPENT, 1985). Les organes de reproduction sexuée sont les gamétocystes à l'intérieur desquels se différencient les gamètes (AMIROUCHE et *al.*, 2009).

Selon LUTTGE et *al.* (2002) la reproduction sexuée chez les champignons est très diversifiée.

b-Reproduction asexuée

Les spores représentent le mode de reproduction asexuée le plus commun chez les champignons. Elles sont produites soit dans les sporocystes, soit à partir de cellules d'hyphe appelées cellule conidiogènes (RAVEN *et al.*, 2000). Elle permet de conserver des génomes particulièrement bien adaptés (J-P LARPENT *et M.LARPENT*, 1985).

Les spores résultent d'une simple mitose. Elles assurent la survie de la souche en conservant intégralement ses caractères et permet la propagation d'une lignée pure et stable (SMITH *in* LEVEAU *et* BOUIX, 1993).

Certains champignons peuvent aussi se reproduire asexuellement par conidies, qui sont produites par bourgeonnement à l'extrémité des conidiophores (PEBERDY *in* LEVEAU *et* BOUIX, 1993).

III.4 .Classification des champignons

Selon CHADEFAUD (1978) la répartition des champignons en différentes classes est basée essentiellement sur les critères suivants :

- Type de thalle.
- La nature des spores et des gamètes (présence ou absence des zoïdes).
- La nature biochimique des parois cellulaires.
- Le type de gamie et le cycle de développement.
- Le mode de vie.

Nous avons adopté la classification résumée par DAVET *in* BENACEUR (2002) dans le tableau suivant :

Tableau N°3 : Classification des champignons.

		Classe	Forme sexuée	Zoospore	Cloison	Paroi
EUMYCETES	Mastigomycètes	Myxomycètes	Variable	Variable	Non	Non
		Oomycètes	Oospore	Oui (2 flagelles)	Non	Oui
		Chytridiomycètes	Zygote	Oui (1 flagelle)	Non	Oui
	Amastigomycètes	Zygomycètes	Zygote	Non	Non	Oui
		Ascomycètes	Asque	Non	Oui	Oui
		Basidiomycètes	Baside	Non	Oui	Oui
		Deutéromycètes	Non	Non	Oui	Oui

III.5. Exigences nutritives des champignons

Les champignons sont des microorganismes hétérotrophes, ils ont besoins de différentes sources de nutriments pour leurs survies (DAVET ,2006).

III.5.1. Sources de carbone

D'après TRAQUAIR (2003) les mycètes utilisent des matériels organiques comme sources de carbone et d'énergie.

Presque tous les champignons peuvent utiliser le glucose, le mannose, le saccharose et l'amidon comme source de carbone (BOTTON *et al.*, 1990).

III.5.2. Source d'azote

Selon MEYER *et al.* (1999) les champignons utilisent une source d'azote organique pour synthétiser leurs protéines qui représentent environ 10% de leur poids sec, mais chez certains champignons, L'azote peut être fourni sous forme minérale.

III.5.3. Les éléments minéraux

Les oligo-éléments tels que K, Fe, Cu, Mg, Zn, Mo et Ca sont essentiels pour la croissance des champignons.

Plusieurs champignons exigent des vitamines, en particulier la thiamine et la biotine (BOTTON *et al.*, 1990).

III.6. Conditions de croissance des champignons

➤ La température

BOURGEOIS *et al.* (1996) estiment que la température optimale pour la croissance des champignons est comprise entre 20 et 25°C.

➤ La lumière

Elle n'est pas indispensable à la croissance des champignons, néanmoins, pour développer des carpophores, c'est-à-dire pour fructifier, un peu de lumière est indispensable et quelques minutes suffisent.

Les mycètes utilisent la partie supérieure du spectre visible (bleue) (JOMPHE, 2001).

➤ **L'humidité (eau)**

L'humidité a une grande influence sur la croissance mycélienne, la sporulation et plus particulièrement sur la germination des spores (PELHATE in AISSAT, 1988).

JOMPHE (2001) estime que le taux optimal de l'humidité se situe entre 35 et 50%.

➤ **Le sol**

Les champignons ont parfois des préférences pour tel ou tel type de terrain. Certaines espèces dites calcicoles affectionnent les sols calcaires, d'autres ne poussent que sur des sols acides, ce sont donc des acidophiles. Tandis que la plupart ont des exigences moins strictes (SUGNY in BENACEUR, 2002).

➤ **L'aération**

Les champignons sont des organismes aérobies donc l'oxygène est indispensable à leur développement, ils sont cependant assez peu exigeants. Certains peuvent exploiter l'oxygène dissout dans le substrat (JOMPHE, 2001).



Chapitre IV

IV.1. Définition de la symbiose

« La symbiose est une association étroite qui profite, au moins temporairement, aux deux partenaires de façon équivalente » (LUTTGE et *al.*, 2002).

Chaque partenaire de la symbiose (symbiote) tente de tirer profit de l'autre au maximum pour sa propre survie, en ce qui concerne les substances nutritives (nutriments) ainsi que les métabolites ou l'eau.

Le monde végétal présente différents types de symbioses, tels que :

- Les lichens formés par l'association de type mutualiste de champignons et d'algues.
- La symbiose fixatrice d'azote formée par les légumineuses et les bactéries.
- La symbiose mycorhizienne formée par la plupart des plantes avec des champignons du sol (SMITH et READ in BENALI, 2002).

Dans notre étude on s'intéresse aux deux derniers types de symbiose : fixatrice d'azote et mycorhizienne.

IV.2. La symbiose bactérienne

L'azote est l'un des éléments majeurs de la vie. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. C'est le constituant principal de l'atmosphère terrestre sous forme d'azote gazeux (N_2), mais les plantes n'ont pas la capacité de l'assimiler directement (<http://www.fondation-nicolas-hulot.org/page.php?id=1>).

Si les plantes ne peuvent pas fixer directement l'azote de l'air, quelques espèces peuvent être colonisées au niveau de leurs racines par les bactéries fixatrices d'azote moléculaire. Ces bactéries transforment l'azote gazeux (N_2) en ammonium (NH_3), utilisé pour les besoins azotés des plantes. La plante profite du travail réalisé par les bactéries, ces dernières trouvent protection et compensation du côté de la plante qui leur fournit des sources de carbone. Un tel échange de bons procédés s'appelle symbiose (MOROT-GUADRY, 1997 ; SPICHIGER et *al.*, 2002).

Il ya peu de plantes qui ont la capacité d'interaction symbiotique avec les bactéries fixatrices d'azote du genre *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*, cette interaction est presque complètement limitée aux légumineuses (ALBRECHT et *al.*, 1999).

La symbiose légumineuse-*Rhizobium*, décrite pour la première fois par Frank (1889), constitue une association extrêmement importante du point de vue écologique et agronomique.

IV.2.1. L'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuses

L'établissement de la symbiose implique des interactions complexes et très spécifiques entre bactérie et végétal-hôte (MEYER et *al.*, 2008) qu'on peut résumer comme suit :

- Dans la rhizosphère des légumineuses comme d'ailleurs dans celle des autres plantes, les rhizobia se multiplient aux dépend des exsudats et divers dépôts racinaires (Rhizo-déposition).
- L'infection et la formation de nodule chez les légumineuses sont contrôlées par un dialogue moléculaire entre la bactérie symbiotique et la plante hôte (DOMMERGUE et *al.*, 1998) (figure N°1).
- Selon ROGER et *al.* (1996), l'interaction commence avec la colonisation de jeunes poils absorbants par les rhizobia et un échange de molécules signal (Figure N°2).
- Les bactéries reconnaissent des flavonoïdes et d'autres molécules qui sont sécrétées par la plante hôte.
- Ces molécules attirent les rhizobia par le chimiotactisme et induisent la production de facteurs Nod par les rhizobia qui déclenchent le programme de nodogénèse chez la plante hôte.
- Suite à l'action des facteurs Nod, les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse, qui enferme les rhizobia.
- A partir de cette niche, les rhizobia pénètrent dans la cellule végétale, provoquant la formation d'un cordon d'infection contenant les bactéries disposées en file.

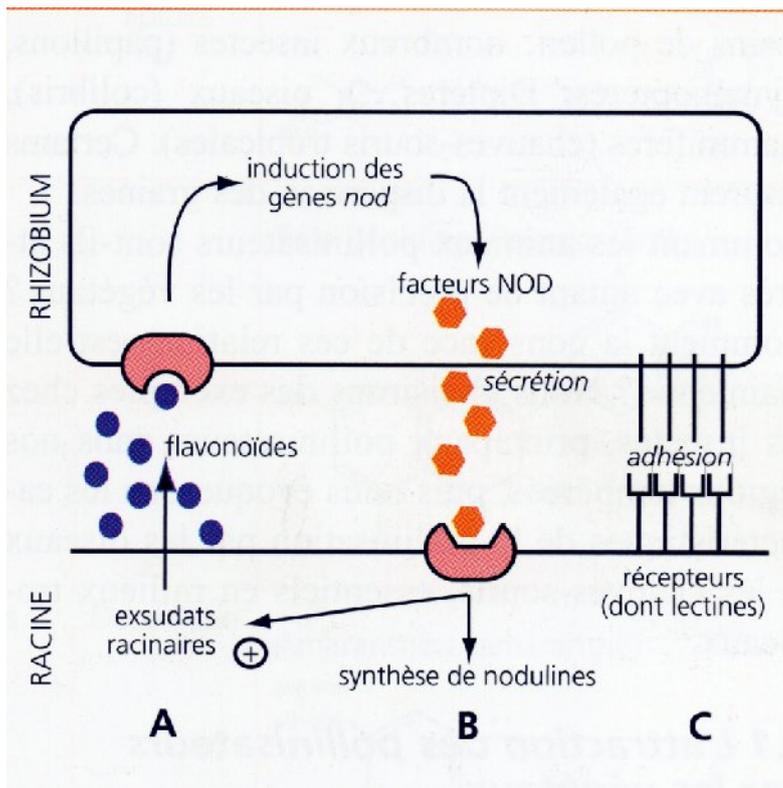


Figure N° 1: Dialogue moléculaire (échanges de signaux chimiques) entre *Rhizobium* et racine de légumineuse (d'après SELOSSE in MEYER et *al.* 2008).

- Ce cordon d'infection traverse d'abord le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales guidant ainsi les bactéries vers les couches cellulaires intérieures.
- Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire.
- Quand les cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules arrêtent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréduplication.

- Les bactéries prolifèrent à l'intérieur du cordon et vont se libérer dans le cytoplasme des cellules corticales via ce cordon, provoquant ainsi l'apparition du méristème, qui est une zone de multiplication cellulaire dont l'activité est à l'origine de la formation du nodule, dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en bactéroïdes (LINDSTROM et *al.*, 2002) aptes à fixer l'azote (N_2) grâce à la nitrogénase, une enzyme codée par le gène bactérien *nif*.
- L'infection se poursuit pendant la vie de la nodosité: Une connexion vasculaire s'établit entre la nodosité et la vascularisation de la racine. Elle permet l'importation des sucres issus de la photosynthèse dans la nodosité et l'exportation de l'azote fixé depuis la nodosité vers le reste du végétal (MEYER et *al.*, 2008).
- Le diazote diffuse à partir des méats dans les bactéroïdes et il est directement réduit en ammonium (NH_4^+) au cours d'une réaction catalysée par la nitrogénase bactérienne. L'ammonium est utilisé par le végétal pour la synthèse d'acides aminés.

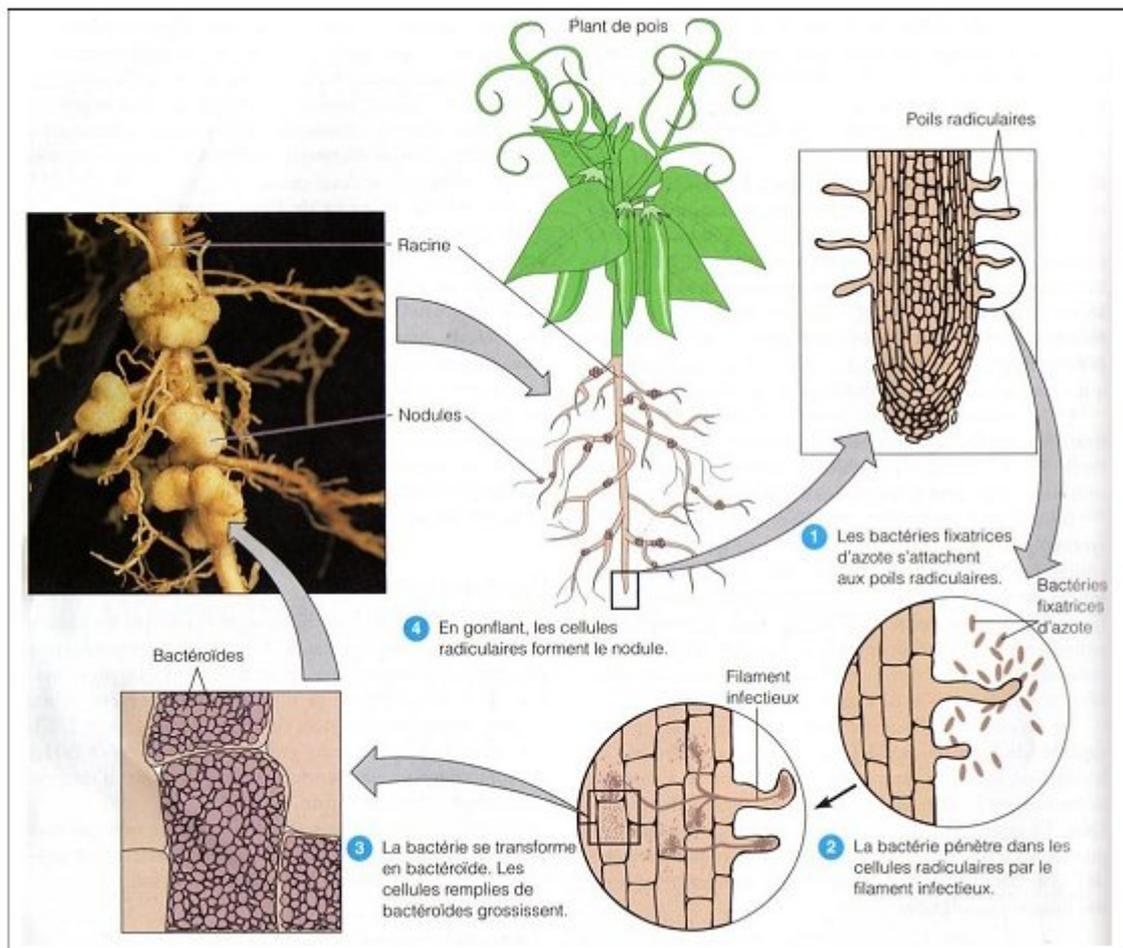


Figure N°2: Formation d'un nodule (TORTORA et *al.*, 2003) .

IV.2.2. Facteurs influençant la symbiose bactérienne

Plusieurs facteurs tels que la composition physico-chimique du sol peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice de l'azote après symbiose (TAQ et *al.*, 2004; COLLAVINO et *al.*, 2005; KINKEMA et *al.*, 2006).

A. Facteurs abiotiques

➤ **Le pH du sol**

L'acidité élevée du sol influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobiums et engendre par conséquent une diminution de la nodulation (MUNNS, 1977). Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (BORDELEAU et PREVOST, 1994).

➤ **Le stress salin**

La salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la FSN (Fixation Symbiotique de l'Azote) est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (RAO *et al.*, 2002).

➤ **Le stress hydrique**

La sécheresse inhibe la nodulation et la fixation azotée même chez les plantes inoculées (ZABLOTOWIXZ *et al.*, 1981). En effet, il existe des taux d'humidité extrêmes tolérés au delà desquels le développement et la survie du rhizobium sont affectés (VINCENT, 1982).

B. Effets dus aux techniques culturales

Dans le cas des grandes cultures, l'usage des produits phytosanitaires de synthèse, les labours profonds et répétés et la fertilisation chimique, apparaissent comme des facteurs majeurs du déclin de la richesse spécifique et de l'abondance de nombreux organismes (AUBERTOT *et al.*, 2005; TSCHARNTKE *et al.*, 2007).

IV.3. La symbiose mycorhizienne

IV.3.1. Définition

On appelle mycorhize une symbiose entre des champignons et des racines de plantes terrestres.

Les mycorhizes sont connues chez 83% des dicotylédones, 79% des monocotylédones et l'ensemble des gymnospermes, soit environ 90 % des trachéophytes (MEYER *et al.*, 2008).

IV.3.2. Types de mycorhizes

(PEYRONNEL *et al.*, in STRULLU, 1991) ont classé les mycorhizes en trois groupes principaux (figure N°3) :

a- Les ectomycorhizes

Sont une association fréquente entre les arbres des régions tempérées (Fagacées, Bétulacées, Pinacées) et les Basidiomycètes (Bolets, Amanites) ou les Ascomycètes (MEYER *et al.*, 2008).

