

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



Faculté des Sciences.

Département de biologie 2^{ème} année Master

Thème

**La symbiose tripartite :
Légumineuse mycorhizes et rhizobium**

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie– biotechnologie et génome végétal

Présenté par :

M^{elle} BENZAIER Asmaa

M^{elle} BENZAIER Nadia

Membres du jury :

Mr AMMAM Abdelkader

Mme BERBER Naima

Encadreur:

Mme FARES Soria

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

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

tous tenons à exprimer nos vifs remerciements :

A *tfme FARES Souria*, tfa directrice de recherche qui nous a accordé tout le temps pour son aide morale et scientifique.

À *tfonsieur BERGUIG.tf*. Responsable de la formation, pour ses enseignements « enthousiasmants » en

tficrobiologie. A toutes les personnes qui *m'ont aidé* dans la réalisation de notre travail surtout

tfonsieur OTtfAtfE

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

Dédicaces :

A nos parents et mes *sœurs* et mes frères qui comptent beaucoup pour nous,
A toute les familles, et les amis, surtout à nos poussins Djawad, Wail, Abedelbaset
Et à toutes les personnes qui, par leur amour et leur *encouragement*, *m'ont* ouvert la
voie vers les cimes du savoir, nous dédions notre travail.

Liste d'abréviations :

(CMA): Le champignon mycorhzien à arbuscule

MA: mycorhzien à arbuscule

(AC) : cellules auxiliaires

(HyER).: hyphes extra-racinaires

BNL: bactéries nodulants les légumineuses

(YEM): Yeast Extract Mannitol

(LCO): lipo-chitooligosaccharides

(fixX): la fixation symbiotique de l'azote L'un d'eux au mois

EPS: Les exopolysaccharides

(KPS): Les polysaccharides capsulaires

(LPS): Les lipopolysaccharides

(GOGAT): glutamine synthétase cytoplasmique et le glutamate synthase

Listes des Figures

Figure 1	diversité des associations mycorhiziennes chez les Angiospermes.
Figure 2	mycorhize d'une Orchidée (<i>Pterostylis vittata</i>)(Anonyme2)
Figure 3	mycorhize éricoïde au niveau des racines de <i>Leucopogon erticillatus</i> (Anonyme1)
Figure 4	Les différents types de symbioses mycorhiziennes : schémas d'une coupe longitudinale de racines mycorhizées
Figure 5	Représentation schématique d'une MA (Fortin et al., 2008).
Figure 6	Un mélange des spores mycorhiziennes arbusculaires sous la loupe.
Figure 7	Arbuscule fongique de <i>Glomus</i> .
Figure 8	vésicules (en bas à droite de la photo) et un arbuscule (en haut à gauche)
Figure 9	Racine endomycorhizées environnées de mycélium portant des spores (photo de Yolande Dalpé) citée dans
Figure 10	Aspect des cellules auxiliaires (AC)
Figure 11	Représentation schématique des trois principaux types de la colonisation du cortex racinaire par les Gloméromycètes formant des endomycorhize arbusculaire
Figure 12	Morphologie de <i>rhizobium trifoli</i>
Figure 13	Bactéries du genre <i>Rhizobium</i> vues au microscope (x 1 000) Schéma montrant nombreux bactéroïdes dans une cellule d'une nodosité racinaire.
Figure 14	Aspects macroscopique des rhizobiums (ASMA ,2008)
Figure 15	les nodules chez légumineuses
Figure 16	Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses. D'après Brenic et Winans (2005).
Figure 17	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.
Figure 18	La structure du nodule.
Figure 19	Schéma de la surface d'une paroi de <i>Rhizobium</i> . (Chataigné ,2007).
Figure 20	Fixation biologique de l'azote lors d'une relation symbiotique
Figure 21	Les nodules de la plante <i>Medicago sativa.L</i>
Figure 22	Couleurs de bleu bromothymol
Figure 23	virage de couleur après hydrolyse de l'urée
Figure 24	Germination des grains de <i>Médicago sativa</i>
Figure 25	Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisé <i>in-vitro</i> .
Figure 26	dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton et Walker(1992).
Figure 27	Schéma représentatif des étapes d'éclaircissement et coloration des racines.
Figure 28	Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l'identification microscopique.
Figure 29	Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire
Figure 30	Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules
Figure 31	Extraction des spores des champignons endomycorhiziens selon la méthode de Gerdemann et Nicolson (1963).

Listes des tableaux

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

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

وبهدف تطبيق التطعيم المزدوج بالفطريات الجذرية والتممية المستدامة.

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

والجزء الثاني مخصص لمصلحة التعايش الثال ثي 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 الرئي سية: الكائنات الحية الدقيقة، الفطريات الجذرية، الجذور، التتمية المستدامة، البكتيريا المثبتة للنيتروجين، التعايش الثال ثي.

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,

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 générale

Introduction :

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 certaines 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 mycorrhiziens 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 mycorrhiziens 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 mycorrhizien 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 mycorrhiziens 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 mycorrhiziens 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 mycorrhiziennes 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.

CHAPITRE I

**Interactions plantes-
symbiotes**

I. Interactions plantes-symbiotes

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

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

symbiose mycorhizienne

De la découverte à la généralisation

Au début des années 1840, le forestier allemand Theodor Hartig observe au microscope les racines fines de différentes espèces d'arbres et en décrit la structure. Ses dessins montrent un entrelacs compact de cellules qui s'immiscent entre les cellules du cortex racinaire (Hartig, 1840). Alors qu'il ignore la nature fongique de ce réseau cellulaire, Hartig vient à son insu de dévoiler une alliance fondamentale entre plantes et champignons. D'autres biologistes font des observations similaires au cours du XIXe siècle et finissent par révéler l'identité fongique de l'organisme colonisant ainsi les racines des arbres. C'est finalement le botaniste allemand Albert Bernhard Frank qui en 1885 synthétise ces travaux et propose le terme mycorhize (du grec *myco* : champignon et *rhiza* : racine) pour désigner l'organe mixte plante-champignon, siège de cette association récurrente (Frank, 1885). Frank va même plus loin en démontrant expérimentalement le rôle bénéfique du champignon dans la croissance du pin sylvestre (*Pinus sylvestris* ; Frank, 1892a).

Depuis ces travaux précurseurs, des associations durables avec des champignons ont été observées chez plus de 90 % des familles d'Embryophytes : mycothalles et mycorhizoïdes chez les bryophytes *sensu lato*, mycorhizes arbusculaires chez les ptéridophytes, mycorhizes arbusculaires, ectomycorhizes et autres types (voir définitions dans la partie suivante) chez les Spermatophytes (Wang et Qiu, 2006). Les mycorhizes sont une composante essentielle de la biologie des plantes terrestres, et ce, dans tous les grands biomes (Read, 1991). A cette omniprésence actuelle s'est ajoutée la découverte de structures semblables à certains types de mycorhizes parmi les fossiles des premiers végétaux terrestres connus (Kidston et Lang, 1921 ; Remy *et al.*, 1994), mettant ainsi en lumière que Les Basidiomycètes, Ascomycètes et Gloméromycètes sont les trois seuls groupes de champignons connus qui ont la possibilité de mettre en place des symbioses *via* leur association avec les racines des plantes pour former des mycorhizes (Garbaye, 2013).

Principaux types de la Symbiose mycorhizienne :

On distingue classiquement quatre principaux types de mycorhizes : les mycorhizes arbusculaires, les ectomycorhizes, les mycorhizes d'orchidées et les mycorhizes éricoïdes (van der Heijden *et al.*, 2015). S'y rajoutent quelques associations particulières, restreintes à certains groupes, que nous ne traiterons pas ici.

Les mycorhizes arbusculaires :

Ce type de mycorhize est de loin le plus fréquent puisqu'il concerne les trois quarts environ des espèces d'Angiospermes (Brundrett, 2009). Dans cette association, les hyphes des champignons colonisent le cortex de la racine, dégradent et traversent les parois végétales, puis pénètrent dans les cellules hôtes en développant des ramifications typiques en forme de petits arbres (*arbuscules* ; **Figure 1**). Le déploiement de cette interface importante – deux à quatre fois la surface initiale de la membrane plasmique (Toth *et al.*, 1990) – est un élément clé de la symbiose. Au cours de l'invasion par le champignon, la membrane plasmique de la cellule hôte est repoussée mais jamais rompue, de sorte que la cellule conserve son intégrité. 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'œil 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 cloisonnées proche des Mucoromycètes (par exemple *Rhizopus*, *Mucor* ; Spatafora *et al.*, 2016). Ce sont des symbiontes 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 symbiontes fongiques.

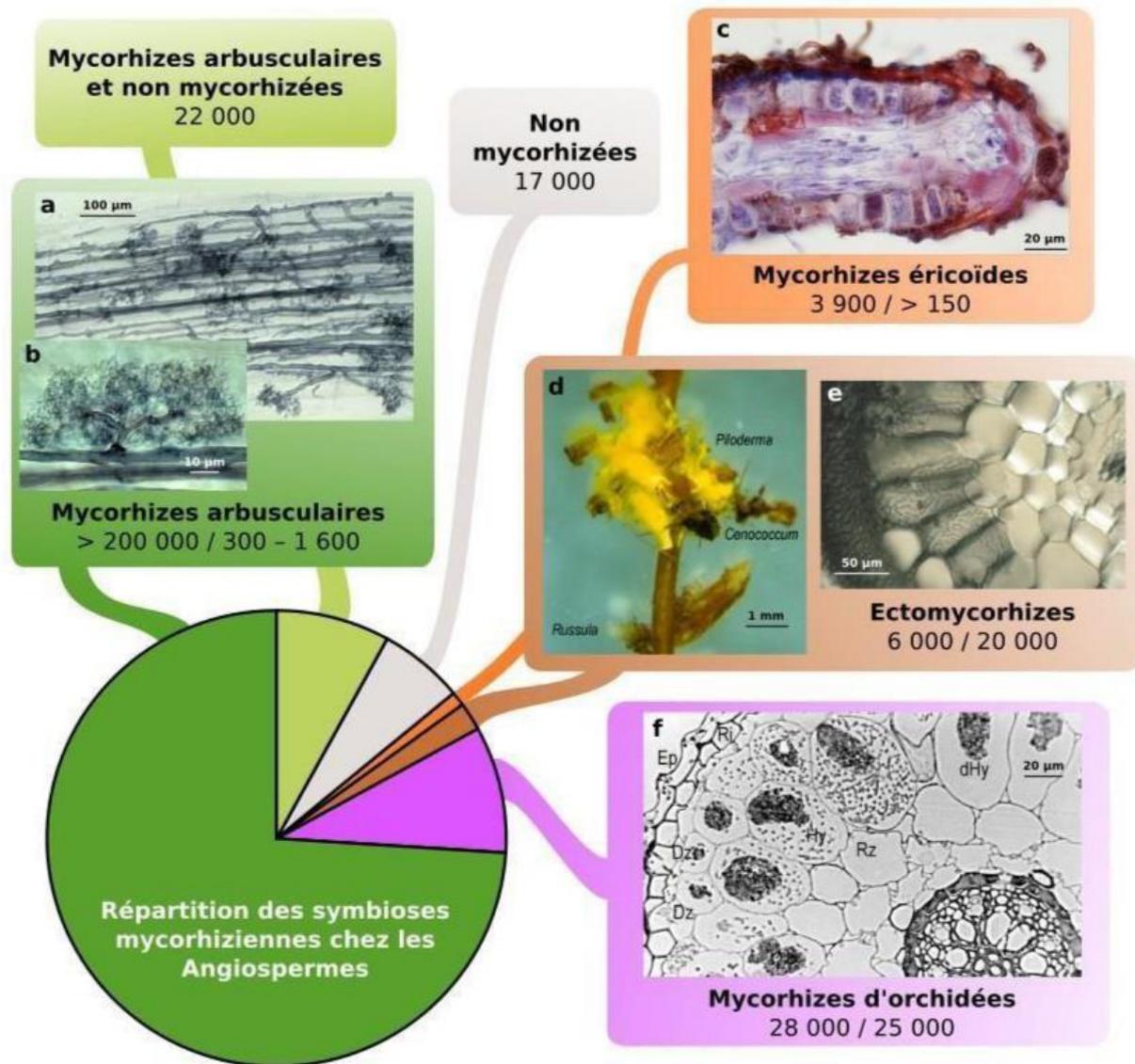


Figure 1 : diversité des associations mycorhiziennes chez les Angiospermes.

