

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



Faculté des Sciences.

Département de biologie 2ème année Master

Thème :

Contribution à l'étude de la double association mycorhize rhizobium de *Medicago sativa* L

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : biotechnologie et génomique végétal

Présenté par :

M elle BENHEKKOU Lamis

M elle ZAGGAI Ikram

| | | |
|---------------------|--|-----------------------------|
| Président | : Mme Chalane Fatiha Maitre assistant A | Université Dr. Moulay Tahar |
| Examinatrice | : Mr Ammam Abdelkader Maitre assistant A | Université Dr. Moulay Tahar |
| Encadreur | : Mme. Fares Soria Maitre assistant A | Université Dr. Moulay Tahar |

Année universitaire 2020/2021

Remerciement

Avant toute chose, nous remercions Dieu le tout puissant qui nous avons offert la volonté et la vigueur pour réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à FARES SOURIA qui fut pour plus qu'une directrice de thèse. Malgré ses nombreuses charges, elle a toujours été attentive et disponible. J'aimerais la remercier pour tout le temps qu'elle m'a consacré tout au long de ces années, tant sur le plan personnel que scientifique. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de notre travail de chercheur.

Je tiens à remercier tous les membres du jury et notamment Professeur AMMAM ABD EL KADDER, Docteur Christophe VERONESI et Docteur Naceur DJEBALI qui ont accepté de lire et d'évaluer notre manuscrit et de participer à mon jury de thèse.

Nous remercierons tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents MAAMAR F et ZAGGAI MOHAMMED, Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. En témoignage de tant d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières, pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous vos efforts. EN CE JOUR, J'ESPERE REALISER L'UN DE VOS REVES.

A mes très chères sœurs : très chers frères

A mon encadreur Mme S-Fares Que Dieu exauce ses vœux les plus chers.

A qui m'accompagné a tous moment pour réaliser ce modeste travail a

Mon binôme : lamis Benhekkou

Et enfin à tous mes amis, tous ceux que j'aime et tous ceux qui m'aiment.

Dédicaces

J'adresse cette dédicace :

A qui ont toujours été à mes cotés ;

*A ceux qui m'ont toujours soutenu dans les moments les plus difficiles
et avec lesquels j'ai partagé les meilleurs et mauvais moments ;*

A ceux qui ont participé avec force à la construction de mon avenir ;

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie,

*qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui a été à mes cotées
durant toutes les années de mes études, à ma très chère mère Zihouf F.*

*A mon cher père ABd el rahmane, qui a toujours été là pour moi,
et qui ma encouragé pendant toute ma vie.*

À toute ma famille (Zihouf et Benhekkou).

*À mon binôme Ikram Zaggai pour leurs soutiens et son
patience Pendant la période de réalisation de mémoire.*

Lamis Benhekkou

Liste de tableau :

Tableau 1:Classification récente des BNL (Berrada et Benbrahim, 2014).....20

Table de figures

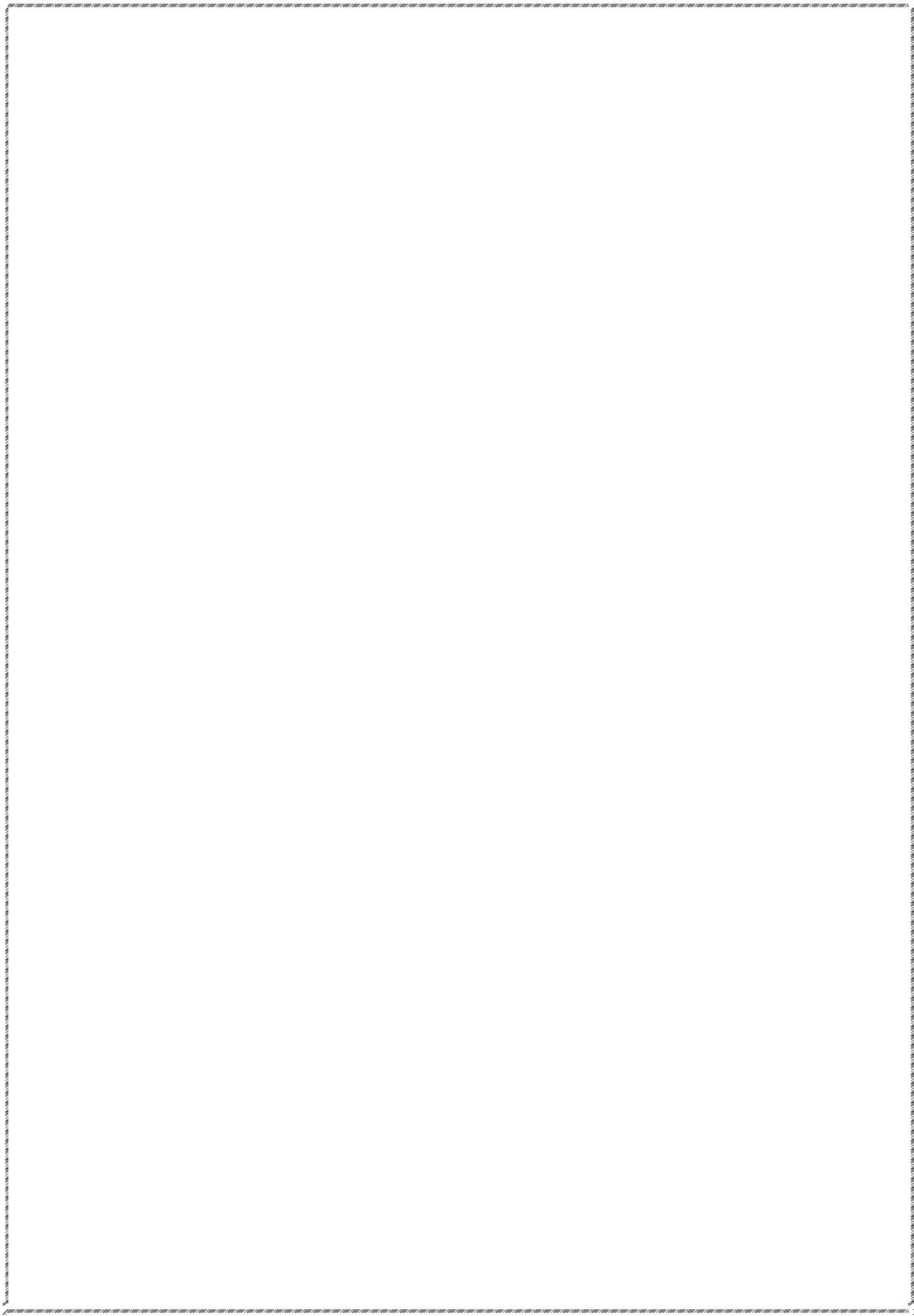
| | |
|---|----|
| Figure 1:Principaux types mycorhiziens d’après de Le Tacon, 1985 | 6 |
| Figure 2:Représentation schématique d’une MA (Fortin et al., 2008). | 9 |
| Figure 3:Arbuscule fongique de Glomus. | 10 |
| Figure 4:Racine endomycorhizées environnées de mycélium portant des spores (photo de Yolande Dalpé) citée dans (Garbaye, 2013). | 11 |
| Figure 5:Aspect des cellules auxiliaires (AC) (Bago et Cano, 2005)..... | 12 |
| Figure 6:Schéma des grandes étapes de la symbiose à arbuscules. Progression des structures fongiques (violet) dans les racines de l’hôte. Source: D’après Gutjahr and Parniske, 2013..... | 14 |
| Figure 8:Bactéries du genre Rhizobium vues au microscope (x 1 000) Schéma montrant | 18 |
| Figure 7:Morphologie de rhizobium trifoili | 18 |
| Figure 9:Aspects macroscopique des rhizobiums (ASMA ,2008) | 20 |
| Figure 10:les nodules chez légumineuses | 25 |
| Figure 11:Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses. D’après Brennic et Winans (2005). | 26 |
| Figure 12:A : Ramification du cordon d’infection et progression vers le cortex interne qui est en cours de division pour former le primordium puis le méristème nodulaire. Les flèches représentent l’initiation de la mitose dans ces cellules. | 27 |
| Figure 13:La structure du nodule. | 29 |
| Figure 14:Fixation biologique de l’azote lors d’une relation symbiotique..... | 31 |
| Figure 15:Les nodules de la plante Medicago sativa.L..... | 42 |
| Figure 16:Couleurs de bleu bromothymol | 44 |
| Figure 17:virage de couleur après hydrolyse de l’urée. | 45 |
| Figure 18:Germination des grains de Médicago sativa | 46 |
| Figure 19:Schéma explicatif du test d’infectivité des isolats réalisé in-vitro. | 47 |
| Figure 20:dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton et Walker(1992). | 48 |
| Figure 21:Schéma représentatif des étapes d’éclaircissement et coloration des racines. | 50 |
| Figure 22:Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l’identification microscopique. | 51 |
| Figure 23:Echelle d’intensité de colonisation du cortex racinaire | 52 |
| Figure 24:Echelle d’évaluation de la présence des arbuscules | 53 |

Figure 25:Classification des différents niveaux de colonisation mycorhizienne du cortex racinaire d'après Trouvelot et al., 19853

Figure 26:Extraction des spores des champignons endomycorhiziens selon la méthode de Gerdemann et Nicolson (1963).54

Table de matière

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| I.1 Interactions plantes-symbiotes..... | 5 |
| I.2 symbiose mycorhizienne..... | 5 |
| I.2.1 Les différents types de la symbiose mycorhizienne :..... | 5 |
| I.3 Symbiose mycorhizienne à arbuscules..... | 6 |
| I.3.1 Partenaires de la symbiose mycorhizienne à arbuscules | 8 |
| I.4 Symbiose rhizobienne | 17 |
| I.4.1 Caractéristiques des rhizobia | 17 |
| II La vie en symbiose chez les légumineuses et les microorganismes..... | 31 |
| II.1 Historique de la symbiose tripartite..... | 31 |
| II.2 Intérêt de la symbiose tripartite | 31 |
| II.3 La symbiose tripartite entre luzerne- rhizobiums et mycorhizes..... | 32 |
| III Technologie de production d'inoculum | 35 |
| III.1 Inoculum mycorhizien :..... | 35 |
| III.2 Méthodes de production Inoculum mycorhizien..... | 36 |
| III.2.1 Etapes de production d'inoculum mycorhizien..... | 36 |
| III.2.2 Qualité des inoculum..... | 37 |
| III.2.3 Production industrielle d'inoculant mycorhizien | 37 |
| III.3 Production d'inoculum rhizobien..... | 38 |
| III.3.1 Les différents types d'inoculum | 38 |
| III.3.2 Choix de support | 39 |
| III.3.3 Conservation et emploi d'inoculum | 39 |
| III.3.4 Facteurs affectant la réponse de l'inoculum rhizobienne..... | 39 |
| IV Les méthodes d'étude de la symbiose mycorhizienne et rhizobienne au niveau laboratoire :..... | 42 |
| IV.1 Méthodologie suivie pour l'étude des <i>Rhizobium</i> | 42 |
| IV.1.1 Isolement des rhizobia à partir de nodosités récoltées <i>in-nature</i> | 42 |
| IV.2 Méthodologie suivie pour l'étude des Mycorhizes..... | 48 |
| IV.2.1 Piégeage des endomycorhizes | 48 |
| IV.2.2 Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes .. | 49 |
| Bibliographie | 58 |



Résumé

Cette étude rentre dans le cadre des activités de recherches interdisciplinaire et participative de l'intégration des microorganismes dans le système de l'agriculture au niveau de notre université DR. TAHAR Moulay SAIDA. Et dans le but d'application de la double inoculation avec les champignons mycorhiziens et les rhizobiums pour la croissance et le développement durable.

Notre étude a porté dans la première partie de récapitulé les connaissances acquise sur la diversité des champignons mycorhiziens et des bactéries fixatrices d'azote associées au légumineuses. Et la deuxième partie est consacrée sur l'intérêt de la symbiose tripartite chez les légumineuses et les microorganismes. Inspirée par les succès d'inoculation mycorhiziennes et rhizobiennes dans la troisième partie nous avons détaillées les technologies de production d'inoculum et la quatrième partie relate Les méthodes d'étude de la symbiose mycorhizienne et rhizobienne au niveau de laboratoire

Mots clés : microorganismes, champignons mycorhiziens, rhizobiums, développement durable, bactéries fixatrices d'azote, symbiose tripartite,

ملخص

هذه الدراسة هي جزء من الأنشطة البحثية متعددة التخصصات والتشاركية لدمج الكائنات الحية الدقيقة في النظام الزراعي في جامعتنا الدكتور مولاي الطاهر سعيدة.

وبهدف تطبيق التطعيم المزدوج بالفطريات الفطرية والجذيرية للنمو والتنمية المستدامة.

ركزت دراستنا في الجزء الأول من تلخيص المعرفة المكتسبة حول تنوع الفطريات والبكتيريا المثبتة للنيتروجين المرتبطة بالبقوليات.

والجزء الثاني مخصص لمصلحة التعايش الثلاثي في البقوليات والكائنات الحية الدقيقة. مستوحاة من نجاحات التلقيح الفطري والجذري.

في الجزء الثالث، قمنا بتفصيل تقنيات إنتاج اللقاح.

ويتعلق الجزء الرابع بطرق دراسة التعايش الفطري والجذري على مستوى المخبر.

الكلمات الرئيسية: الكائنات الحية الدقيقة، الفطريات الجذرية، الجذور، التنمية المستدامة، البكتيريا المثبتة للنيتروجين، التعايش الثلاثي.

Abstract

This study is part of the interdisciplinary and participatory research activities of the integration of microorganisms into the agricultural system at our university DR. TAHAR Moulay SAIDA. And with the aim of applying the double inoculation with mycorrhizal fungi and rhizobia for growth and sustainable development.

Our study focused in the first part of summarizing the knowledge acquired on the diversity of mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria associated with legumes.

And the second part is devoted to the interest of the tripartite symbiosis in legumes and microorganisms. Inspired by the mycorrhizal and rhizobial inoculation successes.

in part three we have detailed the inoculum production technologies and part four relates to the study methods of mycorrhizal and rhizobial symbiosis at the laboratory level

Key words: microorganisms, mycorrhizal fungi, rhizobia, sustainable development, nitrogen fixing bacteria, tripartite symbiosis,

introduction

Introduction général

Dans le contexte actuel où les approches respectueuses de l'environnement sont de plus en plus valorisées, les choix mondiaux s'orientent vers une agriculture durable qui repose sur l'utilisation de moins d'intrants d'engrais chimiques et qui favorise l'utilisation des produits biologiques jouant un rôle important dans la lutte contre les différents problèmes environnementaux associés à la surfertilisation et la pollution massive des sols et de l'eau. Les nitrates et phosphates notamment, présents dans les engrais chimiques, atteignent les cours d'eau et les nappes phréatiques par infiltration.

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

Les problèmes cités peuvent être résolus en profitant du fait qu'une bonne nutrition azotée peut être garantie par la plante elle-même à partir de l'azote atmosphérique. En effet, dans le cadre d'un phénomène biologique naturel qui est la symbiose, certaines espèces végétales, surtout les légumineuses, s'associent à des bactéries de sol, notamment les rhizobiums (Vitousek et al., 1997). Cette association comble directement les besoins de la plante en azote en fixant des quantités importantes d'azote atmosphérique ce qui peut donner un apport annuel de 110-227 kg N/ha (Herridge et al., 2014).

En plus de leur association symbiotique avec les rhizobiums, les légumineuses sont capables d'établir d'autres associations symbiotiques avec les champignons mycorhiziens arbusculaires, qui leur garantissent une bonne croissance, une protection contre les conditions de stress et une meilleure productivité (Evelin et al., 2009; Elmer et Pignatello, 2011).