Du point de vue anatomique le champignon entoure complètement la racine et constitue le manteau fongique (MARTIN et PLASSARD, 1997).

b- Les endomycorhizes

Les hyphes du champignon pénètrent dans la paroi des cellules de l'écorce de telle sorte que leur paroi entre en contact avec la membrane plasmique de la cellule racinaire, sans la traverser (MEYER *et al.*, 2008).

Suivant les caractères des champignons, les endomycorhizes se subdivisent en plusieurs groupes :

- Les mycorhizes à vésicules et arbuscules, formées par les Zygomycètes.
- Les mycorhizes à pelotons d'hyphes cloisonnés, formées par les Ascomycètes ou Basidiomycètes (MARTIN et PLASSARD, 1997).

c- Les ectendomycorhizes

Ce sont des formes intermédiaires, qui possèdent à la fois des caractères d'ectomycorhizes et d'endomycorhizes (NULTSCH, 1998).

Dans ce cas intermédiaire, connu chez les Ericacées, le champignon forme des pelotons intracellulaires en plus d'un manteau autour de la racine (MEYER *et al.*, 2008).

Les trois types de mycorhize sont résumés dans la figure suivante :

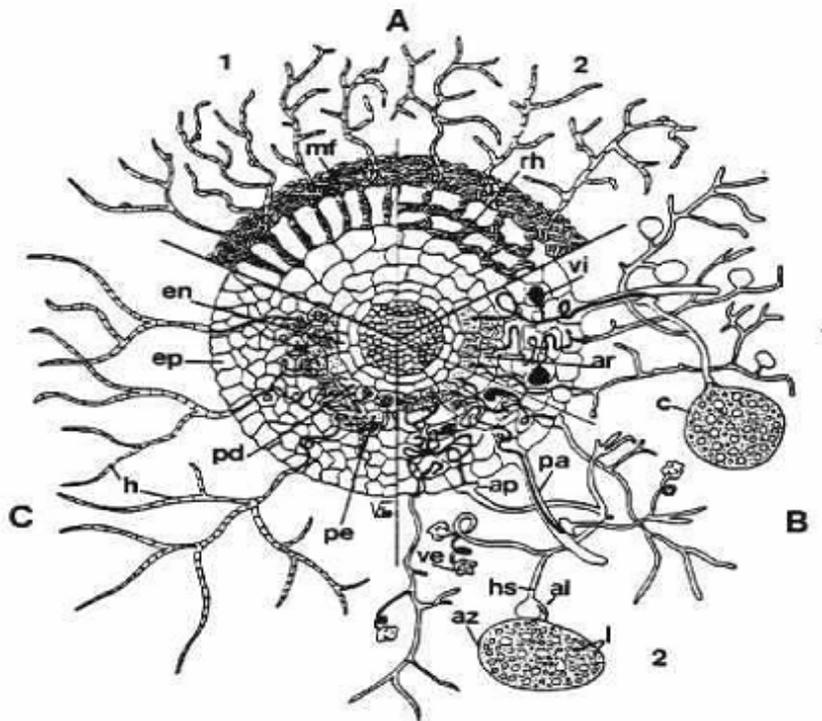


Illustration schématique des 3 principaux types de mycorhizes

- A : ectomycorhizes; typiques des Bétulacées (1) et des Pinacées (2)
- B : endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA); formes chlamydosporique (1) et azygosporique (2)
- C : endomycorhizes des Orchidées

Figure N°3: Illustration schématique des trois principaux types de mycorhizes, d'après FURLAN (1981).

IV.3.3. Rôle des mycorhizes

➤ L'alimentation en eau

La présence de symbiose mycorhizienne augmente la résistance de la plante au déficit hydrique, ainsi elle acquiert une protection notamment contre la sécheresse, le froid, la salinité élevée et la pollution (ANTOLLIN *et al.*, 1998).

L'effet bénéfique de la mycorhization dans l'alimentation hydrique de la plante hôte est en partie liée au vaste réseau d'hyphes qui prospectent le sol.

Cette meilleure alimentation est nécessaire pour une bonne circulation des éléments minéraux (STRULLU, 1991).

➤ La nutrition minérale et la croissance des plantes hôtes

Selon DURRIEU (1993), la fonction des mycorhizes est essentiellement trophique, complétée par une action de protection vis-à-vis des micro-organismes du sol. Les mycorhizes jouent un rôle dans la nutrition surtout dans les sols où les ressources en matières minérales sont réduites ou bloquées.

Le phosphore, le potassium, l'azote et les oligo-éléments (cuivre, zinc, soufre) sont bien assimilés par les complexes mycorhiziens (ABOUBACRY, 1997).

➤ Protection phytosanitaire

Selon STENSTROM *et al.* (1997) ; HIRSH et KAPULNIK (1998) :

- ✓ les associations mycorhiziennes augmentent la résistance des plantes aux stress environnementaux et aux agents pathogènes.
- ✓ Les champignons mycorhiziens peuvent produire des substances antibiotiques qui pourraient avoir un effet contre les pathogènes.
- ✓ Le manteau des ectomycorhizes agit comme une barrière mécanique contre les pathogènes qui tenteraient de pénétrer dans la racine.
- ✓ Après la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens, l'hôte peut produire des inhibiteurs contre les pathogènes.

➤ **Production d'hormones**

La modification mycorhizienne joue un rôle dans la synthèse de composés complexes tels que : les vitamines, les phytohormones comme les auxines, les cytokinines, et les gibbérellines qui agissent sur la différenciation cellulaire (STRULLU, 1991).



Chapitre V

V.1. Notion de stress

La production agricole dans le monde est fortement limitée par des stress abiotiques tels que la température, la salinité et la toxicité aluminique (RUIVENKAMP *et al.*, 1994).

C'est un médecin d'origine Hongroise, Hans Selye (1907-1982), qui découvrit le phénomène physiologique et lui attribua le nom de « stress ». Sa première publication scientifique sur le sujet date de 1936. « Le stress, syndrome générale d'adaptation, désignait à l'origine la réponse de défense, se déroulant à l'intérieur de l'organisme ».

Plusieurs phénomènes peuvent provoquer le stress : température élevée, déficit hydrique, baisse d'humidité de l'air, forte insolation et salinité (ENCARTA, 2006).

Trois types de stress sont remarquables dans le monde végétal : thermique, hydrique et salin.

V.2. Stress salin

Résulte de l'accumulation de sel dans le sol ou dans l'eau d'irrigation, et constitue une préoccupation environnementale majeure et un problème sérieux pour l'agriculture dans les régions arides et semi arides (MAINASSARA *et al.*, 2009).

Lors d'un stress salin, l'organisme végétal rencontre deux obstacles : d'un côté la présence de sel fait abaisser le potentiel hydrique du sol, ce qui menace l'approvisionnement de la plante en eau, de l'autre côté l'absorption de sel par les tissus menace le bon fonctionnement physiologique des cellules.

L'excès de sel conduit évidemment à des perturbations des enzymes, des membranes et d'autres macromolécules (CALU, 2006)

Selon le degré de salinité dans le milieu, les plantes sont exposées à des modifications de leur comportement morpho-physiologique, biochimique et minéral. Donc ces plantes réagissent parallèlement aux variations de la salinité dans le biotope, en déclenchant des mécanismes de résistance. Parmi ces mécanismes l'ajustement osmotique qui joue un rôle primordial dans la résistance ou la tolérance de la plante au stress salin (HASSANI *et al.*, 2008).

V.3. Stress thermique

Le stress thermique peut être provoqué soit par une activité physique intense soit par de nombreux facteurs environnementaux, et notamment la température, l'oxygène, la pression, le soleil etc.

L'exposition de tout organisme à des températures élevées induit l'expression cellulaire rapide et transitoire de protéines spécifiques, les protéines de choc thermique HSPs, qui représente un mécanisme d'adaptation et de réparation (LIAUTARD in BOUDJELLIL et BENZAOUZ, 2009).

V.4. Stress hydrique

V.4.1. Importance de l'eau pour la plante

La plante puise l'eau du sol par ses racines et la transporte dans chacun de ses organes, en même temps que les éléments nécessaires à sa croissance (BELKACEMI, 2003).

L'eau est nécessaire à la plante car elle participe au maintien des structures et permet le déroulement du métabolisme. Elle contribue au port des végétaux qui, sans elle, flétrissent. Elle commande divers mouvements d'organes (feuilles) et de cellules (stomates) comme elle participe à l'allongement cellulaire (HELLER et *al.*, 1989).

L'eau est aussi le milieu qui permet aux éléments nutritifs de circuler entre les différentes parties de la plante (GAUSSEN, 1995).

V.4.2. Définition du stress hydrique

En biologie un stress hydrique est un type d'agression des organismes dû à un déficit d'apport en eau (WIKIPEDIA).

Certains auteurs tels que KRAMER (1969), s'accordent pour dire que le terme de stress hydrique se rapporte aux conditions physiologiques de l'eau dans la plante. Lorsque ces conditions sont au dessous de l'optimum, la plante est dite stressée.

Selon cet auteur, le déficit hydrique des plantes est le résultat de combinaison complexe entre les facteurs du sol, de la plante et de l'atmosphère contrôlant le taux d'absorption de l'eau et les pertes d'eau par transpiration.

Le stress peut concerner aussi bien le manque que l'excès d'eau (LEPOIVRE, 2003).

Le stress provoqué par un déficit hydrique est plus fréquent, de sorte que l'expression de « stress de déficit hydrique » est abrégée en « stress hydrique » (HOPKINS, 2003).

V.4.3. Effets du déficit hydrique sur la plante

Selon sa durée ainsi que son intensité, le stress provoque des modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques (KRAMER ; SALL et *al.* in BENHAMICHE, 1999).

a- Modifications anatomiques et morphologiques

En réponse à un déficit hydrique, la plante réagit en orientant sa croissance vers : la réduction du volume et de la surface foliaire afin de limiter la transpiration ; d'autre part, vers un développement du système racinaire pour une utilisation plus efficace des réserves hydriques du sol.

De plus, un stress hydrique, au cours de la période reproductrice, entraîne une réduction de la masse de la matière sèche (LUTTGE et *al.*, 2002).

b- Modifications physiologiques

Parmi les modifications physiologiques liées au stress hydrique :

➤ Diminution de la pression de la turgescence

La caractéristique biophysique qui répond le plus rapidement à un déficit en eau est la turgescence des cellules qui se déroule bien avant que le flétrissement soit perceptible (GIRARDIN in PINDARD, 2000).

Elle a des conséquences sur le développement foliaire, la captation du rayonnement, la photosynthèse globale et finalement la production (ROBELIN in PINDARD, 2000).

➤ **Photosynthèse et transpiration**

Ce sont les stomates qui régulent les échanges gazeux et de vapeur d'eau avec l'atmosphère. Le stress hydrique provoque leur fermeture qui se traduit par un ralentissement de la photosynthèse, en même temps que la transpiration (PINDARD, 2000).

V.4.4. Effet de déficit hydrique au niveau cellulaire

Différentes études montrent que lors d'un stress hydrique il se produit une accumulation des sucres solubles, entraînée le plus souvent par hydrolyse d'amidon. Elles montrent aussi une augmentation de la teneur en proline des tissus végétaux notamment au niveau des vacuoles. Le stress se manifeste également par des différences qualitatives et quantitatives des protéines cellulaires. D'une manière générale, la synthèse protéique se réduit dans les tissus. Aussi s'établit une accumulation d'ARNm particuliers (LE DOIGT in BAKOURI et KHERFALLAH, 2007).

V.4.5. Effet du déficit hydrique sur le système racinaire

Les racines sont par ailleurs, d'avantage affectées que les autres organes de la plante, par un déficit hydrique.

Ce dernier provoque la formation d'un système racinaire développé et profond, (racines nombreuses et divisées) (CRUTZIAT in BENHAMICHE, 1999).

V.4.6. Adaptation des plantes au stress hydrique

V.4.6.1. Définition

La stratégie d'adaptation ou la tolérance à la sécheresse se traduit par la capacité de la plante à survivre et à donner des rendements satisfaisants dans les zones sujettes à des déficits hydriques périodiques (REKIKI, 1997 ; BENHAMICHE, 1999).

La tolérance permet donc à la plante d'assurer normalement ses fonctions physiologiques malgré la dégradation de l'état hydrique externe (sol) et interne (plante) consécutive à la sécheresse (BENHAMICHE, 1999).

V.4.6.2. Mécanismes d'adaptation

a- Adaptation phénologique

Afin d'éviter les périodes difficiles pour la croissance et le développement, certaines variétés accomplissent leur cycle de développement avant l'installation du stress hydrique (MOUELLEF, 2010).

Selon TURNER in REKIKI (1997), l'amélioration des rendements en conditions sèches est due en grande partie à la précocité. Ils caractérisent le décalage du cycle vis-à-vis des événements climatiques.

Selon BAJJI in SLAMA et al, (2005), la précocité assure une meilleure efficacité de l'utilisation de l'eau. En effet, en produisant la biomasse la plus élevée, les génotypes à croissance rapide et à maturité précoce utilisent mieux l'eau disponible et ils sont moins exposés au stress environnementaux que les génotypes tardifs.

b- Adaptation morphologique

Les longs déficits hydriques se traduisent par des changements progressifs dans la structure de la plante.

➤ Le système racinaire

L'adaptation de la plante à la sécheresse est due à un développement considérable de l'appareil racinaire très ramifié et portant de nombreux poils absorbants. L'appareil souterrain peut aussi atteindre un volume plusieurs fois supérieur à celui des parties aériennes de la plante.

Le sol est fouillé à l'aide de longues racines pivotantes qui s'enfoncent profondément jusqu'au niveau d'une nappe phréatique (les légumineuses arborescentes, possèdent des racines qui s'enfoncent parfois jusqu'à 30 mètres de profondeur) (CAMEFORT, 1977).

➤ La surface évaporante

Les adaptations des plantes au milieu sec, portent sur la réduction de la surface foliaire, la diminution de la vitesse d'évaporation et la constitution de réserve d'eau à l'intérieur des tissus (OZENDA, 1982).

c- Adaptation physiologique

➤ La turgescence

Dans une plante turgescente, l'eau cellulaire est en équilibre avec l'eau du milieu externe. Cet équilibre signifie que les potentiels chimiques de l'eau à l'intérieur des tissus et au niveau du milieu sont égaux (MONNEVEUX in ADDA, 1996).

Selon JOUR in REKIKI (1997), la tolérance à la déshydratation est donc liée au maintien de l'intégrité fonctionnelle des structures cellulaires au cours de l'installation de la contrainte hydrique, celle-ci garantissant la reprise de l'activité normale de la plante dès qu'il y a réalimentation hydrique (MORIZET et *al.* in REKIKI, 1997).

Les mécanismes physiologiques impliqués dans le maintien du potentiel hydrique permettent :

- le maintien de la pression de turgescence à un niveau aussi élevé que possible pour des valeurs basses du potentiel hydrique (JOHMSAR et *al.* in ADDA, 1996).
- Le maintien de la turgescence permet d'empêcher la fermeture des stomates et de maintenir en conséquence le bon déroulement de la photosynthèse et l'élongation cellulaire (ALIDIB in ADDA, 1996).

➤ La photosynthèse

La photosynthèse est particulièrement sensible aux stress hydriques. Les effets directs sur l'activité des chloroplastes provoquent une diminution de la demande en CO₂, dont la concentration demeure relativement importante à l'intérieur de la feuille (HOPKINS, 2003).

➤ Régulation stomatique

Selon MONNEVEUX in BENHAMICHE (1999), la transpiration stomacale représente 90% du total d'eau perdue. La régulation stomatique est donc l'un des phénomènes les plus importants à considérer pour la régulation des pertes d'eau. Les stomates ont la capacité de se fermer rapidement dès que débute la sécheresse.

Selon MOUELLEF (2010), la fermeture des stomates permet à la plante de réduire la sortie d'eau.

➤ Osmorégulation

L'adaptation cellulaire liée au phénomène d'Osmorégulation, est un processus biologique important qui protège l'organisme contre les effets de la déshydratation (BENHAMICHE, 1999).

Ce paramètre permet de rendre compte des phénomènes de tolérance avec diminution du potentiel hydrique, mais maintient le potentiel de turgescence grâce à l'accumulation de divers solutés à rôle osmorégulateur (KHAN *et al.*, 1993).

Les éléments qui contribuent à l'Osmorégulation sont très variés, ce sont essentiellement des ions minéraux (surtout le potassium puis les phosphates, les sulfates et les nitrates), des sucres solubles (saccharose, glucose et fructose), des acides aminés particulièrement la proline, certains acides organiques (acide malique, acide nitrique) et certains alcools (GATE, 1995).

Dans ce travail, nous avons dosé les sucres, qui jouent un rôle important dans l'ajustement osmotique.

Selon (RICHER, 1993) La plus grande partie des substances organiques est constituée par les glucides, qui sont principalement synthétisées par les plantes et constituent avec les lipides et les protéines une part importante de la nourriture des animaux et de l'homme.

La palette de leurs fonctions dans la plante s'avère aussi riche que celle de leur structure : éléments de construction pour la plupart des composés, source d'énergie, substance de réserve, substance de soutien.

D'après MOUELLEF (2010) les sucres peuvent servir de composés solubles compatibles pour l'ajustement osmotique.