Pour chaque type de mycorhize sont indiqués le nombre d'espèces de plantes / de champignons concernés (Brundrett, 2009 ; van der Heijden *et al.*, 2015). **a.** Colonisation d'une racine de poireau (*Allium porrum*) par le champignon *Glomus versiforme*. **b.** Vue de détail d'un arbuscule. **c.** Racine cheveu de myrtille (*Vaccinium myrtillus*) colonisée par un champignon mycorhizien (espèce non précisée). **d.** Racine de jeune épicéa (*Picea abies*) colonisée par trois champignons ectomycorhiziens différents. **e.** Réseau de Hartig dans une racine de peuplier (*Populus* sp.). **f.** Electronographie d'une racine d'orchidée (espèce non précisée) montrant des pelotons intacts (Hy) ou dégradés (dHy). Photographies reproduites avec l'aimable autorisation de Mark Brundrett (a, b, e) et Martin Vohnik (c ; Institute of Botany ASCR, Czech Republic) ou issues de Wikimedia Commons (d, f ; Ingrid Kottke).

Les ectomycorhizes :

Ce type de mycorhize doit son nom au fait que les hyphes des champignons, bien qu'ils colonisent l'ensemble du cortex racinaire, ne traversent pas les parois végétales et prolifèrent donc à l'extérieur des cellules hôtes (Figure 1). C'est cet enchevêtrement d'hyphes que Hartig avait observé sans le savoir au XIXe siècle et qui porte désormais son nom (réseau de Hartig). Contrairement aux mycorhizes arbusculaires et aux autres endomycorhizes, les ectomycorhizes peuvent être repérées à l'œil nu. En effet, en plus du réseau de Hartig interne, la racine colonisée est recouverte d'un manchon de mycélium dense et développe appelé manteau (**Figure 1**).

Les ectomycorhizes sont apparues à plusieurs reprises dans plus de 20 familles d'Angiospermes et de Gymnospermes et concernent environ 6 000 espèces de plantes (Wang et Qiu, 2006 ; Brundrett, 2009). La plupart de ces espèces sont des arbres et des arbustes des régions tempérées, boréales et tropicales, si bien que, malgré une richesse spécifique limitée, les ectomycorhizes ont une importance écologique majeure et structurent littéralement une grande des écosystèmes terrestres (Read, 1991 ; Courty *et al.*, 2010). Les champignons ectomycorhiziens ont d'ailleurs pour la plupart conservé l'équipement enzymatique leur permettant de dégrader la matière organique présente dans le sol (Courty *et al.*, 2010).

Les mycorhizes d'orchidées

Parfois nommé « orchidoïde » ce type de mycorhize est l'apanage des orchidées. Avec près de 28 000 espèces décrites (The Plant List, 2018) – auxquelles s'ajoutent plusieurs centaines de nouvelles espèces chaque année ! (Chase *et al.*, 2015) – cela concerne toutefois une part importante de la biodiversité végétale. Comme pour les mycorhizes arbusculaires, les mycorhizes d'orchidées sont des endomycorhizes. Les hyphes s'immiscent dans les cellules racinaires en repoussant leur membrane plasmique et s'y développent en amas spirales compacts appelés pelotons (**Figure 1 et 2**). Ces pelotons ont une durée de vie de seulement quelques jours, les hyphes étant alors dégradées par la cellule végétale qui reprend ensuite une forme normale (Dearnaley *et al.*, 2016). La recolonisation des cellules par le champignon se fait cependant rapidement et, de cette instabilité dynamique à l'échelle cellulaire, émerge une interaction stable à l'échelle de l'organe. L'interprétation biologique de ce renouvellement permanent est encore discutée. Il pourrait s'agir d'une réaction de défense de la plante hôte – réminiscence d'un parasitisme ancestral –, d'une forme de transfert de nutriment du champignon vers la plante, ou encore d'un mécanisme de contrôle du symbiote par la plante qui sélectionnerait les partenaires les plus profitables (Smith et Read, 2008 ; Dearnaley *et al.*, 2016). La majorité des orchidées s'associent classiquement avec des champignons basidiomycètes appartenant à trois familles : les Tulasnellaceae, les Ceratobasidiaceae et les Serendipitaceae (Dearnaley *et al.*, 2012).

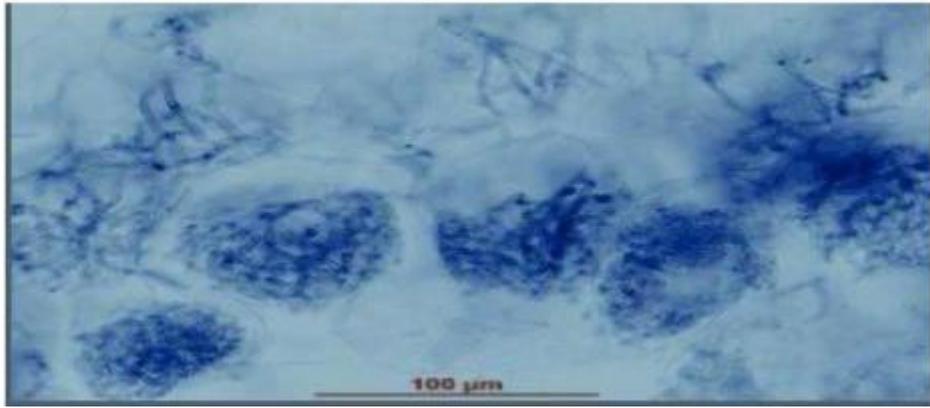


Figure 2 : mycorhize d'une Orchidée (*Pterostylis vittata*)(Anonyme2)

Les mycorhizes éricoïdes

Ce dernier type de mycorhize se rencontre chez cinq sous-familles d'éricacées : les Styphelioideae, les Vaccinioideae, les Harrimaneloideae, les Éricoideae et les Cassiopoideae (Smith et Read, 2008 ; Schwery *et al.*, 2014). Les espèces de ce groupe ont la particularité de posséder des racines «cheveux

>> extrêmement fines (diamètre < 100 μm) dont le cylindre central est entouré d'un endoderme et d'une seule couche de cellules épidermiques. C'est dans cette dernière que se met en place l'interaction mycorhizienne : une endomycorhize ou les hyphes fongiques forment des pelotons semblables à ceux des mycorhizes d'orchidees (**Figure 1** ; Smith et Read, 2008). Les champignons impliqués sont pour la plupart des ascomycètes et des basidiomycètes de la famille des Serendipitaceae (Weis *et al.*, 2016), mais d'autres espèces sont de temps en temps retrouvées dans les jeux de données moléculaires sans que leur nature mycorhizienne ou endophytique puisse être clairement tranchée (van der Heijden *et al.*, 2015).

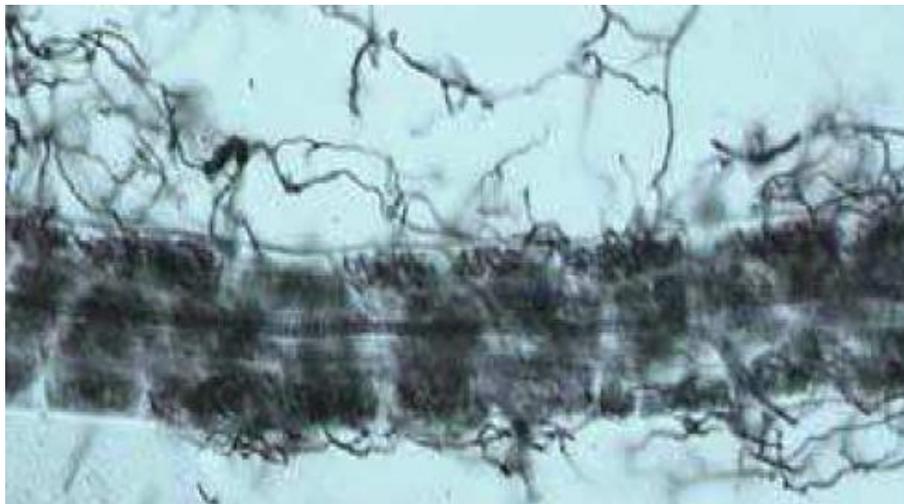


Figure 3 : mycorhize éricoïde au niveau des racines de
Leucopogon verticillatus(Anonyme1)

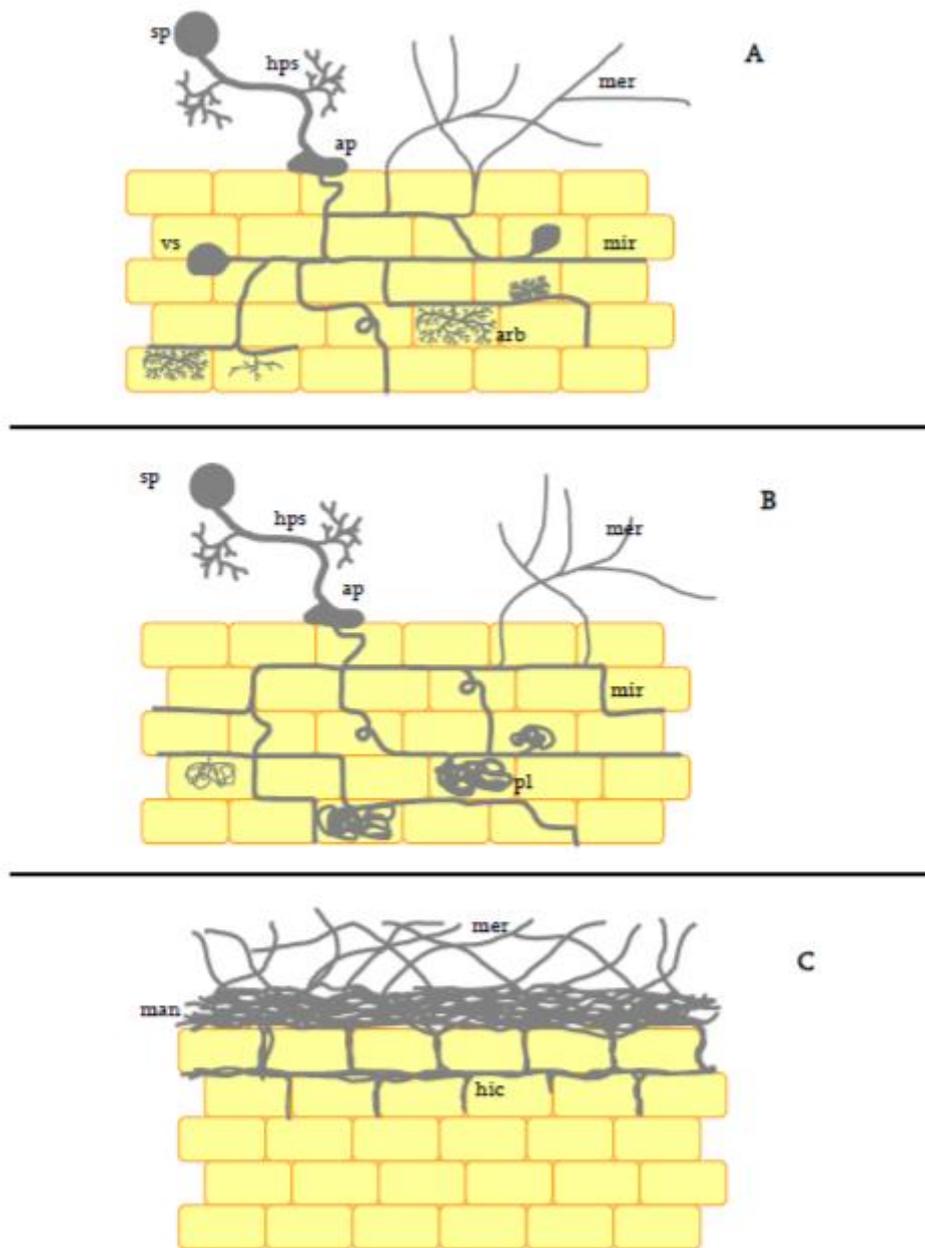


Figure 4. Les différents types de symbioses mycorhiziennes : schémas d'une coupe longitudinale de racines mycorhizées