Le développement et l'amélioration des légumineuses nécessitent l'installation d'une microsymbiose, cette approche implique une sélection des deux partenaires de la symbiose, d'une autre part, d'après les travaux réalisés sur l'effet bénéfique des champignons mycorhiziens à arbuscules(CMA) sur le microsymbiote rhizobium, l'interaction de ces microorganismes sont des

relations impliquant un échange bidirectionnel de ressources entre la plante et microsymbiose. Dans cette association à bénéfice réciproque, le champignon mycorhizien arbusculaire améliore la nutrition hydrominérale en particulier la nutrition phosphatée, la réduction sensible de la pression parasitaire, alors que les rhizobiums accroissent la nutrition azotée en fixant l'azote atmosphérique. En retour, ces micro-organismes reçoivent de leurs plantes hôtes, les produits de la photosynthèse nécessaires à leur développement.

La maîtrise de ces associations plantes/microorganismes permet d'améliorer durablement la production des écosystèmes et de lutter contre la dégradation de l'environnement en maintenant et régénérant la fertilité des sols.

Les pratique d'inoculation se sont avérées une solution très efficace pour entrainer des augmentations rendements des cultures et pour réduire les intrants minéraux notamment le phosphore et l'azote. Il a été démontré que certains microorganismes du sol tels que les champignons mycorhiziens et les rhizobiums, ont la faculté d'acquisition par les nutriments majeurs (Strullu, 1991 ; Koide et Mosse, 2004).

Toutefois, peu de travaux de recherche ont porté sur les effets des combinaisons des rhizobia et des champignons mycorhiziens sur la croissance des végétaux.

Fort de ce constat, nos actions se sont inscrites dans deux directions : scientifique, développement et valorisation. Sur le plan scientifique, nos objectifs ont été d'abord de caractériser la diversité des associations symbiotiques mycorhiziennes en général et fixatrices d'azote dans le cas des légumineuses notamment les *Medicago* , Sur le plan du développement et de la valorisation, l'objectif est de proposer des méthodologies susceptibles d'intéresser directement le développement durable et les entreprises du domaine des biotechnologies ; qui serait donc très important de penser à optimiser davantage la relation symbiotique tripartite dans les systèmes agricole notamment en Algérie.

I.1 Interactions plantes-symbiotes

Il existe une multitude d'interactions entre les plantes et leur environnement biotique et abiotique depuis l'émergence de celles-ci. (Simon, *et al* ; 1993, Brundrett, 2002), les plantes ont adopté des stratégies en relation avec leur survie, leur évolution et leur pouvoir d'adaptation. Parmi celles-ci, les systèmes racinaires ont établi des relations, avec des microorganismes telluriques. (Simon *et al* ; 1993). Parmi ces interactions, les associations entre les *Rhizobium* et les légumineuses aussi les associations entre les mycorhizes et les légumineuses. De ce fait nous présentons une synthèse sur les deux symbioses telluriques rhizobienne et mycorhizienne dans la section suivante.

I.2 symbiose mycorhizienne

Dans la nature, la majorité des végétaux terrestres vit en symbiose avec des champignons. Cette étroite relation entre les plantes supérieures et les micro-organismes que sont les champignons s'élabore au niveau des racines. Les organes résultants de cette association sont appelés mycorhizes. Le terme « mycorhize » a été proposé par (Frank, 1885), il vient de la combinaison de deux mots, l'un grec *mukes* (champignon) et l'autre latin *rhiza* (racine), il désigne donc essentiellement l'association symbiotique entre des champignons et les racines des plantes presque, toujours chlorophylliennes (Smith et Read, 1997).

On estime à 90% la proportion de familles de plante pouvant former des associations mycorhiziennes (Brundrett, 2002).

I.2.1 Les différents types de la symbiose mycorhizienne :

Selon le partenaire fongique, il existe plusieurs formes d'associations mycorhiziennes. En effet, sept types de mycorhizes ont été définis, se différenciant par des caractères systématiques, morphologiques et physiologiques, dont deux prédominants chez les légumineuses : les mycorhizes à arbuscule vésicule (M. A. V) et les ectomycorhizes (Peterson *et al.* 2004) (figure1).

I.2.1.1 Ectomycorhizes (ECM)

Ils existe environ 6000 espèces de plantes à ectomycorhizes (Rinaldi *et al.*, 2008 ; Brundrett, 2009 ; Tedersoo *et al.*, 2010) ; ces plantes appartiennent aux angiospermes (environ 6500 espèces), Gymnospermes (285espèces) (Smith et Read, 2008 ; Vander Heijden *et al.*, 2008 ; Matsuda *et al.*, 2009 ; Brundrett, 2009). La diversité des champignons ectomycorhiziens est estimée entre 20 000 à 25 000 espèces (0,5 à 0,7 % de la diversité fongique totale). Le degré de spécificité varie; certaines espèces de champignons sont spécifiques à une seule espèce d'hôte, tandis que d'autres peuvent former des ECM avec une large gamme de plantes (Allen, 1992).

Chez Les ectomycorhizes (du grec *ektos* : à l'extérieur), la racine mycorhizée, elle présente la morphologie d'une racine courte, renflée, ramifiée, ou même peu prendre la forme d'un racème (grappe) (Dexheimer, 1997 ; Fortin *et al.*, 2008). Où les champignons se développent essentiellement autour de la racine, en formant un manchon mycélien (le manteau) à partir duquel se développent des hyphes qui s'insèrent entre les cellules corticales de la racine pour former (le réseau de Hartig) (Fortin *et al.*, 2008). Le réseau s'étend jusqu'au cylindre central ou reste aux premières assises cellulaires (Dexheimer, 1997), dans lequel le mycélium ne se développe pas dans les cellules hôte (Fortin *et al.*,

2008). La plupart des champignons ectomycorhiziens se reproduisent par voie sexuée lorsque les conditions sont favorables, les hyphes dicaryotiques donnent naissance à des fructifères (carpophores épigés ou hypogés) (Kernaghan, 2005).

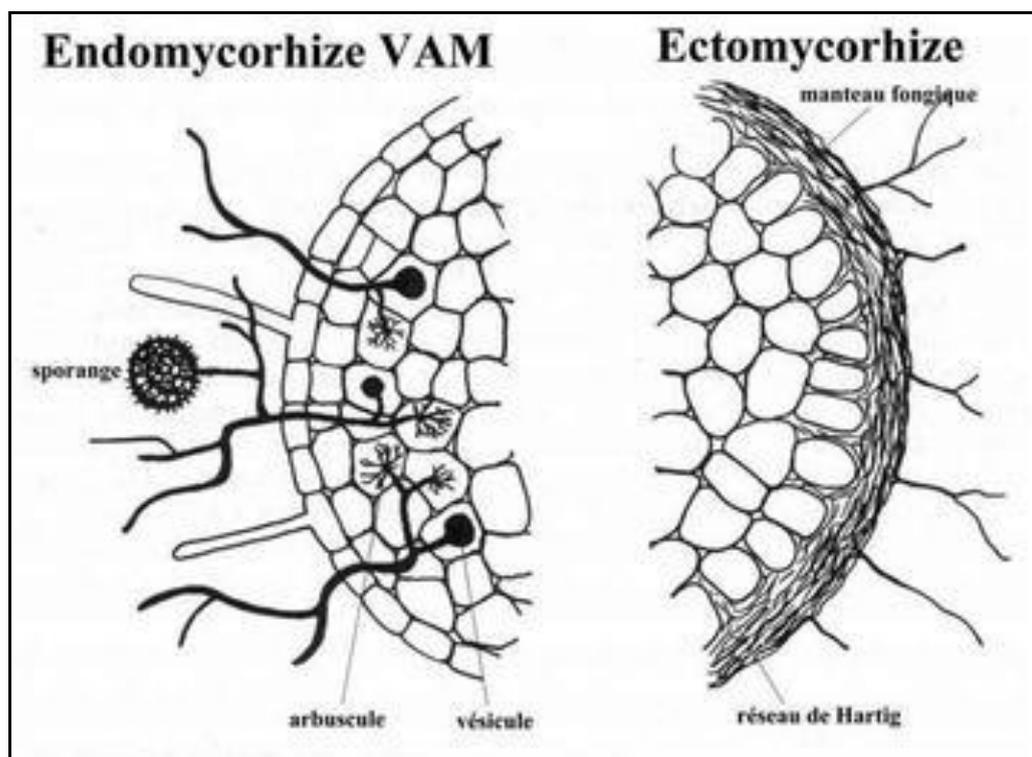


Figure 1: Principaux types mycorhiziens d'après de Le Tacon, 1985

I.2.1.2 Endomycorhizes

Endomycorhize (du grec endon : à l'intérieur) sont caractérisées par l'absence de manchon mycélien externe et par la pénétration des hyphes fongiques dans les cellules corticales. On rencontre : les endomycorhizes éricoïdes et les endomycorhizes d'orchidées, qui forment des pelotons d'hyphes intracellulaires, et les endomycorhizes à arbuscules qui colonisent l'intérieur des cellules sous forme d'arbuscules (Fig. 1) (Smith et Read, 2008).

Une étude détaillée sur MA sera présentée dans la section suivante du fait qu'elles ont fait l'objet de notre travail.

I.3 Symbiose mycorhizienne à arbuscules

Les mycorhizes à arbuscules sont les plus primitives et les plus répandues dans les écosystèmes naturels et cultivés (Tedersoo *et al.*, 2010), existe probablement depuis 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000 ; Schübler *et al.*, 2001).

Cette association fût appelée « mycorhize à vésicule et à arbuscule » vu la présence des vésicules et des arbuscules. Actuellement, il est rapporté que certaines associations avec les Glomeromycota ne forment pas de vésicules. Récemment, la terminologie « association mycorhizienne à arbuscule » est utilisée pour décrire la symbiose endomycorhizienne (Delian *et al.*, 2011).

Le terme *endomycorhize* qualifie ces interactions mycorhiziennes ou le développement du champignon se fait à l'intérieur des cellules végétales. Les endomycorhizes ne sont pas visibles à l'oeil nu par simple observation des racines, un examen au microscope est nécessaire pour en déceler les structures caractéristiques. Notons et ceci est valable pour tous les types de mycorhizes que la colonisation du champignon se limite au cortex de la racine, jamais les hyphes ne traversent l'endoderme et ne pénètrent dans le cylindre central.

Les champignons impliqués dans les mycorhizes arbusculaires appartiennent tous à la classe des Glomeromycètes, un groupe de champignons à hyphes non cloisonnés proche des Mucoromycètes (par exemple *Rhizopus*, *Mucor* ; Spatafora *et al.*, 2016).

Ce sont des symbiotes obligatoires ne pouvant se développer, ou être cultivés en laboratoire, sans une plante hôte assurant leur nutrition carbonée (Bonfante et Genre, 2008). Selon les seuils de divergence et les marqueurs considérés, entre 300 et 1 600 espèces de glomeromycètes ont été décrites sur la base de données moléculaires (Kivlin *et al.*, 2011 ; Opik *et al.*, 2013). Un chiffre étonnamment faible si on le compare aux plus de 200 000 espèces de plantes qui mettent en place des mycorhizes arbusculaires (Brundrett, 2009), soulignant le caractère généraliste des symbiotes fongiques.

I.3.1 Partenaires de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

I.3.1.1 Plante hôte

Les champignons mycorhiziens arbusculaires ont nécessairement besoin d'une plante hôte pour se développer et se reproduire, car ils sont des symbiotes obligatoires (Fortin et al, 2008).

En plus des produits carbonés, la plante hôte fournit au champignon un abri et une protection physique contre les aléas de l'environnement, comme les variations de température et d'humidité et les attaques des agents pathogènes (Garbaye, 2013).

Cependant, le développement des champignons mycorhiziens arbusculaires peut être différent d'une espèce végétale à une autre.

Pour un même cultivar, la réponse endomycorhizienne peut également être différente. Par exemple, une expérience réalisée par Lackies et al. en 1988 a démontré que plusieurs familles de demi-frères (*half-sibs*) de luzerne issus d'une même plante mère ont des descendants qui expriment des différences au niveau de la colonisation endomycorhizienne.

Les facteurs végétaux qui sont à l'origine des différences observées dans l'aptitude à la colonisation endomycorhizienne ne sont pas encore bien déterminés. Toutefois, ces facteurs semblent liés aux caractères morphologiques et physiologiques des plantes.

Ainsi, les plantes qui possèdent des poils absorbants courts et peu nombreux ont généralement une forte dépendance mycorhizienne comparativement à celles dont les poils absorbants sont longs, fins et ramifiés (Fortin et al. 2015). Certaines espèces comme la carotte, le poireau et l'oignon ont une forte dépendance mycorhizienne, alors que d'autres comme le sorgho, le soja, le maïs et la luzerne ont une dépendance mycorhizienne intermédiaire. Enfin, une dernière catégorie comprenant le blé, l'orge, le riz et la tomate montrent une faible dépendance envers la colonisation mycorhizienne (Fortin et al. 2015).

I.3.1.2 Champignon

Les champignons mycorhiziens arbusculaires appartiennent à l'embranchement des *Glomeromycota* (Gehrig et al. 1996; Schwarzott et al. 2001 ; Schüßler et al. 2001) et ce champignon est considéré comme le type de symbiote le plus répandu (Ansori et Gholami, 2015; Guttenberg, 2000; Wang et Qiu, 2006).

Apparus il y a plus de 400 millions d'années, les gloméromycètes sont ubiquitaires dans les écosystèmes terrestres et développent une relation symbiotique avec environ 80% des plantes vasculaires (An et al. 2008; Ansori et Gholami, 2015; Bencherif, 2015 ; Candido et al. 2015 ; Wang et Qiu, 2006). En plus des mousses et des hépatiques, on retrouve les champignons arbusculaires chez les fougères, les lycopodes, plusieurs conifères et chez la majorité des plantes à fleurs mono- et dicotylédones.

Un *gloméromycète* est une cellule géante unique composée d'un réseau de filaments dans lequel circulent librement les ressources nutritives (Garbaye, 2013).

Certaines caractéristiques permettent de les reconnaître, notamment de longs hyphes avec peu de ramifications et l'absence de septum dans les hyphes.

La classe des gloméromycètes regroupe actuellement environ 250 espèces réparties dans 4 ordres, 11 familles et 17 genres (Garbaye, 2013) associés à plus de 250 000 espèces végétales terrestres (Fortin et al. 2008).

Les champignons mycorhiziens arbusculaires forment plusieurs structures dont les spores, les arbuscules, les vésicules et des hyphes qui pénètrent à l'intérieur des cellules des racines colonisées.

On utilise le terme propagule pour désigner à la fois les spores, les fragments de racines contenant des vésicules et les vésicules elles-mêmes, puisque ces structures contribuent à propager l'espèce (Ansori et Gholami, 2015; Fortin et al, 2008). Situés à l'intérieur des cellules corticales de la racine, les arbuscules offrent une surface de contact importante entre les partenaires de la symbiose.

Ils assurent les échanges entre la plante et le champignon au niveau 7 de la membrane plasmique (Chiffot, 2008; Hopkins, 2003; Liu et al. 2015; Madigan et al. 2014; Ramos et al. 2008). Formées dans le sol, les spores servent d'organe de stockage et de propagation des champignons mycorhiziens arbusculaires (Nabila, 2014). Après germination, ces spores donnent naissance à des filaments mycéliens et colonisent une plante.

1.3.1.2.1 Structure des champignons mycorhizens à arbuscules

Au cours de leur cycle de vie, les CMA forment donc des structures différentes (des arbuscules, des vésicules, des cellules auxiliaires, mycélium interne / externe) et des spores (Morton, 1990) (Fig. 2). Ces structures possèdent chacune une fonction plus ou moins propre.