Lorsque la contrainte hydrique cesse, la feuille reconstitue les réserves d'amidon et si une nouvelle contrainte hydrique intervient, le temps d'adaptation est plus court (BENSARI *et al.* in MOUELLEF (2010).

Selon DIB *et al.* in BENHAMMICHE (1999) l'accumulation des glucides dans les feuilles varie d'une espèce à une autre et d'une variété à une autre selon le niveau de tolérance et l'intensité du stress.

De nombreux travaux ont pu établir une relation entre l'accumulation des glucides et la résistance à la sécheresse chez les légumineuses associées aux champignons (GOICOECHEA *et al.*, 1998 ; SCHÜTZENDÜBEL *et al.*, 2001).



Matériel et méthodes

I.1. Matériel

Le sol : le sol utilisé dans notre étude est un mélange de 3 types de sol. Le premier provient de la forêt de Sidi Ahmed, le deuxième du campus et le troisième de la région Tichy.

Les graines d'*Hedysarum coronarium* : les gousses contenant les graines sont récoltées en 2012 au campus de l'université Abderrahmane Mira ; puis conservées au laboratoire de biologie végétale.

Les champignons utilisés dans l'étude appartiennent à la collection du laboratoire d'écologie microbienne.

Les bactéries symbiotiques utilisées dans ce travail, sont isolées le 10-03-2013 à partir des nodules des racines d'*Hedysarum coronarium* ; récoltées le 07-03-2013 au campus de l'université.

I.2. Méthodes

Notre travail est divisé en trois grandes parties ; qui sont la préparation des deux inocula, fongique et bactérien, et l'étude du stress hydrique.

I.2.1. Multiplication des champignons

I.2.1.1. Préparation du milieu de culture des champignons PDA

Ce milieu non sélectif, qui permet l'isolement d'une flore fongique générale, est préparé selon la méthode de DAVET et ROUXET (1997) (annexe 1).

Après préparation, il est coulé dans des boîtes de pétri stériles à raison de 15 ml par boîte.

Une fois le milieu solidifié, les boîtes sont mises à l'étuve réglée à une température de 25°C pendant 24 heures afin d'éliminer les boîtes contaminées.

I.2.1.2. Repiquage des champignons

Nous avons sélectionné 5 espèces de champignons issues du laboratoire qui sont : *Absidia sp1*, *Absidia sp2*, *Dreschlera sp2*, *Dreschlera sp4*, *Dreschlera sp5*.

Le repiquage consiste à prélever avec une pince stérile et dans des conditions stériles quelques spores ou un fragment mycélien à partir des boîtes mères sélectionnées ; on transfère l'inoculum dans une nouvelle boîte de pétri contenant le milieu PDA préalablement préparé. L'inoculum est mis au centre de la boîte. Après cette opération, les boîtes de pétri sont recouvertes avec du parafilm, afin d'éviter au maximum les contaminations.

I.2.1.3. Incubation

Après repiquage des colonies fongiques ; les boîtes sont mises à l'étuve à une température de 25°C.

Après 48 heures d'incubation on constate l'apparition de colonies bien différenciées.

I.2.1.4. Choix de l'inoculum fongique pour notre étude

Le choix de l'inoculum s'est porté sur *Dreschlera sp2* en raison de son bon développement, ajoutant à cela l'espèce *Dreschlera sp* est considérée par DALPY (1997) dans l'herbier national de mycologie du Canada comme un champignon mychorizien.

I.2.2. Préparation des bactéries symbiotiques

Les différentes étapes d'isolement sont celles décrites par VINCENT (1970), SOMASEGARAN et HOBEN (1994).

I.2.2.1. Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doivent être réalisés durant une période où la plante est en pleine activité. La récolte est effectuée au printemps durant le mois de Mars, quand la terre est un peu sèche. A cette période de l'année les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peuvent indiquer la présence de la légghémoglobine et la fixation active de l'azote.

Le prélèvement des nodules est réalisé suivant la méthode de VINCENT (1970) et BECK et *al.* (1993). Une creusée d'environ 15 cm est réalisée autour de la plante pour extraire son appareil racinaire, retiré ensuite délicatement le sol lié sans endommager les

nodules. Au laboratoire, les racines sont rincées à l'eau courante, les nodules sont ensuite détachés à 1-2 cm de leur point d'attache (Planche N°1).



A



B



C

Planche N°1 : Etapes de la collecte des nodules avec (A-plante de sulla, B-racine contenant les nodules, C-nodules collectés sous la loupe binoculaire).

I.2.2.2. Stérilisation des nodules

Les nodules intacts sont stérilisés en surface, et ce en les passant dans les solutions suivantes :

- Ethanol 95° pendant 30 secondes.
- Eau de javel 3% pendant 3 minutes.
- Suivi d'une série de 8 rinçages à l'eau distillée stérile.

I.2.2.3. Isolement et purification des bactéries symbiotiques

Chacun des nodules stérilisés (9 nodules) est mis dans un tube Eppendorf stérile (photo N° 2), puis broyé à l'aide d'une tige métallique préalablement stérilisée au four Pasteur pendant 30 mn à 180°C. Le broyat obtenu dans chaque tube est utilisé pour ensemercer plusieurs boîtes de pétri (figue N°4) contenant le milieu YMA (Vincent, 1970) (annexe 1), qui sont incubées par la suite à l'étuve à une température de 28°C.

Après 48heures d'incubation, une série de purifications est réalisée sur les colonies obtenues. Les souches bactériennes choisies sont identifiables grâce à leurs caractères morphologiques observés à l'œil nu.



Photo N° 2 : Tubes Eppendorf contenant les nodules.

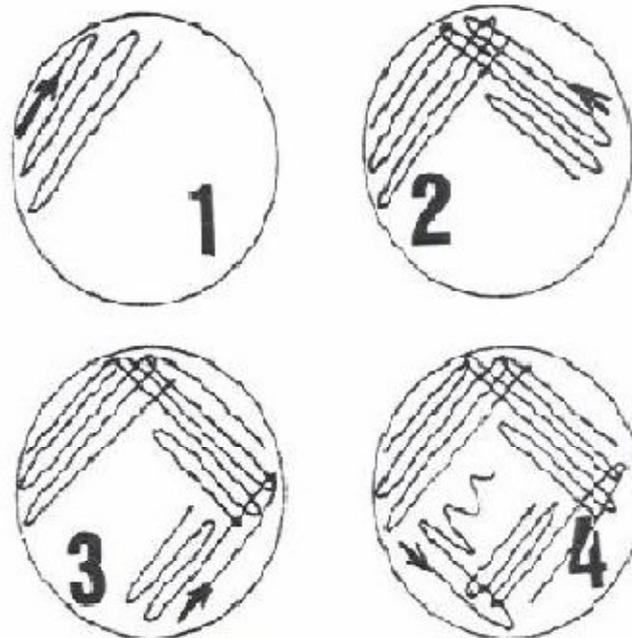


Figure N°4 : Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide en suivant Les étapes dans l'ordre 1, 2, 3,4. (Quatre cadrans) (SOMASEGARAN et HOBEN, 1994).

I.2.2.4. Conservation des isolats

La technique de conservation utilisée est celle décrite par VINCENT (1970) :

- Le milieu YMA est réparti dans des tubes à essai.
- Après stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes, les tubes sont inclinés.
- Après refroidissement, des stries de la souche à conserver sont effectués sur la surface de la gélose inclinée. La technique permet une conservation de 6 à 12 mois à 4°C.

I.2.2.5. Authentification des isolats présumés Rhizobium

Tous les isolats doivent être testés et confirmés avant de les inoculer, le test de nodulation est la capacité et l'aptitude des isolats à former des nodules avec la plante-hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées (VINCENT, 1970 ; BECK *et al.*, 1993).

Les graines d'*Hedysarum coronarium* sont scarifiées avec du papier verre puis stérilisées par immersions successives dans les solutions suivantes :

- Eau savonneuse.
- Eau (pour rinçage).
- Ethanol 70° pendant 1 minute.
- Hypochlorite de sodium 3% pendant 1 minute.
- 3 bains successifs à l'eau distillée stérile de 10 minutes chacun.

Les graines sont ensuite mises à germer à l'obscurité pendant 2 jours dans des boîtes de pétri tapissées de papier absorbant, imbibé d'eau distillée.

Tout le matériel utilisé (boîtes de pétri, papier absorbant et eau distillée) est stérile (planche N°2)



A



B



C



D

Planche N°2 : Etapes d'imbibition des graines selon l'ordre A-B-C-D.

Les graines germées sont transférées aseptiquement dans des flacons contenant 250 ml (BOULILA et *al.*, 2009) du milieu Jensen stérile, préparé selon la méthode de Vincent (1970) (annexe 1), à raison d'une graine par flacon (planche N°3). Les flacons sont placés au phytotron (photo N°3) où les conditions de luminosité sont contrôlées : 16 heures de luminosité et 8 heures d'obscurité.

Après 7 jours de germination les plantules sont inoculées avec 1 ml de suspension bactérienne contenant environ 10^9 cellules/ml. 5 répétitions sont prises en considération.

La nodulation a été suivie par plusieurs paramètres : l'apparition des nodules, leur forme ainsi que leur couleur.



Planche N3° : Dispositif de nodulation.



Photo N°3 : Mise à nodulation au phytotron.

I.2.2.6. Caractéristiques des bactéries

Après le test de nodulation, les bactéries symbiotiques sont caractérisées de point de vue morphologique.

a-Caractères cultureux

Les colonies, obtenues après 24 heures d'incubation à 28°C dans des boîtes de pétri contenant le milieu YMA, sont décrites selon la forme, l'aspect de la surface, la couleur, l'opacité, le diamètre, le contour, la présence des exopolysaccharides (EPS), et ce par observation des boîtes de pétri à l'œil nu.

b-Caractères cellulaires

La coloration de Gram (annexe 2), effectuée après une culture de 48 heures sur milieu YMA, a permis de connaître leur type de Gram des bactéries, leur forme, leur taille et leurs extrémités.

L'observation microscopique des isolats, à l'état frais, quand à elle, nous a permis de voir la forme des bactéries et leur mobilité.

I.2.3. Etude du stress hydrique

I.2.3.1. Stérilisation du sol et des pots

Le sol est d'abord bien nettoyé et débarrassé des grands cailloux puis soumis à 3 stérilisations successives à l'autoclave de 20 minutes chacune et à 120°C (DUCHAUFOR et *al.*, 1979).

96 pots bien lavés et désinfectés à l'eau de javel, sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

I.2.3.2. semis des graines stérilisées :

Les graines préalablement stérilisées selon le protocole décrit en haut (test de nodulation), sont semis le 25-03-2013 dans des conditions stériles.

Chacun des 96 pots est rempli de 500 g à 1 Kg de sol stérile. Ensuite répartis en 8 conditions à raison de 12 pots condition (photo N°4 et tableau N°4). 3 à 4 graines germées sont semées dans chaque pot.

L'arrosage se fait chaque 2 jour.

Après 15 jours de culture, nous avons procédé à une deuxième inoculation des plantes par les trois souches bactériennes, et cela afin d'augmenter les chances de nodulation.

Après 40 jours de culture, on arrête l'arrosage afin de provoquer un stress hydrique pour toutes les conditions exceptées les témoins pour qui l'arrosage se poursuit.

Après 20 jours de stress, nous avons procédé à l'étude des paramètres suivants :

- La croissance.
- La teneur relative en eau.
- La teneur en sucre.



Photo N° 4 : Semis des graines dans les différentes conditions.

Tableau N°4 : Représentation des différentes conditions réalisées.

Numéro condition	Conditions	Stress hydrique	Désignation	Nombre de pots
1	Graines non inoculées	avec	Témoin I	12
2	Graines non inoculées	sans	Témoin II	12
3	Graines inoculées avec : champignon (<i>Dreschlera sp2</i>) + bactérie (3 souches de <i>Rhizobium süllea</i>).	avec	Champ. + bact.	12
4	Graines inoculées avec : champignon (<i>Dreschlera sp2</i>) + bactérie (3 souches de <i>Rhizobium süllea</i>).	sans	Champ. + bact . Témoin	12
5	Graines inoculées avec : champignon (<i>Dreschlera sp2</i>).	avec	Champ.	12
6	Graines inoculées avec : champignon (<i>Dreschlera sp2</i>).	sans	Champ. témoin	12
7	Graines inoculées avec : 3 souches de bactérie <i>Rhizobium süllea</i> .	avec	Bact.	12
8	Graines inoculées avec : 3 souches de bactérie <i>Rhizobium süllea</i> .	sans	Bact. Témoin	12

A. La croissance

Au cours du développement des plantules, nous avons suivi la croissance, avant et après l'application du stress, en mesurant tous les 5 jours la longueur des plantules pour toutes les conditions.

B. La teneur relative en eau

L'un des principaux paramètres du niveau hydrique de la plante est la teneur relative en eau (T.R.E ou R.W.C). Celle-ci est obtenue selon la méthode de BARRS in BAKOURI et KHERFLLAH (2007).

- On coupe la partie aérienne de la plantule, qui est pesée immédiatement (poids frais), ensuite elle est placée dans l'eau distillée à l'obscurité pendant 24 heures, pour obtenir un taux de réhydratation maximum. Les échantillons ont été à nouveau pesés (PFSH), puis mis à sécher à l'étuve 80°C pendant 24 heures et puis repesés (poids sec).
- La teneur relative en eau est ensuite calculée selon la formule :

$$\frac{PF - PS}{PFSH - PS} \times 100$$

PF : poids frais.

PS : poids sec.

PFSH : poids frais à saturation hydrique.

C. la teneur en sucre

La méthode utilisée est celle au phénol de DUBOIS et *al.* in HIRECHE (2006) et qui a porté sur les feuilles.

• Extraction

On procède à une extraction à froid, en broyant 100 mg de substance végétale fraîche, dans un mortier contenant 3 ml d'éthanol à 80%, pour obtenir l'extrait végétal à doser.

- **Dosage**

Dans un tube à essai, on met 1 ml de solution à doser, auquel on ajoute 1 ml de solution de phénol. On agite soigneusement puis on ajoute 5 ml d'acide sulfurique concentré en 5 secondes à l'aide d'une burette dont le jet tombe brutalement sur la surface du liquide. La température atteint 110°C.

Après une agitation rapide (agitateur vortex), les tubes sont maintenus pendant 5 minutes à 100°C. Après un séjour de 30 minutes à l'obscurité, les mesures d'absorbance sont effectuées à 490 nm.

Les valeurs obtenues sont reportées sur une gamme étalon réalisée avec des solutions de concentrations connues de glucose.

- **Préparation de la courbe étalon**

À partir d'une solution mère de 1mg/ml, nous avons préparé des concentrations croissantes de glucose : 0ug/ml, 1ug/ml, 10ug/ml, 20ug/ml, 40ug/ml, 60ug/ml, 80ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml, 300ug/ml, 400ug/ml et 500ug/ml.

La courbe d'étalonnage sert à déterminer la teneur relative en sucres solubles présents dans les échantillons. Les quantités de sucres sont exprimées en mg/g de MVF (matière végétale fraîche).

q

Résultats et discussion

II.1. choix de l'inoculum fongique

Le choix de l'inoculum fongique s'est porté sur *Dreschlera sp2*, dont l'observation macroscopique a montré une colonie de couleur verte qui occupe pratiquement la totalité de la boîte de pétri (Photo N°5).

Le thalle observé est velouté, avec une vitesse de croissance moyenne.

D'après BOTTON *et al.* (1990), ROQUEBERT (1998), GUIRAUD *et GALZY* (1980) la classification de *Dreschlera* est la suivante :

Classe : Deutéromycètes.

Ordre : Moniliales.

Famille : Dematiaceae.

Genre : *Dreschlera*.

Espèce : *Dreschlera sp2*.



Photo N°5 : *Dreschlera sp2*.

Quand aux autres espèces de champignons repiquées, elles ont été conservées au laboratoire d'écologie microbienne afin d'enrichir et de renouveler la collection fongique déjà existante.

II.2. L'étude des bactéries symbiotiques

Dans cette étude, 9 souches présumées rhizobium ont été isolées à partir des nodules de la légumineuse *Hedysarum coronarium* récoltée au campus de l'université.

3 souches représentatives ont été retenues pour effectuer le reste du travail, et sont codées comme suit : HC2, HC7 et HC9.

II.2.1. Authentification des isolats

L'authentification des isolats et leur appartenance au genre *Rhizobium* passe nécessairement par le test de nodulation, c'est-à-dire leur capacité et leur aptitude à former des nodules avec la plante-hôte en conditions bactériologiquement contrôlées (VINCENT, 1970 ; SOMASEGARAN *et al.*, 1985).

La capacité des bactéries à infecter les racines des légumineuses et de former des nodules s'appelle « l'infectivité », alors que le terme « efficacité » donne une indication de la capacité des plantes nodulées à fixer l'azote (BECK *et al.*, 1993).

Selon DOMMERGUES *et al.* 1999, les bactéries du genre *Rhizobium* peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation d'un organe spécialisé ; le nodule.

Dans cette étude, les 3 souches testées (HC2, HC7 et HC9) ont réussi à infecter les racines de la plante-hôte (*Hedysarum coronarium*) et à former des nodules deux semaines seulement après l'inoculation des plantes, ce qui confirme leur appartenance au genre *Rhizobium* (planche N° 4).