A, La symbiose mycorhizienne à arbuscules ; B, La symbiose mycorhizienne des Ericoïdes ; C, La symbiose ectomycorhizienne ap: appressorium ; arb : arbuscule ; hic: hyphes intercellulaires ; man: manchon fongique ; hps: hyphes pré-symbiotiques ; mer: mycélium extra-radicalaire ; mir: mycélium intraradicalaire ; pl: peloton ; sp: spore ; vs: vésicule.

Symbiose mycorhizienne à arbuscule

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

Structure des champignons mycorhizes à arbuscules :

Au cours de leur cycle de vie, les CMA forment donc des structures différentes (des arbuscules, des vésicules, des cellules auxiliaires, mycélium interne / externe) et des spores (Morton, 1990). Ces structures possèdent chacune une fonction plus ou moins propre (**figure 5**).

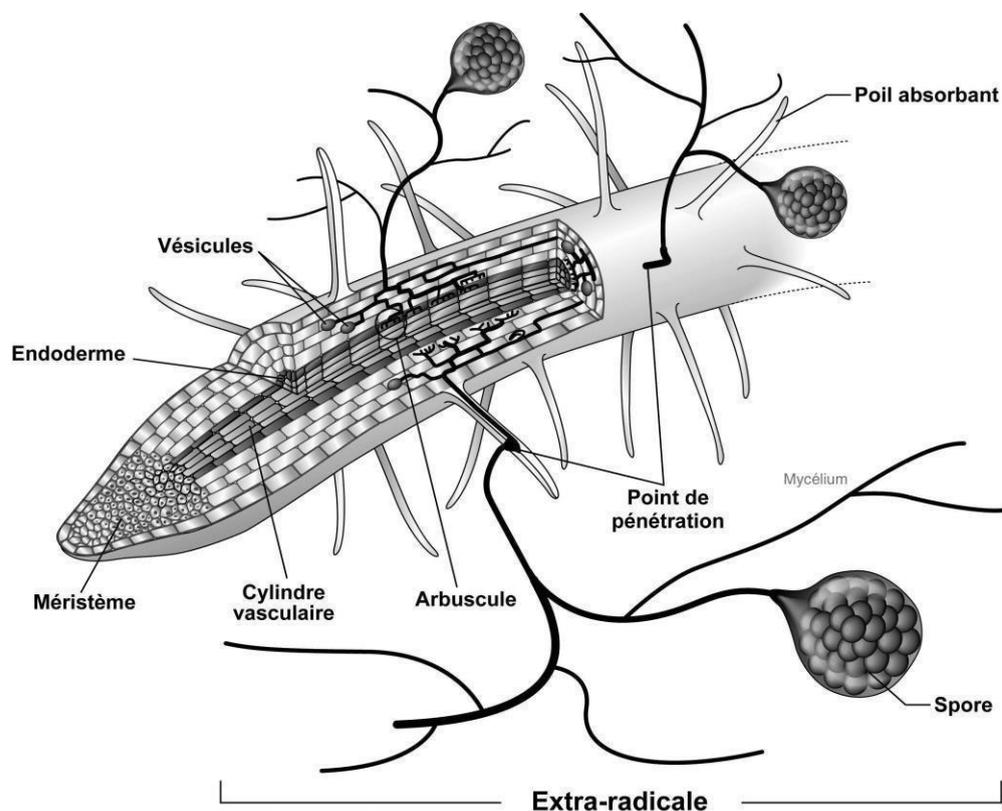


Figure 5 : Représentation schématique d'une MA (Fortin *et al.*, 2008).

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 dispersée

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 conservation dans le sol (Garbaye, 2013) qui peut rester en dormance durant 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. 6**) (Garbaye, 2013).



Figure 6 : Un mélange des spores mycorhiziennes arbusculaires sous la loupe.
(<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/gigaspora/decipiens>)

I.1.3.1.2 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. 7) (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).

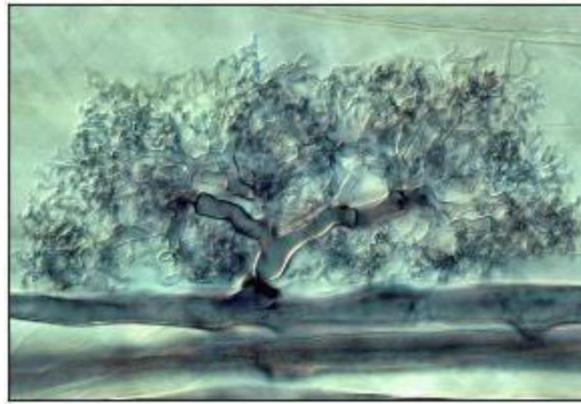


Figure 7 : Arbuscule fongique de *Glomus*. (De Mark Brundrett :

<http://mycorrhizas.info/resource.html>)

I.1.3.1.3. 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.8**). 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 8 : 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).

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 extraradiculaire 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.9**) (Newman et Reddell, 1987). En fonction de leur activité principale, on peut distinguer plusieurs types d'hyphes extraradicaires :

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

Cellules auxiliaires

Chez les *Gigaspora*, *Pcispora* et *Scutellospora* (Blaszkowski *et al.*, 2006), le mycélium extra-

matriciel forme des cellules auxiliaires (AC) (formes globulaires regroupées en grappe, attachées aux hyphes extra-matriciels et souvent ornementées) (**Fig. 10**). En culture monoxénique, les jeunes cellules contiennent des gouttelettes lipidiques 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.

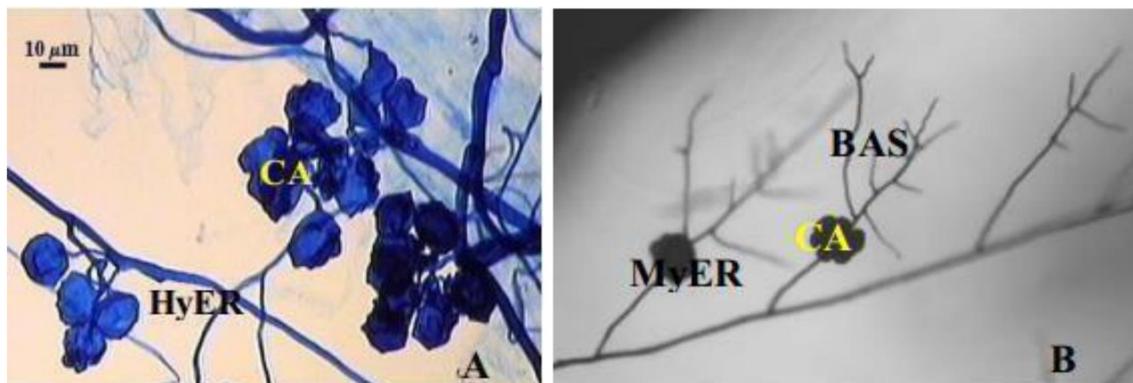


Figure 10 : Aspect des cellules auxiliaires (AC) (Bago et Cano, 2005).

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

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

Morphologie des champignons mycorhiziens à arbuscules

Les mycorhizes à arbuscules développent deux types morphologiques de colonisation décrits pour la première fois par Gallaud en 1905, qu'il a nommé type *Arum* et type *Paris* (Garbaye, 2013). Cependant elles sont abandonnées et considérées beaucoup plus tard par d'autres auteurs.

L'expression de type morphologie de la symbiose est contrôlée par le génome de la plante hôte (Smith et Smith, 1997) et le génome fongique (Cavagnaro *et al.*, 2001).

Dans le type *Arum*, le filament mycélien se ramifie et s'étend rapidement dans la direction longitudinale de la racine en progressant entre les assises cellulaires. Il émet des branches latérales qui pénètrent dans les cellules en traversant la paroi cellulosique et s'y ramifient très densément, en

repoussant et invaginant la membrane. C'est le résultat de cette hyper-ramification, qui ressemble à un petit arbre (*arduscule*) (Fig. 11).

Dans le type *paris*, filament mycélien ne chemine pas entre les cellules : il passe de l'une à l'autre en traversant les parois et s'enroule sur lui-même en faisant plusieurs spires à l'intérieur de chaque cellule (Fig. 9) (Garbaye.2013 ; Declerck, 2014).

Ces deux formes peuvent coexister dans une même plante et des formes intermédiaires entre ces deux formes sont également observées (Dickson, 2005 ; revue de Dickson *et al.*, 2007).

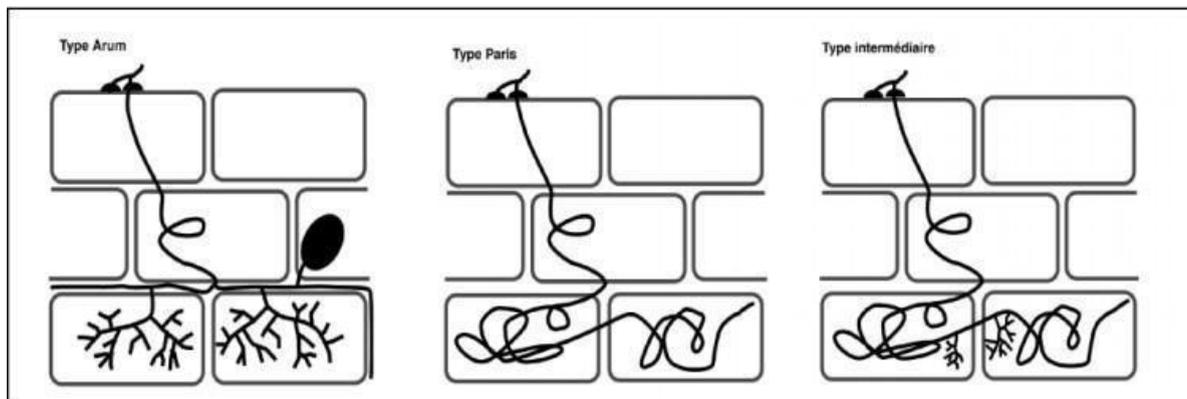


Figure 11 : Représentation schématique des trois principaux types de la colonisation du cortex racinaire par les Gloméromycètes formant des endomycorhizes arbusculaires (Garbaye, 2013).

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 fournit 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 nodulantes des 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.