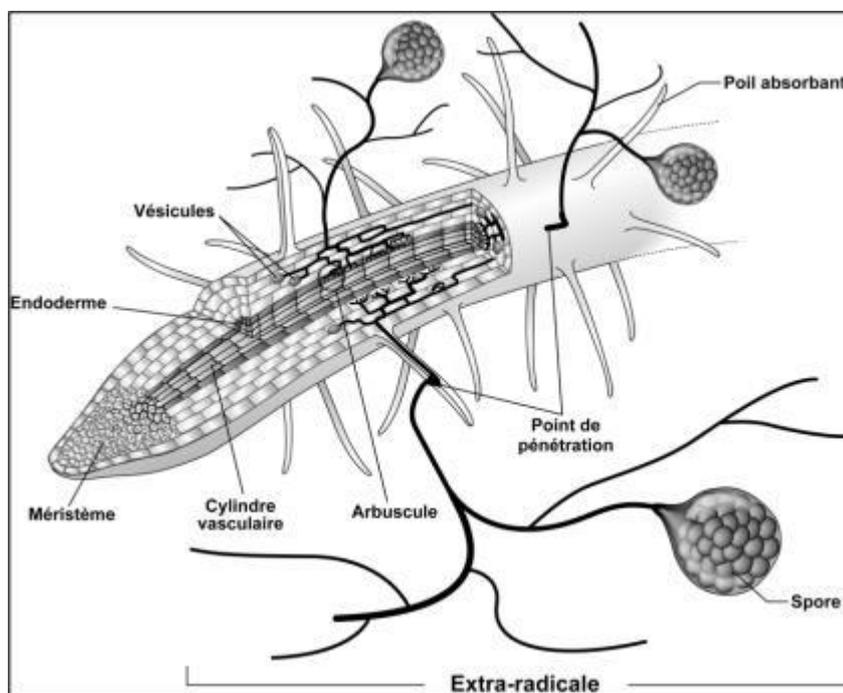


Figure 2: Représentation schématique d'une MA (Fortin et al., 2008).

1.3.1.2.1.1 Spores

Les spores constituent la principale structure anatomique qui sert à la détermination morphologique des espèces de CMA (Koffi *et al.*, 2009).

Les spores des glomérormycètes sont en nombre variable dans le sol. Elles sont produites dans le sol sur le mycélium externe des endomycorhize arbusculaires, à l'extrémité des hyphes, et sont dispersées par les mouvements de particules de terre dus au vent et au ruissellement, mais elles sont aussi activement transportées par les petits animaux du sol (surtout les invertébrés comme les vers de terre ou les larves d'insectes). Par conséquent, la spore sert d'organes de dispersion et de conservation dans le sol (Garbaye, 2013) qui peut rester en dormance pendant de longues périodes (Smith et Read, 2008).

Elles Atteignent des dimensions imposantes de 40 à plus de 500 μm . Ces spores possèdent également des parois ou enveloppes extrêmement épaisse (2-35 μm) qui les protègent contre les stress environnementaux (Fig. 4) (Garbaye, 2013).

Figure 4 : Un mélange des spores mycorhiziennes arbusculaires sous la loupe.
(<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/gigaspora/decipiens>)

1.3.1.2.1.2 Arbuscules

L'arbuscule c'est une ramification latérale des hyphes fongiques dans les cellules du cortex racinaire (Guissou, 2001), leur taille varie de 2 μm à 6 μm (Dexheimer, 1997), jusqu'au moins d'un micro de diamètre (Fig. 4) (Brundrett, 1999).

L'arbuscule est intracellulaire mais pas intra-cytoplasmique puisqu'il se met en place entre la membrane plasmique et la paroi de la cellule végétale sans altérer l'intégrité de cette dernière. Cette structure, reliée aux hyphes, est donc un indicateur de l'activité symbiotique. La forme exacte des arbuscules varie selon le genre du CMA (Smith et Read, 2008).

L'arbuscule augmente la surface de contact entre les symbiose, cette interface arbusculaire représente le site d'échange des nutriments (Guether *et al.*, 2009). Leur début de formation est approximativement 2 jours après pénétration du champignon dans la racine et leur moyenne de vie peut atteindre quelque jours (2 à 15 jours) (Harley, 1986 ; Brundrett *et al.*, 1999).

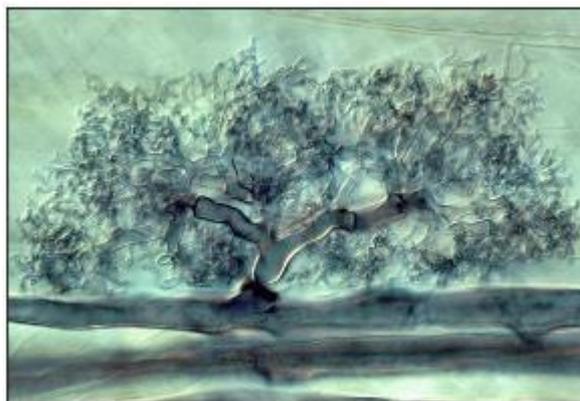


Figure 3:Arbuscule fongique de Glomus.

(De Mark Brundrett : <http://mycorrhizas.info/resource.html>)

1.3.1.2.2 . Vésicules

Ce sont des petits sacs à paroi épaisse, intra- ou intercellulaires, de forme variable (sphérique, allongées, lobées ou épousant la forme interne d'une cellule) et contenant un grand nombre de noyaux et gouttes de lipides (Fig. 6). La fonction de ces vésicules n'est pas connue, mais l'accumulation de réserve en carbone sous forme de lipide suggère fortement un rôle de conservation et dissémination du champignon après la mort de la racine. Cependant, les espèces de Gloméromycètes appartenant aux genres *Gigaspora* et *Scutellospora* ne forment jamais de vésicules elles portent à la place des cellules auxiliaires sur le mycélium extra-racinaire (Garbaye, 2013).

D'ailleurs, ce sont des propagules infectives (Declerck *et al.*, 1998) car elles possèdent une des propriétés analogue à celles des spores c'est pour quoi on utilise le terme « propagule » pour désigner à la fois les spores, les vésicules, les fragments de racine contenant des vésicules puisque toutes ces structures servent à propager l'espèce (Garbaye, 2013).

Figure 6 : vésicules (en bas à droite de la photo) et un arbuscule (en haut à gauche) ; on voit aussi des hyphes longitudinaux (photo reproduite avec l'aimable autorisation de Mark Brundrett) citée dans (Garbaye, 2013).

I.3.1.2.2.1 Hyphes

D'un point de vue morphologique, les hyphes des CMA sont coenocytiques (hyphes dépourvus de septa) (Reinhardt, 2007). La plupart des noyaux bougent ainsi librement dans les hyphes bien que certains situés en position latérale semblent immobiles (Bago *et al.*, 1999). Les hyphes intraradiculaires sont reliés aux arbuscules et se prolongent de façon extra-radiculaire dans le sol. Elles se propagent dans le sol créant ainsi un réseau mycélien qui peut atteindre des longueurs importantes allant jusqu'à plusieurs dizaines de mètres par gramme de sol (Leake *et al.*, 2004). La capacité des différents CMA à former ces réseaux mycéliens peut différer (Voets *et al.*, 2006). Les CMA étant des biotrophes obligatoires, l'exploration du sol par le réseau mycélien participe à la survie du champignon car cela leur permet de rencontrer d'autres plantes hôtes. De plus, le réseau mycélien absorbe les éléments nutritifs du sol (azote, phosphore notamment) agissant comme une extension du système racinaire des plantes dans le sol (Fig. 4) (Newman et Reddell, 1987). En fonction de leur activité principale, on peut distinguer plusieurs types d'hyphes extra-radicaires :

- Les hyphes d'absorption, très ramifiées et minces, elles prélèvent les molécules du sol.
- Les hyphes conductrices ayant un diamètre plus important et un cytoplasme peu abondant.
- Les hyphes d'infection qui peuvent coloniser de nouvelles racines.
- Les hyphes sporogènes qui donneront naissance aux spores (Gavériaux, 2012).



Figure 4:Racine endomycorhizées environnées de mycélium portant des spores (photo de Yolande Dalpé) citée dans (Garbaye, 2013).

I.3.1.2.2.2 Cellules auxiliaires

Chez les *Gigaspora*, *Pcispora* et *Scutellospora* (Blaszkowski *et al.*, 2006), le mycélium extramatriciel forme des cellules auxiliaires (AC) (formes globulaires regroupées en grappe, attachées aux hyphes extra-matriciels et souvent ornementées) (Fig. 5). En culture monoxénique, les jeunes cellules contiennent des gouttelettes lipidique tandis que les vieilles apparaissent vides (de Souza et

Declerck, 2004). Gerdemann et Trappe (1974) ont suggéré que ces cellules étaient des organes de stockage temporaire.

Les cellules auxiliaires sont formées lors des ramifications d'hyphes extra-matriciels ; chaque ramification génère plusieurs branches qui forment à leur tour des structures sphériques regroupées en masses dont chacune contient 2 à 20 sphères mesurant 12 à 39 µm de diamètre.

Les cellules auxiliaires sont riches en noyaux, en organites et en lipides (Bonfante et Perotto, 1995) ; leur surface est lisse chez *Scutellospora sp.* Et rugueuse chez *Gigaspora sp.* Derlerck *et al.*, (2004) ont observé en culture monoxénique, une croissance des hyphes à partir des cellules auxiliaires chez *S. reticulata*, ils ont suggéré que les longs fragments de mycélium intacts portant plusieurs cellules auxiliaires peuvent induire une symbiose.

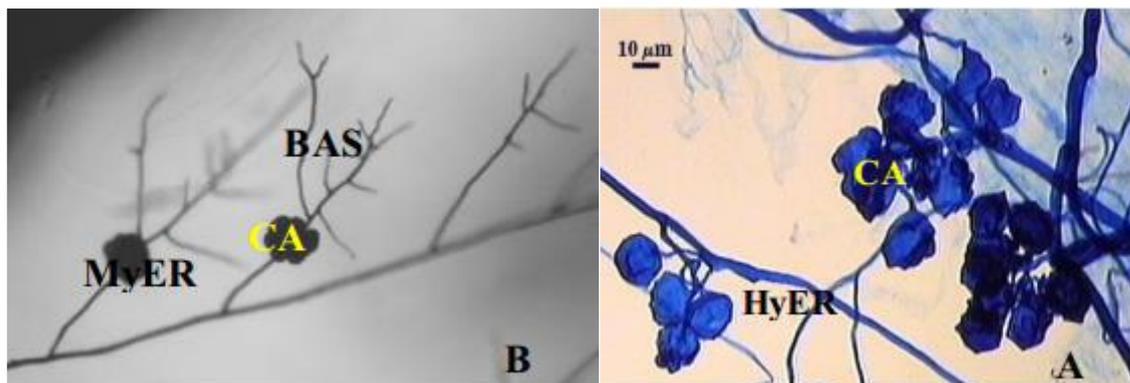


Figure 5: Aspect des cellules auxiliaires (AC) (Bago et Cano, 2005).

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

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

I.3.1.3 Spécificité d'hôte

La symbiose mycorhizienne à arbuscule ne présente pas une spécificité d'hôte nette (Selosse *et al.* 2006). Généralement, une espèce de CMA est capable de mycorrhizer une grande variété de plantes n'appartenant pas au même taxon. De la même façon, une plante peut être mycorrhizée par différentes espèces de CMA n'appartenant pas obligatoirement au même genre. (Newman *et al.*, (1994)) ont montré qu'un même CMA est capable de mycorrhizer simultanément deux plantes adjacentes d'espèces différentes qui peuvent être liées avec un réseau mycélien souterrain commun.

D'autre part, la spécificité entre les partenaires de la symbiose est déterminée par plusieurs facteurs. En effet, les espèces végétales diffèrent dans la dépendance à la symbiose MA, certaines plantes sont des mycotrophes facultatives, tandis que d'autres sont mycotrophes obligatoires. Récemment, le statut mycorhizien a été lié à la distribution et la productivité des plantes (van der Heijden *et al.*, 2008 ; Hempel *et al.*, 2013). Hausmann *et al.*, (2009) ont rapporté que les CMA peuvent être influencés à petite échelle par la communauté végétale locale et la plante voisine de la plante focale peut altérer les communautés CMA.

I.3.1.4 Mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules :

La mise en place de cette symbiose requière plusieurs étapes distinctes (Figure 03), La première étant la reconnaissance mutuelle des organismes. Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire de molécules diffusibles échangées entre les deux microorganismes.

Tout d'abord, les spores de champignon AM présentes dans la rhizosphère vont percevoir les strigolactones exsudées par les racines de l'hôte.

Les strigolactones sont des hormones végétales impliquées dans le développement des plantes et capables d'induire la croissance et la ramification des hyphes du champignon symbiotique (Besserer et al. 2006; Gutjahr and Parniske, 2013).

Suite à cette stimulation, le champignon diffuse des signaux moléculaires incluant un mélange de chitooligosaccharides (Genre et al. 2013) et de lipochitooligosaccharides (Maillet et al. 2011).

La perception de ces signaux induit chez la plante des oscillations calciques nucléaires, l'expression de gènes et la stimulation des racines latérales (Chabaud et al. 2011; Maillet et al. 2011; Genre et al. 2013).

Après ce dialogue moléculaire, le champignon AM adhère aux cellules de l'épiderme racinaire via une structure nommée hyphopodium (Figure 03). Ce contact induit un remodelage cytoplasmique dans les cellules de la plante appelé appareil de pré-pénétration (PPA).

Guidé par ce PPA, le champignon pénètre une cellule de l'épiderme racinaire et colonise la racine de manière intra et intercellulaire jusqu'au cortex interne (Gutjahr and Parniske, 2013) (Figure 06).

Dans le cortex interne, les hyphes du champignon progressent le long de l'axe longitudinal et forment des arbuscules dans les cellules (Demchenko et al. 2004).

Les arbuscules sont des structures d'échange en forme d'arbre et hautement ramifiées qui envahissent la quasi-totalité de l'espace cellulaire mais en restant toujours entourées et délimitées par la membrane plasmique (Bonfante and Genre, 2008).

L'objectif de cette ramification est d'augmenter au maximum la surface d'échange entre le champignon AM et la plante. L'endomycorhize fournit à la plante de l'eau et des minéraux (principalement du phosphate) et reçoit en échange des composés carbonés issus de la photosynthèse.

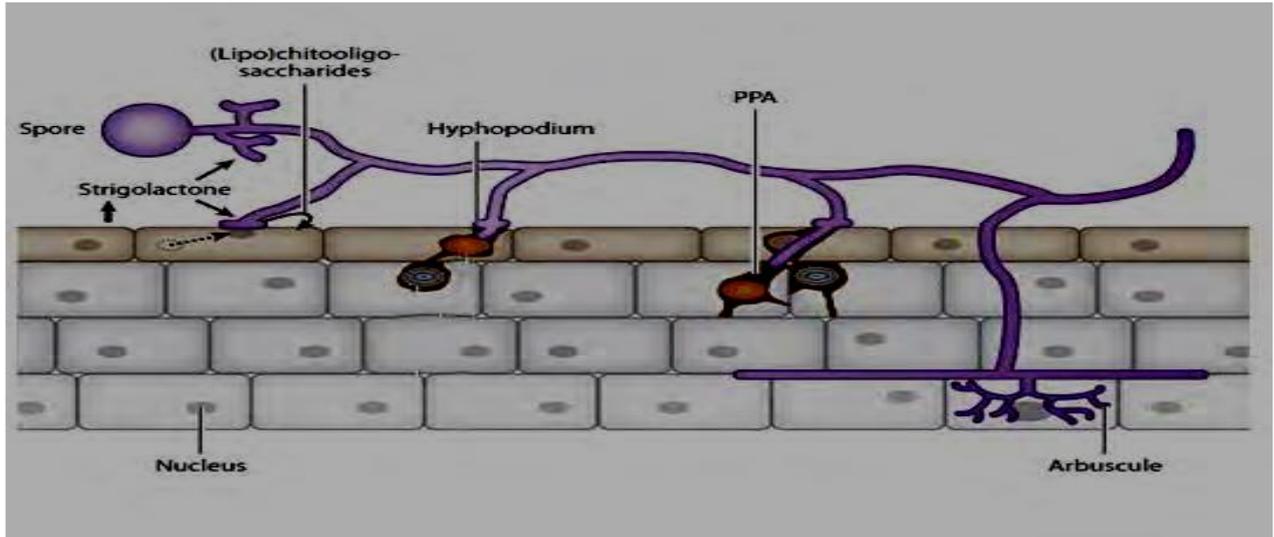


Figure 6:Schéma des grandes étapes de la symbiose à arbuscules. Progression des structures fongiques (violet) dans les racines de l'hôte. Source: D'après Gutjahr and Parniske, 2013

I.3.1.5 Intérêt de la symbiose mycorhizienne à arbuscules :

Les champignons mycorhiziens arbusculaires représentent un élément incontournable dans la progression vers une 'agriculture alternative' moins polluante et dont les produits sont exempts de résidus chimiques (Jeffries et al. 2003). La multitude des services bénéfiques directs et indirects qu'ils rendent peut être classée en deux catégories : un rôle nutritif et un rôle protecteur.