Les nodules obtenus chez les trois souches sont de nombre limité et de petite taille. Ce résultat correspond à celui présenté par TORCHE (2006) dans son travail sur l'isolement et la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*.

Les nodules formés sont soit individuels ou regroupés en tétrade, circulaires au début de leur apparition et deviennent allongés et irréguliers quelque jours après leur formation.

La croissance des plantes s'est déroulée normalement jusqu'à la fin du test. La partie aérienne s'est bien développée et la partie racinaire présente une stimulation même en absence des nodules.



A

B

C

Planche N° 4 : Nodulation chez les trois souches bactériennes (A-HC2, B-HC7, C-HC9).

II.2.2. Caractéristiques des bactéries

Les 3 souches HC2, HC7 et HC9 ayant nodulé la plante-hôte (*Hedysarum coronarium*) sont caractérisées du point de vue cultural et cellulaire :

A- Caractères culturaux

Au bout de 48 heures d'incubation, des colonies bactériennes apparaissent sur le milieu YMA et se distinguent par une production abondante d'exopolysaccharides,

notamment chez les deux souches HC7 et HC2, ce qui leur confère un aspect mucoïdale (planche N°5).

Leur forme est circulaire, d'un aspect bombé, de couleur blanche crèmeuse, translucides, de taille variable (0,5 à 3 mm de diamètre) à contours réguliers (planche N°5).



A



B



C

Planche N°5 : Caractères cultureux des trois souches bactériennes (A-HC2, B-HC7, C-HC9)

Ces caractères correspondent à ceux de quelques souches isolées d'*Hedysarum coronarium* étudiées par AMIROUCHE et KHETTAL (2012).

B- Caractères cellulaires :

D'après BECK (1993) toutes les espèces de *Rhizobium* montrent une couleur rose et sont donc gram négatif.

La coloration de Gram effectuée (annexe 3) révèle des bâtonnets courts, à extrémités arrondies, gram négatif de différentes tailles (planche N°6).

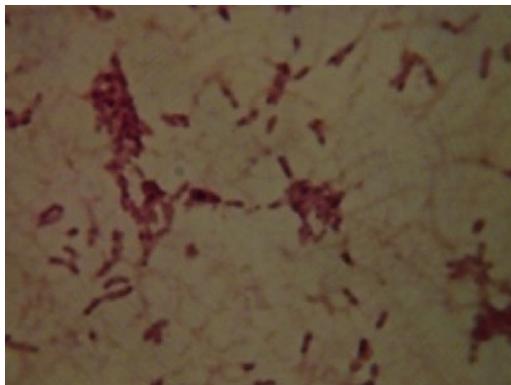
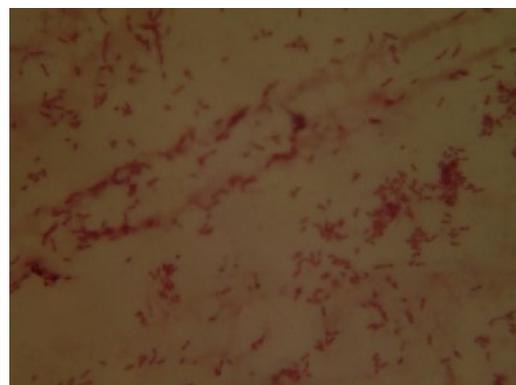
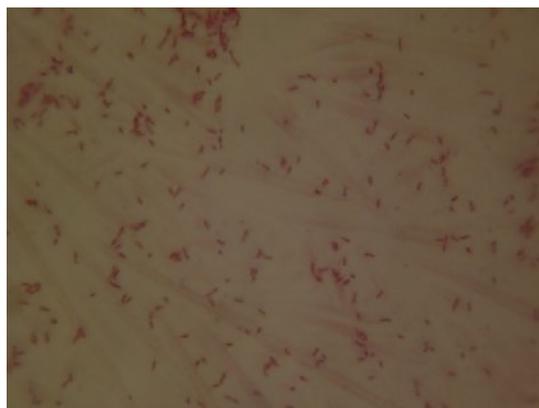
**A****B****C**

Planche N° 6 : Résultats de la coloration Gram (A-HC2, B-HC7, C-HC9).

L'observation microscopique à l'état frais d'une colonie bactérienne prélevée d'une culture sur milieu YMA et additionnée à une goutte d'eau physiologique, montre des petits bâtonnets, mobiles. Ces derniers présentent un aspect réfringent, qui résulte de la production de granules de poly β -hydroxybutyrate (PHB).

Les caractères cellulaires de ces 3 souches sont similaires à ceux des bactéries symbiotiques isolées à partir d'*Hedysarum coronarium* et étudiées par AMIROUCHE et KHETTAL (2012).

Tous ces caractères correspondent, d'après SQUARTINI et *al.* (2002) et TORCHE (2006), aux caractères de *Rhizobium sullea* qui est le microsymbiote spécifique de l'espèce *Hedysarum coronarium*.

II.3. l'étude du stress hydrique

Afin de pouvoir montrer l'action des microorganismes (bactéries et champignons) contre le stress hydrique chez la légumineuse *Hedysarum coronarium*, 3 paramètres ont été étudiés :

- La croissance.
- La teneur relative en eau, et
- La teneur en sucre.

II.3.1. La croissance

La longueur des plantes a été mesurée dans 3 pots représentatifs pour chaque condition à l'aide d'une règle. Les résultats sont représentés sur les figures suivantes :

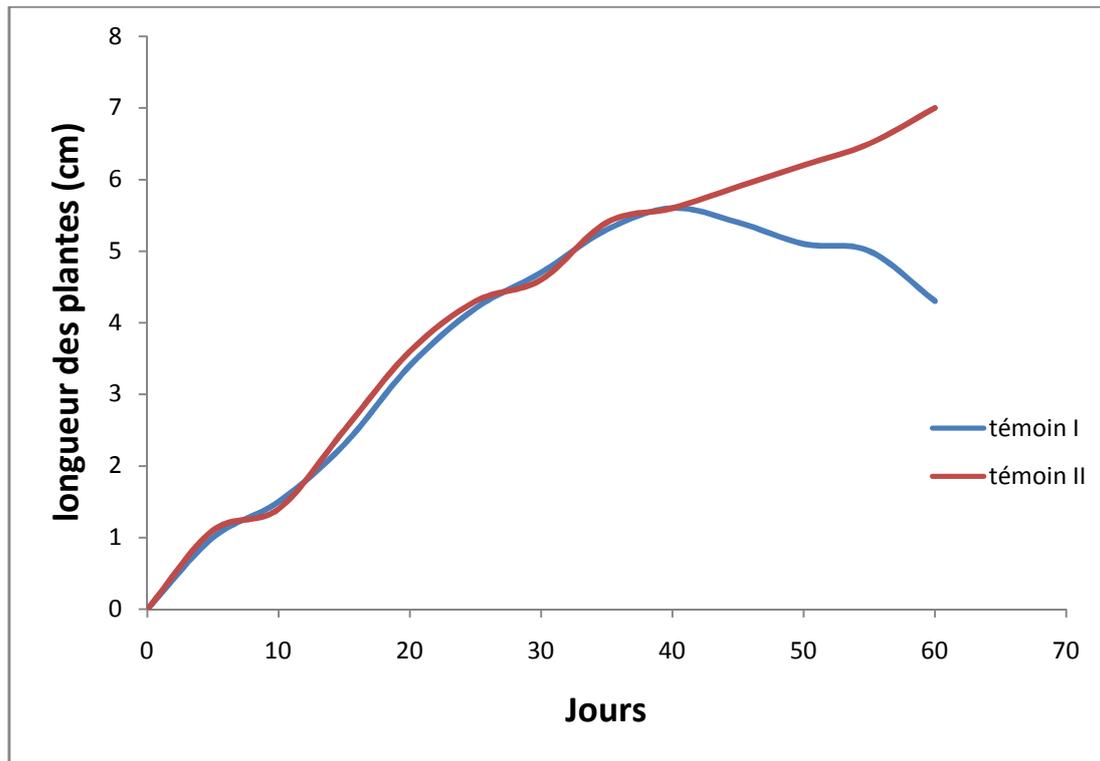


Figure N°5 : Evolution de la croissance des plantes des conditions témoin I et témoin II.

La figure N°5 nous montre une croissance régulière pour les deux conditions jusqu'au 40^{ème} jour, ceci est dû aux conditions hydriques optimales.

A partir du 40^{ème} jour, qui correspond à l'application du stress hydrique pour la condition (témoin I), nous remarquons que le développement des plantes se stabilise dans un premier temps, puis commence à régresser à partir du 45^{ème} jour, jusqu'à leur flétrissement (photo N°6).

Par contre, pour la condition (témoin II) pour laquelle l'arrosage s'est poursuivi, nous remarquons une croissance continue des plantes jusqu'à la fin de l'expérience (Photo N°7).

Cela montre l'importance de l'eau, qui participe au maintien des structures, permet le déroulement du métabolisme et contribue au port des végétaux qui, sans elle flétrissent (HELLER *et al*, 1989).

Et d'une autre, que dans les conditions naturelles, en absence de symbioses, bactérienne et mycorhizienne, les Légumineuses ne peuvent pas absorber les éléments minéraux qui sont en très faibles quantités ou très peu solubles, en particulier (P, Cu et Zn) (OUHABI *et al.*, 1996 ; GUIGNARD, 1999 *et al.* ; TRAQUAIR, 2003).



Photo N°6 : Témoin I (début de stress).



Photo N°7 : Témoin II (sans stress).

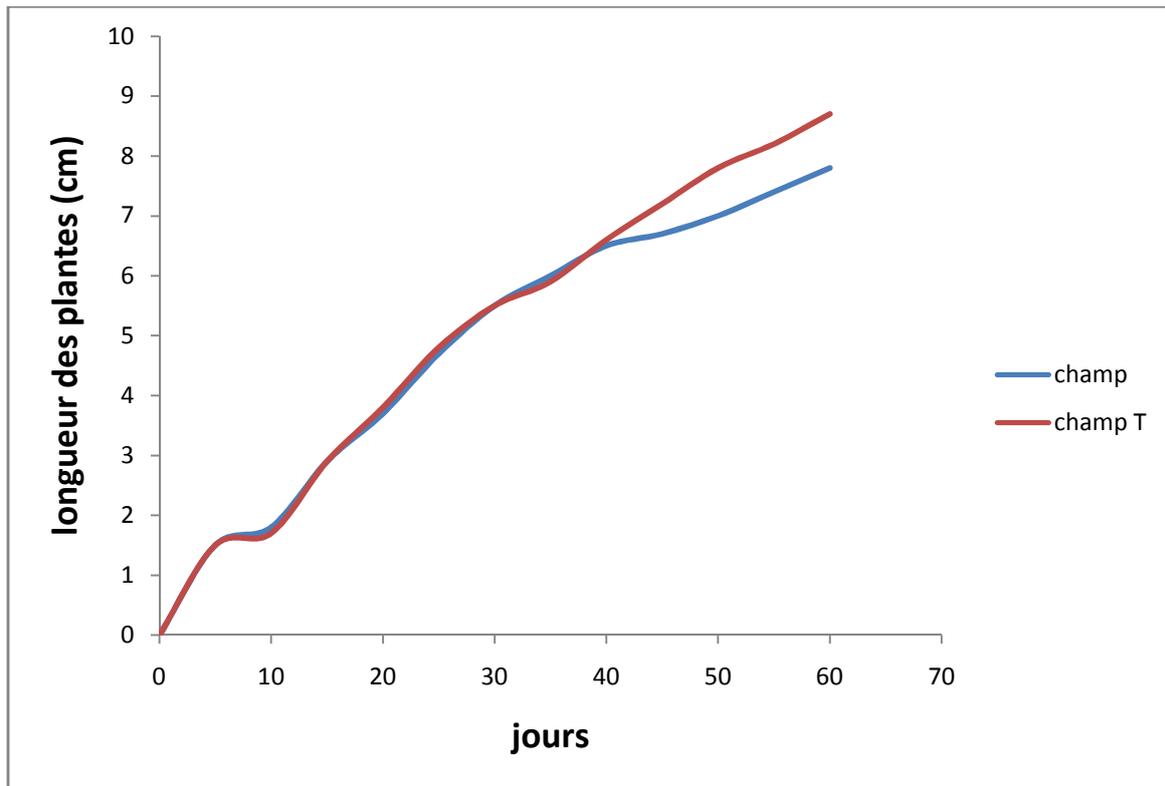


Figure N°6 : Evolution de la croissance des plantes des conditions champignon et champignon témoin.

D'après la figure N°6, on remarque que les plantes des deux conditions présentent une croissance rapide et progressive, jusqu'au 40^{ème} jour.

L'application du stress hydrique pour la condition (champ), permet aux plantes de poursuivre leur croissance avec une allure moins importante (photo N°8) par rapport à la condition témoin (champ T) pour laquelle l'arrosage est maintenu (Photo N°9).

Le bon développement des plantes, puis leur résistance à la sécheresse imposée, est dû à la mise en place d'une symbiose mycorhizienne entre les racines de la plante et le champignon inoculé. Cette symbiose contribue à une meilleure alimentation hydrique et minérale, par conséquent au bon développement des plantes.

La présence des mycorhizes augmente l'absorption des nutriments par la racine et améliore la performance de la plante (NICKLIN *et al.*, 2000).



Photo N°8 : Plante+champignon sous stress



photo N°9 : Plante+champignon témoin
(sans stress).

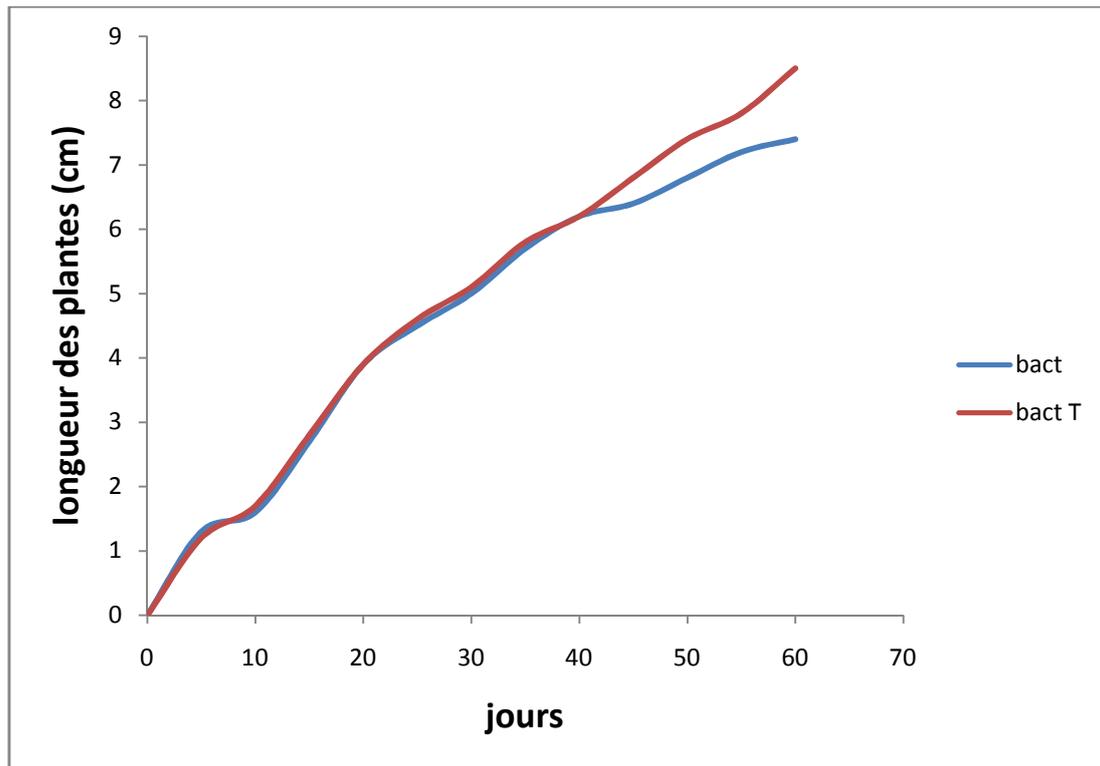


Figure N° 7 : Evolution de la croissance des plantes des conditions bactérie et bactérie témoin.

La figure N°7 nous montre un développement régulier des plantes pour les deux conditions.

Au bout de 40 jours de culture, et la mise en place du stress hydrique pour la condition (bact), les plantes continuent leur croissance malgré le manque d'eau (photo N°10), mais avec une vitesse moindre par rapport à la condition témoin (bact T) (photo N°11).

Les bactéries inoculées forment des symbioses avec les racines de la plante, capables de fixer l'azote, ce qui permet un meilleur développement de la plante et lui confère des compétences de résistance au stress hydrique.

Selon HELLER et *al.* (1998) ; ALBERCHT et *al.* (1999) les symbioses bactériennes fixatrices d'azote assurent la nutrition azotée des plantes et d'après DAJOZ (2000), elles enrichissent le sol ce qui permis d'améliorer sa fertilité.