Caractéristiques des rhizobia

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):

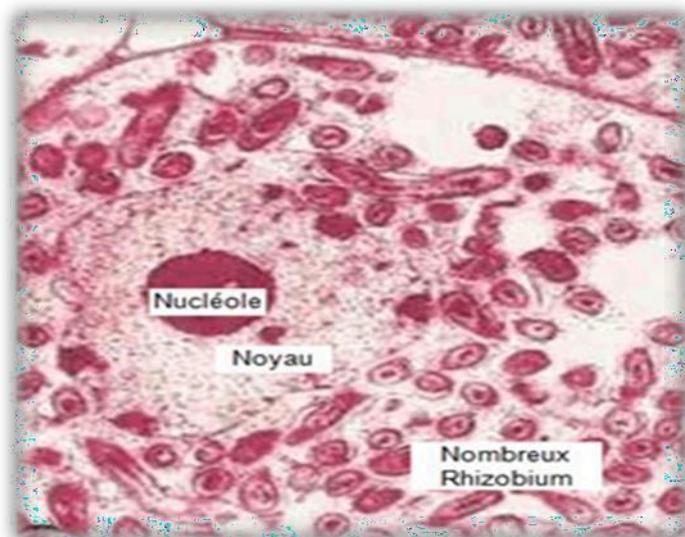
➤ La forme libre (végétative) ; Elles apparaissent se forme bâtonnet régulier 0,5 à 0,9 de largeur sur 1,2 à 3µm de longueur, Ce sont des petits organismes mobiles avec ciliature péritricheux, ceux à croissance lente sont mobile par un seul flagelle polaire. Cette bactérie que l'on trouve dans la rhizosphère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



➤ **Figure 12:** Morphologie de *rhizobium trifoli*

(<https://docplayer.fr/33113805-Les-symbioses-racinaires.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 13 : Bactéries du genre *Rhizobium* vues au microscope (x 1 000) Schéma montrant nombreux bactéroïdes dans une cellule d'une nodosité racinaire.

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

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.

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. 14**). 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 14: Aspects macroscopique des rhizobiums (ASMA ,2008)

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 -, -, -, 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).

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. plurifarum</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. pachyrhizi</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>Pseudomonadales</i>		<i>Pseudomonas sp.</i>

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

Critères de résistance

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 croître en présence de 2 % de NaCl (Hua *et al* ; 1982 ; Zhang *et al* ; 1991 ,Ghittoni *et Bueno*, 1995).

I.2.1.5.2. 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).

I .2.1.6. 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. phaeofina*, *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 fêverole de l'attaque des larves de *Sitona flavescens* (Skat et al ; 1999).

Spécifié d'hôte

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

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. 15**) 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).

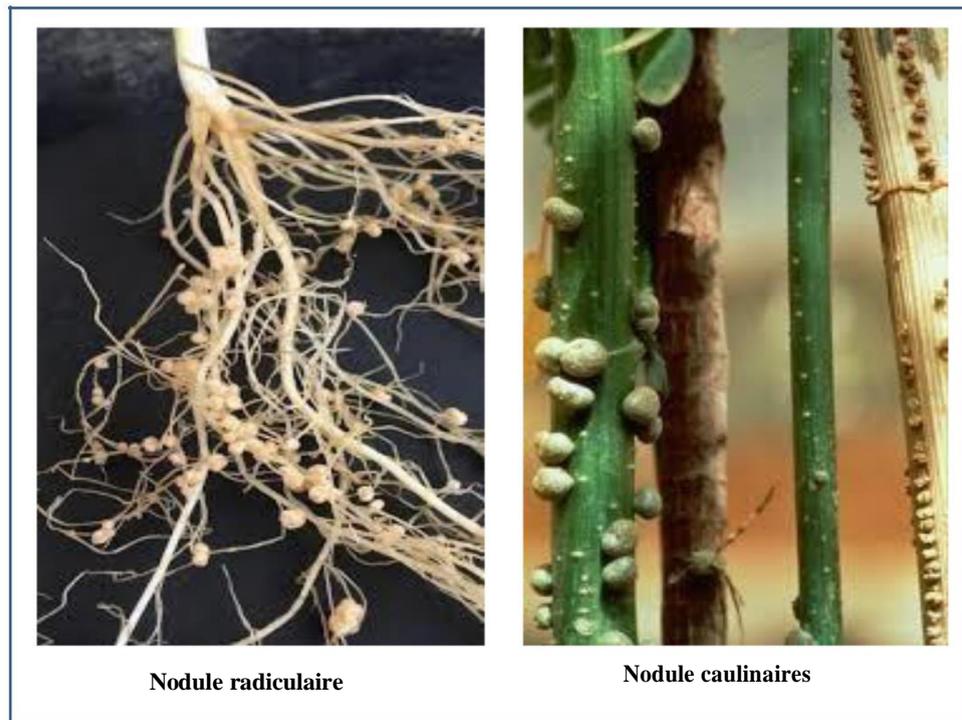


Figure 15: les nodules chez légumineuses

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

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

a. Pré infection

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

A cette étape ; débute un échange des signaux moléculaires entre les deux partenaires (**fig. 16**), principalement des flavonoïdes (Long, 1996), Ces molécules sont sécrétées par la plante hôte, qui sont capables d'activer la transcription des gènes Nod chez les rhizobia. Les facteurs NOD sont des lipo-chitooligosaccharides (LCO) émis par la bactérie, à l'origine de la reconnaissance spécifique entre les deux symbiotes et du déclenchement du programme d'organogenèse nodulaire chez le végétal par une cascade d'expression de gènes spécifiques (Miklashevichs *et al* ; 2001).

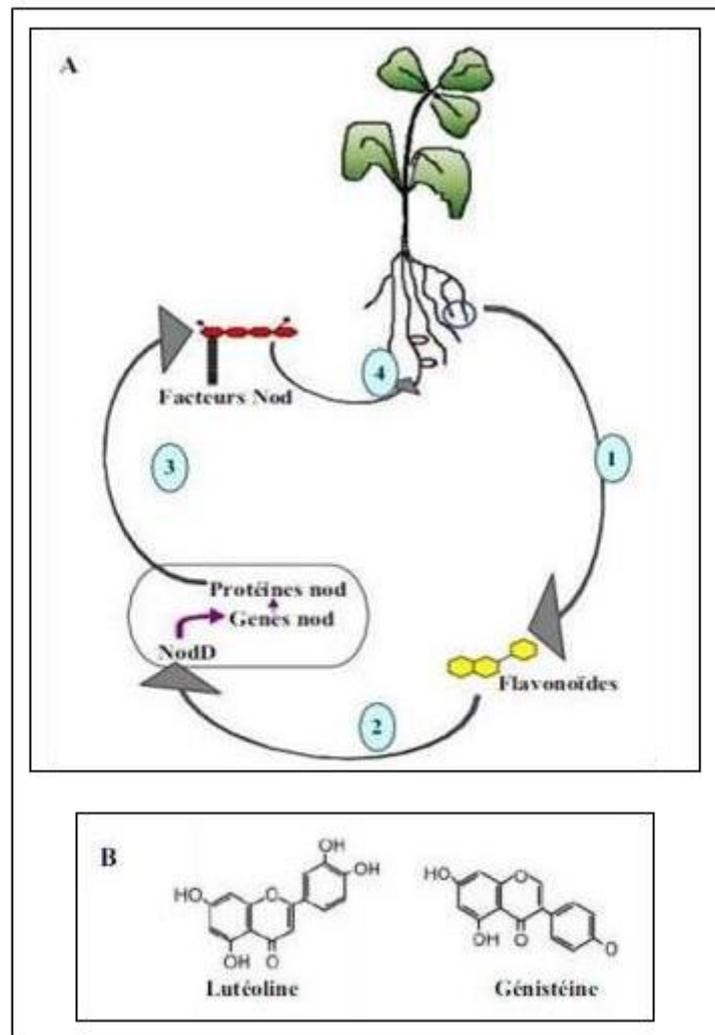


Figure 16: Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses. D'après Brennic et Winans (2005).

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 Brennic 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*.

b. 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 plasmalemme s'invagine et du nouveau matériel pariétal est déposé conduisant à la formation d'une structure tubulaire appelée cordon d'infection qui contient les bactéries et progresse de cellule en cellule en direction du cortex (Gage, 2004).

L'infection de la plante par les rhizobia induit des divisions cellulaires au niveau du cortex, en face d'un pôle de protoxylème (**fig 17**). 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).

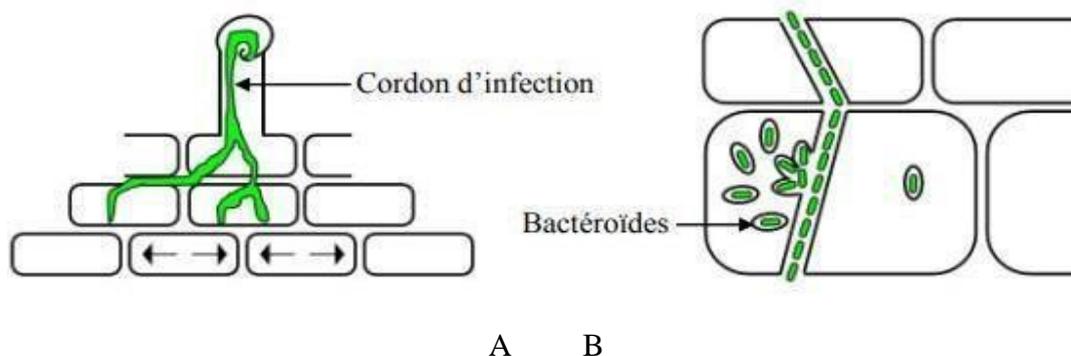


Figure 17 : A : Ramification du cordon d'infection et progression vers le cortex interne qui est en cours de division pour former le primordium puis le méristème nodulaire. Les flèches représentent l'initiation de la mitose dans ces cellules.

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

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

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

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

c. Développement des nodules

La prolifération des bactéroïdes enfermés dans 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).

d. La structure du nodule

Toutes les étapes de développement nodulaire sont présentes au sein d'un même nodule selon un gradient de différenciation, ainsi, le nodule est typiquement divisé en cinq zones (**fig 18**) (Pawlowski et Bisseling, 1996).

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

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

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

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

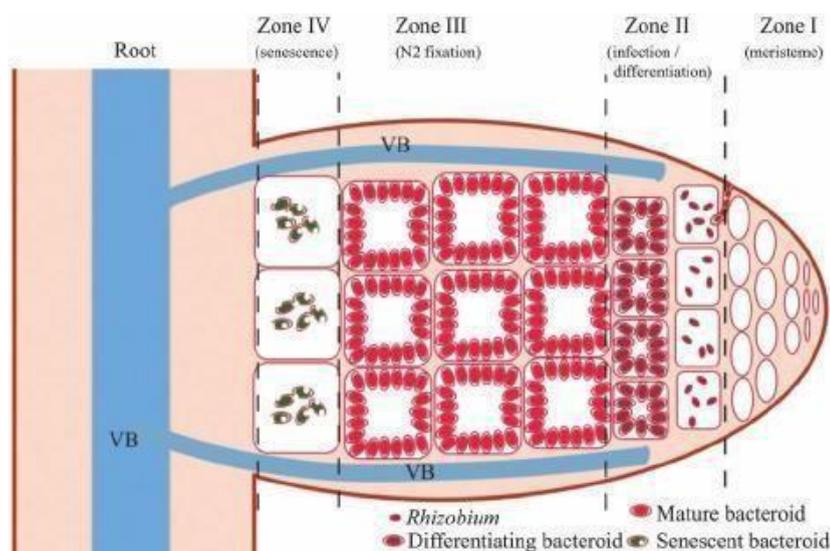


Figure 18 : La structure du nodule.