➤ Rôle nutritif des CMA :

La meilleure absorption d'éléments minéraux par les racines mycorhizées se fait essentiellement grâce à la capacité des champignons mycorhizogènes à les absorber du sol par leur filament et à les transférer ensuite vers les racines de la plante hôte.

Cette surface supplémentaire d'absorption apportée par la mycorhization est d'autant plus efficace que son développement entraîne une économie dans la production racinaire (Grimoldi et al. 2005). Ils améliorent ainsi la nutrition (phosphatée, azotée et en oligo éléments) de la plante hôte.

1. Amélioration de la nutrition phosphatée :

Le phosphore est indispensable à la vie de la plante, il entre dans la composition du matériel génétique (ADN et ARN), intervient dans tous les échanges énergétiques sous forme d'ATP et participe dans la régulation du métabolisme cellulaire sous forme d'AMP cyclique (Taylor et al. 1997). Les mycorhizes prélèvent le phosphore (qui est sous forme d'orthophosphate), du pool de phosphore soluble, grâce à leur arsenal enzymatique comme les phytases et les phosphatases, ensuite, il est stocké dans les structures fongiques sous forme de polyphosphates et transféré ainsi à la plante au niveau de l'interface arbusculaire

Par ailleurs, il convient de ne pas négliger le rôle indirect des endomycorhizes dans la fixation de l'azote atmosphérique chez les légumineuses. En effet, la fixation d'azote ne peut être pleinement efficace que si la nutrition phosphatée de la plante est satisfaisante.

De nombreux travaux ont mis en évidence l'interaction entre la symbiose endomycorhizienne et la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses, que ces dernières soient herbacées ou ligneuses (Provorov et al., 2002).

2. Amélioration de la nutrition azotée :

Les premiers travaux sur la contribution des mycorhizes à la nutrition azotée de la plante hôte ont été menés sur les endomycorhizes éricoïdes, puis sur les ectomycorhizes (Plassard et al. 1991). L'intervention des endomycorhizes à arbuscules dans la nutrition azotée de la plante hôte a été jusqu'ici peu étudiée. Des études isotopiques ont pourtant démontrés qu'au moins pour certaines espèces, le champignon endomycorhizien est bien le site premier de l'assimilation de l'azote pour la plante (Handley et al. 1993).

3. Amélioration de la nutrition en oligo-éléments :

Si l'amélioration de la nutrition minérale par la symbiose mycorhizienne a été surtout étudiée pour le phosphore, on sait qu'une nutrition équilibrée dépend aussi d'autres éléments tels le soufre ou les oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer.

Ces éléments sont peu mobiles dans le sol et on estime que le mécanisme d'absorption est le même que pour le phosphore, c'est-à-dire que l'augmentation de leur prélèvement est essentiellement due à une meilleure exploration du sol par les hyphes extra-racinares (Whipps, 2004).

4. nutrition hydrique

L'amélioration de la nutrition hydrique des plantes est prouvée via cette matrice extracellules qui explore un plus grand volume de sol (Smith et Read, 1997 ; Augé, 2001). En effet, le fin mycélium des champignons peut aller puiser l'eau dans de petits interstices et agrégats du sol qui ne sont pas accessibles aux racines (Fortin *et al.*, 2008).

les CMA jouent un rôle direct dans l'acquisition de l'eau chez les plantes puisque des gènes codant pour des aquaporines, protéines membranaires des cellules formant des canaux perméables aux molécules d'eau, ont été récemment détectés dans le génome de l'espèce fongique *Rhizophagus irregularis* (Tisserant *et al.*, 2013). De plus, il a été prouvé que l'expression de gènes de certaines

aquaporines de plantes est modifiée lorsque la symbiose mycorhizienne à arbuscules est en place (Krajinski *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013).

➤ Rôle protecteur des CMA

1. Résistance aux stress biotiques et abiotiques

Le CMA contribuent au maintien et au fonctionnement de l'écosystème en effet, la mycorhize arbusculaire augmente la production et la survie des plantes dans des conditions de stress biotiques et abiotique (Ruiz-Lozano, 2003 ; Augé, 2001 ; Cho *et al.*, 2006 ; Cornet et Diem, 1982 ; Sturmer, 1998 ; Tao et Zhiwei, 2005).

Le stress abiotique tel que la sécheresse, les extrêmes températures, la salinité partagent un composant osmotique commun le déficit en eau pour les plantes (Porcel *et al.*, 2006).

2. Protection des agents pathogènes

Un autre avantage conféré aux plantes hôtes par la mycorhization est une protection contre les pathogènes, principalement contre les champignons et les nématodes qui attaquent les racines des plantes (Dalpé, 2005 ; Dalpé, 2006 ; Fortin et autres, 2008 ; Helgason et Fitter, 2005).

Plusieurs mécanismes expliquent ce phénomène. Premièrement, les avantages nutritionnels qu'offre la mycorhization permettent aux plantes hôtes d'être plus vigoureuses et de mieux résister aux attaques des pathogènes (Dalpé, 2006). Deuxièmement, il été démontré que l'infection des racines de la plante hôtes par les champignons mycorhiziens préconditionne la plante à faire face aux attaques de pathogènes et d'autres organismes nuisibles comme les brouteurs. En effet, la mycorhization entraine la plante dans un état actif d'immunisation qui lui permet d'être plus efficace dans ses réponses aux attaque des pathogènes (Ismail et Hijri, 2012 ; Jung *et al.*, 2012). Finalement, il a aussi été montré que certaine champignon mycorhiziens, comme *Glomus irregulare*, peuvent contrôler la croissance des champignons pathogènes et réduire leur production de mycotoxine (Ismail *et al.*, 2013).

Il semblerait aussi que les champignons mycorhiziens protègent la plante hôtes contre les pathogènes. En entrainant une compétition directe avec ces derniers pour les ressources énergétiques et pour les sites d'infection. À eux seuls, les hyphes du champignon mycorhizien peuvent constituer jusqu'à 80% de la biomasse microbienne du sol. Ainsi, les hyphes qui colonisent les racines satureraient le milieu et laisseraient peu de sites potentiels pour l'infection par des pathogènes (Daplé, 2006 ; Helgason et fitter, 2005). Toutefois, ce dernier élément reste toujours une hypothèse qui ne fait pas consensus au sein de la communauté scientifique.

Il est à noter que le pouvoir protecteur de la mycorhize contre les pathogènes a ses limites et dépend de plusieurs facteurs comme la plante, le champignon mycorhizien et la virulence du pathogène. Les conditions environnementales (sol, humidité, température, etc .) influencent aussi la capacité de la mycorhize à protéger la plante hôte contre les pathogènes (Daplé, 2006).

3. Pollution

La contamination des sols en divers polluants, dont les ETM, constitue un autre stress abiotique qui peut être atténué par la symbiose MA. Les mycorhizes à arbuscules favorisent en effet la croissance des plantes sur des sols contaminés par les métaux lourds (Leyval, 2005).

Eléments traces métalliques (ETM) peuvent résulter des activités humaines (Schachtschabel *et al.*, 1992) ou être présents de façon naturelle (gisements miniers) (Jung et Thornton, 1996 ; Rodríguez *et al.*, 2009). Certains métaux sont nécessaires aux organismes et considérés comme des micronutriments, comme le Zn, le Cu ou le Co, Se, Mo, à de faibles concentrations. En revanche, l'accumulation de fortes concentrations de ces composés est très toxique puisqu'ils peuvent altérer le niveau d'autres nutriments et induire la production de radicaux libres (Gutteridge et Halliwell, 1989). De plus, d'autres métaux sont

toxiques même à de faibles concentrations. que sont Cd, Pb, Hg, As, Ni, Cr, Se, le mercure et l'arsenic (Bourrellet et Berthelin, 1998).

Les mécanismes intervenant dans la survie des organismes symbiotiques mycorhiziens se développant sur des milieux contaminés par les ETM et la protection apportée par la colonisation symbiotique ont été répertoriés par Hildebrandt (2007), González-Guerrero *et al.*, (2009) et Ferrol *et al.*, (2009). Tout d'abord, un meilleur apport nutritif apporté par le CMA pourrait aider à la croissance des plantes parallèlement à une diminution de la concentration en métaux dans les parties aériennes (Heggo *et al.*, 1990 ; Lee et George, 2005). D'autre part, dans les racines mycorhizées, il a été démontré que les métaux étaient préférentiellement accumulés dans les structures fongiques, préservant ainsi les tissus végétaux (Weiersbye *et al.*, 1999 ; Rivera-Beccerril *et al.*, 2002). En effet, le Zn, le Cu et le Cd sont accumulés dans la paroi et dans des granules dans le cytoplasme des champignons alors que leur cytoplasme lui même contient peu de métaux (González-Guerrero *et al.*, 2008). De plus, les vacuoles et les parois fongiques pourraient servir de compartiment de séquestration pour ces ETM (Turnau, 1998 ; Weiersbye *et al.*, 1999; González-Guerrero *et al.*, 2008).

Les associations de plantes avec des CMA sont proposées comme une solution biologique potentielle pour améliorer la résistance des plantes à la toxicité des métaux et restaurer la fertilité des sols pollués par les métaux lourds (Vivas *et al.*, 2005).

I.4 Symbiose rhizobienne

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

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

I.4.1 Caractéristiques des rhizobia

I.4.1.1 . Description microbiologique de rhizobia

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

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



Figure 7: Morphologie de rhizobium trifoili

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

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

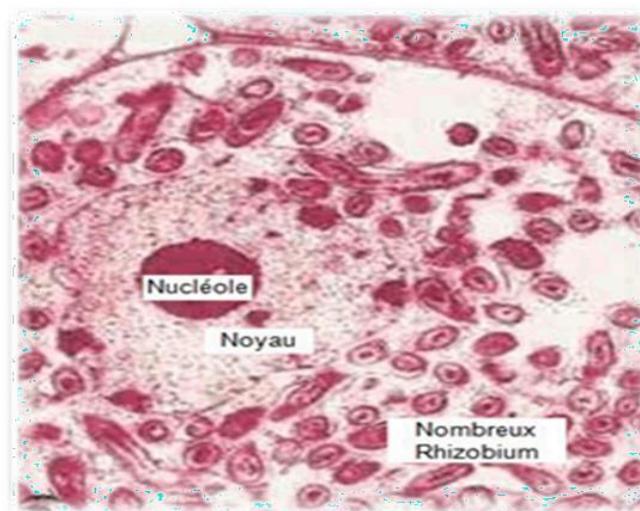


Figure 8: Bactéries du genre *Rhizobium* vues au microscope (x 1 000) Schéma montrant nombreux bactéroïdes dans une cellule d'une nodosité racinaire.

I.4.1.2 .Habitat :

Les bactéries du genre *Rhizobium* vivant dans le sol ; à la proximité des racines dans la rhizosphère, Ce dernier est un habitat particulièrement favorable à croissance des rhizobia et l'on a pu démontrer une augmentation sensible de la population de *Rhizobium* dans la zone rhizosphérique comparé au sol sans racines. Ils peuvent également exister comme des cellules viables dans l'eau où ils sont capables d'infecter et de noduler des légumineuses aquatiques telles qu'*Aschynomene spp*, et *Sesbania* (Grouzis et Le flocc' H, 2003).

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

I.4.1.3 . Caractères physiologiques et cultureux

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

L'observation macroscopique montre différentes caractéristiques des colonies développées d'une culture de 24h - 48h à 28°C sur le milieu Yeast Extract Mannitol (YEM) solide (**fig. 09**). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, humides et translucides. Elles peuvent être brillantes (Somasegaran et Hoben, 1994). Les colonies jaunes et pâles sont rencontrées surtout dans les cultures âgées. Autre critère de différenciation, Le genre de *Rhizobium* regroupant les *Rhizobium* à croissance rapide ; le *Rhizobium*, *Mesorhizobium*

,*Sinorhizobium* et les souches *Allorhizobium* sont généralement des colonies gommeuses sur milieu YEM, de 4-6 mm de diamètre après 3 à 7 jours d'incubation ,ils produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h. Les souches de *Bradyrhizobium* ont une Croissance plus lente, elles produisent des colonies plus petites, généralement 1-2 mm de diamètre après 7-10 jour d'incubation et produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).



Figure 9:Aspects macroscopique des rhizobiums (ASMA ,2008)

I.4.1.4 . Taxonomie des rhizobia

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

Actuellement, Les rhizobia comportement 14 genre et 98 espèces fait partie de la classe protéobactéries et du sous classes α - β - γ -, forment l'ensemble de BNL. (Zakhia et De Lajudie, 2006 ;Ruberg et al . ,2001 ;Nogom et al . ,2004 ;Benhizia et al . ,2004) (**Tableau 1**).

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

Tableau 1:Classification récente des BNL (Berrada et Benbrahim, 2014).

| Classe | Ordre | Famille | Genre | Espèce |
|--------|-------|---------|-------|--------|
|--------|-------|---------|-------|--------|

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

| | | | | |
|---------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|--|
| | | <i>Brucellaceae</i> | <i>Ochrobactrum</i> | <i>O. cytisi-O. lupini</i> |
| | | <i>Hyphomicrobiales</i> | <i>Azorhizobium</i> | <i>A. caulinodans-A. dobereinereae-A. oxalatophilum</i> |
| | | | <i>Devosia</i> | <i>Devosia neptunia</i> |
| | | <i>Bradyrhizobiales</i> | <i>Bradyrhizobium</i> | <i>B. japonicum-B. elkanii-B. liaoningense-B. yuanmingense-B. betae-B. canariense-B. iriomotense-B. jicamae-B. lablabi-B. huanghuaihaiense-B. cytisi-B. daqingense-B. denitrificans-B. oligotrophicum-B. pachyrhizum</i> |
| β - Proteobacteria | <i>Burkholderiales</i> | <i>Burkholderiaceae</i> | <i>Burkholderia</i> | <i>B. caribensis-B. cepacia-B. tuberum-B. phymatum-B. nodosa-B. sabiae-B. mimosarum-B. rhizoxinica-B. diazotrophica-B. endofungorum-B. heleaia-B. symbiotica</i> |
| | | | <i>Cupriavidus</i> | <i>C. taiwanensis</i> |
| γ - Proteobacteria | <i>Pseudomonadales</i> | <i>Pseudomonaceae</i> | | <i>Pseudomonas sp.</i> |

1.4.1.5 Critères de résistance

1.4.1.5.1 La résistance aux contraintes abiotiques

Les bactéries du genre *Rhizobium*, possèdent des propriétés physiologiques leur permettant de se développer dans le sol avec une quantité suffisante pour fournir la nodulation efficace qui se dépend du type de sol (milieux arides et semi-arides), c'est pour cela que l'étude des facteurs inhérents de sol tels que le pH ; la température et le stress salin.