Photo N°10 : Plante+bactérie sous stress



Photo N°11 : Plante +bactérie témoin

(Sans stress)

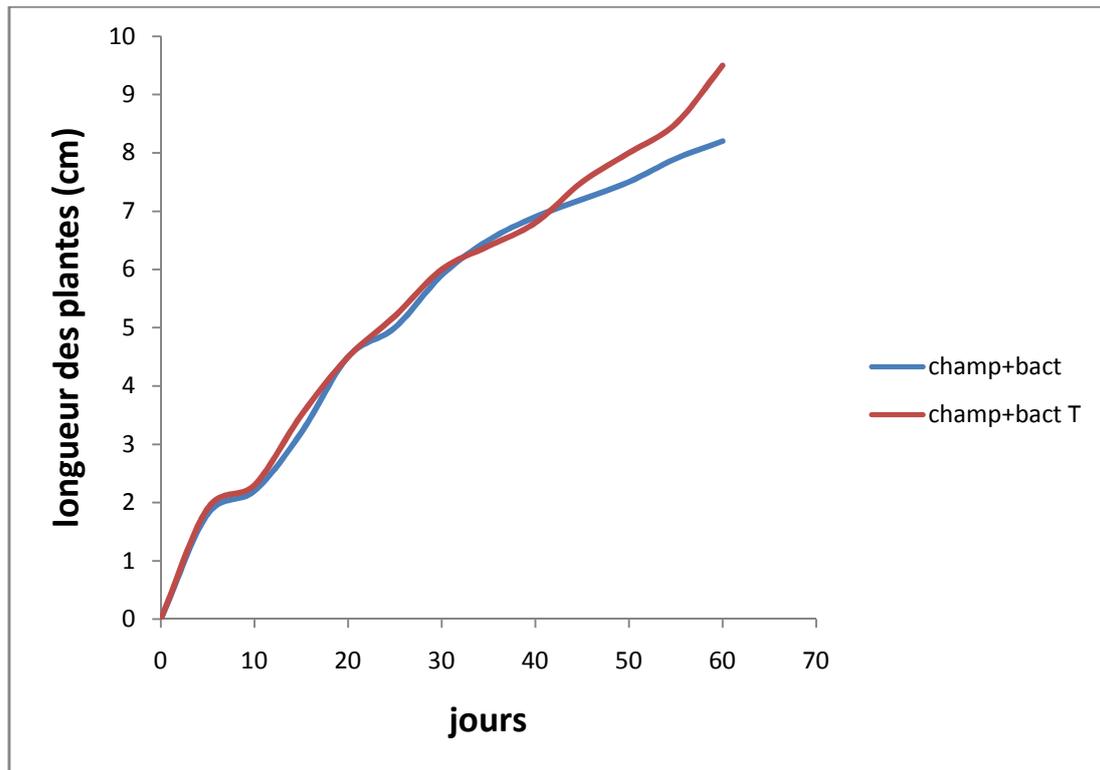


Figure N°8 : Evolution de la croissance des plantes des conditions champignon+bactérie et champignon+bactérie témoin.

Avant le stress, nous remarquons un développement rapide et progressif des plantes, chez les deux conditions (Figure N° 8).

Après application du stress pour la condition (champ+bact), la croissance des plantes se poursuit normalement, mais avec une allure plus faible que la condition témoin (champ+bact T).

La présence des microorganismes a aidé les plantes de la condition (champ+bact) à résister et à continuer leur développement malgré le stress imposé (photo N°12), et celles de la condition (champ+bact T) à améliorer d'avantage leur croissance (photo N°13).

GUIGNARD *et al.* (1999) s'accordent pour dire que la présence des champignons mychoriziens permet la mise en place d'un environnement rhizosphérique plus favorable au développement des plantes, et les symbioses bactériennes assurent selon (RENGEL, 2002), la nutrition azotée.

Enfin, le complexe (champignon et bactéries) additionne les avantages des deux microorganismes et améliore d'avantage le développement des plantes.



Photo N°12 : Plante+ champignon + bactérie
(sous stress).



Photo N°13 : Plante + champignon +
bactérie témoin (sans stress)

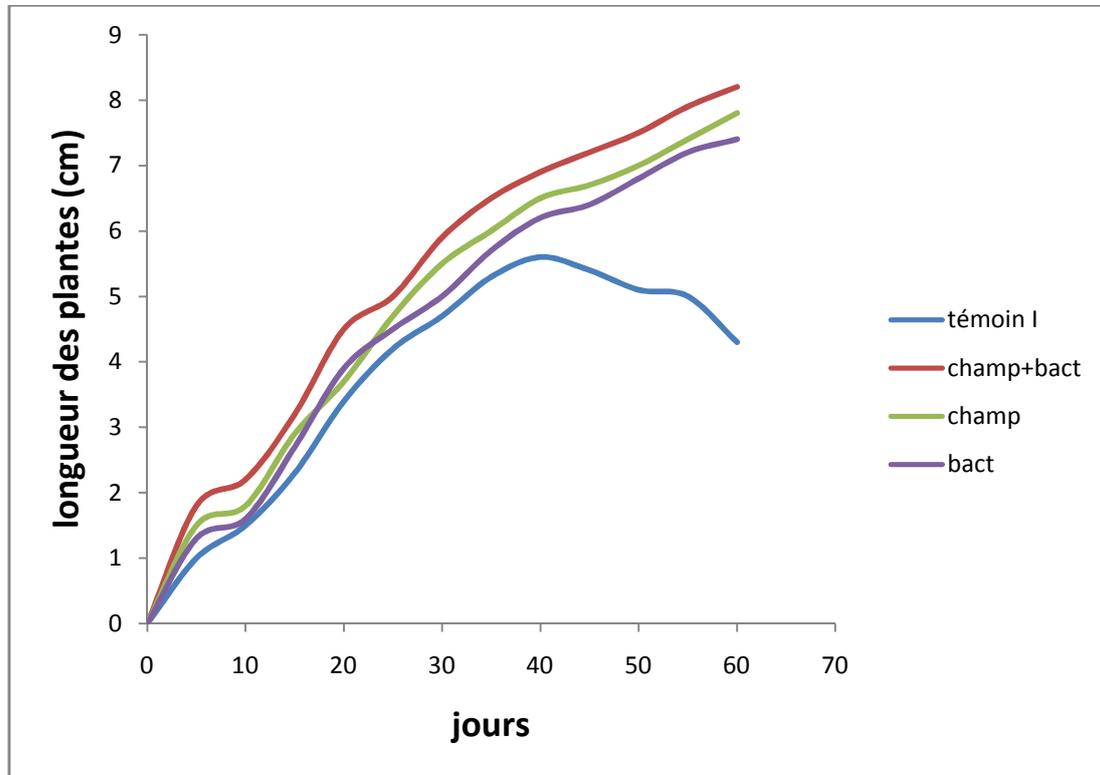


Figure N° 9: Evolution de la croissance des plantes de toutes les conditions sous stress.

L'analyse de la figure N° 9, nous montre qu'avant le stress hydrique toutes les conditions présentent une évolution progressive de la croissance des plantes, avec une allure similaire, toute fois les conditions où les plantes sont inoculées avec des microorganismes présentent un meilleur développement, ceci est probablement dû à la présence des microorganismes (champignon et bactérie) qui permettent une meilleure alimentation hydrique et minérale.

Ce meilleur développement s'exprime, selon LANCHAMP (2001), par une biomasse plus importante.

L'application du stress hydrique provoque chez les plantes non inoculées un ralentissement de la croissance suivi d'un flétrissement des plantes. Par contre les plantes inoculées avec les microorganismes présentent un fléchissement mais poursuivent leur croissance.

On remarque également que les plantes inoculées par le couple bactérie-champignon présentent un net avantage par rapport à celles inoculé uniquement par la bactérie ou par le champignon.

Nos résultats rejoignent ceux présenté par AIT BENALI (2002), HAMOUR et NASSOU (2003) ; BAKOURI et KHERFALLAH (2007).

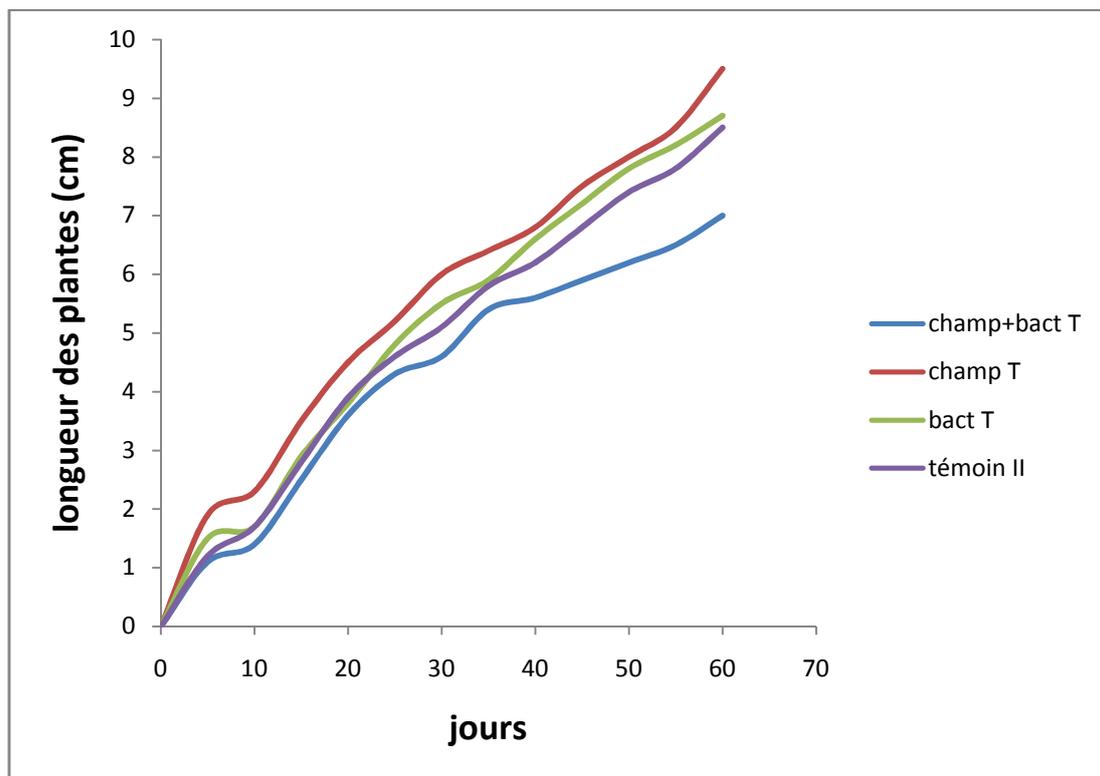


Figure N°10 : Evolution de la croissance des plantes de toutes les conditions sans stress.

Après analyse de la figure N° 10, on remarque au niveau des différentes conditions, une croissance progressive des plantes. Toute fois, celles inoculées par des microorganismes (champignons ou bactérie) présentent une allure plus rapide, avec un net avantage pour celles inoculées par le couple (champignon+bactérie).

Cette dernière condition additionne les avantages des deux microorganismes et améliore d'avantage le développement des plantes, ce qui explique les résultats observées.

II.3.2 Teneur en eau

La teneur en eau des plantes dans chaque condition est représentée dans le tableau N°5.

Tableau N° 5 : Influence des différentes conditions sur la teneur en eau.

conditions	Teneur en eau (%)
Témoin I	$24 \pm 1,06$
Champ+ bact	36 ± 1
Champ	$28 \pm 0,4$
Bact	$27 \pm 0,7$
Témoin II	$66 \pm 0,7$
Champ+bact T	$78 \pm 1,17$
Champ T	73 ± 1
Bact T	$69 \pm 0,8$

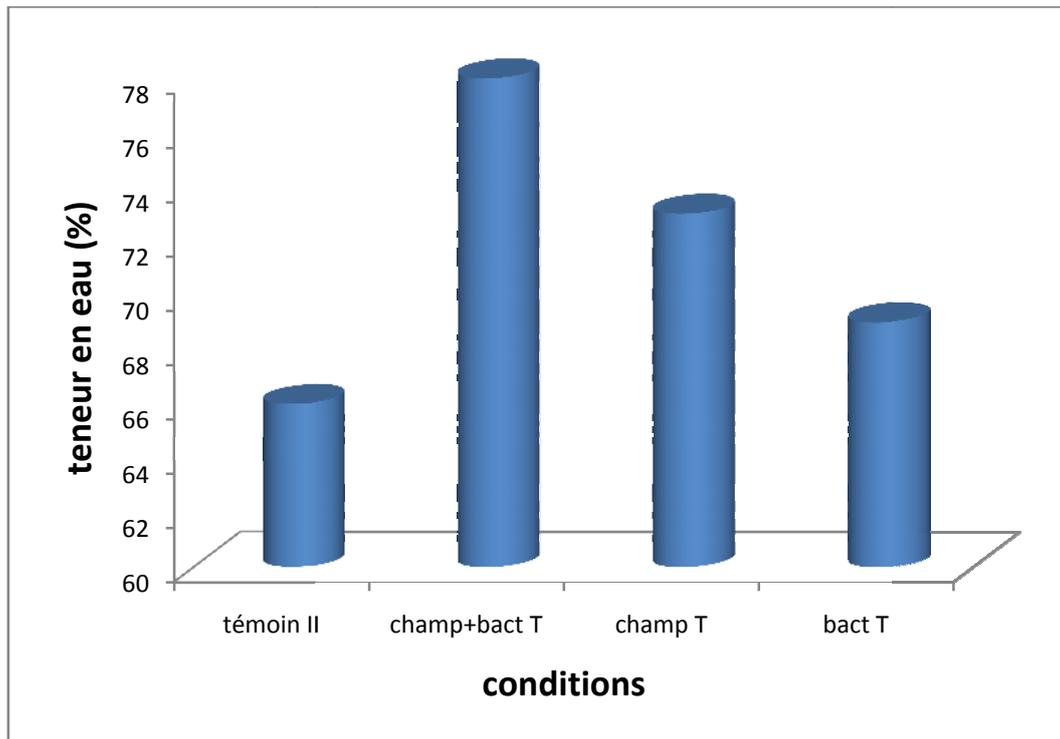


Figure N°11 : Teneurs en eau des plantes des conditions sans stress.

La figure N° 11 montre que la teneur en eau des plantes dans les conditions optimales d'hydratation varie de 66 à 78 %.

On remarque également que les plantes inoculées par les micro-organismes présentent les valeurs les plus élevées par rapport au témoin.

La présence simultanée des deux microorganismes (Champignon et Bactérie) améliore d'avantage la teneur en eau des plantes, par rapport à celles inoculées par un seul microorganisme (Champignon ou Bactérie).

L'analyse statistique (ANOVA) effectuée pour ces quatre conditions, montre une différence très significative au seuil $\alpha = 0,5\%$.

Selon HELLER et *al.* (1998) les symbioses bactériennes fixatrices d'azote assurent la nutrition azotée des plantes, et la présence des mycorhizes augmente selon NICKLIN et *al.* (2000) l'absorption des nutriments par la racine. Ce qui contribue à un meilleur développement des plantes, et par conséquent une teneur en eau importante.

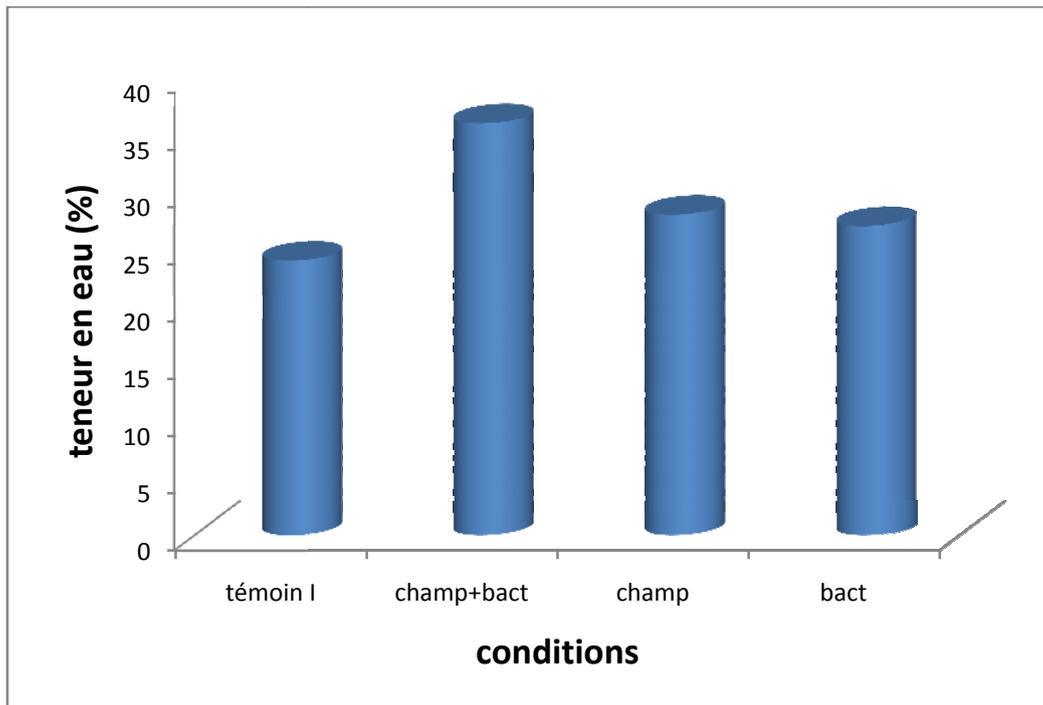


Figure N°12 : Teneurs en eau des plantes des conditions sous stress.