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

Les bases moléculaires de la symbiose

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

- **Les flavonoïdes**

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

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

- **Les facteurs Nod**

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

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

- **Les gènes nif**

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

- **Les gènes fix**

Les gènes fixes ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote L'un d'eux au mois (*fixX*), code pour une ferrédoxine ; d'autres pourraient être impliqués dans le transport des éléments vers la di-nitrogénase,

- **La nitrogénase**

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

1. Une dinitrogénase réductase : (la nitrogénase I) la Fe-protéine qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur, renferme deux sous unités identiques, elle contient du fer et se comporte comme une réductase de 64 KDa (Leclerc et *al* ; 1995 ; Hopkins, 2003).

2. Une nitrogénase : appelée aussi molybdoprotéine (MoFe protéine) c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramériques) $\alpha_2\beta_2$ de 220 KDa, chaque monomère contient un centre (4Fe - 4S) reliés entre eux deux par deux. Ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8Fe et 2 atomes de molybdène (Mo), qui utilise cet électron pour réduire N₂ en NH₃ (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003).

- **La leghémoglobine**

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

Autres facteurs symbiotiques

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

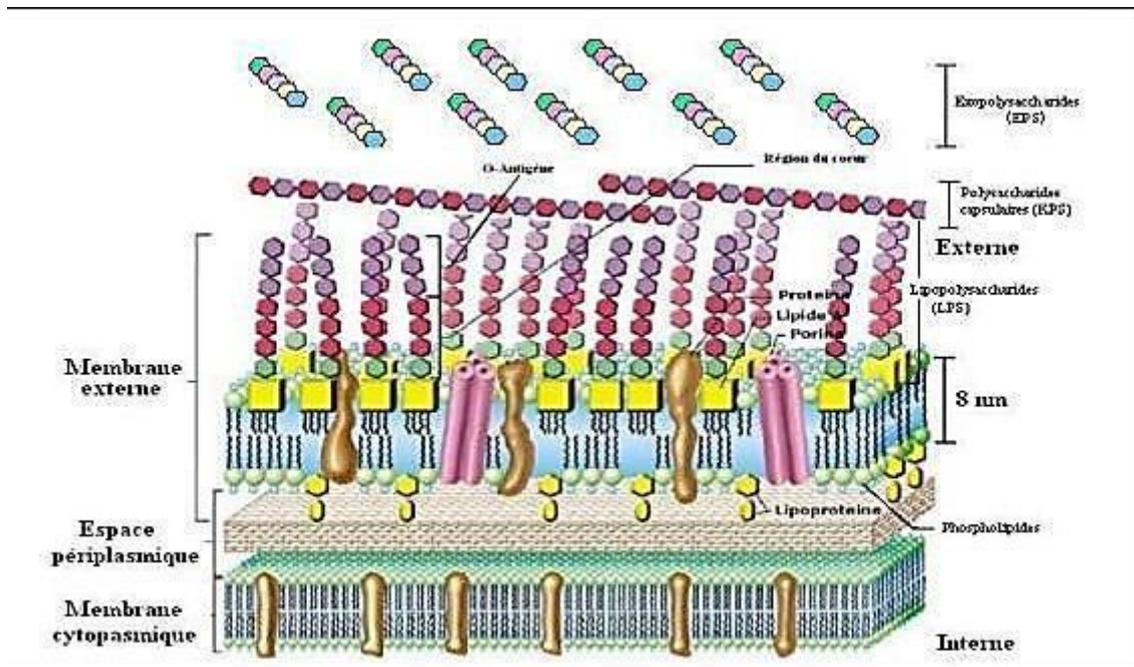


Figure 19 : Schéma de la surface d'une paroi de *Rhizobium*. (Chataigné ,2007).

- **Les exopolysaccharides (EPS)**

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

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

- **Les polysaccharides capsulaires (KPS)**

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

- **Les lipopolysaccharides (LPS)**

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

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).

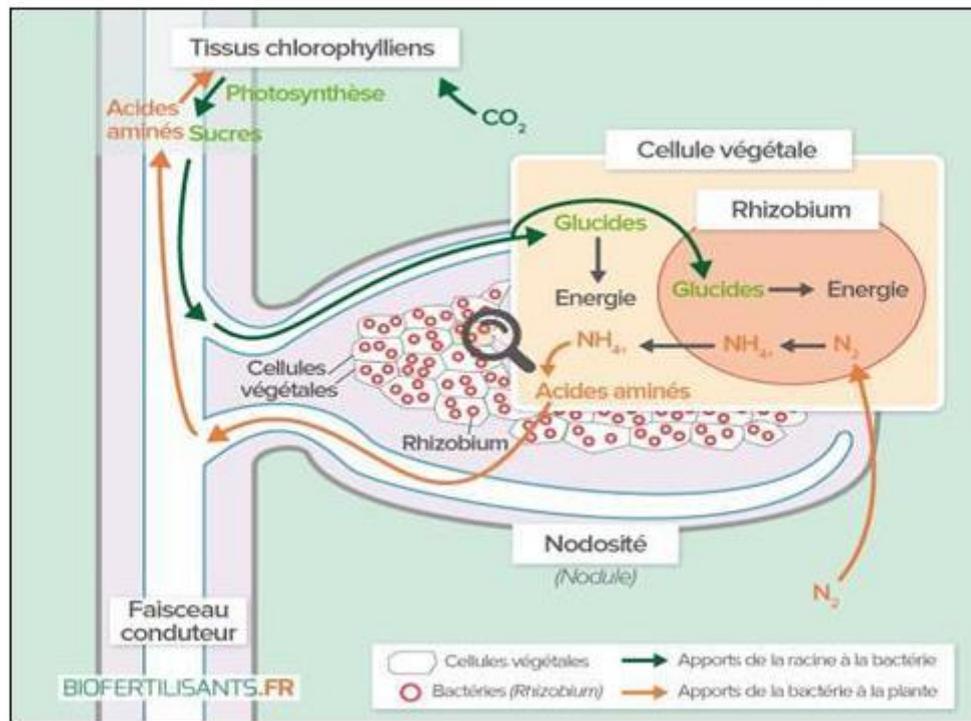


Figure 20 Fixation biologique de l'azote lors d'une relation symbiotique

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

I.2.1.11. 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
microorganismes**

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).

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.

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).

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 micro 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 : États-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. Technologies de production d'inoculum

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

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

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).

Méthodes de production

Le mode de production diffère selon la famille de champignons, mais il s'agit d'inoculants endomycorhiziens pour la plupart.

✓ **Les champignons endomycorhiziens :** sont des symbiotes obligatoires strictes c'est à dire dépendants de la présence d'une plante hôte pour se développer et se multiplier. Le producteur d'inoculum est alors tenu de co-cultiver le complexe « champignon-plante hôte ».

✓ **Les champignons ectomycorhiziens :** la production d'inoculums de champignons ectomycorhiziens se fait généralement en conditions axéniques, sans plante hôte, en culture liquide ou sur support solide

A ce jour, les deux technologies de production les plus utilisées sont :

- La méthode dite conventionnelle consistant à multiplier les champignons endomycorhiziens sur les racines d'une plante-hôte entière, cultivée en conditions contrôlées en serre ou en chambre de culture.

- La méthode « in vitro » consistant à multiplier le champignon endomycorhizien sur des racines cultivées sur milieu synthétique en conditions stériles (Haimet, 2013).

Etapes de production d'inoculum mycorhizien

Depuis, plusieurs techniques de mycorhization ont été développées et celle utilisant des champignons mycorhiziens seuls repose dorénavant sur les étapes suivantes :

- (i) Isolement et purification de souches fongiques.
- (ii) Sélection, en conditions contrôlées de souches fongiques performantes pour un paramètre donné (par exemple : effet de la souche sur la croissance de la plante hôte).
- (iii) Multiplication de la souche en conditions axéniques et production d'inocula fongique (Duponnois *et al.*, 2013).

Qualité des inoculums

Concernant la qualité des inoculums 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.1.4 Production industrielle d'inoculant mycorhizien

Premier Tech Biotechnologies commercialise des produits avec mycorhizes sous la marque de commerce MYKE® PRO. Conçus pour les marchés horticole et agricole

Le procédé de production de mycorhizes développé par Premier Tech requiert un environnement strictement contrôlé et utilise des standards industriels de haute technologie. Ce qui résulte en des spores mycorhiziennes en suspension, exemptes de contaminant, qui sont utilisées pour formuler des produits de très haute qualité.

Les produits MYKE® PRO sont des inoculants mycorhiziens qui augmentent la croissance végétale, la résistance des plantes aux maladies et le rendement des productions agricoles et horticoles, tout en protégeant l'environnement. Chaque produit possède sa propre formulation adaptée aux applications spécifiques des différents types de cultures.

Production d'inoculum rhizobien

L'inoculation des légumineuses avec les bactéries symbiotique est une pratique qui est bien établie. Il s'agit de l'introduction dans le sol d'une souche de rhizobium spécifique, sélectionné pour son efficacité symbiotique et son pouvoir compétitif pour la nodulation. L'inoculation assurent donc la présence d'un grand nombre des rhizobia (Sanginga *et al.*, 1994 ; 2000) qui favorisera l'infection des racines, la nodulation et conséquemment la fixation de l'azote atmosphérique (Dufresne, 2004).

L'utilisation de la souche de rhizobium à partir de nodule prélevés sur des légumineuses locales est la méthode la plus efficace pour constituer une collection pour la production d'inoculum.

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 rhizobienne sélectionnée :

✓ Une sélection très pointilleuse doit être fait à fin d'identifier l'inoculum idéal pour une légumineuse. Les critères de sélection varient selon le type de sol : acide, alcalin, salin, riche en nitrate ou en matière organique ou contaminé avec des métaux lourds (Kannaiyan *et al.*, 2000). Les souches rhizobiennes les plus performantes pour une légumineuse sont les plus souvent celles isolées à partir de zones ayant des conditions environnementales (pH, température et salinité) similaires (Chatel et Greenwood, 1973 ; Chatel et Parker, 1973). Cependant, il n'est pas exclu de tester l'efficience et la compétitivité des souches des rhizobiums isolés dans des zones particulières.

✓ Les souches rhizobiennes doivent être très efficaces, c'est à dire aptent à fixer l'azote dans les nodules des légumineuses pour laquelle l'inoculum est recommandé (Brockwell,1982 ; Kannaiyane *et al.*, 2000), même en présence des condition contraignantes : physiques (température élevée , dessiccation, salinité) (Vincent et Waters 1954 ; Jebara *et al.*, 2001 ; Cacciari *et al.*, 2003 ;Maougal, 2004) ; chimiques (pH, substance toxiques) (Cacciari *et al.*, 2003) ; ou biologiques

(bactéries, champignons).



La souche rhizobium doit être compétitive (Monsalud *et al.*, 1989 ; Sanginga *et al.*, 1994 ; Cacciari *et al.*, 2003) , c'est à dire qu'en présence d'autre souche des rhizobium , elle doit être apte à former des nodules sur le système racinaire de la

Légumineuse et d'empêcher des souches indigènes de pénétrer les racines (Giller et Cadish, 1995 ; Catroux *et al.*, 2001).

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 semis, 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.

Choix de support

Le critère principal du choix est la capacité de support à permettre une bonne survie des Rhizobium pendant le stockage (Ruiz-Argueso *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).

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).

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

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

Méthodologie suivie pour l'étude des *Rhizobium*

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

IV.2.1.

1.1.1 Collection des nodosités

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



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

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.

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 ...).

Identification des souches de Rhizobium

L'identification des souches de Rhizobium a été faite par un examen macroscopique (caractères cultureux 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.