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

- **Le stress hydrique :**

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

- **La température**

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

- **La salinité**

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

1.4.1.5.2 . La résistance d'un agent biologique

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

1.4.1.6 Antagonisme entre Rhizobium et flore microbienne :

Les *Rhizobiums* capables inhibée certaine champignons sont phytopathogènes pour les légumineuses (*Penicillium Sp, Rhizopus stolonifère, Trichoderma et F. oxysporum*).

a. Antibiose

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

b. . Hydrolases

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

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

I.4.1.7 Spécifié d'hôte

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

I.4.1.8 Établissement de la symbiose

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont capables d'infecter les plantes de la famille des légumineuses, par leur aptitude à induire la formation de nodules sur la partie racinaire de la plante hôte comme c'est le cas chez les deux légumineuses modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*, au formation de nodules au niveau des tiges (**Fig. 10**) comme dans le cas de l'interaction *Sesbania rostrata* - *Azorhizobium caulinodans*, et à réduire l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par la plante. Dans cette section, les données relatives à l'infection des légumineuses et au développement des nodules racinaires ou caulinaires sont brièvement présentées (Selami, 2017).

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

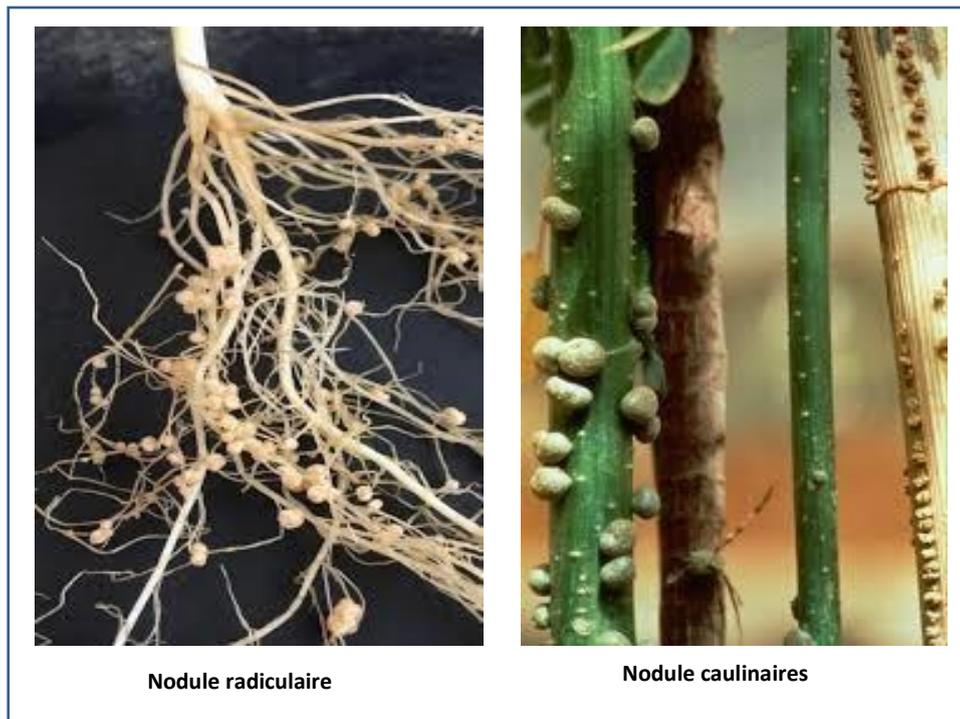


Figure 10: les nodules chez légumineuses

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

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

c. Pré infection

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

A cette étape ; débute un échange des signaux moléculaires entre les deux partenaires (**fig. 11**), principalement des flavonoïdes (Long, 1996), Ces molécules sont sécrétées par la plante hôte, qui sont capables d'activer la transcription des gènes Nod chez les rhizobia. Les facteurs NOD sont des lipo-chitoooligosaccharides (LCO) émis par la bactérie, à l'origine de la reconnaissance spécifique entre les deux symbiotes et du déclenchement du programme d'organogenèse nodulaire chez le végétal par une cascade d'expression de gènes spécifiques (Miklashevichs *et al* ; 2001).

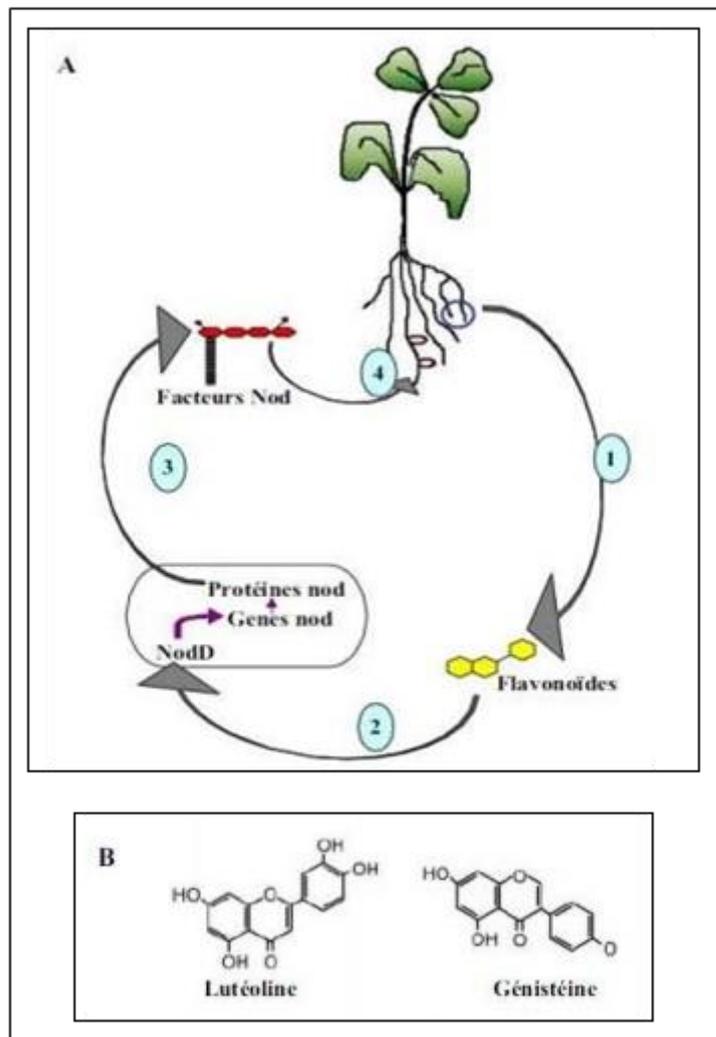


Figure 11: Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses. D'après Brenic et Winans (2005).

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

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

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

d. L'infection

- **La voie intracellulaire « Infection par les poils absorbants »**

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

L'infection de la plante par les rhizobia induit des divisions cellulaires au niveau du cortex, en face d'un pôle de protoxylème (**fig 12**). Ces divisions conduisent à la formation d'un méristème à l'origine d'un primordium nodulaire. A cette étape les bactéries se différencient alors en leur forme endosymbiotique « les bactéroïdes » et libérées à certains endroits des cordons d'infection dans le cytoplasme des cellules végétales. Les cordons d'infection ne sont plus délimités par de la paroi, permettant ainsi l'invagination de la membrane plasmique et la formation de vésicules d'endocytose enfermant une ou plusieurs bactéries, la membrane qui les entoure et appelée membrane péri-bactéroïdienne et l'ensemble forme le symbiosome. L'endocytose est probablement la conséquence d'interactions physiques entre lipopolysaccharides sur la surface des bactéries et des composés glycoprotéiques et glycolipidiques sur la surface de la membrane cellulaire de la plante (Brewin et al., 1992).

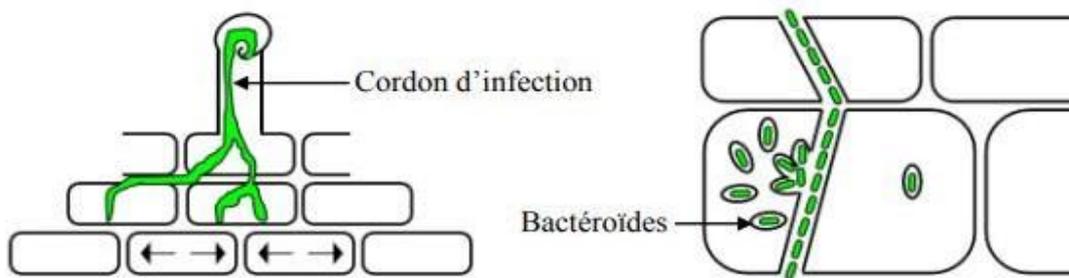


Figure 12:A : Ramification du cordon d'infection et progression vers le cortex interne qui est en cours de division pour former le primordium puis le méristème nodulaire. Les flèches représentent l'initiation de la mitose dans ces cellules.

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

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

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

Le mode d'infection par pénétration intercellulaire des racines des légumineuses est le plus souvent observé chez les comme *Sesbania rostrata* qui forment des nodules au niveau des tiges la pénétration des bactéries se fait par des fissures ; l'infection a lieu au niveau de l'émergence des

racines latérales et des racines adventives. Chez certaines Légumineuses, l'entrée se fait à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme. Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection (Pawlowski et Bisseling, 1996).

e. Développement des nodules

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

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

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

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

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

2. Les nodules à croissance déterminés caractéristique des espèces tropicales (soja, haricot...), ces espèces définies par des divisions cellulaires ont lieu au niveau du cortex interne, la zone méristématique qui produit le nodule est persistante (Hirsch, 1992). De ce fait, ces nodules

ont une croissance indéfinie, ce qui se traduit par une forme allongée.

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

f. La structure du nodule

Toutes les étapes de développement nodulaire sont présentes au sein d'un même nodule selon un gradient de différenciation, ainsi, le nodule est typiquement divisé en cinq zones (**fig 13**) (Pawlowski et Bisseling, 1996).

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

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

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

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

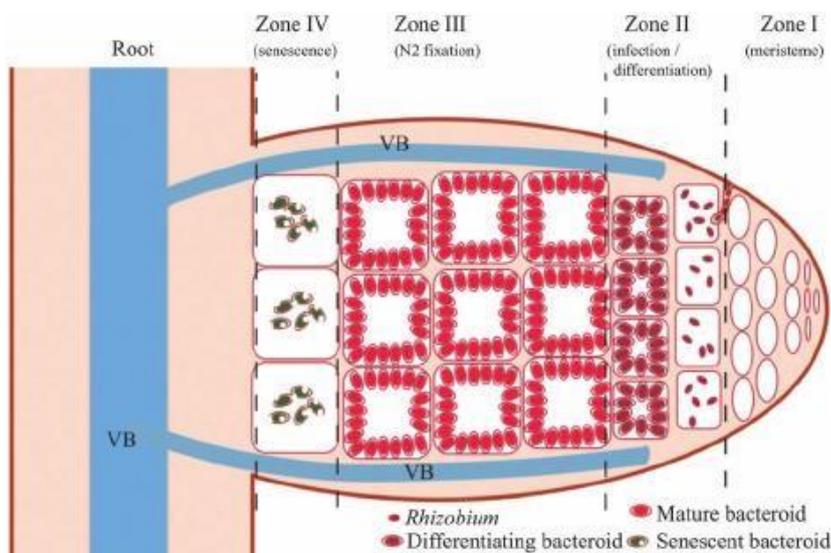


Figure 13: La structure du nodule.

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

1.4.1.8.1 Fixation biologique de l'azote

Les nodules sont des organes hautement spécialisés où d'importants échanges ont lieu entre la

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

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



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

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

L'activité glutamine synthétase cytoplasmique et le glutamate synthase (GOGAT) plastidique très importantes dans les nodules, le NH₄⁺ convertie en glutamine par la

glutamine synthétase et en asparagine, Chez certaines espèces, la glutamine est exportée directement vers le reste de la plante (Pawlowski, 1997 ; Kahn et coll., 1998).

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

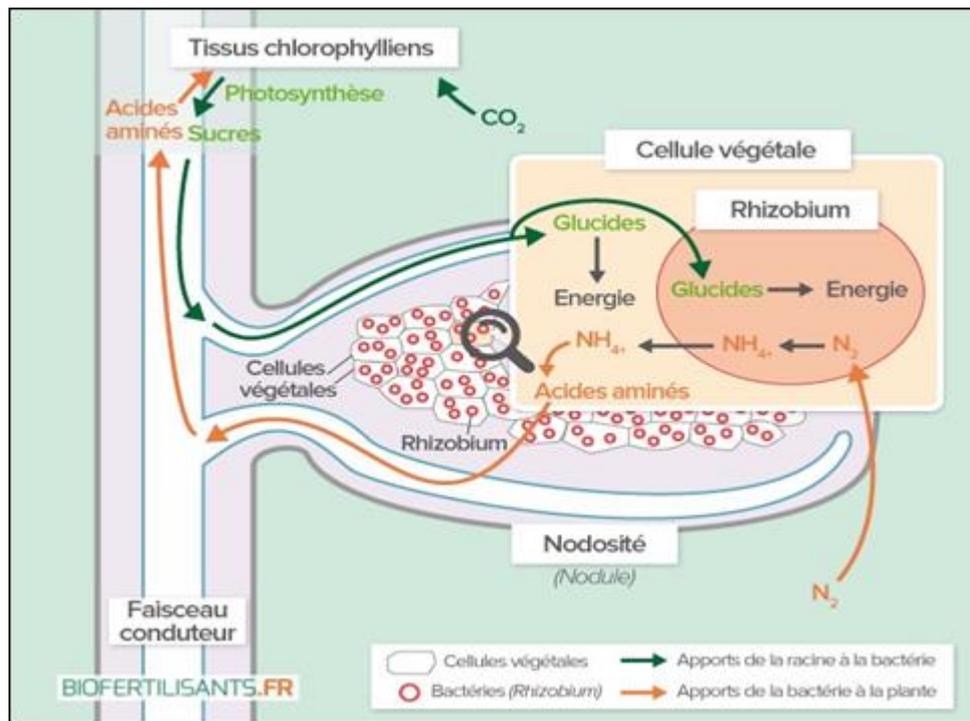


Figure 14: Fixation biologique de l'azote lors d'une relation symbiotique

(<http://www.biofertilisants.fr/zoom-les-bacteries-fixatrices-dazote/>).

1.4.1.8.2 Les intérêts de la symbiose Rhizobienne

Cette symbiose présente de nombreux avantages pour les légumineuses. En effet, celle-ci leur permet d'avoir une bonne croissance sur des sols carencés en azote. Cette interaction est le résultat d'un équilibre délicat entre une plante supérieure et une bactérie.

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

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

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

Chapitre II:
La vie en symbiose
Chez les légumineuses
Et les micro-organismes

II La vie en symbiose chez les légumineuses et les microorganismes

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

L'augmentation de l'absorption du phosphore par le champignon mycorhizien améliore également le fonctionnement de la nitrogénase, enzyme active dans la nodulation, permettant ainsi une fixation d'azote plus importante. En contrepartie, cette absorption accrue d'azote permet un meilleur développement du champignon via une meilleure croissance racinaire (**Invam**, disponible sur: <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae>, Consulter le 20/05/2017).

II.1 Historique de la symbiose tripartite

Depuis des millions d'années, ces deux types de symbioses jouent un rôle considérable dans le fonctionnement des écosystèmes naturels et dans la nutrition phosphatée et azotée des plantes. Ces dernières années, des chercheurs ont découvert qu'il existait une relation entre trois types de partenaires différents : la plante, la bactérie et le champignon (Xie *et al.*, 1995). Cornet et Diem (1982) ont montré que la double inoculation *Glomus mosseae*- *Rhizobium* chez *Acacia holosericea* et chez *A. raddiana* a amélioré la croissance, la nodulation et les teneurs en phosphore et en azote des parties aériennes des plantes. Des effets similaires ont été obtenus par de la Cruz *et al.* (1988) chez *A. mangium* et *A. auriculiformis* inoculés avec une souche de *Rhizobium* et quatre souches de champignons mycorhiziens à arbuscules (*Glomus fasciculatus*, *Gigaspora margarita*, *Scutellospora persica* et *Sclerocystis clavispora*). En 1993, Ianson et Linderman ont découvert que les Fabacées établissaient des associations intimes avec les Mycorhizes et les *Rhizobium*. Cette association est une véritable symbiose mutualiste tripartite. La portée de cette association tripartite est double : les avantages accrus pour la plante et l'acheminement du carbone vers les partenaires hôtes (de manière importante pour les champignons et moins importante pour les bactéries). Il existe entre les deux partenaires symbiotiques ; Mycorhizes et *Rhizobium*, une association assez proche et des chercheurs ont découvert qu'il y avait une influence des champignons mycorhiziens sur la formation des nodules sur les racines des Fabacées (Ianson et Linderman 1993). Des études récentes (Dénarié *et al.*, 2004) ont permis de démontrer que les deux types de symbioses partageaient des étapes communes dans la cascade de traduction des signaux symbiotiques.

