

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE

N° :



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE
ET DE LA VIE

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : BIOTECHNOLOGIE
VEGETALE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique
Biotechnologie Végétale

Par:

LAKEHAL AHLEM et CHARIK NOUR ELHOUDA

Intitulé

***Diversité des rhizobia nodulant (*Ononis biflora*
Desf.) et les champignons mycorhiziennes de
leurs sols rhizosphériques.***

Soutenu devant le jury composé de :

BENDERRADJI Laid

Université de M'Sila

Président.

GHADBANE Mouloud

Université de M'Sila

Rapporteur.

BOUNAR Rabah

Université de M'Sila

Examineur.

Année universitaire : 2017 /2018

Remerciement

Au terme de ce modeste travail de recherche, nous remercions d'abord Dieu, le tout puissant, qui nous a donné la force et le courage pour poursuivre nos études.

Nous voudrions remercier tous ceux qui nous ont accordé leur aide et leurs encouragements.

En premier lieu, nos remerciements vont à notre encadreur Mr : GHADBANE .M d'avoir acceptée de nous prendre en charge pour réaliser ce mémoire. Sans ses orientations et ses Suggestion les plus inestimables, ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour.

Mes remerciements sont aussi adresses aux membres du jury, Monsieur le président Mr : BENDERRADJI .L et l'examineur Mr : BOUNAR .R qui ont pris de leur temps pour lire ce manuscrit, ave : leurs remarques pertinentes.

Nous remercions vivent Mr : SEGHIRI .K responsable du laboratoire de biologie, ainsi que les ingénieurs de laboratoire, de nous avoir accueilli au sein du laboratoire, Asma, Samiha, Amel.

Enfin, nos remerciements vont également à toute personne acceptant de nous lire ce présent, de nous corriger et de nous conseiller.

Dédicace

Avant de dédier ce travail je tiens à remercier الله le tout

Puissant qui nous a permis de mener à bien ce

modeste travail

A mes très chers parents

A mes frères (Amdjed, Oussama)

A mes sœurs (Samiha, Lamia, Nour, Hanin)

A mes amies : Messouda, Imane, Amel, Warda

Ceux qui la rendent plus intéressante

A toute ma famille et mes amies.

Ahlem

Table de matière

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

I.1. Description des relations Sol-Plante-Microorganismes	1
I.1.1. Rhizosphère.....	1
I.1.2. Organismes de la rhizosphère.....	1
I.1.2.1. Les plante.....	1
I.1.2.2. Microorganismes.....	1
I.2. La symbiose.....	2
I.2.1. Généralités.....	2
I.2.2. Spécificité de la symbiose rhizobia-légumineuse.....	2
I.2.3. Le partenaire végétal	3
I.2.3.1. Caractères générale de Genre <i>Ononis</i>	3
I.2.3.2. Présentation L'espèce <i>Ononis biflora Desf</i>	3
I. 2.3.3. Taxonomie.....	5
I.2.4. Le partenaire bactérien.....	5
I.2.4.1. Caractères généraux.....	6
I.2.4.2. Caractères biochimiques et physiologiques.....	6
I.2.4.3. Caractères génétiques.....	6
I.2.5. La nodulation.....	6
I.2.5.1. Le nodule.....	7
I.2.5.2. Processus de nodulation.....	7
I.3. Généralités sur les mycorhizes.....	8
I.3.1. Définition.....	10
I.3.2. Types de Mycorhizes.....	10
I.3.2.1. Les ectomycorhizes.....	11
I.3.2.2. Les ectendomycorhizes.....	11
I.3.2 .3. Les endomycorhizes.....	11

I.3.2 .3.1. Les mycorhizes à arbuscules (MA).....	11
I.3.3. Classification des champignons mycorhizes à arbuscules (CMA).....	13