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 1 minute. 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.2.1.1.1.4 .2. Examen mobilité

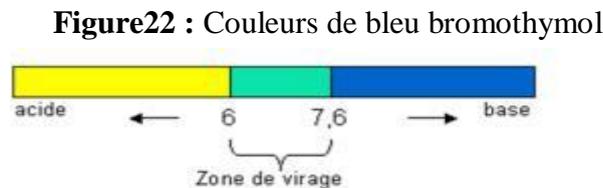
Le milieu utilisé est le Mannitol-mobilité, nous permettant d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

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.2.1.1.1.4 .3. Tests biochimiques

IV.2.1.1.1.4 .3.1.Vitesse de croissance sur YMA + Bromothymol

Pour vérifier la vitesse de croissance des isolats pour la distinction entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente, elles ont ensemencé sur un milieu YMA additionné de bleu de bromothymol (Jordan ,1984 ; Vincent, 1970). 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.



IV .2.1.1.4.3.2.Recherche de certaines enzymes

□ Réduction des nitrates

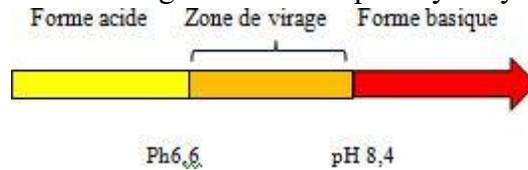
Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide TY contenant 0.1% KNO₃ (p/v) (Behringer, 1974), Après 05 jours d'incubation avec agitation à 28°C, Au terme de l'incubation à chaque tube on ajoute les réactifs nitrate réductase 1 et nitrate réductase 2 (Annexes01). L'apparition d'une coloration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

□ Hydrolyse de l'urée

Les bactéries possédant une uréase transforment l'urée en carbonate d'ammonium entraînant une

alcalinisation qui provoque une coloration rouge violacé du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH) (Jarvis et al, 1977).

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



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

Les boîtes sont incubées 48h à 28°C.

□ **Activité Cellulosique**

Les souches sont cultivées dans les tubes à essai contenant 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 .4.2.1.1.5. Conservation des souches

Les isolats purifiés sont conservés selon le procédé suivant :

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

IV.2.1.1.1.6. Etude des paramètres symbiotiques

IV.2.1.1.1.6.1. Test d'infectivité des souches

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

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

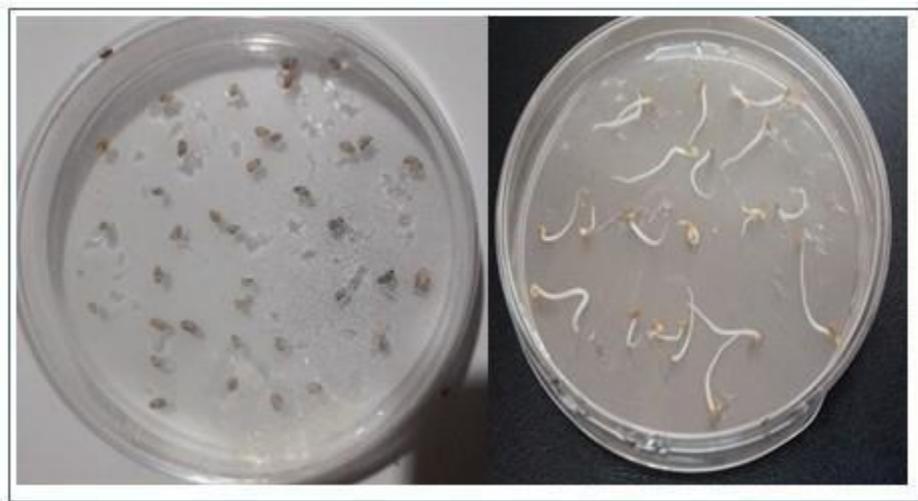
Stérilisation, germination et mis en culture des plantules de

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 (Bertrant, 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 24: Germination des grains de *Médicago sativa*



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.

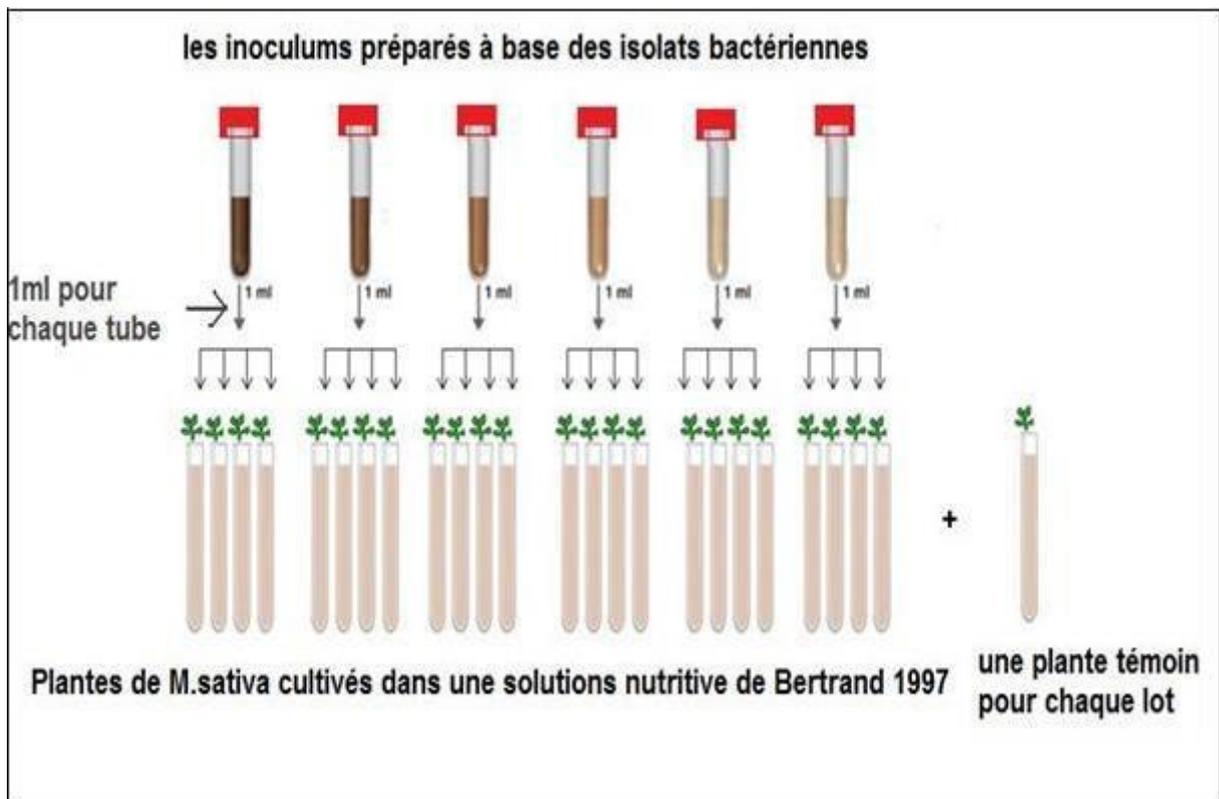


Figure 25 : Schéma explicatif du test d'infectivité des isolats réalisé *in-vitro*.

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 .2.1.2. Méthodologie suivie pour l'étude des Mycorhizes

IV .2.1.2.1. 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'autre 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°Chl 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.

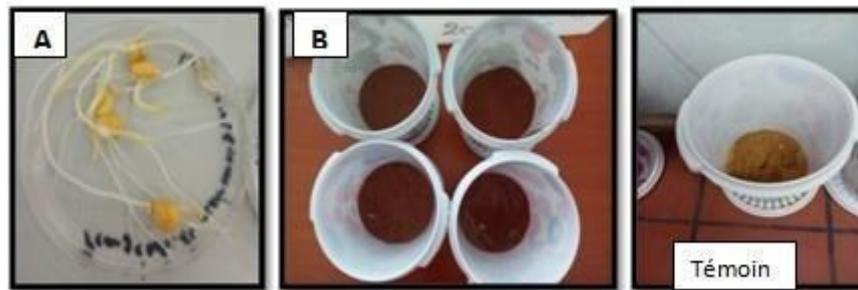


Figure 26: dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton et Walker(1992).

A : plantules de maïs après 3 jours de germination.

B : plantules de maïs transplantés.

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

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

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

IV .2.1.2.2. 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 .2.1.2.2 .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 racinaires. Puis les blocs de terre prélevés ont été placés dans sachet en plastique fermés très serrés pendant le transport.

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 seule nous intéressent sont extrêmement fragiles.

A l'aide de ciseaux, les racines fines ont été séparées de racine pivotante et versées dans un bocal pour moitié remplie d'eau ,puis agiter délicatement pendant quelque 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.

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 %.

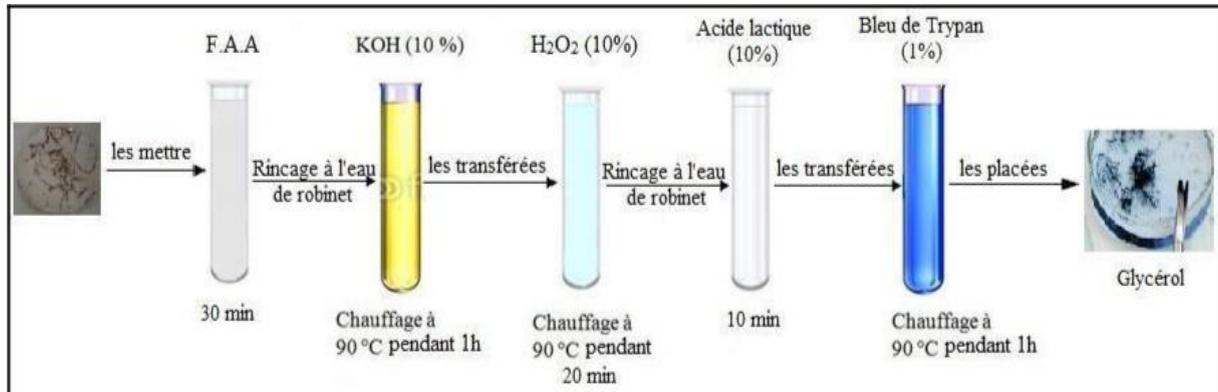


Figure 27: Schéma représentatif des étapes d'éclaircissement et coloration des racines.

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).

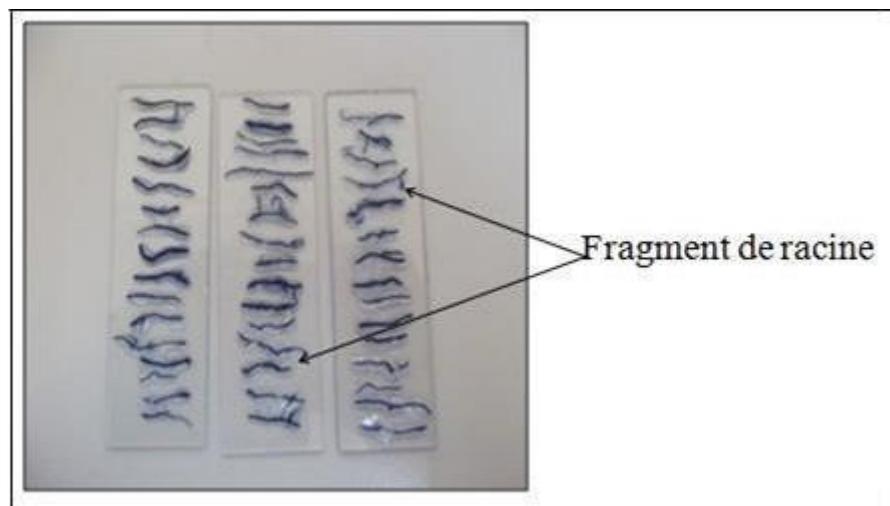


Figure 28 : Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l'identification microscopique.