II.2 Intérêt de la symbiose tripartite

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

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

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

• **Meilleure productivité** : Une meilleure efficacité de l'utilisation des nutriments et une plus grande biomasse entraînent un rendement plus élevé pour chaque plante de légumineuse (index de récolte). Il a été découvert que les plantes de pois coinoculés avec *Rhizobium leguminosarum* et le champignon mycorhizien ont montré de meilleurs résultats en ce qui concerne la hauteur des plantes, le poids sec des plantes, le poids frais des nodules, le nombre de graines, le poids des graines, le rendement des graines, le nombre de nodules des racines, le nombre de gousses par plante, le poids moyen des gousses et la longueur de celles-ci (Shinde et al., 2016 ; Signorelli et al., 2016).

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

II.3 La symbiose tripartite entre luzerne- rhizobiums et mycorhizes

L'association tripartite luzerne, rhizobiums et endomycorhizes permet :

- i) la transformation des éléments nutritifs comme le sulfate, le potassium et le fer en forme assimilable par la plante. À titre d'exemple, les rhizobiums produisent des sidérophores qui chélatent le fer le rendant ainsi plus mobile donc plus assimilable par la plante.
- ii) la production des phytohormones qui stimulent la formation des poils absorbants entraînant ainsi l'augmentation de l'absorption racinaire des microéléments et macroéléments.
- iii) garantir les besoins en azote et en phosphate pour la plante assurant ainsi un bon rendement de la culture tout en réduisant l'utilisation des fertilisants. Dans le cas de l'azote par exemple, Les rhizobiums fixent l'azote atmosphérique grâce à la nitrogénase produite, dans les nodosités.

Les racines des plantes et les hyphes des mycorhizes secrètent des phosphatases extracellulaires qui hydrolysent les liaisons phosphodiester dans le sol libérant ainsi le

phosphate dans le sol où il peut être assimilé par les racines des plantes (American Academy of Microbiology, 2013; Nygren et al., 2012).

Luzerne, mycorhizes et rhizobiums forment ainsi un système symbiotique d'importance cruciale dans les cultures des fourragères. Ce système forme une bonne combinaison qui présente une forte habilité à garantir les besoins de chaque partenaire symbiotique menant ainsi à des effets positifs sur la nutrition, la croissance de la plante et des microorganismes et du coup sur le rendement et la qualité des fourrages et la protection de l'écosystème.

➤ La plante légumineuse Les légumineuses représentent une des familles les plus importantes et les plus variées des Angiospermes avec 750 genres et environ 20 000 espèces réparties sur une aire géographique diversifiée (Cronk et al., 2006). Ce sont des plantes Eudicotylédones appartenant à l'ordre des Fabales, ordre appartenant à la famille des Fabacées (Cheriet, 2016). La luzerne, *Medicago sativa* L., est une légumineuse très cultivée au monde surtout au Canada, car elle est adaptée à son climat. Son plus grand développement se trouve dans les zones tempérées chaudes : Etats-Unis, Europe, Amérique du Sud, Asie, Japon, Australie, Nouvelle-Zélande, Afrique du Nord et Argentine (Barnes et al., 1990; Mauriès, 1994). Elle fait partie de la liste des plantes fourragères recommandées par le Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ 2013-2014). Cette plante est souvent appelée la reine des fourrages, car elle fournit d'excellents rendements de fourrage de qualité et elle garantit une bonne nutrition azotée de la culture subséquente.

➤ La luzerne La mycorhize arbusculaire est la forme usuelle chez les plantes agricoles.

CHAPITRE III

Technologies de production d'inoculum

III Technologie de production d'inoculum

La fabrication d'inoculum pour légumineuses nécessite la culture des bactéries spécifiques en concentration élevés et leur mélange avec un support poudreux qui a pour but de faciliter la manutention et l'application sur les semences des produits toute en favorisant en maximum la survie des microorganismes symbiotiques (P .BEUNARD, et al1989).

L'inoculation est la pratique qui consiste à introduire les souches de *Rhizobia* dans l'écosystème plante-sol ; un inoculum étant une formulation des souches en porteur solide ou liquide (Baraibar., 2000). Il y a plus de 100 ans que des recherches ont été entreprises en vue d'améliorer la croissance des plantes.

Les chercheurs se sont surtout attachés à élucider les questions de l'apport et la disponibilité d'azote et de phosphate, qu'ont les éléments nutritifs les plus indispensables à la croissance des plantes.

Les premiers inocula, constitués de bactéries telluriques, qui, induits dans les légumineuses, apportaient à celles-ci de l'azote, ont été commercialisés en 1898. Ces bactéries sont encore utilisées aujourd'hui et font l'objet d'importants travaux de recherche (Anonyme, 2001).

III.1 Inoculum mycorhizien :

L'application d'inoculants mycorhiziens commerciaux dans l'agriculture vise à entraîner une meilleure mycorhization des cultures par introduction d'une ou plusieurs souches étrangères de CMA qui ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des effets bénéfiques sur les plantes (augmentation de la nutrition, réduction des maladies, etc.). Les espèces qui sont couramment utilisées pour les inoculums commerciaux sont du genre des *Glomus*. Ces espèces sont naturellement très répandues dans les écosystèmes et ont comme avantage de coloniser une grande variété de plantes hôtes (Dalpé et Monreal, 2004 ; Fortin et al., 2008). L'inoculum sous forme solide (granuleux ou poudreux) ou en suspension liquide pourra se composer de différents types de propagules : spores, mycélium fongique, fragments de racines mycorhizées. Un ou plusieurs types de propagules peuvent être formulés dans un même inoculum endomycorhizien. De plus, les inoculums de champignons ectomycorhiziens ou endomycorhiziens peuvent contenir une ou plusieurs espèces fongiques mélangées. Les produits multi-espèces sont plus proches des conditions naturelles car dans les écosystèmes il est rare de ne rencontrer qu'une seule espèce de champignon mycorhizien. La présence de plusieurs espèces fongiques permet à l'inoculum de répondre à une plus grande diversité de conditions de culture (Haimet, 2013).

Inoculant mycorhiziens commerciaux

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

grande variété de plantes hôtes (Dalpé and Monreal, 2004; Fortin et autres, 2008). Les souches généralement sélectionnées ont la particularité d'adopter une stratégie évolutive de type **r** ou reproductrice, c'est-à-dire une croissance rapide et la production de beaucoup de spores. Cette stratégie permet aux souches introduites d'entrer très rapidement en symbiose avec la plante cultivée à la suite de l'inoculation. Ainsi, les cultures peuvent bénéficier rapidement des effets positifs de la symbiose. Les inoculant mycorhiziens peuvent être appliqués dans les champs sous diverses formules (liquide ou solide) et sont généralement appliqués au moment du semis ou de la transplantation des plants dans les champs.

Depuis déjà plusieurs années, certains pays en voie de développement ont mis en pratique l'inoculation de leurs cultures par des souches sélectionnées à haute performance. Les effets mesurés sur les rendements des cultures et sur la baisse des demandes en intrants chimiques Phosphatés de certains sont impressionnants. Le prochain chapitre fera un constat des principaux succès reliés à l'usage des inoculant mycorhiziens commerciaux dans l'agriculture à Cuba et en Inde, deux pays pionniers quant à l'adoption de cette biotechnologie.

III.2 Méthodes de production Inoculum mycorhizien

L'inoculum constitue la forme sous laquelle le champignon sera apporté à la plante. Il s'agit généralement d'une culture pure du champignon cible. Les techniques de production d'inoculum fongique diffèrent selon le type de mycorhize concerné. Chez les ectomycorhizes la production d'inoculum ne pose pas de problèmes majeurs. En effet,

- **Les ectomycorhizes** : sont majoritairement des symbiotes facultatifs donc capables de se développer et de fructifier en l'absence d'une plante hôte. Les études ont montré qu'il est possible d'isoler le champignon cible et de le multiplier en le plaçant simplement sur un 22 substrat approprié et arrosé avec des solutions nutritives de composition adéquate ou fertilisé avec des engrais retardés.
- **Les endomycorhizes** : constitue une embûche de taille à la production d'inoculum, car on ne sait pas les cultiver en l'absence d'une plante hôte. La multiplication in vitro sur racines vivantes est cependant réalisable (STRULLU et al, 1991).

Dans ce cas, on isole les propagules du champignon et on les cultive en présence d'une plante mycotrophe. Après développement de la plante, on récolte l'inoculum constitué par les racines mycorhizées et le substrat qui a servi de support pour la multiplication. En raison de l'absence de spécificité d'hôte des endomycorhizes, on peut utiliser des racines d'espèces végétales très diverses.

III.2.1 Etapes de production d'inoculum mycorhizien

Les étapes de la production de l'inoculum mycorhizien sont les suivantes :

- Recueillir du sol, avec des pousses des plantes pièges coupées à la couronne. Les racines sont finement hachées et mélangées avec le sol en utilisant un hachoir fort.
- Les racines hachées et le sol sont mélangés avec du sable grossier, ou bien massé dans un sac en plastique durable.
- Le mélange de terre est ensuite transféré dans un pot en plastique de 15 cm de hauteur.
- Plantez des graines de la plante piège appropriée dans le pot.

- Les cultures en pots sont maintenues dans une serre pendant au moins 3 mois tout en vérifiant la sporulation de temps en temps. Après quatre mois, la sporulation des mycorhizes peut être à la pointe. Des tests sanitaires peuvent également être effectués
- pour s'assurer qu'aucune contamination par des champignons parasites ne s'est produite.
- Garder l'application des engrais à des faibles quantités, afin d'encourager la prolifération des mycorhizes à arbuscules.

III.2.2 Qualité des inoculum

Concernant la qualité des inoculum disponibles, plusieurs critères mentionnés sur l'emballage doivent être pris en compte :

- La dose d'utilisation qui informe sur la dose minimale d'inoculum nécessaire pour garantir la mycorhization d'un plant ou d'une surface végétalisée.
- Le nombre de propagules / unité de poids ou de volume du produit qui indique la richesse minimale de l'inoculum garantie par le fabricant.

La dose d'utilisation préconisée et la richesse en propagules sont liées. Le dénombrement de propagules par unité d'inoculum ne suffit toutefois pas pour évaluer la qualité d'un inoculum. Le critère de qualité le plus précis repose sur le dénombrement des propagules effectivement viables et infectieuses. Dans ce cas, une méthode utilisant un test biologique sur plante c'est à dire un test type MPN doit être réalisé. La durée de conservation (DLUO) ainsi que les conditions optimales de conservation de l'inoculum sont mentionnées sur l'emballage. La durée de conservation aura été définie en prenant en compte le nombre de propagules viables et infectieuses présentes dans l'inoculum en fin de vie. Ainsi, il est essentiel que l'utilisateur garde à l'esprit qu'un inoculum est un produit composé de microorganismes vivants et qu'il respecte les conditions d'utilisation et de stockage prescrites par le fournisseur (Haimet, 2013).

III.2.3 Production industrielle d'inoculant mycorhizien

Depuis la démonstration originale de Barbara Mosse en 1958, ce postulat continue de se confirmer dans la majorité des travaux de recherche mobilisant aujourd'hui des milliers de chercheurs et praticiens de par le monde. Devant l'ampleur du phénomène, auquel n'échappent ni les plantes agricoles ni les plantes horticoles, maraichères aussi bien qu'ornementales, on a cherché à définir comment on pourrait mettre à contribution cette symbiose pour rationaliser les pratiques agricoles et les orienter vers des pratiques plus respectueuses de l'environnement. Nous ne parlerons ici que des mycorhizes arbusculaires prévalant chez les plantes agricoles et horticoles.

Dans les manuels de botanique des années 2000, on retrouve encore une description des racines primaires des plantes le plus souvent dépourvues de leur symbiose arbusculaire. Et pourtant, cette symbiose omniprésente modifie en profondeur les relations des plantes avec le sol et sa fertilité, avec les autres microorganismes du sol, avec les organismes pathogènes ainsi qu'avec les insectes pollinisateurs et les herbivores. La composition chimique des plantes est modifiée par la présence des mycorhizes, ce qui affecte sans aucun doute la composition de nos aliments. Devant ces considérations, il faut conclure qu'il n'y a pas d'agriculture biologique valable sans une considération approfondie du rôle des mycorhizes.

Bien que les champignons mycorhiziens soient omniprésents dans les sols naturels, les pratiques culturales perturbent le plus souvent leurs populations et leur diversité. Dans ces conditions, les nombreuses expériences conduites depuis plus de 10 ans au Canada et ailleurs dans le monde démontrent le plus souvent que l'addition aux sols de spores ou propagules de ces champignons (inoculum) se traduit par un départ plus rapide du développement de la plante, une floraison plus hâtive et des rendements accrus. L'utilisation de ces inocula permet de réduire l'utilisation d'engrais phosphatés de 25% ou même 50 % selon les sols, les espèces végétales et leurs cultivars. L'incidence des maladies est également moins fréquente, ce qui se traduit par une réduction de l'utilisation des biocides. Un meilleur approvisionnement en eau permet à la plante de mieux résister aux épisodes de sécheresse. Finalement, l'utilisation de l'inoculation mycorhizienne se traduit pour le producteur par des gains significatifs en rendement et en retour sur les investissements, accompagnés de réduction substantielle des fertilisants et pesticides de synthèse.

Mais voici que la production industrielle de ces champignons mycorhiziens arbusculaires présente un défi de taille. Associés aux plantes depuis leur apparition, il y a plus de 400 millions d'années, ces champignons sont devenus totalement inféodés à leurs symbiotes végétaux, de sorte que pour en produire les spores (semences) il faut absolument faire appel à une plante porteuse. L'existence d'une telle contrainte pour la production industrielle massive sur plantes entières permettant l'inoculation de millions d'hectares nécessiterait des installations onéreuses et risquées quant à l'introduction de contaminants et la régularité des productions. Tout de même, dans les années 1980, faute de mieux, nous produisons des inocula efficaces de souches sélectionnées en serres.

III.3 Production d'inoculum rhizobien

La première étape de la production d'inoculum est d'obtenir une souche de rhizobium pour la ou les légumineuses à inoculer. Trois conditions doivent être remplies pour produire un inoculum avec la souche de Rh obtenue :

- La souche de Rhizobium doit être très effective, c'est à dire très apte à fixer l'azote dans le nodule de la légumineuse pour laquelle l'inoculum est recommandé.
- La souche de rhizobium doit être très compétitive, c'est à dire, qu'en présence d'autres souches de Rhizobium elle doit être très apte à former des nodules sur le système racinaire de la légumineuse pour laquelle l'inoculum est recommandé.
- la souche de rhizobium doit présenter un taux de survie très élevé dans le sol.

III.3.1 Les différents types d'inoculum

Il existe de nombreux inocula commerciaux qui se rapprochent des principaux types suivants (Bashan, 1998) :

- **Inoculum en poudre**

C'est le type le plus commercialisé (Graham Weiss et al, 1987). La culture des rhizobia est mélangée à un support finement broyé, dont le pH est proche de 6,5 qui protège des rhizobia pendant le stockage et facilite leur adhésion sur les graines. La tourbe non acide reste la meilleure des supports. Mais divers produits organique ou minéraux peuvent être employés pour la remplacer.

- **Inoculum granulé**

Ce produit est constitué par des micro-granules obtenus à partir d'un inoculum en poudre aggloméré avec des paillettes d'argile. Localisé dans la raie du semi, cet inoculum permet de séparer les rhizobia de la graine si cette dernière est traitée par des insecticides (Beuerlein, 2003).