Chapitre II : Matériels et méthodes

II .1.Présentation de la zone de prélèvement.....	15
II.1.1. Situation géographique.....	15
II.2. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	15
II .2.1.Collecte des nodules.....	15
II .2.2.Conservation des nodules.....	16
II.2.3. Stérilisation des nodules.....	17
II.2.4.Ecrasement des nodules.....	18
II.2.4.1.Méthode préconisée par Vincent.....	18
II.2.4.2.Méthode des tubes Eppendorf.....	18
II.2.5. Isolement des souches à partir des nodules.....	18
II.3. Caractères morphologique et culturaux.....	19.
II.3.1. Principaux milieux de culture utilisés.....	19
II.3.2. Purification des isolats.....	19
II .3.3.Examen microscopique.....	20
II .3.4. Observations des colonies et conservation des isolats.....	20
II.4. Caractéristiques métaboliques des isolats.....	21
II.4.1. Le test de bleu bromothymole.....	21.
II.4.2. Test nutritionnel.....	21
II.4.2.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone.....	21
II.4.3. Tests physiologiques.....	21
II.4.3.1. Effet de la température.....	21
II.5. Recherche des mycorhizes.....	21
II.5.1.Préparation des solutions.....	21
II.5.2.Prélèvement des racines.....	22
II.5.3.Préparation des racines et coloration.....	22
II.5.4.Préparation des lames.....	25
II.5.5.Estimation de la mychorhization.....	26

Chapitre III: Résultats et discussions

III.1. Test de stérilisation.....	29
III .2. Caractères morphologiques et culturaux.....	29

III.2.1. Croissance sur YMA.....	29
III.2.2. Croissance sur YMA+ RC.....	30
III .2.3. Croissance sur GPA+BCP.....	31
III.2.4. Aspect microscopique.....	32
III .3. Caractérisation phénotypique des isolats.....	32
III .3.1. test de Bleu de Bromothymol.....	32
III.3.2. Assimilation de la source de carbone.....	33
III.3.2. Tests physiologiques.....	34
III.3.2.1. Effet de température.....	34
III.4. Détection des mycorhizes.....	35
III.4.1. Mise en évidence de l'infection endomycorhizienne.....	35
III.4.1.1. Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne.....	35
III.4.2. Observation microscopique des mycorhizes à partir des fragments de racines <i>OnonisbifloraDesf</i>	37

Conclusion

Références Bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des figures

Figure 1 : Nodules racinaires et nodules caulinaires.....	7
Figure 2 : Représentation schématique de la symbiose.....	8
Figure 3 : Infection intracellulaire chez les Légumineuses.....	9
Figure 4 : Principaux types mycorhiziens représentés sur une coupe transversale de racine d'après de Le Tacon, 1985	12
Figure5 : Arbre phylogénétique des champignons mycorhiziennes.....	13
Figure 6 : Localisation géographique de la zone prélèvement	15
Figure7 : La légumineuse <i>Ononis biflora Desf</i> (W. Sétif).....	16
Figure 8 : Collecte des nodules (Photo D.P. Beck, 1993).....	16
Figure 9 : Conservation des nodules (Vincent, 1970).....	17
Figure 10 : Méthodes d'ensemencement.....	19
Figure 11 : Schéma de coloration des échantillons racinaires	24
Figure 12 : Les étapes de préparation des échantillons du mycorhize.	25
Figure 13 : Répartition en classes de la colonisation du cortex racinaire par les CM et la présence d'arbuscules (Trouvelot <i>et al.</i> , 1985)	27
Figure14 : Aspect des colonies sur YMA.....	30
Figure15 : Croissance sur milieu YMA+ RC.....	31
Figure16 : Acidification sur milieu GPA+ BCP	31
Figure 17 : Observation microscopique des bactéries isolées (G ×100).....	32
Figure 18 : Croissance des isolats sur milieu YMA+BTB.....	33
Figure 19 : Test de culture sur températures 28°C et 37°C.....	35
Figure 20 : Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne.....	35
Figure 21 : Racines de <i>Ononis biflora Desf</i> traitée et observée sous microscope otique (G X 40).....	37

Liste des tableaux

Tableau 01 : caractères de l'espèce *ononis biflora* Desf.....25

Tableau 02 : Caractères morphologiques des colonies.....29

Tableau03 : Utilisation des sucres comme source de carbone par le groupe des souches testée.....33

Liste abrégations

YMB : (yeast Mannitol Broth).

YMA : (yeast Mannitol Agar).

YMA+RC : (yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)

YMA+BTB : (yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol).

GPA+BCP :(Glucose Peptone Agar+ pourpre de Bromocrésol).

CMA : champignons mycorrhiziens à arbuscules

B.N.L : Bactéries nobulants légumineuses

Introduction

Introduction

L'azote est un facteur limitant majeur de la production agricole, alors que l'atmosphère terrestre est constituée à 80% d'azote. Ce paradoxe est dû au fait que l'azote moléculaire (N₂) est une molécule très stable, que seuls les organismes appartenant au groupe des procaryotes (mais aucun organisme eucaryote) sont capables de le réduire sous une forme combinée assimilable. Les systèmes fixateurs les plus efficaces sont des symbioses qui réalisent un couplage entre la fixation d'azote et la photosynthèse.