IV.2.1.2.3. Estimation de la colonisation MA des racines

Le pourcentage de colonisation des racines est calculé selon la méthode de Trouvelot *et al.*, (1986). Les fragments racinaires observés ont été notés dans un tableau, selon un barème de notation 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 classes d'infection marquant l'importance de la mycorhization à savoir :

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

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

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

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

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

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

□ 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 hyphe de la racine.

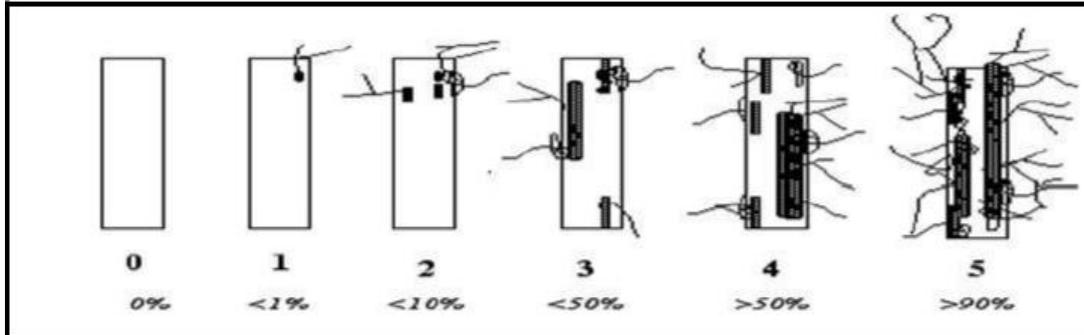


Figure 29 : Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire

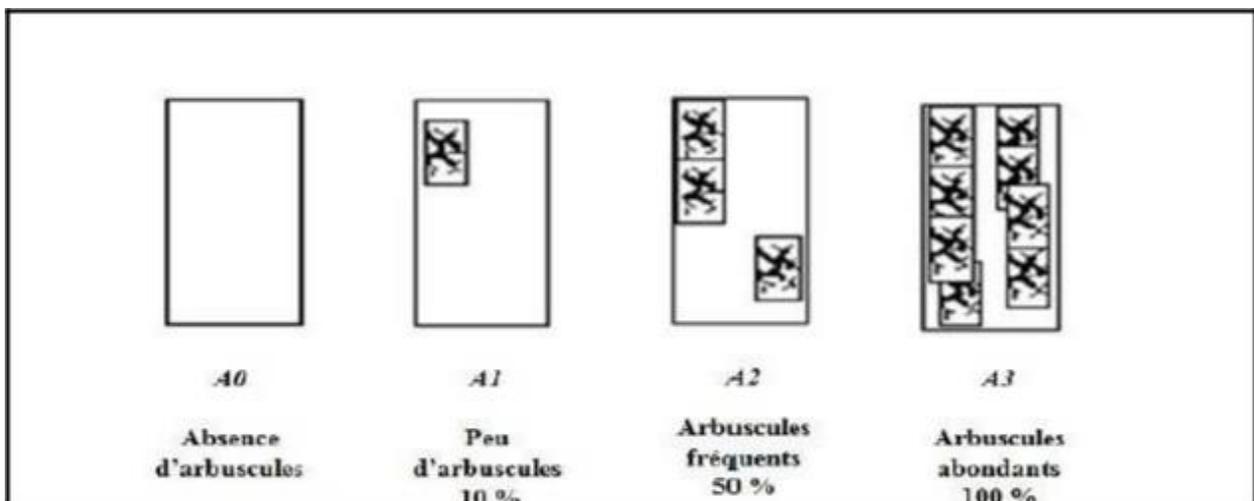


Figure 30 : Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules

Extraction des spores :

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

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

Les particules retenues dans le tamis des 45 μ m de diamètre ont été récupérées dans des tubes de centrifugation remplis à 1/3 d'une solution de saccharose a 60%(P/V). Ces tubes ont été soumis à une première centrifugation à 1750 tr /mn pendant 5min pour réduire les particules de sol et les fragments racinaires, le surnageant et les particules flottantes ont été éliminés. Les spores et les particules sédimentées au fond des tubes ont été reprises dans une solution de saccharose a 60%(p/v). Le mélange sédiments-saccharose a été de nouveau centrifugé à 1750tr/mn pendant 15 secondes. Le surnageant est filtré sur un tamis de 45 μ m puis rincées avec l'eau distille pour éliminer l'excès de saccharose. Les suspensions sporales obtenus ont été conservés à 4°C pour l'observation et l'identification morphologique (**fig.31**).



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

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.

Traitement des données

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

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

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

□ Inoculation des plants

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

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

□ Simple inoculation rhizobienne

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

□ Simple inoculation mychorizienne

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

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

Conclusion générale

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 et bibliographies

- **Bago B, Zipfel W, Williams RM, Piché Y .)1999**(. Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo two-photon microscopy. *Protoplasma*. 209: 77-89.
- **Bago B., Cano C.,)2005**(. Breaking Myths on Arbuscular mycorrhizas in Vitro Biology. In *Vitro Culture of Mycorrhizas*. (Ed. by S. Declerck, D. G. Strullu, and A. Fortin). *Soil Biol.* 4 : 111-138.
- **Bonfante P, Genre A (2008)** Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends Plant Sci* 13: 492–498.
- **Bonfante P., Perotto S.)1995**(. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130 : 3-21.
- **Bordeleau, L. M. (1989)**. potentiel du rhizobium comme agent de lut biologique phymprotecron.70 :1-41.
- **Brencic, A; et Winans, S.C. (2005)**. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 155-194.
- **Brewin, C. R.; Firth-Cozens, J; Furnham, A; et McManus, C. (1992)**. Self-criticism in adulthood and recalled childhood experience. *J Abnorm Psychol*, 101(3), 561-566
- **Brundrett M. C.)2002**(. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. 154: 275-304.
- **Brundrett M. C.)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. C., Abbott L. k., Jasper D. A.,)1999**(. Glomalean fungi from tropical Australia. I. Comparison of the effectiveness of isolation procedures. *Mycorrhiza*. 8 : 350-314.
- **Cavagnaro T. R., Gao L. L., Smith F. A., Smith S. E.,)2001**(. Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytol.* 151 : 469-475.
- **Chatagné ,G. (2007)**. Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*, Thèse de doctorat, université Paul Sabatier, France.
- **Cheriet, Dahbia.,)2016**(. Etude des bactéries symbiotiques de la luzerne (*Medicago ciliaris*)
- coordination with fatty acid synthesis and redox metabolism of chloroplast and
- **Courty P-E, Buee M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, et al. (2010)** The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts.
- **Davet ,P . (1996)**. Vie microbienne du sol et production végétale. Editions INRA, Paris. France. pp 145-161.
- **Dearnaley J, Perotto S, Selosse M-A (2016)** Structure and development of orchid mycorrhizas. In: Martin F (ed) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, Wiley-Blackwell, pp 63–86.
- **Declerck S., D’Or D., Bivort C., de Souza F. A.,(2004)**. Développement de l'extraradical mycelium de *Scutellospora reticulata* under root-organ culture : spore production and function of auxiliary cells. *Mycol. Res.* 108 : 84-92.
- **Declerck S., Strullu D. G., Plenchette C., (1998)**. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. Isolated from tropical ecosystem : a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*. 90 : 576-585.
- **Deliane E, Chiraa A, Chira L, Savulescu E. (2011)**. Arbuscular mycorrhizae : an overview. *South western Journal of Horticulture, Biology and Environment*. 2 : 167-192..

- **Dexheimer J. (1997).** Étude structurale et fonctionnelle des interfaces entre le champignon et la plante-hôte. Rev. For. Fr. 43-56.
- **Dickson S. (2005).** The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. New Phytologist. 163: 187-200.
- **Dickson S., Smith F.A., Smith S.E. (2007).** Structural differences in arbuscularmycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? Mycorrhiza. 17: 375-393.
- **Domrgues, Y; Duhaux, E et G .D . HOANG. (1999).** les arbre fixateur d'azote : Caractéristique fondamentales et rôles dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux , Y . Domrgues(ed), Edition espace 34, Paris, 475P.
- **Domrgues, Y; Mangenot, F. (1970).** Ecologies microbienne du sol . Masson et Cie, paris, 796p.
- **Duponnois, R. Sanon, A. Hafidi, M. Ndoye, I. Bâa, M., (2013).** Généralités sur la Ecology and Evolution, vol 6(13): 4332–4346pp. Doi:10.1002/ece3.2207.
- ecosystems from a field-based comparison. Soil Biol. Biochem. Vol 69, 63–70pp.
- **Fortin J. A., Plenchette C., et Piché Y. (2008).** Les mycorhizes : La nouvelle révolution verte. Québec, Edition MultiMondes. 138.
- **Fortin J. A., Plenchette C., Piché Y. (2011).** Les mycorhizes: la nouvelle révolution verte, Editions Multimondes et Editions QUAE.
- **Fortin J. A., Plenchette C., Piché Y.)2008(.** Les mycorhizes. La nouvelle révolution verte. MultiModeQuae. (Eds.), Québec. 131.
- François, M, G.1(1997). Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire, Quae, Paris, P149.
- **Frank AB (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber Dtsch Bot Ges 3: 128–145.**
- **Frayse ,N; Couderc ,F; Poinso, V. (2003).** Surface polysaccharide involvement in establishing the Rhizobium-legume symbiosis. European Journal of Biological Chemistry. 270:1365- 1380.
- Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68, 280-300.
- **Garbaye J (2013)** La symbiose mycorrhizienne. Une association entre les plantes et les champignons. Quae.
- **Gryndlerová, Hana. Jansa, Jan., (2016).** Plant–fungus competition for nitrogenases
- **Guether M., Balestrini R., Hannah M. A., Udvardi M. K., Bonfante P., (2009).** Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. New Phytol. 182 : 200-212.
- **Guether M., Neuhauser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U., Bonfante P. (2009).** A mycorrhizal specific mycorrhizal fungi ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Physiology. 150 : 73-83.
- **Guisso T., B A A. M., Plenchette C., G Uinko S., Duponnois R., (2001).** Effects 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. L., (1986).** Mycorrhizal studies : past and future. In : Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. 1er SEM. On mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (Eds.), I.N.R.A.

Paris, France. 25-35.