On remarque au niveau de la figure N° 12 , que la teneur en eau varie de 24 à 36 %, pour les différentes conditions où les plantes sont soumises au stress hydrique.

L'application de ce dernier a provoqué une chute de la teneur en eau au niveau des plantes non inoculées, qui est passée de 66 % (témoin II) à 24 % (témoin I).

les plantes des trois autres conditions présentent des teneurs en eau plus importantes que celles du témoin I, ce qui est dû à la présence des microorganismes (champignon et bactérie) , qui ont contribué à maintenir l'eau et à aider les plantes a mieux résister a la secheresse.

Nous ramarquons également que les plantes inoculées par le couple (champignon-bactérie) présentent des teneurs en eau plus importantes que celles inoculées par un seul microorganisme (champignon ou bactérie).

L'analyse statistique (ANOVA) effectuée sur les quatre conditions, montre une différence significative au seuil $\alpha = 0,5\%$. Ce qui confirme les observations précédentes.

Selon GUIGNARD *et al.* (1999) la présence de racines mycorhiziennes, qui sont pourvues d'intenses ramifications, permettent d'augmenter les surfaces d'échanges entre la plante et son milieu.

Par contre la symbiose bactérienne permet d'améliorer la nutrition azoté SPICHIGER *et al.* (2002). Et l'ensemble de ces symbioses favorise d'avantage une bonne alimentation hydrique.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par AIT BENALI (2002), HAMOUR *et* NASSOU (2003) *et* SLIMANI *et* SOUALMI (2004) *et* BAKOURI *et* KHERFALLAH (2007).

II.3.3. Teneur en sucre

Une courbe étalon est tracée (annexe 3) après une lecture de la densité optique à 490 nm, c'est à partir de cette courbe que sera extrapolées l'ensemble des valeurs de la teneur en sucre des plantes de chaque condition.

Les valeurs consignées dans le tableau ci-dessous, présentent la moyenne de trois mesures pour chaque condition.

Tableau N°6 : Influence des différentes conditions sur la teneur en sucre solubles.

condition	Témoin I	champ	Bact	Champ+ Bact	Témoin II	Champ T	Bact T	Champ+ bact T
Teneur en sucre (mg/g MVF)	17,54 ± 0,73	11,02 ± 0,75	11,25 ± 0,76	8,27 ± 0,67	3,73 ± 0,25	1,76 ± 0,25	1,83 ± 0,25	1,2 ± 0,45

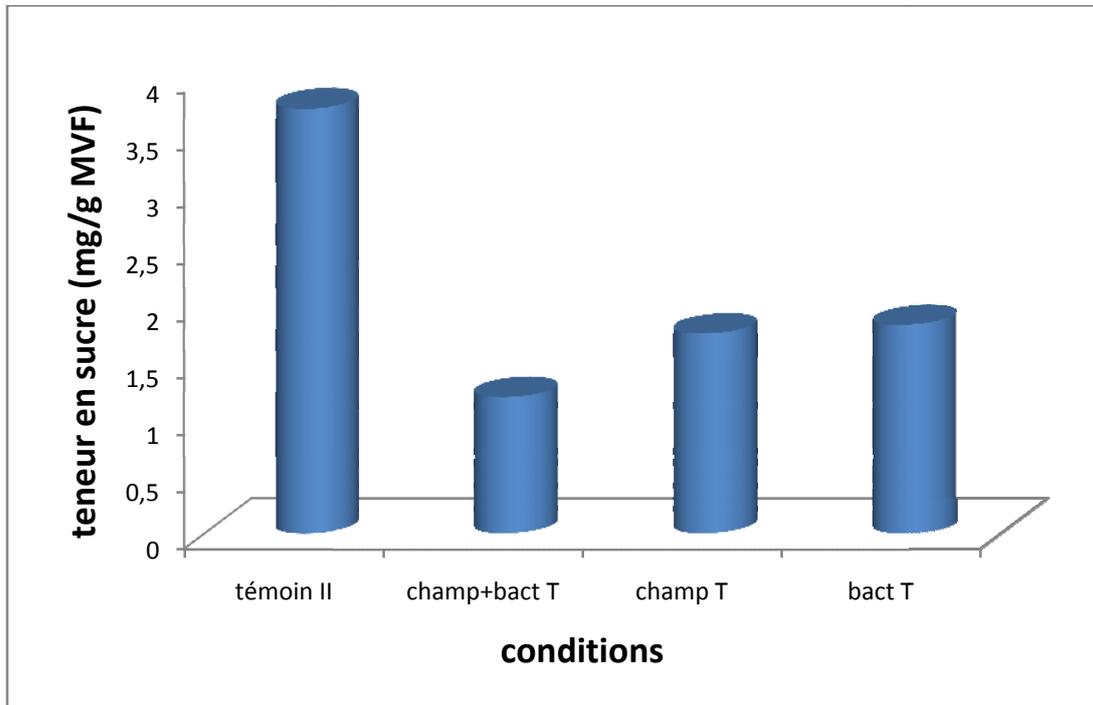


Figure N°13 : Teneurs en sucres solubles des plantes des conditions sans stress.

La figure N° 13 et le tableau N° 6 nous montre que dans les conditions hydriques optimales, les teneurs en sucres solubles sont assez faibles chez les plantes des quatre conditions, allant de 1,2 à 3,73 mg/g MVF.

La présence des microorganismes provoque une légère décroissance de la teneur en sucre.

L'analyse statistique (ANOVA) montre une différence significative entre les quatre conditions au seuil $\alpha = 0,5\%$.

On suppose que dans les conditions d'hydratation optimale, la plante n'accumule pas de sucres solubles, mais sont transformés en macromolécules (amidon, cellulose.).

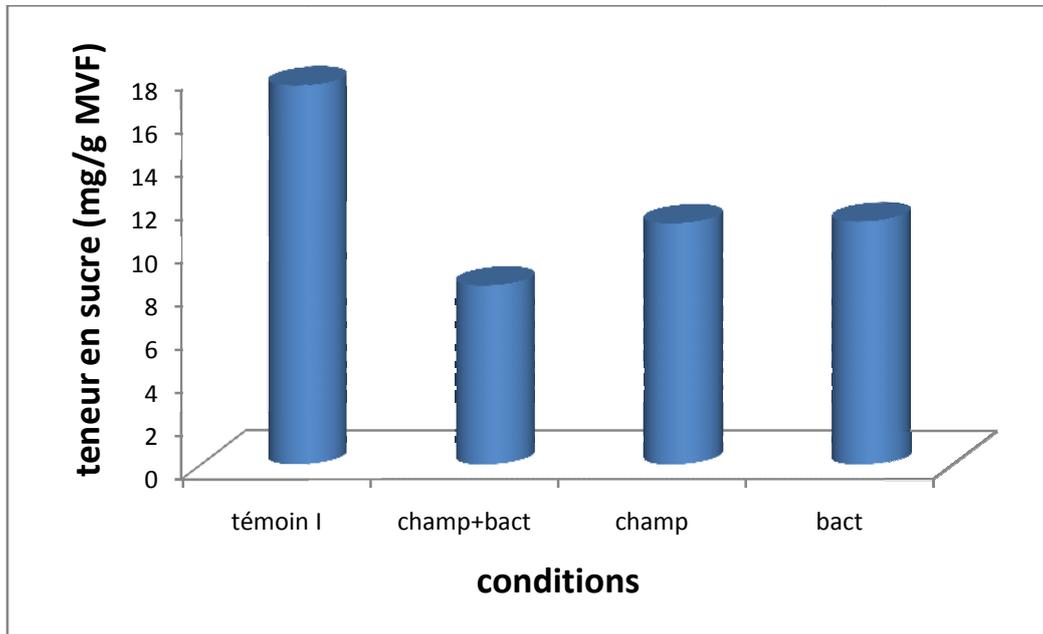


Figure N° 14 : Teneurs en sucres solubles des plantes des conditions sous stress.

L'Application du stress hydrique a provoqué une augmentation remarquable de la teneur en sucre chez les plantes non inoculées et qui est passée de 3.73 à 17.54 mg/g de MVF.

Ceci, nous montre la réaction de la plante qui s'exprime par l'accumulation des osmorégulateurs (sucres solubles) qui permettent selon BENHAMICHE (1999) d'élever la pression osmotique pour maintenir l'eau et empêcher la déshydratation de la plante.

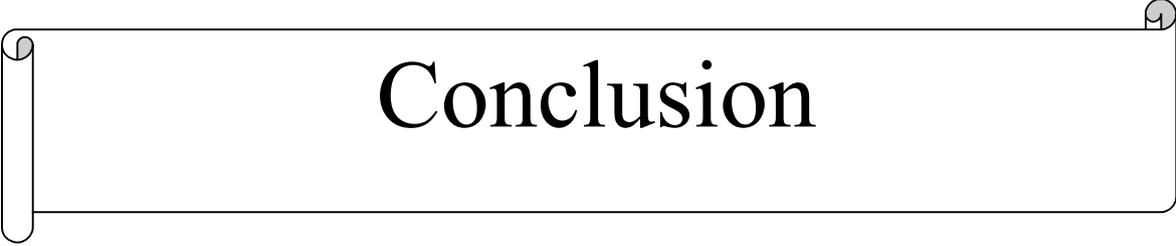
Les plantes inoculées avec des microorganismes, présentent des teneurs en sucres moins importantes que celles des plantes non inoculées.

Les microorganismes atténuent l'influence du stress hydrique en favorisant l'alimentation hydrique, comme on l'a signalé dans l'analyse de la teneur en eau, ce qui réduit l'accumulation des sucres solubles.

Les plantes inoculées simultanément avec les deux microorganismes (champignon-bactérie) présentent des teneurs en sucres moins importantes par rapport à celles inoculées par un seul microorganisme (champignon ou bactérie).

Cela rejoint les travaux de RENGEL (2002) et DIOUF (2003), qui stipulent que la présence de la bactérie avec le champignon permet d'améliorer le déficit hydrique et par conséquent réduire l'accumulation des sucres. Et cet avantage est dû probablement, selon eux, aux éléments minéraux et particulièrement l'azote que met la bactérie à la disposition du champignon, ce qui favorise son développement.

L'analyse statistique (ANOVA), montre une différence significative entre les quatre conditions avec un risque d'erreur de 0,5%.



Conclusion

Conclusion

Dans la première partie de notre travail, nous avons purifié 9 isolats bactériens à partir des nodules de la Légumineuse *Hedysarum coronarium*. Ceci permettra d'enrichir la collection des rhizobia du laboratoire d'écologie microbienne.

Les souches retenues pour l'étude (HC2, HC7 et HC9) ont réussi à infecter les racines de la plante *Hedysarum coronarium* après inoculation et à former des nodules visibles ce qui confirme leur appartenance à l'espèce *Rhizobium süllea* considérée comme le microsymbiote spécifique de *sulla*.

Les colonies des 3 souches bactériennes sont toutes circulaires, d'un aspect bombé, blanches, translucides, de diamètre variant de 0,3 à 3 mm et à contours réguliers. Alors que les bactéries sont sous forme de bâtonnets, à extrémités arrondies, gram négatif et de différentes tailles.

Nous avons par la suite préparé les inocula, fongique et bactérien.

L'inoculum bactérien est présenté par les trois souches bactériennes (HC2, HC7 et HC9) sélectionnées.

Alors que l'inoculum fongique a été représenté par *Dreschlera sp2*. Il a été repiqué à partir d'une collection appartenant au laboratoire d'écologie microbienne, et a présenté une croissance rapide et un thalle bien développé.

La seconde partie de notre travail, a concerné l'étude du stress hydrique.

On note que l'inoculation par le champignon (*Dreschlera sp2*) et par la bactérie (*Rhizobium süllea*) améliore considérablement le rendement en biomasse des plantes qui s'exprime par l'importance du développement de ces dernières (longueur des tiges).

Ce développement est dû :

- Aux mycorhizes, qui forment un réseau de filaments reliés aux racines des plantes qui puisent du sol des nutriments qui, autrement, seraient inaccessibles au système racinaire.
- Et aux symbioses bactériennes qui favorisent l'alimentation azotée.

Ces interactions plantes-microorganismes interviennent également dans la fertilité des sols, donc elles peuvent remplacer les intrants chimiques (engrais, pesticides) préservant ainsi l'environnement.

L'application du stress hydrique, provoque une chute dans la croissance et la teneur en eau des plantes ainsi qu'une accumulation importante des sucres solubles, ce qui montre l'importance de l'eau pour la plante, confirmant ainsi le fait que l'eau constitue un facteur limitant la production agricole.

Toutefois, la présence des microorganismes permet aux plantes de mieux résister à la sécheresse.

D'un côté, le mycélium constitue pour les plantes une extension de leurs systèmes racinaires leur permettant ainsi de mieux retenir l'eau, et les aident à assimiler les éléments en les transformant.

D'un autre côté, les bactéries assurent la nutrition azotée des plantes. Il en résulte de cette alliance, des plantes mieux nourries et en santé, qui résistent d'avantage au stress hydrique. Ce qui s'exprime par une accumulation moindre des sucres solubles en comparaison avec les plantes non inoculées.

On note également que la présence simultanée des deux microorganismes améliore d'avantage la croissance des plantes, leur teneur en eau ainsi que leur résistance à la sécheresse qui s'illustre parfaitement par l'accumulation moins importante des osmorégulateurs (sucres solubles).

Ces interactions constituent la pierre angulaire d'une agriculture durable, d'où la nécessité d'en accélérer l'intégration aux systèmes agricoles.

En perspective, il est souhaitable d'étaler cette étude sur une période plus importante, afin de permettre aux plantes de mieux se développer, et pouvoir ainsi suivre d'autres stades de développement : la fructification, le rendement...

Il est aussi souhaitable de la compléter par l'étude d'autres paramètres : teneur en proline, teneur en azote...et aussi l'étude de l'influence de ces microorganismes sur d'autres facteurs limitant la production agricole comme la salinité.



Références bibliographiques

Références bibliographiques classiques

- Abdelguerfi, A. (1989)** Quelques réflexions sur la situation fourragère et pastorale en Algérie. In. "Constitution de réseaux thématiques de recherche agricole au Maghreb". (A. Birouk, A. Ouhsine, et. T. E. Améziane, eds.) Rabat Maroc, 75-78.
- Abolhasani M, Lakizian A, Tajabadipour A et Haghnia G. 2010.** The study salt and drought tolerance of *Sinorhizobium* bacteria to the adaptation to alkaline condition. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. **4**. Suppl 5. Pp : 882-886.
- Aboubacry K. 1997.** Effets des fongicides (Basamid, Cryptonol, Enzone) et des endomycorhizes sur la croissance et le développement de deux variétés d'oignon (Red Creole et Early Yellow Texas grano 502 PRR) cultivées sur un sol infecté par *Pyrenochaeta terrestris* au Nord Ouest du Sénégal. Thèse de Doctorat. Dakar. P : 160.
- Adda D., 1996.** Contribution à l'étude des caractéristiques morphologiques, physiologiques et anatomiques de la productivité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) dans une zone semi-aride. Thèse de Magister. Alger. P : 180.
- Aissat K., 1988 :** Etude de la mycoflore des blés tendres. Mémoire de D.E.A. université de Béjaia. P : 49
- Ait Benali D., 2002.** Contribution à l'étude des champignons mycorhiziens et leur action sur la nutrition minérale de *Medicago intertexta*, Mémoire de fin de cycle, université de Bejaia. P : 52
- Albrecht C., Geurts R. et Bisseling T.1999.** Legume nodulation and mycorrhizal formation two extremes in host specificity meet. *The EMBO journal*. Vol: 18. N°: 2. P : 281-288.
- Albrecht C., Geurts R. et Bisseling T.1999.** Legume nodulation and mycorrhizal formation two extremes in host specificity meet. *The EMBO journal*. Vol: **18**. N°: 2. P : 281-288.
- Amirouche S., Khetta S. 2012.** Contribution à la caractérisation des bactéries nodulant *Hedysarum coronarium L.* Mémoire de fin d'étude. Université de bejaia.
- Antolin Mc., Goicoechea N., et Sanchez-Diaz M and Paldi E., 1998.** In fluence of arbuscular mycorrhizae and Rhizobium of free polyamine and proline levels in water stressed Alfalfa. Revue "Journal of plant physiologie" N° 153 by Academic Press, Denmark. Pp : 706-711.

Aubertot J.N., Barbier J.M., Carpentier A., Gril J.N., Guichard L., Lucas P., Savary S., Voltz M. et Savini I. 2005. Pesticides, agriculture, environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux, Expertise scientifique collective, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable de France: 702 p.

Baatout , H., Boussaïd, M., Combes, D., Espagnac, H., et Figier, J. 1976. Contribution à la connaissance du genre *Hedysarum* en Tunisie. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de Tunisie* t.11, 87-95.