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac. Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux.

L'association symbiotique plante légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement.

La famille des légumineuses, premier hôte de l'association, renferme trois sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae* ; la majorité des espèces nodulées se rencontrent dans la sous famille des *Papilionoideae*. Le genre *ononis* est un parmi les plus répandu dans le monde.

Les rhizobia, deuxième élément de l'association, sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines des légumineuses la formation d'organes particuliers, les nodosités, au sein desquels ils réduisent l'azote de l'air. Dans cette association à bénéfice mutuel, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte.

Le mycorhize est une association entre la racine d'une plante verte et un champignon filamenteux. Cette association mutualiste joue un rôle prépondérant dans le fonctionnement des écosystèmes végétaux (**FORTIN et al, 2008**).

Les mycorhizes sont classées en différents types selon leurs structures en : Ectomycorhize, Ectendomycorhizes, Endomycorhizes, mycorhizes des Orchidées, mycorhizes des Ericoïdes, mycorhizes Sébacinoïdes, Arbutoïdes et mycorhizes à Arbuscules (**HARLEY ET SMITH, 1983**).

Les mycorhizes à arbuscules appartiennent à la classe des Glomeromycètes et partagent un caractère commun très particulier, le mycélium de ces champignons mycorhiziennes arbusculaires est de type coenocytique, c'est à dire formé de plusieurs cellules fusionnées et composé de trois composantes essentielles : structure fongiques inter et intra cellulaires dans le cortex racinaire et le mycélium extra- racinaire constituant la phase extramatricielles. Les hyphes extra-racinaires du champignon augmentent le volume du sol, alors que les hyphes intraracinaires se propagent dans les espaces intercellulaires, se gonflent en vésicules selon leur génotype et forment des arbuscules intracellulaires créant une importante zone interface entre les cellules des deux partenaires (**HARLEY ET SMITH, 1983**).

Le présent travail de recherche est réparti en **03** chapitres :

Le premier chapitre présente le cadre général de l'étude par des rappels bibliographiques sur les notions de la rhizosphère et la symbiose rhizobia-légumineuse (*Ononis biflora Desf*), et les mycorhizes.

La Deuxième chapitre présente le matériel et méthodes : présentation de la région de l'étude. Isolement des bactéries à partir des nodules, et étude morphologique et microscopique.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus, les interprétations, les discussions éventuelles et la conclusion générale.

Chapitre I

Etude Bibliographique

I.1. Description des relations Sol-Plante-Microorganismes**I.1.1 Rhizosphère**

Le terme rhizosphère (du grec *rhiza*, la racine et de *sphère*, domaine d'influence) a été utilisé pour la première fois par **LORENZ HILTNER (1904)** pour définir la zone de sol sous l'influence des racines de légumineuses. La rhizosphère définit aujourd'hui le lieu d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes. Ces interactions dépendent des conditions physico-chimiques du milieu et des organismes mis en jeu.

La rhizosphère est en fait un micro-habitat dont les limites sont mal définies car il représente un gradient microbiologique et physico-chimique allant de la racine elle-même, au contact de laquelle la microflore présente les différences les plus marquées, jusqu'à une distance plus ou moins grande (1 à 5 mm) au-delà de laquelle l'« effet rhizosphérique » disparaît (**ROVIRA et DAVEY, 1971**).

I.1.2. Organismes de la rhizosphère**I.1.2.1. Les plantes**

Le premier processus qui intervient dans la rhizosphère est commandé par les racines des plantes qui opèrent des changements qualitatifs du sol qui les entoure, de façon physique par leur croissance et chimique par leur exsudation. Elles modifient les propriétés physicochimiques du sol tant au niveau de sa microporosité que de sa macroporosité (modification de pH, de potentiel redox, de température, d'aération, d'humidité, de salinité...) qui conduisent à des modifications des propriétés biologiques et microbiologiques (**DARRAH, 1991**).

I.1.2.2. Microorganismes

Les microorganismes de la rhizosphère interviennent dans la nutrition des plantes en influençant : la disponibilité des nutriments, la croissance et la morphologie racinaire, le processus de prélèvement des nutriments (**HOFLICH et al., 1994 ; PATTEN et GLICK, 1996**).