- **Hartig T** (1840) Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Culturpflanzen Deutschlands. A. Förstner'sche Verlagsbuchhandlung: Berlin.
- Hirsch, A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* 122, 211-237.
- **Hopkins, W.G.(2003)**. Introduction to plant physiology. Second edition. Eds : De Boeck, De Boeck University, Belgique.
- <http://www.centrescientifique.mc/fr/BiologieMarine/recherche/symbiose.aspx>.
- **Kaschuk G., Kuypers T. W., Leffelaar P. A., Hungria M., and Giller K. E., (2009)**. Are <https://www.researchgate.net/publication/280638583>.
- Hua, S.S.T; Tsai v.Y; Lichens G. M.;Noma A.T., (1982) - Accumulation of aminoacids in *Rhizobium* sp, strain WRI 00 1 in response to sodium chloride salinity, *App/. Environ ,Microbiol*, 44 : 135-140.
- **-Ianson, D. C. and Linderman, R. G., (1993)**. Variation in the response of nodulating
- **Kidston R, Lang WH (1921)** On oldred sandstone plants showing structure, from the Rhynie chert bed, Aberdeenshire. Part V. The Thallophyta occurring in the peat-bed; the succession of the plants throughout a vertical section of the bed, and the conditions of accumulation and preservation of the deposit. *Trans R Soc Edinb* 52: 855–902.
- **Kivlin SN, Hawkes CV, Treseder KK (2011)** Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 43: 2294–2303.
- Kloepper, J. W ; Leong, J ; Teintze, M; Schroth, M.N. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria , *Nature* .286: 885-886.
- Kobayashi, Y., Tanaka. H. Et O. Gasawara .(1974). Purification and properties of Fla, a p-glucanase which is highly lytic toward cell walls of *Piriculona oryzae* E. *Agric.Biol. Chem.* pp. 3 8; 973-978.
- **Koele N., Dickie I. A., Blum J. D., Gleason J. D., 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. R., Johnson D., Donnelly D. P., Muckle G. E., Boddy L., Read D. J. (2004)**. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*. 82: 1016-1045.
- **Leclerc, H ; Gaillard ,J. L ; Simonet ,M., (1995)** : *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien* . Doin editeurs.
- legumes. In *La Symbiose*, disponible sur Lévy, J. Debellé, F. Baek, J. M. Kalo, P. Rosenberg, C. Roe, B. A. Long, S. R. Cook, mitochondria. *Plant Physiol*. 1104p. [Epub ahead of print]. Disponible
- **Lodwig, E. M. A. H; Hosie, A; Bourdes, K; Findlay, D; Allaway, R ; Karunakaran, J. A. Downie, P. S. Pool. (2003)**. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature*. 17 (6933):722-6.

- Long, M. H. (1996). The role of the linguistic environment in second language acquisition. In W. C. Ritchie & T. K. Bhatia (Eds.), Handbook of second language acquisition (pp. 413–468). New York.
- **Long, S. R. (1996).** Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**, 1885-1898.
- **M.Neyra. (1989)** .Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote, L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, P.1 /2.
- **Miklashevichs, E.H., Rohrig, J., Schmidt, S.J. (2001).** Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors, *Crit- Rev- Plant- Sci* **20**, 373-394.
- **Morton J. B. Benny G. L.(1990).** Revised classification of arbuscularmycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order Glomales and Gigasporineae and two new families Acaulosporaceae and Gigasporaceae with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon.* 37: 471-491.
- **Morton J. B. (1990).** Evolutionary relationships among arbuscularmycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia.* 82: 192–207.
- **Newcomb, E.H. & Tandon, S.R. (1981)** Uninfected cell of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science* 212, 1394–1396.
- **Newcomb, W; Sippell, D. and Peterson, R.L. (1979)** *Can. J. Bot.*, 2603- 2616.
- **Newman E. I. Reddell P.** Distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist.* 106: 745-751.
- Noel, K.D. (2009). Rhizobia. M. Schaechter (ed), *Encyclopedia of microbiology*, Academic press, San Diego, CA, pp, 261-77.
- **Öpik M, Zobel M, Cantero JJ, Davison J, Facelli JM, Hiiesalu I, et al. (2013)** Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscularmycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23: 411–430..
- Pawlowski k, Bisseling T. (1996). Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features, *Plant Cell* 8, 1899-1913.
- **Pelmont, J. (1993).** bactérie environnement, presse Universitaire de Grenoble, P898.
- Raven; Evert; Eichhorn. (2007). *Biologie végétale.* 2 e édition. Edition de boeck. Paris France. pp 653-660.
- **Read DJ (1991)** Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47: 376–391.
- **Redecker D., Morton J. B., Bruns T. D., (2000).** Ancestral lineages of arbuscularmycorrhizal fungi (Glomales). *Mol. Phyloge. Evol.*, 14(2) : 276-284.
- **Reinhardt, D. (2007)** Programming good relations--development of the arbuscularmycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 1: 98-105.
- -Reinhardt., D. 2007. Programming good relations -development arbuscularmycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 10 :1–8.
- **Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994)** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *PNAS* 91: 11841–11843.
- **Rioux. C. R., Jordan. D. C. Et Raitray J. B. M. (1986).** Iron requirement of *Rhizobium leguminosarum* and secretion of anthracitic acid during growth on an iron deficient medium. *Arch. Biochem. Biophys.* pp. 248; 175- 182.
- **Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. (2001).** A new fungal phylum, the Glomeromycota : phylogeny and evolution. *Mycological Research.* 105: 1413-1421.

- **Schwery O, Onstein RE, BouchenakKhelladi Y, -Xing Y, Carter RJ, Linder HP (2014)** As old as the mountains: the radiations of the Ericaceae. *New Phytol* 207: 355–367.
- **Cronk, Q. Ojeda, I .Pennington, R., (2006).** Legume comparative genomics: progress in
- **Selami, N. (2015).** Etude des Associations Symbiotiques de *Retama monosperma* : Approches Morphologique, Anatomique et Ultrastructurale, Caractérisation Moléculaire des Isolats, Thèse Doctorat, Université des Sciences et de la Technologie d’Oran Mohamed Boudiaf.
- **Shinde, S. Villamor, J.G. Lin, W.D. Sharma, S. Verslues, P.E.,)2016(.** Proline significance of mineralweathering in ectomycorrhizal and arbuscularmycorrhizal
- **Signorelli, Santiago., (2016).** The Fermentation Analogy: A Point of View for
- **-Simon L., ousquet J., Levesque R. C., Lafonde M. (1993).** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 363: 67-69.
- **Skorupska, A; Janczarek, M; Marczak, M; Mazur ,A; Krol J. (2006).** Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories*. vol5, 7
- **Smith S. E., Read D. J. (2008).** Mycorrhizal symbiosis. 3rd Ed. Academic Press. San Diego. 16-32.
- **Smith SE, Read DJ,(2008).** Mycorrhizal symbiosis. 3rd edn. Academic Press. London.
- **Smith, S.E., Read D. J. (2008).** Mycorrhizal symbiosis. Troisième édition, New York,
- **Smitth. M.J., Shoolery. J. N., Schwyn. B., Holden. 1. AND J. B. Neilands. (1985)** .Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. *J. Am. Chem. Soc.* pp. 107; 1739-1743.
- **Somasegaran, P; Hoben H, G .(1994).** Handbook for *Rhizobia*, Springer verlage ,New York.
- **Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, et al. (2016)** A phylum level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108: 1028–1046.
- **Sprent, J ; Raven, J. (1992).** Evolution of nitrogen –fixing symbioses, In : Biological nitrogen fixation ,stady, Burris, R ,Evan, eds, Chapman and hall, New York .
- **Stefano, Romano. Vladimir, Bondarev. Martin, Kölling. Thorsten Dittmar. Heide,** sur: <http://www.plantphysiol.org/content/early/2016/08/09/pp.16.01097.full.pdf+html> .16.0
- **Taylor, L. P; and Grotewold, E.(2005).** Flavonoids as developmental regulators, *Curr Op Plant Biol* 8: 317-323.
- **Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010)** Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–263. 10.1016/j.soilbio.2013.10.041.
- **The Plant List (2018)** <http://www.theplantlist.org/>. the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and
- **Toth R, Doane C, Bennett E, Alexander T (1990)** Correlation between host-fungal surface areas and percent colonization in VA mycorrhizae. *Mycologia* 82: 519–522.
- **Van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR (2015)** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol* 205: 1406–1423.
- **Voets L., De la Providencia I. E., Declerck S. (2006).** Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytologist*. 172: 185-188.
- **Wang B., Qiu Y. L. (2006).** phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants.

Mycorhiza. 16 : 299-363.

- **Werner, D., (1992).**Symbioses of plants and microbes. Philips, University Marburg Germany. Edition Chapman & hall.
- **Xie, Z.P. Staehelin, C. Vierheilig, H. Wiemken, A. Jabbouri, S. Broughton, W.J. Vogel-Lange, R. Boller, T., (1995).** Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal.
- Zakhia; T, F. Et De Lajudie, P. (2001). Taxonomy of rhizobia. Agronomie., 21: p 569-576.
- (<http://biosol.esitpa.org/liens/rhizo2003/nodulation.htm>).
- (http://svt.ac-dijon.fr/IMG/pdf/ppt_interactions_plantes-mo.pdf).
- (<http://www.biofertilisants.fr/zoom-les-bacteries-fixatrices-dazote/>
- (<https://agriculture-de-conservation.com/Legumineuse-fixation-d-azote-et.html>).
- (<https://docplayer.fr/33113805-Les-symbioses-racinaires.html>)
- (https://www.univ-usto.dz/images/coursenligne/as_sym_SN).

Tables des métiers

Remerciement	
Dédicace	
Liste d'abréviation	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Introduction.....	01

Chapitre I : Etude bibliographique.

Interactions plantes-symbiotes.....	03
symbiose mycorhizienne	03
De la découverte à la généralisation.....	03
Principaux types de la Symbiose mycorhizienne	04
Les mycorhizes arbusculaires	04
Les ectomycorhizes	05
Les mycorhizes d'orchidées.....	06
Les mycorhizes éricoïdes	07
Symbiose mycorhizienne à arbuscule.....	08
Structure des champignons mycorhizes à arbuscules.....	09
Morphologie des champignons mycorhiziens à arbuscules	13
Symbiose Rhizobienne.....	14
Description microbiologique de rhizobia.....	15
Caractères physiologiques et culturels	16
Taxonomie des rhizobia.....	17
Critères de résistance.....	19
La résistance aux contraintes abiotiques	19
La résistance d'un agent biologique.....	20
Antagonisme entre Rhizobium et flore microbienne.....	20
Spécifié d'hôte.....	21
Établissement de la symbiose	21
Les bases moléculaires de la symbiose.....	27
Autres facteurs symbiotiques.....	29
Fixation biologique de l'azote.....	30
Les intérêts de la symbiose Rhizobienne	31

Chapitre II

La vie en symbiose chez les légumineuses et les microorganismes

Historique de la symbiose tripartite.....	32
Intérêt de la symbiose tripartite.....	33
la symbiose tripartite entre luzerne- rhizobiums et mycorhizes.....	34

Chapitre III

Technologies de production d'inoculum

Inoculum mycorhizien	35
Méthodes de production	35
Etapes de production d'inoculum mycorhizien	36
Qualité des inoculums	36
Production industrielle d'inoculant mycorhizien	37
Production d'inoculum rhizobien	37
Les différents types d'inoculum.....	38
Choix de support	38
Conservation et emploi d'inoculum	39
Facteurs affectant la réponse de l'inoculum rhizobienne	39

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

Méthodologie suivie pour l'étude des Rhizobium	40
Collection des nodosités	40
Isolement de souches de Rhizobium	40
Purification des isolats	41
Identification des souches de Rhizobium.....	41
Examen microscopique.....	41
Examen mobilité	42
Tests biochimiques	42
Vitesse de croissance sur YMA + Bromothymol	42
Recherche de certaines enzymes.....	42
Conservation des souches	43
Etude des paramètres symbiotiques	43
Test d'infectivité des souches.....	43
Stérilisation, germination et mis en culture des plantules de Médicago.....	44
Inoculation des plantules in Vitro.....	44
Estimation de la croissance des plantes in-vitro et observation du phénotype des plantes noculées.....	45
Méthodologie suivie pour l'étude des Mycorhizes	45
Piégeage des endomycorhizes	46
Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes	46
Echantillonnages	47
Lavage	47
Eclaircissements et coloration des racines.....	47
Montage et observation des racines.....	48
Estimation de la colonisation MA des racines	49
Extraction des spores.....	50
Conclusion	53
Référence bibliographique	55
Table des matières.....	61