- **Inoculum liquide**

L'inoculum est constitué par la culture liquide des rhizobia qui est diluée au moment d'emploi. Ce produit doit être conservé à 4°C et les rhizobia ont une mauvaise survie sur la graine (Singleton et al., 2002). Il peut être ajouté aux graines avant semis ou appliqué dans la raie de semis.

III.3.2 Choix de support

Le critère principal du choix est la capacité de support à permettre une bonne survie des Rhizobium pendant le stockage (Ruiz-Argeuso et al, 1979) ; cette caractéristique est primordiale et doit absolument faire l'objet d'une étude au laboratoire avant d'envisager l'utilisation en grande quantité de support. Un certain nombre des règles permet cependant de faire un tri rapide :

- ✓ Richesse en matière organique (au moins 40%).
- ✓ PH proche à la neutralité (optimale en générale entre 6 et 7).
- ✓ Faible teneur en sel: les valeurs inhibitrices varient cependant selon les souches.
- ✓ Forte capacité de rétention d'eau.
- ✓ Absence des produits toxiques (insecticide ou fongicide) (Beuerlein, 2003).
- ✓ Compatibilité avec toutes les souches de rhizobium et sauvegarder d'une population standard de 3 à 6 mois (Burton, 1981 ; Smith, 1996).

La tourbe donne généralement les meilleurs résultats mais peut également être envisagée l'utilisation d'une grande variété des supports : résidus de culture (paille, composte ...) minéraux (talc, vermiculite, argiles...), charbon, le bois,...etc. Dans la mesure de possible, on choisira comme support un matériel disponible localement et à faible cout (Stephens et Rask, 2000 ; Ferreira et Castro, 2005).

III.3.3 Conservation et emploi d'inoculum

L'inoculum est un produit biologique vivant qui ne peut être stocké et utilisé comme un engrais inerte, il nécessite donc certaines précautions pour sa conservation et son emploi. La conservation de l'inoculum doit se faire à 4°C et la température ne doit jamais dépasser 30°C (Daza et al .,2000 ; Maougal, 2004). Au moment d'inoculation il est recommandé de travailler dans un local frais, à l'abri de soleil. Dans tous les cas, bien lire l'étiquette qui précise le mode d'emploi de l'inoculum et la date limite d'utilisation (Mantonge et Beunard, 1984).

III.3.4 Facteurs affectant la réponse de l'inoculum rhizobienne

La réponse positive ou l'absence de la réponse à l'inoculation peuvent dépendre soit de la qualité de l'inoculum lui même, soit des caractéristiques symbiotiques de la plante ou des

propriétés de sol (Heijnen et Van Veen, 1991 ; Postma et al 1989), soit encore d'une ou plusieurs des composants de système de sol - plant microorganisme.

CHAPITRE IV

Les méthodes d'étude de la Symbiose mycorhizienne et Rhizobienne au niveau de Laboratoire

IV Les méthodes d'étude de la symbiose mycorhizienne et rhizobienne au niveau laboratoire :

IV.1 Méthodologie suivie pour l'étude des *Rhizobium*

IV.1.1 Isolement des rhizobia à partir de nodosités récoltées *in-nature*

IV.1.1.1 Collection des nodosités

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



Figure 15: Les nodules de la plante *Medicago sativa*.L

IV.1.1.2 Isolement de souches de *Rhizobium*

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

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

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

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

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

IV.1.1.3 Purification des isolats :

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

IV.1.1.4 Identification des souches de Rhizobium

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

IV.1.1.4.1 Examen microscopique

a) Coloration de Gram

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

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

-Préparée un frotti à partir de culture pure.

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

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

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

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

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

-Sécher la lame par papier absorbant.

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

IV.1.1.4.2 Examen mobilité

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

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

IV.1.1.5 Tests biochimiques

IV.1.1.5.1 Vitesse de croissance sur YMA + Bromothymol

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

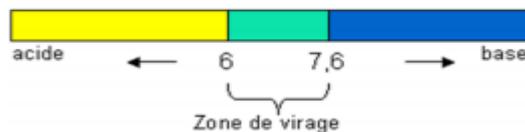


Figure 16: Couleurs de bleu bromothymol

IV.1.1.5.2 Recherche de certaines enzymes

- **Réduction des nitrates**

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide TY contenant 0.1% KNO₃ (p/v) (Behringer, 1974), Après 05 jours d'incubation avec agitation à 28°C, Au terme de l'incubation à

chaque tube on ajoute les réactifs nitrate réductase 1 et nitrate réductase 2 (Annexes01). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et observer après quelques minutes la teinte obtenue.

- **Hydrolyse de l'urée**

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

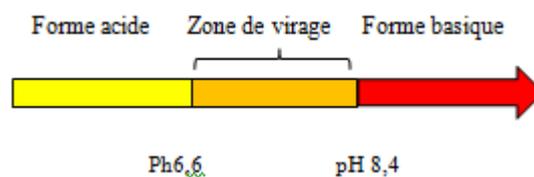


Figure 17: virage de couleur après hydrolyse de l'urée.

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

- **Activité Cellulosique**

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

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

IV.1.1.5.3 Conservation des souches

Les isolats purifiés sont conservés selon le procédé suivant :

- Pour une courte durée, nous les repiquons sur le milieu YEM incliné ; en effectuant des stries régulières sur la surface de leur gélose. Après 48h d'incubation selon les isolats, les tubes sont conservés au réfrigérateur à 4°C, à raison

de plusieurs exemplaires par souche selon la méthode de Vincent, (1970). Des repiquages réguliers tous les 6 mois est recommandés.

IV.1.1.6 Etude des paramètres symbiotiques

IV.1.1.6.1 Test d'infectivité des souches

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

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

IV.1.1.7 Stérilisation, germination et mis en culture des plantules de *Médicago sativa*

Les graines de *M. sativa* sont désinfectées avec de l'hypochlorite du sodium à 12° pendant 5 min et rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile et laissées dans de l'eau distillée, toujours, pendant 30 mn après le dernier rinçage. Les graines désinfectées sont mises à germer aseptiquement dans l'eau gélosée à 1% et incubées à 25°C à l'obscurité. Après 4 à 5 jours, les plantules sont transférées dans des tubes de Gibson (18 cm de longueur, 2 cm de diamètre et une capacité de 35 ml) contenant une solution nutritive dépourvue d'azote (Bertrand, 1997). La culture est conduite dans une chambre de culture contrôlée (Une température de 25°C ± 1, une photopériode de 14 heures et une luminosité de 200 lux).

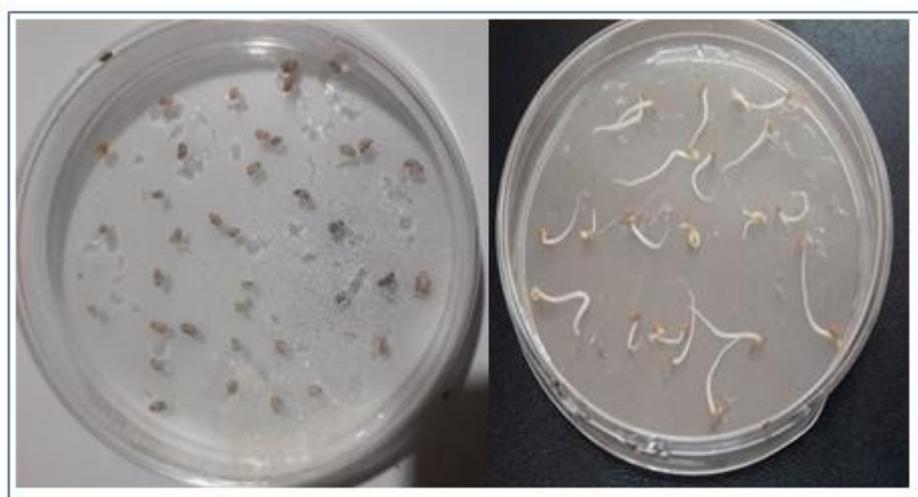


Figure 18:Germination des grains de Médicago sativa

IV.1.1.7.1 Inoculation des plantules in Vitro

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

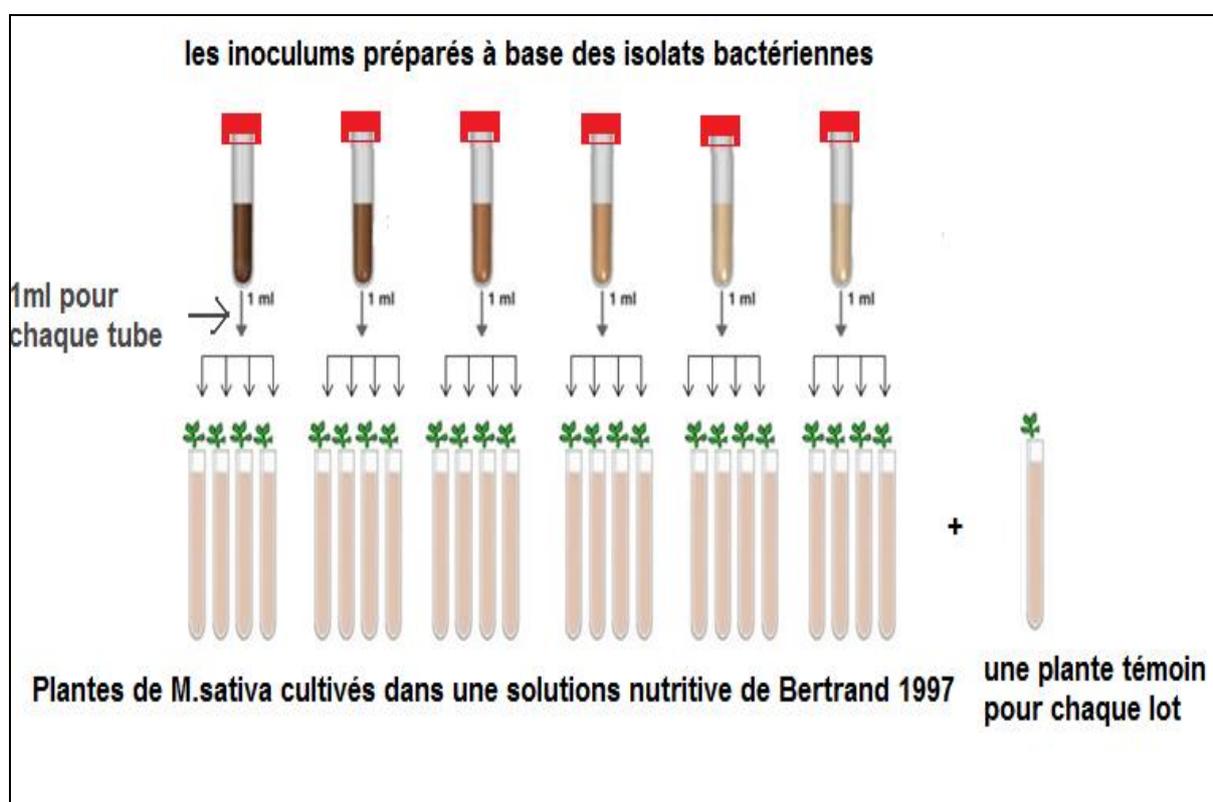


Figure 19:Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisé in-vitro.

IV.1.1.7.2 Estimation de la croissance des plantes in-vitro et observation du phénotype des plantes inoculées :

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

IV.2 Méthodologie suivie pour l'étude des Mycorhizes

IV.2.1 Piégeage des endomycorhizes

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

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

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

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

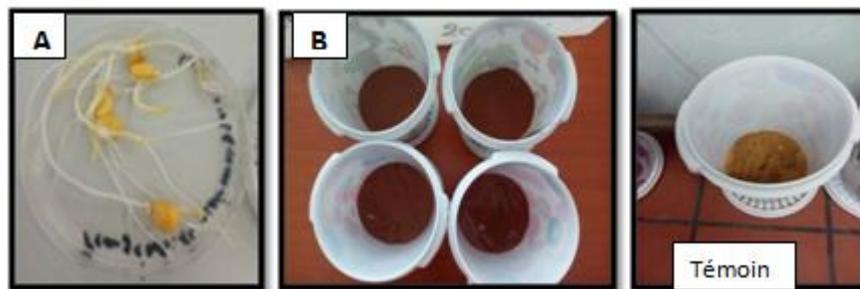


Figure 20:dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton et Walker(1992).

A : plantules de maïs après 3 jours de germination.

B : plantules de maïs transplantés.

Des pots en plastique de 1 L de volume, préalablement lavés et désinfectés avec de l'eau de javel 12°C, ont été remplis à moitié avec le substrat sableux sur lequel 200g de l'inoculum y ont été déposés. Les pots ont été ensuite recouverts du substrat sableux autoclavé afin de limiter les risques de contamination. Les graines pré-germées de maïs ont été semées à raison de trois plantules par pot. Deux répétitions sont réalisées pour chaque sol. Un témoin sans inoculum est réalisé dans les mêmes conditions avec seulement du substrat autoclavé afin de vérifier que les conditions de culture sont exemptes de contamination (figure 26).

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

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

IV.2.2 Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes

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

IV.2.2.1 Echantillonnages

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

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

IV.2.2.2 Lavage

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

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

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

IV.2.2.3 Eclaircissements et coloration des racines

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

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

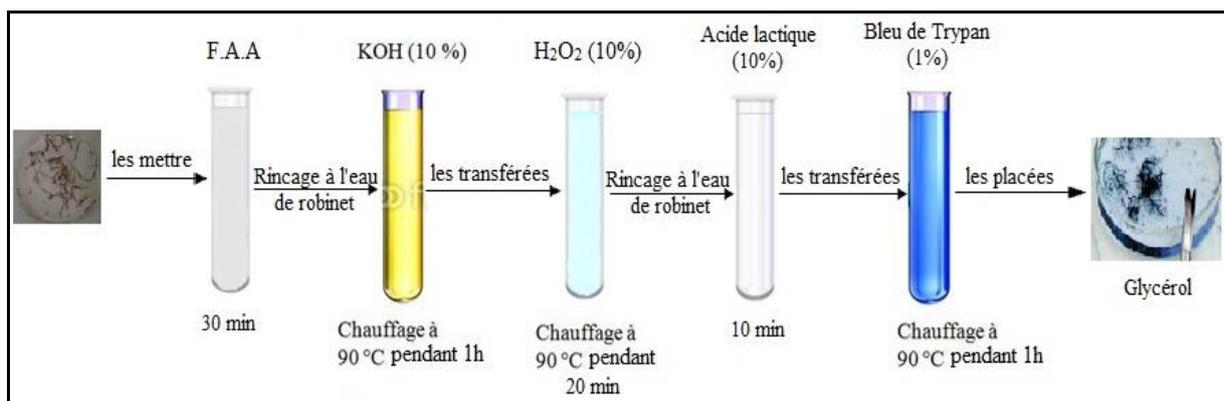


Figure 21:Schéma représentatif des étapes d'éclaircissement et coloration des racines.

IV.2.2.4 Montage et observation des racines

Après la coloration les racines de chaque plante *Medicago Sativa L* ont été découpées en fragments de 1cm de longueur environ et monté parallèlement à raison de 10 fragments par lame dans le glycérol, puis observer au microscope photonique à différentes grossissement.

La plante est jugée mycorhizée lorsque le système racinaire présente au moins un point de colonisation (pénétration d'un hyphe dans la racine ; présence des structure de colonisation).