Ils modifient qualitativement et quantitativement l'exsudation racinaire (**BOWEN et ROVIRA, 1991**) et interviennent au niveau : de la perméabilité racinaire, du métabolisme racinaire, de l'absorption de certains composés, en modifiant la disponibilité des éléments

nutritifs. Ils contribuent ainsi à modifier la disponibilité des éléments minéraux et notamment à altérer les minéraux (**LEYVAL et BERTHELIN, 1991**).

Certains microorganismes tels que *Pseudomonas putida* et *Azospirillum* spp sont capables d'induire des signaux provoquant la libération de nutriments par les racines. Ils interviennent également au niveau des phytohormones, substances régulant la croissance des plantes (auxines, gibbérellines, cytokinines, éthylène et acide absissique). Certains microorganismes sont même capables de sécréter ces phytohormones (**BEREA et al., 1983 ; ROVIRA et al., 1983**).

Le rôle des microorganismes dans la mobilité des éléments métalliques en traces est moins bien connu. Les bactéries et champignons peuvent produire des substances acides ou complexâtes entraînant la dissolution des minéraux avec des actions chimio-lithotrophes ou chimio-organotrophes (**DENEUX-MUSTIN et al., 2001**).

I.2. La symbiose

I.2.1. Généralités

La symbiose rhizobium-légumineuse, décrite pour la première fois par Frank (1889), présente un modèle d'étude d'association entre eucaryote et procaryote. Elle présente un intérêt agronomique considérable. En effet, l'azote minéral du sol, principale ressource azotée des plantes est, dans le cas des plantes cultivées, fourni principalement par des engrais chimiques qui posent des problèmes de pollution, en particulier des nappes phréatiques par le lessivage des nitrates. La symbiose permet l'enrichissement naturel du sol en azote et la réduction des apports d'engrais.

L'azote fixé par la symbiose est restitué au sol après la décomposition de la matière végétale (Racines, nodules, parties aériennes), ou via les déjections des animaux ayant pâture (**NDIAYE, 1996**).

I.2.2. Spécificité de la symbiose rhizobia-légumineuse

La symbiose rhizobium-légumineuse est très spécifique, un *Rhizobium* donné n'est capable d'effectuer une symbiose fixatrice d'azote que si l'autre partenaire appartient à son spectre d'hôte, et le contraire est juste.

Les amplitudes des spectres des légumineuses et des rhizobia sont très variables. En effet, on retrouve des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel qu'Azorhizobium

caulinodans qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (DREYFUS et al, 1988), alors que cette même légumineuse possède d'autres partenaires bactériens (*Sinorhizobium sahelii* et *S. teranga*) (BOIVIN et al., 1997). D'autres symbiotes bactériens présentent un spectre d'hôte modérément spécifique, comme *Sinorhizobium meliloti* qui s'associe avec les espèces des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (LAJUË et al., 1994).

I.2.3. Le partenaire végétal

I.2.3.1. Caractères générale de Genre *Ononis*

Chaque fleur consiste 1^{er}, on calice monophylle, campanule, et partagé en cinq dents longues et linéaire, 2^{ème} en une corolle papilionacée, composée d'un étendard plus grand que les autres pétales, et ordinairement marquée de lignes colorées et parallèles, de deux ailes plus courts que l'étendard, et d'une carène pointue et un peu relevée. Antérieurement, 3^{ème} en dix étamines dont les filets sont tous réunis dans leur partie inférieure en une graine entière qui enveloppe le pistil ; 4^{ème} en un ovaire supérieur, ovale ou biconcave, d'un style dont le stigmate est simple.

Le fruit est une gousse forte, en filée communément un peu velue, uniloculaire, et qui renferme quelques semences réniformes (JEAN, 1783).

Ont classé l'espèce *Ononis biflora* et *Poa annua* parmi les espèces indicatrices de sol sableux-limoneux ou limoneux-sableux (LAUVI, 1985).