Bakouri W. et Kherfallah A. 2007. Influence des champignons mycorhiziens et leurs actions contre le stress hydrique chez les légumineuses *Medicago intertexta*. Mémoire de fin d'étude. Université de Bejaia.

Baudoin J.P., 2001 : Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001 **5** (4) pp 221–230.

Beck D.P., Materon L.A., Afandi F. 1993. Practical *Rhizobium* –legume technology manual, ICARDA (Ed), Syria, P.389.

Belkacemi K., 2003. Optimisation dans la gestion des irrigations du blé dur (*Triticum durum* Desf) variété vitrons à travers la recherche de l'indicateur de stress le plus pertinent. Mémoire de Magister. Alger. P : 135.

Ben Jeddi F. 2005 : *Hedysarum coronarium* L. : variation génétique, création variétale et utilisation dans des rotations tunisiennes. Thèse de Doctorat. Université Gent. Belgique.

Benaceur S.2002. Contribution à l'isolement et l'identification des champignons mycorhiziens associés à l'olivier (*Olea europea*L. Var : Chemlal).

Benguedouar, A. (2000). Etude de la symbiose *Rhizobium- Hedysarum coronarium*: essai de caractérisation de l'espèce *Rhizobium* "hedysari". Thèse de doctorat de l'université de constantine. Algérie.

Benhamiche S., 1999. Etude des paramètres morphologiques et de rendements de quelques variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf), et blé tendre (*Triticum aestivum* L.), susceptibles d'être utilisées en milieu saharien. Thèse de Magister. Université de Bejaia. P : 185.

Bensaid K. 2003. Caractérisation phénotypique des rhizobia isolés de *Medicago polymorpha* de la région de Bejaia et études de l'effet de NaCl sur leur symbiose. Thèse de magistère, Université A. Mira de Bejaia. P83.

Blondeau R. (1980). Fixation biologique de l'azote atmosphérique. *Vuibert*. Pp : 19-79.

Bordeleau L. M. and D. Prevost. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* **161**. Pp : 115-124.

Bossard R., et Cuisance P. 1986. Arbres et arbustes d'ornement des régions tempérées et méditerranéennes. Edition : Lavoisier, Tec & Doc, Baillière.

Botton B.; Breton A. ; Fevre M.; Gauthier S. ; Guy P.H.J.P. ;Larpent J.P. ; Raymond P. ; SanglierJ.J. ; Vayssier Y. et Veau P., 1990 : Moisissures. Utiles et nuisibles, importance industrielle. 2eme Masson-paris. P : 512.

Boudjellil Y. et Benazzouz H. 2009. Etude bibliographique de l'effet du stress salin sur la croissance des plantes et des bactéries d'intérêt agricole. Mémoire de fin d'étude. Université de Bejaia.

Bourgeois C.M., Mescle J.F, et Zucca J., 1996 : Microbiologie alimentaire, Tome 1(aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments). Edition : Tec et Doc, Lavoisier, Paris. PP : 236-247.

Calu G. 2006. *Arabidopsis thaliana* et *Thellungiella halophila*, plantes modèles dans l'étude du stress salin. [www. Spectriscience.com](http://www.Spectriscience.com). (02-04-2013).

Camefort H., 1977. Morphologie des végétales vasculaires 2^{ème} éditions. P : 431.

Casella S., Gault R. R., Reynolds K. C., Dyson J. R., Brockwell J. 1984. Nodulation studies on legumes exotic to Australia (*Hedysarum coronarium* L.) *FEMS Microbiol. Letters* **22**: 37- 45.

Chadefaud M., 1978: *Precis de botanique*. 4eme édition, Masson, Paris. P : 722.

- Clarde C. (1990)** Les adventices des cultures méditerranéennes en Tunisie: leurs plantules, leurs semences. Ministère de l'Agriculture, Tunisie/AGCD, Belgique. *Publication agricole* **26**, 246-247.
- Cloutier J, Prevost D, Nadeau P et Antoun H. 1992.** Heat and Cold Shock Protein Synthesis in Arctic and Temperate Strains of Rhizobia. *Applied and environmental microbiology*. **58**. Pp : 2846-2853.
- Collavino M., Riccillo P.M., Grasso D.H., Crespi M., Aguilar OM. 2005.** GuaB activity is required in *Rhizobium tropici* during the early stages of nodulation of determinate nodules but is dispensable for the *Sinorhizobium meliloti* - Alfalfa symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**:742-750.
- Dajoz R. 2000.** Précis d'écologie. 7ème édition, Doin. P : 23.
- Dalpy Y., 1997.** Biodiversité des champignons mycorhiziens CRECO (Centre de Recherche de l'Est sur les céréales et Les oléagineux). Rapport, préparé pour la 3^{ème} réunion du <<Subidiary Body on Scientific, Technical and technological advice>>. Montréal, Québec, Canada. P : 13.
- Davet P., 2006 :** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. I.N.R.A., P : 369.
- Davet P., et Rouxel F., 1997 :** Détection et isolement des champignons du sol. Edition : INRA, Paris. P : 203.
- Delphine S. 2004.** Impact de la culture de maïs modifiés génétiquement sur les microorganismes du sol, cas des rhizobia. Rapport de stage. INRA. P : 24
- Diouf D., Diop T. A. et NdoyeL. 2003.** Actinorhizal, mycorhizal and rhizobial symbiosis : how much do we know ? *African Journal of Biotechnology*. Vol: 2(1). P: 1-7.
- Dommergue Y., Houx E. et Hoang.Di. 1998.** Les arbres fixateurs d'azote. Edition Scientifiques et culturelles. P 499.
- Dommergues, Y.,Duhoux ,E., and Diem ,H.G. (1999) .** Les arbres fixateurs d' azote : caractérisation fondamentales et rôle dans l' aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Editions espaces 34 (CRAD, FAO ; IRD).
- Duchaufour P., et Souchier B. 1979.** Pédologie : Constituants Et Propriétés Du Sol. Edition :Masson.

Durrieu G., 1993 : écologie des champignons ; Edition : Paris. P207.

EL-hilali I. 2006. La symbiose rhizobium-lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de microbiologie et biologie moléculaire. Université V-Agdal, Rabat, P 157.

Elkan G.H : 1992. Taxonomy of the rhizobia. *Can.J. Microbial.* **38**.PP : 446-450. *Evolutionary Microbiology* 52: 1267–1276

Fitouri S. 2011. Diversité phénotypique et moléculaire des microsymbiotes du Sulla du Nord (*Hedysarum coronarium L.*) et sélection des souches efficaces.

Fitouri S.D., Trabelsi D., Saïdi S., Ben Jeddi F. et Mhamdi R. 2011. Diversity of rhizobia nodulating sulla (*Hedysarum coronarium L.*) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. *Ann Microbiol.* P : 8.

Fortin J. A., Plenchette C. et Piché Y., 2008 : Mycorrhizes de la nouvelle révolution verte. 2008. Canada. P148.

Frame, D. (2000) - *Hedysarum coronarium L.*, Leguminosae F.A.O

Franck, B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **7**: 332-

Free, J.B. (1993). Leguminosae: other Leguminosae. *Insect pollination of crops.* 2ed edition.

Furlan, V. 1981. Programm and abstracts. Fifth North American Conference en mycorrhizae. University Laval, Quebec, Canada.

Gallais A., et Bannerot H. 1992 : amélioration des espèces végétales cultivées (objectif et critères de sélection) Edition, INRA, paris. : 768.

Galzi D.,1978 : L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition : Bordas, Paris. PP : 53-90.

Garrity G.M., Bell J. A. and Lilburn T.G. 2004. Taxonomic out line of the prokaryote BERGEY'S MANUAL of systematic bacteriology. *Second Edition* NEW YORK.

Gate P., 1995. Ecophysiologie du blé. Edition : Technique et documentation Lavoisier ; Paris. P : 351.

Gaussem-G C., 1995. Désertification et aménagement au Maghreb.

Genevés L., 1990 : Biologie végétale : thallophytes et microorganismes ; édition : Dunod : BORDAS : Paris. P91.

Gharzouli R. 2006 : influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces *Rhizobium* sp. Mémoire de Magister. Université Mentouri de Constantine. Algérie .

Goicoichea N., 1998. Influence of arbuscular mycorrhize and *Rhizobium* on free polyamines and proline levels in wter-stressed alfalfa.

Grimaldi, A. (1961) Osservazioni e ricerche morfobiologiche sopra la sulla (*Hedysarum coronarium* L.). Ann. Fac. Agr. Perugia 16, 3-28.

Guignard J.L, 1982 : Abrégé de botanique. Ed, Masson, paris. P171.

Guignard J.L. 2001. Botanique Systématique Moléculaire. 12 □ □ □ édition Masson.

Guignard J.L. et Dupont F., 2007. Abrégé botanique ; 14^{ème} édition : *Masson*, Paris. P : 285.

Guingard J. L., Bouchet PH. et Villard J., 1999. Les chmpignons : Mycologie fondamentale et appliquée. Edition Masson, Paris. P : 183.

Guiraud J.P., et Galzy D., 1980: L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Nouveau tirage, collection: Génie Alimentaire. Edition de l'Usine.

Halary M.S., 2009 : Etude des symbiotes de mytilidés des écosystèmes marins profond à base chimiosynthétique par techniques de FISH, de microscopie et de traitement d'image, thèse de doctorat, université pierre et marie curie, P 213.

Hassani A, Della A, Belkhodja M, Kaid-Harche M. 2008. Effet de la Salinité Sur L'eau et Certains Osmolyte Chez L'orge (*Hordeum Vulgare*). European Journal of Scientific Recherche, ISSN 1450-216X. vol : 23 ; n° : 1. Pp : 61-69 .

Heller R., Esmault R. et lance C., 1989. Abrégé de physiologie végétale : Nutrition. Vol : 1. 4^{ème} édition. P : 273.

Hireche Y. 2006. Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L.) au stress hydrique et la profondeur du semis. Thèse de Magister. Batna. P : 83.

Hirsh Ann M., Kapulnik Y., 1998. Signal transduction pathways in mycorrhizal association: comparaison whith the Rhizobia-Legum Symbiosis. Fungal genetics and Biology 23. Pp : 205-212.

Hopkins W.G., 2003. Physiologie végétale. Université des Science et technologie de Lille.

- Hussain N, Sarwar G, Schmeisky H, Al-Rawahy S, et Ahmad M. 2010.** Salinity and Drought Management in Legume in Climate Change and Management of Cool Season Grain Legume Crops. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. Pp : 171-191.
- Issolah R., Benhizia H., et Khalafallah N. 2006.** Karyotype variation some natural population of Sulla (*Hedysarum coronarium L.*, Fabaceae) in Algeria. *Genetic Resources and Crop Evolution* **53**. Pp : 1653-1664.
- Jenkins MB. 2003.** Rhizobial and Bradyrhizobial symbionts of mesquite from the Sonoran Desert : salt tolerance, facultative halophily and nitrate respiration. *Soil biology & Biochemistry*. **35**. Pp : 1675-1682.
- Jomphe M., 2001 :** Mycorhizes à arbuscule. CERCO (Centre de Recherche de l'Est sur les Céréales et Oléagineux. Agriculture et agroalimentaire du Canada. Bulletin d'information. P : 6.
- Journet E.P., Carrouv., Golzy J., Thoquet P., Rosenberg C., Barker D., Huget T., Denarie J., Gamas P., 2001.** Génomique de la légumineuse modèle *Medicago trunculata* : état des lieux et perspectives. *Oléagineux, corps gras, lipides*. **8**. n°05. Pp : 478-483.
- Kinkema M., Scott P.T. and Gresshoff M. 2006.** Legume nodulation: successful symbiosis through short and long distance signaling. *Func. Plant Biol.* **33**. Pp : 707-721.
- Kulkarni S, Nautiyal CS. 1999.** Effects of Salt and pH Stress on Temperature-Tolerant Rhizobium sp. NBR1330 Nodulating *Prosopis juliflora*. *Current microbiology*. **40**. Pp : 221-226.
- Lanchamp J. P. 2001.** Rôle agronomique des mycorhizes arbusculaires (ma).
- Larpent J.P. et larpent-Gourgaud M., 1985 :** éléments de microbiologie, édition : Herman. P 464.
- Lazrek-Ben friha F. 2008 :** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de Doctorat. Université Toulouse III-Paul Sabatier, France.
- Lepoivre, 2003.** Phtopathologie, 1ere édition de boeck, Bruxelles. P : 427.
- Leveau J.Y., et Bouix M., 1993 :** Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc, Lavoisier. P : 612

Lindström K, Z. Terefework; L. Suominen; G. Lortet (2002). Signalling and development of Rhizobium-legume symbiosis. biology and environment: Royal Irish Academy vol. 102B, NO. 1, 61–64

Lüttge U., Kluge M. et Bauer G. 2002. La botanique 3^{ème} édition. Lavoisier, Paris.

Madingo M. et Martino J ; 2007 : Biologie des micro-organismes ; 11eme édition : Pearson ; P 1047.

Mainassara Z-A, Sitif B, L'Taief B et El Aouni MH. 2009. Paramètres agronomiques liés à la tolérance au stress salin, sel chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). Agron. Soc. Environ. V : 13. Pp : 113-119.

Marouf A. et Reynaud J., 2007 : La botanique de A à Z, édition : Paris. P 342

Martin F., et Plassard C., 1997. Assimilation de l'azote par les symbioses ectomycorhiziennes. In Assimilation de l'azote chez les plantes , aspect physiologique, biochimique et moléculaire, de Jean –François Morot-Gaudry. Edition INRA, Paris. Pp : 179-192.

Meyer A., Deiana J. et Leclerc H., 1999 : Cours de microbiologie générale nouveau programme édition Masson. P : 365.

Meyer S., Reeb C. et Bosdeveix R.2008. Botanique : biologie et physiologie végétales ; 2^{ème} édition : Maloine, Paris. P : 490.

Molle G, Decandia M, Giovanetti V, Cabiddu A, Fois N, Sitzia M. : responses to condensed tannins of flowering sulla (*Hedysarum coronarium* L.) grazed by dairy sheep. Part 1: effects on feeding behavior, intake, diet digestibility and performance.

Morot –Gaudry, J-F. (1997). Assimilation de l'azote chez les plantes, aspect physiologique, biochimique et moléculaire. Edition INRA, Paris. P : 422.

Mouellef A. 2010 : Caractères physiologiques de tolérance du blé dur (*Triticum durum* Desf) au stress hydrique. Mémoire de fin d'étude. Université Mentouri, Constantine. P : 93.

Munns D. N. 1977. Soil acidity and related factors. In J. M. Vincent, A. S. Whitney and J. Bose (eds.) pp. 211-236.

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R., 2000. L'essentiel en MICROBIOLOGIE. Berti Edition. Paris. P : 365.

- Nultsch W., 1998.** Botanique générale, édition, de Boeck, Paris. P 603.
- Ouhabi A. et Midiali A., 1996.** Effet des mycorhizes à arbuscules (ma) sur la croissance et la composition minérales du trèfle. <<Agriculture>>. Vol :5, N°5. P : 382-386.
- Ozenda P., 1982.** Les végétaux dans la biosphère. Doin éditeurs. P : 431.
- Ozenda P., 2000.** Les végétaux organisation et diversité biologique. 2eme édition, Masson. Paris. P : 516.
- Ozenda P., 2006.** Les végétaux : Organisation et diversité biologique. 2^{ème} édition. Dunod. P : 516.
- Perry J.J., staley J.T., Lory S., 2004.** Microliologie. Edition Dunod, Paris.
- Pieterneel V.R et Vanderlyden J. 1995.** The Rhizobium plants symbiosi. *Microbiol. Rev.* **59**. PP : 124-142.
- Pindard A., 2000.** La relation stress hydrique- rendement du maïs en Bresse : Qu'elle perspective de spatialisation ? Utilisation d'un simulateur de culture (STICS). Mémoire d'ingénieur d'agronomie. Dijon. P : 86.
- Quezel P., Santa S., 1962 :** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- Rao DLN, Giller K.E., Yeo A.R. and Flowers T.J. 2002.** The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot.* **89**. Pp : 563-570.
- Raven P.H., Evert Ray F. et Eichhom Susan E., 2000:** Biologie végétale, edition: Paris. P 968.
- Rekika D., 1997.** Identification et analyse génétique des caractères physiologiques au rendement en conditions de sécheresse chez le blé dur. Intérêt potentiel des espèces sauvages apparentées pour l'amélioration de ces caractères. Thèse de Doctorat ENSA-M/INRA. P : 740.
- Rengel., 2002.** Breeding for better symbiosis. Plant and soil.
- Richter G., 1993.** Métabolismes des végétaux. Presse polytechniques et universitaire romands. Edition Lavoisier. P : 525.