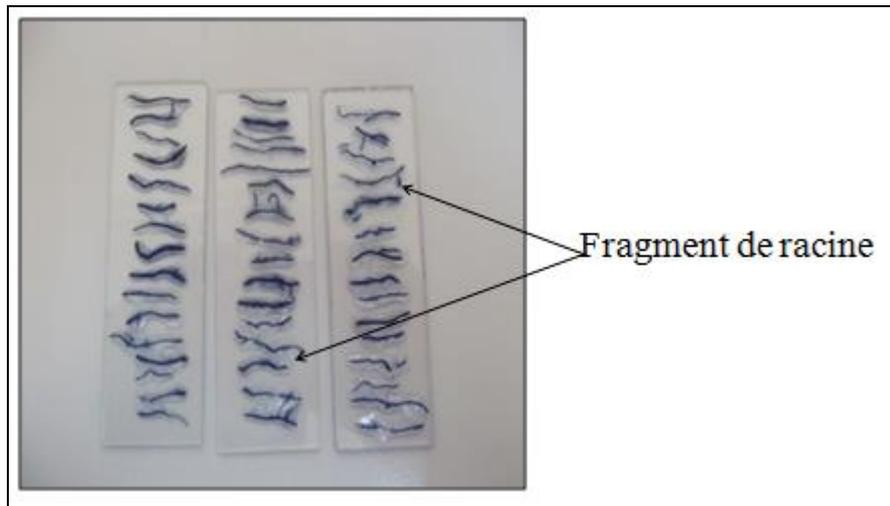


Figure 22: Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l'identification microscopique.

IV.2.2.5 Estimation de la colonisation MA des racines

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$m_{A3} = ((95n_{5A3} + 70n_{4A3} + 30n_{3A3} + 5n_{2A3} + n_{1A3}) / \text{nombre de fragments mycorhizes}) * 100 / m$$

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

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

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

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

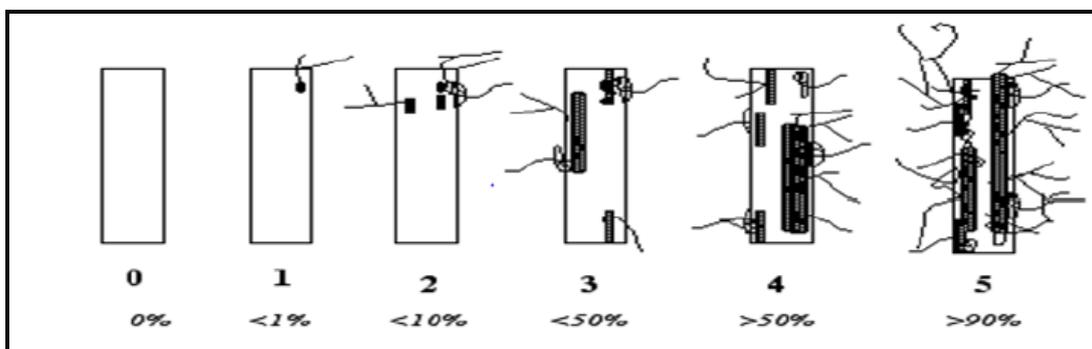


Figure 23: Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire

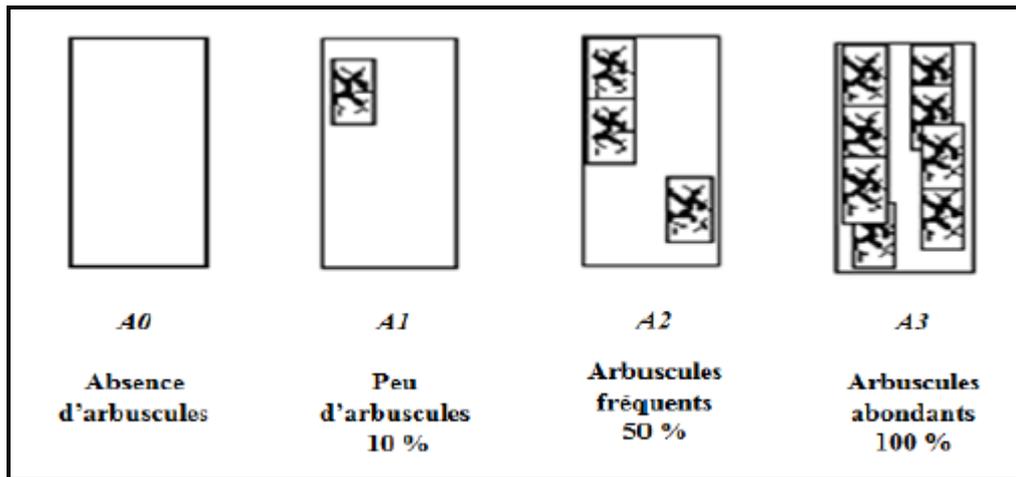


Figure 24: Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules

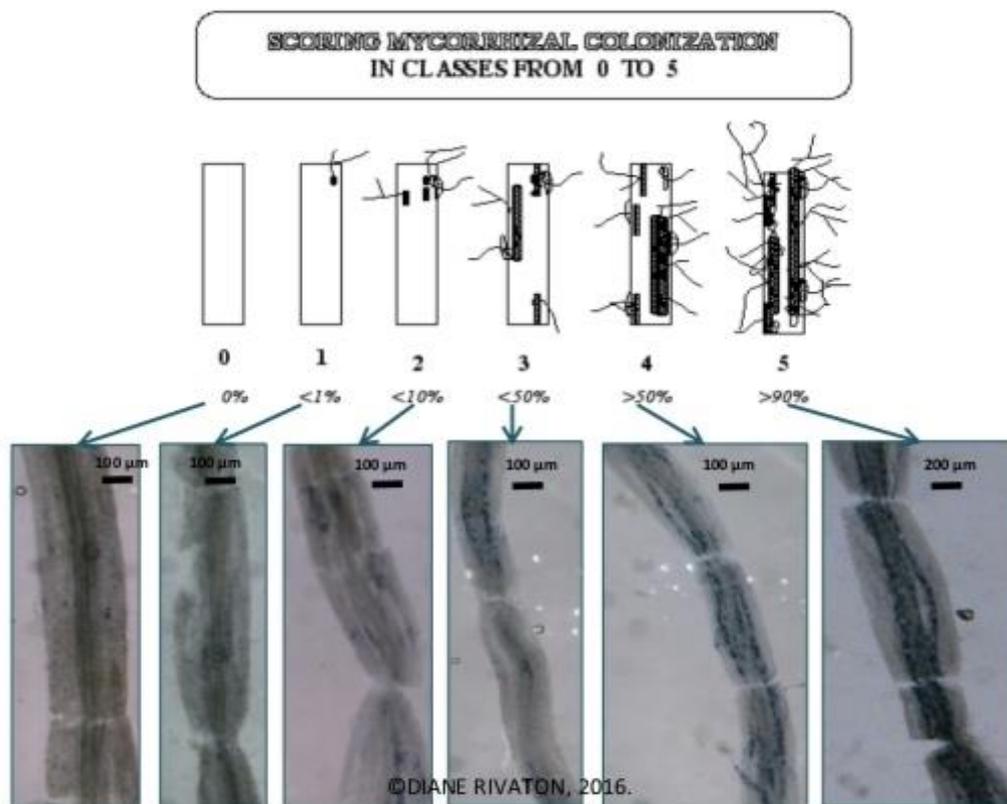


Figure 25: Classification des différents niveaux de colonisation mycorrhizienne du cortex racinaire d'après Trouvelot et al., 198

IV.2.2.6 Extraction des spores :

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

En effet, 100g de sol rhizosphérique sèche issus de la culture de maïs sont prélevés et mis dans 1000ml d'eau, la suspension est ensuite vigoureusement agitée pendant 1min puis filtrée dans

une série de tamis à mailles décroissantes (500 -250- 125 et 45 μm) sous un jet d'eau de robinet jusqu'à ce que l'eau qui en ressorte devienne claire et limpide. Les tamisât contenant les spores des CMA sont mélangés et mis en suspension dans de l'eau distillé.

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



Figure 26:Extraction des spores des champignons endomycorhiziens selon la méthode de Gerdemann et Nicolson (1963).

IV.2.2.7 Observation et Caractérisation morphologique des spores :

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

Conclusion

CONCLUSION

L'effet bénéfique de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses est bien connu, car elle comble directement les besoins de la plante en azote à partir de l'atmosphère, avec des apports annuels variant de 110 à 227 kg N/ha (Herridge et al., 2014). Les endomycorhizes arbusculaires (MA) importantes pour la croissance et la protection des plantes, forment aussi une symbiose tripartite avec l'association *Rhizobium*-légumineuses (Nygren et al., 2012).

L'usage d'inoculants mycorhisiens et rhizobiens dans les cultures est assez récent et encore peu employé pour les agriculteurs. Inspirés par le succès qui ont réalisés dans les pays développés. Cette étude permettra de constater l'intérêt de la symbiose tripartite mycorhizien et rhizobien des cultures et qui permis à favoriser une agriculture à la fois plus productive et plus durable.

Cette étude est dédiée à la formulation de plusieurs recommandations visant à améliorer la réponse de cette nouvelle biotechnologie face aux défis de l'agriculture moderne pour assurer une agriculture plus durable.

Références Bibliographiques

Bibliographie

- ANONYME, I. (2001). *Cinquième conférence des états parties chargée de l'examen de la convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes bactériologiques (biologiques) ou aux toxines et sur leur destruction*. BWC/CONF.V/4, 14 Sep 2001.
- ANSORI, A., & GHOLAMI, A. (2015). *Improved nutrient uptake and growth of Maize in response to inoculation with thiobacillus and Mycorrhiza on an Alkaline soil*. communication in soil science and plant Analysis.
- Bago, B., Zipfel, W., Williams, R., & Piché, Y. (1999). *Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo two-photon microscopy*. *Protoplasma*. 209: 77-89.
- BARAIBAR, A. (2000). - *Rhizobium inoculants form , field performance and inoculation procedures*.
- Barea, J., & Hourubia, M. (1993). *Micorrizas y revegetacion*. Ecosistemas.
- Bonfante, & Fasolo. (1984). *Anatomy and morphology of VA mycorrhizae*. En : Powell CL, Bagyaraj DJ(eds) *VA mycorrhiza*. Boca Raton: CRC Press.
- BRUNBRETT, M. (2004). *Diversity and classification of mycorrhizal association*. *Biol: Rev*.
- Brundrett, M. (2002). *Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants*. *New Phytologist*.154:175-304.
- Brundrett, M. (2009). *Mycorrhizal association and other means of nutrition of vascular plants : understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis*. *Plant and Soil*.320:37-77.
- Brundrett, M., Abbott, L., & Jasper, D. (1999). *Glomalean fungi from tropical Australia. I. comparison of the effectiveness of isolation procedures* . *Mycorrhiza*.8:350-314.
- Buscot, F., Munch, J., Charcosset, J., Gardes, M., Nehls, U., & Hampp, R. (2000). *Recent advance in exploring physiology and biodiversity ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems*. *FEMS Microbiol: Rev*.
- CANDIDO, V., & al, e. (2015). *Growth and yield promoting effect of artificial mycorrhization on field tomato at different irrigation regimes*. *Scientia Horticulturae*.
- Cheriet, & Dahbia. (2016). *Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (Medicago sativa) : coordination with fatty acids synthesis and redox metabolism of chloroplast*.
- Cronk, Q., Ojeda, I., & Pennington, R. (2006). *Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics*. *Curr Opin Plant Biol*. vol 9, 99-103pp.

- Declerck, S., D'Or, D., Bivort, C., & de Souza, F. (2004). *Development of extraradical mycelium of Scutellosporareticulata under root-organ culture : spore production and function of auxiliary cells*. Mycol. Res. 108:84-92.
- Declerck, S., Strullu, D., & Plenchette, C. (1998). *Monoxenic culture of the intraradical forms of Glomus sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection*. Mycologia. 90:576-585.
- Dexheimer, J. (1997). *Étude structurale et fonctionnelle des interfaces entre le champignon et la plante-hôte*. Rev. For. Fr. 43-56.
- FORTIN, J., & al, e. (2008). *les mycorhizes: la nouvelle révolution verte*. Québec: édition multimondes, 131.
- Frank, A. (1885). *Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze*. Ber Dtsch Bot Ges 3: 128–145.
- GARMENDIA, I., & al, e. (2006). *Défence-related enzymes in pepper roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and/or verticillium dahliae*. Biocontrol.
- GERBAYE, J. (2013). *La symbiose mycorrhizienne: une association entre les plantes et les champignons*. Paris: Edition Quae.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., & al, e. (1994). *Gene expression and molecular modifications associated with plant responses to infection by arbuscular mycorrhizal fungi*. Dordrecht: Kluwer.
- Guissou, T., B A A, M., Plenchette, C., G Uinko, S., & Duponnois, R. (2001). *Effets des mycorhizes à arbuscules sur la tolérance à un stress hydrique de quatre arbres fruitiers*. Science et changements planétaires/ Sécheresse. 12, 2: 121-127.
- Harley, J. (1986). *Mycorrhizal studies : past and future*. In : *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Paris, France.: 1er SEM. On mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (Eds.), I.N.R.A. 25-35.
- Ianson, D., & Linderman, R. (1993). *Variation in the response of nodulating*.
- Kivlin, S., Hawkes, C., & Treseder, K. (2011). *Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi*. Soil Biol Biochem 43: 2294–2303.
- Koele, N., Dickie, I., Blum, J., Gleason, J., & de Graaf, L. (2014). *Ecological*.
- Koffi, M. C., De La Providencia, I. E., Elsen, A., & Declerck, S. (2009). *Development of an in vitro culture system adapted to banana mycorrhization*. African Journal of Biotechnology. 8: 2750-2756.
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L., & Read, D. (2004). *Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant*. Canadian Journal of Botany. 82: 1016-1045.

- Morton, J. (1990). *Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae*. Mycologia. 82: 192–207.
- Newman, E., & Reddell, P. (1987). *Distribution of mycorrhizas among families of vascular plants*. : New Phytologist. 106: 745-751.
- Öpik, M., Zobel, M., Cantero, J., Davison, J., Facelli, J., Hiiesalu, I., et al. (2013). *Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi*. Mycorrhiza 23: 411–430.
- Peterson, R., Massicotte, H., & Melville, L. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. Oxon: CABI publishing.
- Plassard, C., Scheromm, P., Mousain, D., & et Salsac, L. (1991). *assimilation of mineral nitrogen and ion balance in the two partners of ectomycorrhizal symbiosis: Data and hypothesis*. Experientia.
- Provorov, N., Borisov, A., & Tikhonovich, I. (2002). *Developmental genetics and evolution of symbiotic structure in nitrogen-fixing nodule and arbuscular mycorrhiza*. J Theor Biol.
- Read, D., DicRett, J., Francis, R., Ligron, R., & Russel, A. (2000). *Symbiotic fungal in (lower) land plants*. philos Transc : Soc lond ser B-Biol sci.
- Redecker, D., Morton, J., & Bruns, T. (2000). *Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales)*. Mol. Phyloge. Evol., 14(2) : 276-284.
- Reinhardt, D. (2007). *Programming good relations - development of arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Curr Opin Plant Biol. 10 :1–8.
- Reinhardt, D. (2007). *Programming good relations--development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Current Opinion in Plant Biology 10, 1: 98-105.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). *A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution*. Mycological Research. 105: 1413-1421.
- Shinde, S., Villamor, J., Lin, W., Sharma, S., & Verslues, P. (2016). *Proline significance of mineral weathering in ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal*.
- Simon, L., Ousquet, J., Levesque, L., & Lafonde, M. (1993). *Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants*. Nature. 363: 67-69.
- Smith, S., & Read, D. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. San Diego: Academic Press.
- Smith, S., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. San diego: Third édition, Academic.
- Spatafora, J., Chang, Y., Benny, G., Lazarus, K., Smith, M., Berbee, M., et al. (2016). *A phylum level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data*. Mycologia 108: 1028–1046.

- Taylor, L., & Grotewold, E. (2005). *Flavonoids as developmental regulators*. *Curr Op Plant Biol* 8: 317-323.
- Tedersoo, L., May, T., & Smith, M. (2010). *Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages*. *Mycorrhiza* 20: 217–263. [10.1016/j.soilbio.2013.10.041](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.041).
- Voets, L., De la Providencia, I., & Declerck, S. (2006). *Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks*. *New Phytologist*. 172: 185-188.
- Whipps, J. (2004). *Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens*. *Can J Bot*.
- Xie, Z., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W., et al. (1995). *Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal*.