Le genre *Ononis* appartient à la tribu des trifolieae qui constitue une des 31 tribus relevant de la sous-famille Papilionoideae. Ce genre qui compte environ 75 espèces, est largement distribué dans la région méditerranéenne, les îles Canaries, l'Europe et l'Asie centrale [2]. En Algérie, on rencontre principalement les espèces suivantes [10] :

- *Ononis scensia* (L.)
- *Ononis fruticosa* (L.)
- *Ononis spinosa* (L.)
- *Ononis hispida* (Desf.)
- *Ononis aragonensis* (Asso.)
- *Ononis minutissima* (L.)
- *Ononis pusilla* (L.)
- *Ononis serotina* (Pomel.)
- *Ononis natrix* (L.)
- *Ononis ornithopodioides* (L.)
- *Ononis biflora* (Desf.)
- *Ononis sicula* (Guss.)
- *Ononis antennata* (Pomel.)
- *Ononis pubescens* (L.)
- *Ononis viscosa* (L.)
- *Ononis incisa* (Coss.)
- *Ononis laxiflora* (Desf.)
- *Ononis reclinata* (L.)
- *Ononis pendula* (Desf.)
- *Ononis euphrasiaefolia* (Desf.)
- *Ononis variegata* (L.)
- *Ononis alopecuroides* (L.)
- *Ononis alba* (Poiret.)
- *Ononis crinita* (Pomel.)
- *Ononis avellana* (Pomel.)
- *Ononis rosea* (Dur.)
- *Ononis villosissima* (Desf.)
- *Ononis serrata* (Forsk.)
- *Ononis. Hirta* (Desf.)
- *Ononis. Mitissima* (L.)
- *Ononis cephalantha* (Pomel.)
- *Ononis diffusa* (Ten.)
- *Ononis cossoniana* (Boiss.)

I.2.3.2. Présentation l'espèce *Ononis biflora* Desf

Tableau 01 : caractères de l'espèce *ononis biflora* Desf.

L'appareil végétatif	-Plante annuelle de 15 à 50 cm velue-glanduleuse. Feuilles à 3 folioles ovales-oblongues, dentées, stipules de 15 mm de long longuement soudés et brièvement denticulés
L'appareil reproducteur	- Inflorescence en grappes lâches et feuillées. Fleurs réfléchies par 2, assez grandes, chacune sur un pédoncule égal à la feuille ou plus long et inséré au sommet du pédoncule de la grappe ; ce dernier à l'aisselle d'une feuille, dressé et terminé par une arrête plus longue que les pédoncules floraux. - Calice à longs sépales en alêne, corolle de 14-22 mm, égalant 2 fois le calice, blanc-jaunâtre et lavé de violet.
Floraison	mars-mai
Ecologie	Ecologie : champs, jachère, lieux incultes.
Aire géographique	Afrique du nord, Espagne, Moyen-Orient.

I.2.3.3.Taxonomie

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Ononis*

Espèce : *Ononis biflora* Desf.

I.2.4. Le partenaire bactérien

Les rhizobiums furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote, c'est Franck 1889 le premier a proposé le nom de *Rhizobium*

I.2.4.1. Caractères généraux

Les rhizobiums sont des bactéries à Gram négatif, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulant (JORDAN, 1984).

Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision d'*Alpha-Proteobacteria*. (ZAKHIA et de LAJUDIE., 2001; LQRANJOet al., 2002). Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (WERNER, 1992).

Les espèces de rhizobia en culture ont besoin d'un milieu de culture qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux (SOMOSEGARAM et HOBEN, 1994). En comparaison avec d'autres bactéries de sol, les rhizobiums et le *Bradyrhizobium* ont une grande exigence pour le Ca²⁺, Fe²⁺ et Co²⁺, leurs besoins en vitamines sont très variables, le genre *Bradyrhizobium* est généralement stimulé par la biotine, alors que le *Rhizobium* a besoin conjointement de thiamine et de pantothénate (WERNER, 1992).

I.2.4.2. Caractères biochimiques et physiologiques

Rhizobium possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobiose ; alors que dans les conditions d'anaérobiose, les espèces *rhizobium* peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons (WERNER, 1992 et BENGUEDOUAR, 2000).

Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH 6,0 à pH 7,0 (SOMASEGARAN et HOBEN, 1994).

I.2.4.3. Caractères génétiques

La génétique de *Rhizobium* n'est pas facile, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (PELMONT, 1995). Les souches de *Rhizobium* nodulant les légumineuses sont considérées particulièrement sensibles en raison de leurs caractéristiques génétiques (PATRICIA et al., 1998; RAPOSEIRAS et al., 2002).

Le génome du *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un méga plasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieure à 1 Mb, selon les espèces (LARANGO et al., 2002).