- Robert D. et Catesson A.M., 2000** : Organisation végétative; Edition : Paris, P 356
- Roger P., Dommergue Y., Blandreau J., Dreyfus B. et Sougoufara B. 1996.** La fixation biologique de l'azote : Quelles potentialités pour le développement ? Conférence-débat de L'ORSTOM. P : 7.
- Roland J.C., El Maarouf-Bouteau. et Bouteau F.,2008.** Organisation des plantes sans fleurs, algues et champignons. 7^{ème} édition, *Dunod* ; Paris. P : 154.
- Roquebert M. 1988.** Moisissures des aliments hydratés. Ed. Lavoisier. *Tec et Doc*. P : 503.
- Ruivenkamp G., et Richards P., 1994.** La recherche sur la tolérance à la sécheresse : Un processus social. *Le Moniteur de la Biotechnologie et du Développement*. **18**. Pp : 3-6.
- Sawada H., David Kuykendall L., and Young J.M. 2003.** Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J.Gen. Appl.Microbiol.***49**. PP : 155-179.
- Schützendubel A. et Pole A., 2002.** Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*. Vol : 53; n°: 372. P : 1351-1365.
- Sebbane N., 2001:** caractérisation phénotypique et génotypique de souches de rhizobias isolées de quatre espèces de *Medicago* de la région de Bejaia. Thèse, magister, Univ.Bejaia.p :111
- Selenska-Pobell S., Evguenieva-Hackenberg E., Radeva G. and Squartini A. 1996.** Characterization of *Rhizobium hedysari* by RFLP analysis of PCR-amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 517-528.
- Selosse M.A., 2009** : la symbiose structures et fonctions, rôle écologique et évolutif, édition Dunod, P154.
- Semadeni, A. (1976).** Le sulla en Tunisie, (741).
- Slama A., Ben Salem M., Ben Naceur M., et Zid E. 2005.** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance, *Sécheresse*. Vol : 16, n°3, 225—9. Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT).
- Somasegaran P., Hoben H.J. 1994.** Handbook for Rhizobia :Methods in legume-Rhizobia technology .P.450.Springer-Verlag.new York.
- Somasegaran P., Hoben H.J.,1994.** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York.

- Somasegaran P., Hoben H.J.1985.** Methods in legumes –rhizobium technology.P:1-331.Niftal.University.
- Spichiger R-E., Savolainen.V.V., Figeat M., Jeanmonod D. 2002.** Botanique, systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. Edition : Press polytechnique et universitaires romandes. P : 413
- Squartini A., Struffi P., Do-ring H., Seleska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S. and Nuti M. P. 2002.** *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *Rhizobium hedysari*): The root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. Int J Syst Evol Microbiol 52: 1267-1276.
- Stenström E., Damm E., et Unestam T., 1997.** Le role des mycorhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogènes du sol. Pp : 121-128.
- Struffi, P., V. Corich; A. Giacomini; A. Benguedouar; A. Squartini; S. Casella; and M. P. Nuti .1998.** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia
- Strullu D., 1991.** Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Edition : Tec et Doc, Lavoisier. P : 248.
- Tak T., van Spronsen P. C., Kijne J.W., van Brussel A. A. N. and Kees Boot J. M. 2004.** Accumulation of lipochitin oligosaccharides and NodD-activating compounds in an efficient plantRhizobium nodulation assay. Mol. Plant. Interac. 17: 816-823.
- Tan Z., En T., Gui X.P., Ming E. Z., Esperanza M.R. and Wen X.C 1999.** Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *International journal of systematic bacteriology*. **49**. PP : 14576-1469.
- Toffanin A., Wu Q., Maskus M., Casella S., Abruna H. D. and Shapleigh J. P. 1996.** Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the nondenitrifying *Rhizobium `hedysari`* strain HCNT1. Appl Environ. Microbiol. 62 :4019-4025.
- Tortora G.J., Funk B.R. et Case C.L.2003.** Introduction à la microbiologie. *Edition Renouveau Pédagogique Inc.*
- Traquair J., 2003 :** Les champignons et les mycorhises. Agriculture et agroalimentaire Canada. P : 1-14. **Tscharntke T., Bommarco R., Clough Y., Crist T.O., Kleijn D., Rand T. A., Tylianakis J. M., van Nouhuys S. and Vidal S. 2007.** Conservation biological control and enemy diversity on a landscape scale. Biological Control 43(3): 294-309.

- Van Berkan P., Terefework Z., Pawlin L., Suoma Lines S. Lindstrom K. and Bertland D. 2003.** Discordant phylogenetic within the *rrn* loci of rhizobia. *Journal of Bacteriology*. **185**. n° 10. PP : 2988-2998.
- Vance C.P. 1991.** Root Bacteria interaction-Symbiotique Nitrogen fixation. *Sci. J.* Pp : 13065, 671-702.
- Vance C.P., Heichel, G.H. and Philips D.A. 1988.** Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. *Alfalfa and alfalfa Improvement-Agronomy*. **29**. Pp : 229-257.
- Vernié T. 2008 :** analyse fonctionnelle d'EFD, un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat. Université Toulouse III, France. P : 26.
- Vincent J.M. 1970.** A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP. Handbook n°15 – Blackwell scientific publishers, Oxford.
- Werner D., 1992.** Symbiosis of plants and microbes. Edition Chapman & Hall. Germany.
- Woese C.R. 1987.** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**. Pp : 221-271.
- Yesli S., Lahcen N. 2005.** Isolement et identification des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Medicago* des régions salées de Bejaia. Mémoire de fin d'étude. Université de Bejaia.
- Zablotowicz R. M. and D. D. Focht. 1981.** Physiological characteristics of cowpea rhizobia evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 679-685.
- Zahran H.H. 1999.** Rhizobium-legume symbioses and nitrogen fixation under severe conditions in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*. **63** n°4. pp. 968-989.
- Zahran H.H. 2001.** Rhizobia from wild legumes; diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*. **91**. Pp. 143-153.
- Zerhari K. 2000.** Diversité phénotypique et génotypique des rhizobia isolés de régions arides et sahariennes du Maroc nodulant quatre espèces d'*Acacia* : *A. cyanophylla*, *A. gummifera*, *A. horrida* *trottilis* sub-espèces *raddiana*. Thèse de doctorat. Université MOHAMMED V-AGDAL. Pp : 104.

Références numériques

Nicole ouelette, 2001 : les légumineuses .

www.ouelette.com.

<http://www.fondation-nicolas-hulot.org/page.php?id=1>

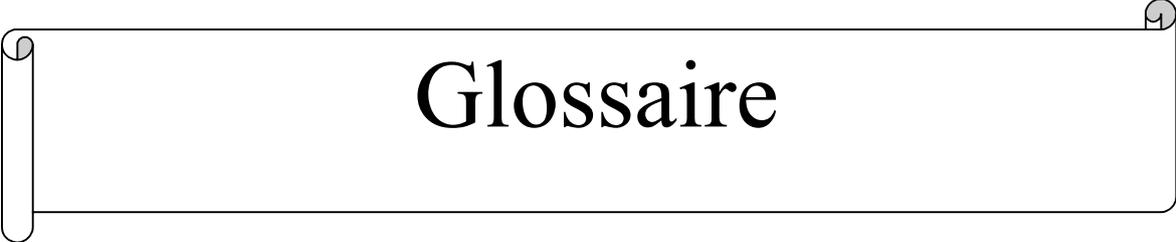
Hans Selye, 1936 : Le stress.

Données Encarta 2009.

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Stress_hydrique_\(homonymie\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Stress_hydrique_(homonymie)).

WEIR, 2013 : taxonomie courante des rhizobia (2 Mai 2013).

<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.



Glossaire

Conidie: Spore asexuée, unie ou pluricellulaire, capable de multiplier l'espèce : produite par un conidiophore.

Gousse : Fruit sec, provenant d'un seul carpelle et s'ouvrant à maturité suivant deux fentes longitudinales en deux valves pour libérer les graines disposées en deux rangées alternantes.

Hyphe : Filament mycélien, cloisonné ou non, dont l'ensemble constitue le thalle des champignons.

Mycélium : Filament ou hyphes constituant le thalle.

Mycose : En pathologie c'est une infection externe ou interne causée par des champignons microscopiques.

Nodosité : Excroissance formée sur les racines et /ou les tiges des légumineuses à la suite de leur infestation par les bactéries fixatrices d'azote.

Réceptacle : Extrémité plus ou moins élargie, plane, convexe ou concave du pédoncule sur laquelle s'insèrent les divers éléments constitutifs d'une fleur.

Sporange : Chez les ptéridophytes, organe en forme de sac, limité par une ou plusieurs assises cellulaires.

Spore : Organe uni ou pluricellulaire, ou produit de façon diverse et pouvant reproduire l'espèce ; terme générale pouvant être remplacé par un nom plus spécifique suivant leur mode de formation ; conidie, ascospore...

Thalle : masse végétative des champignons.



Annexes

Milieux de culture utilisés

1-pour les champignons :

Milieu PDA (pomme de terre glucosée et gélosée) (DAVET et ROUXET ,1997) :

- Faire cuire 200 g de pomme de terre pelées, lavées et coupées en tranches fines dans 1 l d'eau pendant 1 h.
- Filtrer puis presser pour exprimer le liquide restant.
- Ajouter 20 g de glucose et 15 à 20 g de gélose.
- Compléter à 1 l si nécessaire. Stériliser à l'autoclave 15 minutes à 120°C.

2-pour les bactéries :

Milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA) en g/l (VINCENT, 1970) :

Mannitol	10g
Extrait de levure	0,4g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSo ₄ 7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Agar	15g
H ₂ O	1000ml

Ajuster le PH à 6,8

Milieu Yeast-Mannitol-Broth (YMB) en g/l (VINCENT, 1970): milieu YMA sans agar

Mannitol	10g
Extrait de levure	0,4g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSo ₄ 7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
H ₂ O	1000ml

Ajuster le PH à 6,8.

Milieu de Jensen en g/l (VINCENT, 1970) :

Ca HPO₄	1X Concentré	10X Concentré
K₂HPO₄	1 g	5 g
MgSO₄ 7H₂O	0,2 g	1 g
Na Cl	0,2 g	1 g
F₂ cl₃	0,2 g	1 g
Oligoéléments (solution)	1 ml	0,5 ml

Test gram

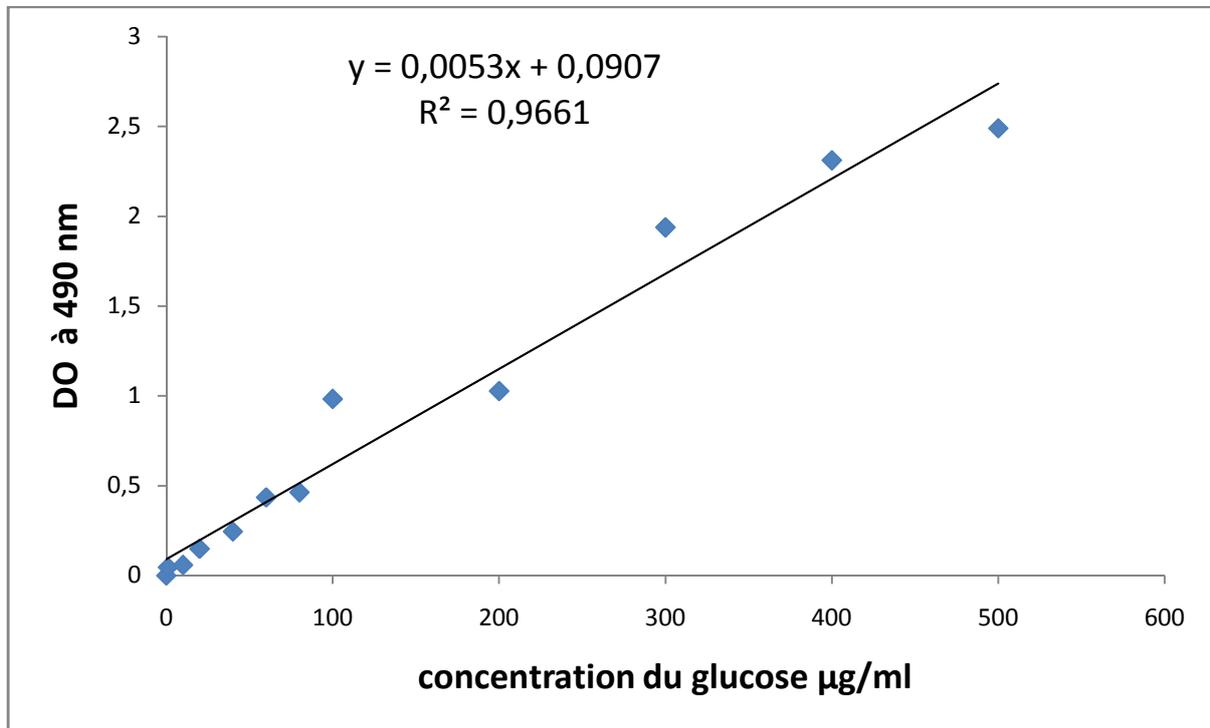
1) Réalisation d'un frottis :

- Prélever une goutte de la suspension bactérienne et la déposer au centre de la lame.
- Étaler la suspension bactérienne avec l'anse de platine sur la lame de façon à obtenir un étalement mince de 1 à 2 cm.
- Sécher et fixer en portant la lame au dessus de la flamme du bec bensen (la lame est tenue avec une pince en bois).
- Procéder à la coloration voulue.

2) Coloration de Gram :

- Déposer 1 à 2 gouttes de violet de gentiane sur le frottis préparé, laisser agir 30 secondes à 1 mn.
- Rincer avec de l'eau distillée.
- Appliquer le lugol qui est un fixateur, laisser agir 20 secondes.
- Rincer avec de l'eau distillée.
- Décolorer rapidement en versant l'alcool éthylique goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement.

Passer ensuite à l'observation microscopique, grossissement X100.



Courbe d'étalonnage

Résultats des analyses statistiques

I. Teneur en eau

I.1.conditions sous stress

	SS	DDL	MS	F	p
Intercept	9918,750	1	9918,750	14186,53	0,000000
Facteur	237,877	3	79,292	113,41	0,000001
Error	5,593	8	0,699		

Groupes homogènes :

	Facteur	TE - Mean	1	2	3
1	1	23,93333		****	
4	4	27,00000	****		
3	3	28,06667	****		
2	2	36,00000			****

I.2.conditions sous stress

	SS	DDL	MS	F	p
Intercept	61375,60	1	61375,60	66292,28	0,000000
Facteur	239,11	3	79,70	86,09	0,000002
Error	7,41	8	0,93		

Groupes homogènes :

	Facteur	TE - Mean	1	2	3	4
1	1	66,16667	****			
4	4	68,90000		****		
3	3	73,00000			****	
2	2	78,00000				****

II. Teneur en sucres solubles

II.1. conditions sous stress

	SS	DDL	MS	F	p
Intercept	1745,564	1	1745,564	3244,895	0,000000
Facteur	137,712	3	45,904	85,333	0,000002
Error	4,304	8	0,538		

Groupes homogènes :

	Facteur	TE - Mean	1	2	3	4
1	1	66,16667	****			
4	4	68,90000		****		
3	3	73,00000			****	
2	2	78,00000				****

II.2. conditions sans stress

	SS	DDL	MS	F	p
Intercept	55,04083	1	55,04083	559,7373	0,000000
Facteur	10,78250	3	3,59417	36,5508	0,000051
Error	0,78667	8	0,09833		

Groupes homogènes :

	Facteur	TE - Mean	1	2	3	4
1	1	66,16667	****			
4	4	68,90000		****		
3	3	73,00000			****	
2	2	78,00000				****

Résumé :

Ce travail consiste en l'isolement et l'étude de quelques souches bactériennes nodulant la légumineuse fourragère *Hedysarum coronarium*. L'inoculation par ces bactéries appartenant à l'espèce *Rhizobium süllea* (microsymbiote spécifique du Sulla) et un champignon mychorizien, améliore considérablement le rendement en biomasse des plantes et augmente leurs teneurs en eau, grâce au réseau mycélien dense formé par le champignon, et qui prospecte le sol assurant ainsi une bonne nutrition hydrique et minérale, et à l'alimentation azotée assurée par la bactérie. La plante *Hedysarum coronarium* présente une accumulation des osmorégulateurs (sucres solubles) lui permettant de lutter contre le stress hydrique. Cette accumulation s'atténue en la présence du champignon ou de la bactérie, et s'atténue encore d'avantage en présence des deux, ensemble (champignon+bactérie), ce qui est un signe de résistance de la plante à la contrainte hydrique.

Mots clé : légumineuse, *Hedysarum coronarium*, *Rhizobium süllea*, champignon mychorizien, symbiose, stress hydrique, sucres solubles.

Abstract:

This work consists on the study of some bacterial strains isolated from root nodules of the fodder leguminous plant *Hedysarum coronarium*. The inoculation by this bacteria belonging to *Rhizobium süllea* specie (specific microsymbiot of sulla) and a fungi, improves considerably the output in biomass of the plant and increases their water contents, thanks to the dense mycelia network formed by the fungi, wich prospect the ground, ensuring a good hydrous and mineral nutrition, and the nitrogenized food ensured by the bacteria. The plant *Hedysarum coronarium* presents an accumulation of the osmoregulators (soluble sugars) enabling it to fight against the hydrous stress. This accumulation attenuates in the presence of the fungi or the bacteria and still attenuates more in the presence of both the bacteria and the fungi; wich is a sign of strength of the plant to the hydrous constraint.

Key words: leguminous, *Hedysarum coronarium*, *Rhizobium süllea*, fungi, symbiosis, hydrous stress, soluble sugars.