I.2.5.La nodulation

I.2.5.1.Le nodule

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte au sein duquel les bactéries, différenciées en bacteroides, fixent l'azote atmosphérique. Pour permettre une activité optimale de la nitrogénase, enzyme irréversiblement inactive par l'oxygène, la plante maintient les nodules en condition de micro-oxie grâce au parenchyme nodulaire pendant que le lé hémoglobine transporte et tamponne la concentration d'oxygène indispensable à la respiration. Les nodules sont majoritairement racinaires mais peuvent parfois être caulinaires (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 1998). Une illustration de ces différents types de nodules est présentée (Figure 1).



(a)



(b)

Figure 1 : (a) : Nodules racinaires(b) : Nodules caulinaires

I.2.5.2 Processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien. L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (MADIGAN *et al.*, 2007). Les étapes sont les suivantes

La symbiose commence par l'attachement des bactéries aux poils absorbants des racines de la plante légumineuse en germination ; on pense que cette liaison initiale dépend d'une reconnaissance cellulaire entre des molécules de surface comme des glycoprotéines des bactéries et de la plante.

La bactérie est encapsulée dans une poche de la paroi cellulaire et portée dans les profondeurs de la racine par la formation d'un filament infectieux constitué principalement de cellulose. Les cellules corticales sur l'extérieur de la racine se dédifférencient pour former un méristème, un tissu végétal formé de cellules indifférenciées, siège de divisions rapides et nombreux, situé dans les régions de croissance de la plante, qui grandit et fait saillie pour former une nodosité. Les filaments infectieux qui prolifèrent libèrent alors les bactéries dans le cytoplasme de cellules hôtes, après avoir été recouvertes d'une membrane spéciale synthétisée par l'hôte, connues sous le nom de bactéroïdes. Au sein de cet environnement extrêmement protecteur, les bactéries se différencient finalement pour atteindre un stade de fixation de l'azote, en réprimant les gènes de la nitrogénase et des cytochromes spécifiques des bactéroïdes. (PELMONT, 1995).

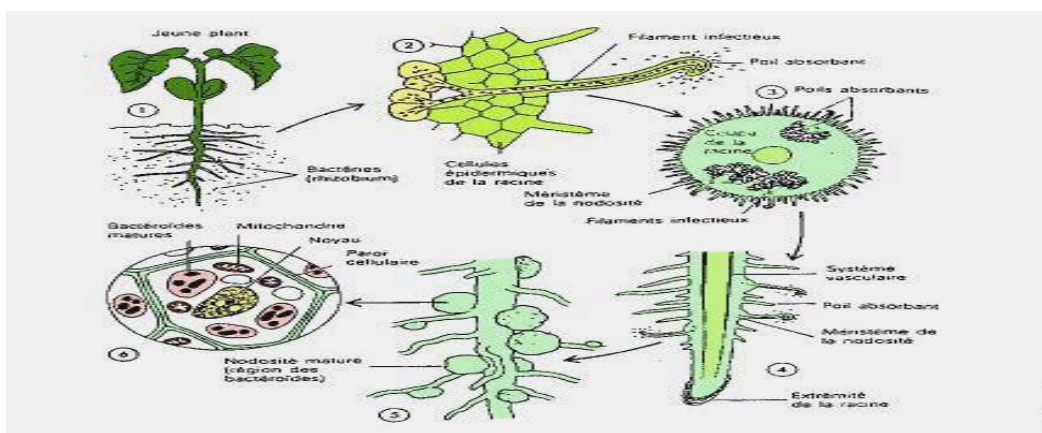


Figure 2 : Représentation schématique de la symbiose

L'établissement de la symbiose plante-microorganisme est le résultat d'interactions complexes, impliquant un dialogue moléculaire, entre la bactérie et la plante-hôte (Long, 1996).

La plante produit des composés (des flavonoïdes) qui attirent et activent les bactéries fixatrices d'azote autour des racines. Par un phénomène de reconnaissance, les bactéries s'agglutinent sur les poils absorbants et forment un cordon infectieux qui va pénétrer dans la racine. Sous l'action des bactéries, le poil absorbant se déforme selon une allure bien particulière. Arrivées au niveau des vaisseaux conducteurs les bactéries provoquent le développement d'une tumeur qui formera la nodosité. Certaines cellules de la racine vont se différencier et retourner à l'état de méristème. Elles ne vont alors que se diviser. Rapidement la nodosité se forme. C'est logiquement à l'extrémité de cette nodosité que l'on trouve les cellules méristématiques. Plus à l'intérieur se trouve une zone riche en bactéries. C'est à cet endroit qu'elles s'enkystent, augmentent de volume et changent de forme. On parle alors de bactéroïdes. Bien qu'à l'intérieur des cellules végétales, ces bactéroïdes sont entourés par une membrane pér bactéroïdienne qui les isole, en partie, du cytoplasme cellulaire. A ce stade, ces microorganismes fabriquent la nitrogénase, l'enzyme responsable de la fixation du diazote (HRISH, 1992) .

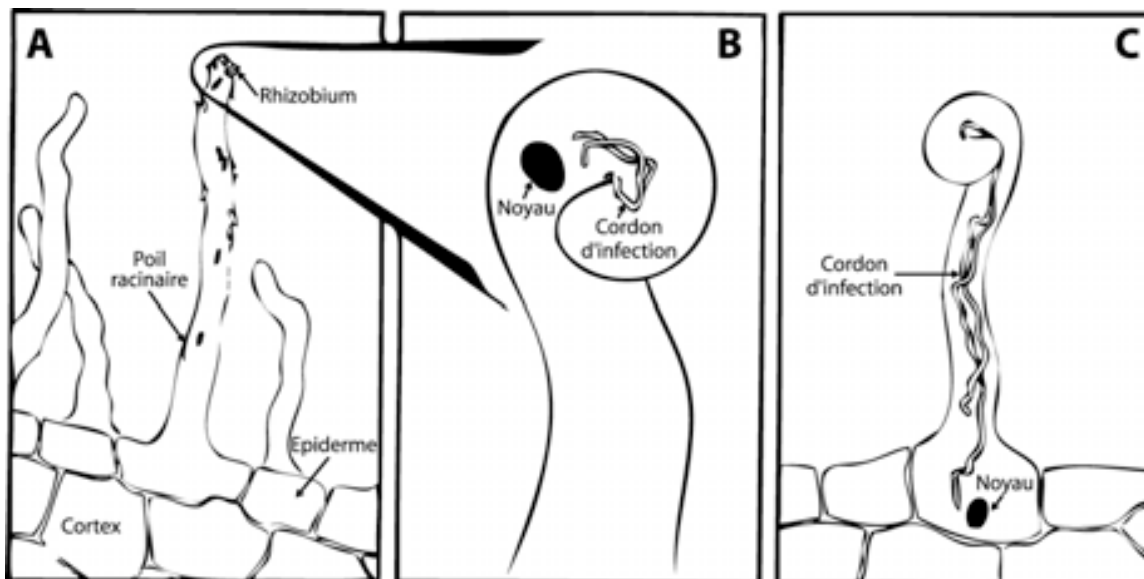


Figure 3 : Infection intracellulaire chez les Légumineuses.

La bactérie colonise la rhizosphère et entre en contact avec le poil racinaire (A)

Les facteurs Nod induisent la courbure du poil racinaire ce qui permet la création d'une zone confinée pour la bactérie qui initie l'infection (B). La mise en place du cordon d'infection suit le déplacement du noyau vers la base du poil (C). D'après Perret et col, 2000.

C'est au centre de la nodosité que les bactéroïdes vont fixer le diazote. Pour cela, ils synthétisent en collaboration avec la plante, une protéine, la leghémoglobine, dont le rôle est de fixer l'oxygène pour protéger la nitrogénase (les bactéroïdes produisent l'hème tandis que la plante produit la globine). Cette protéine peut représenter plus de 40 % des protéines d'une nodosité. Ce pigment présente la particularité de ne pas fixer entièrement l'oxygène ce qui permet aux bactéries de continuer la respiration sans gêner la fixation d'azote

I.3. Généralités sur les mycorhizes

I.3.1. Définition

Les mycorhizes relèvent de l'association d'un organisme photosynthétique, soit une plante verte, et d'un champignon filamenteux ; l'ensemble constitue une autre forme de symbiose végétale. D'origine gréco-latine, le mot mycorhize signifie champignon-racine (*μukes*= champignon, *rhiza*= racine) (ANDRE *et al.*, 2004).

La plante fournit au champignon des composés carbonés produit par la photosynthèse et, en retour, le champignon approvisionne la plante en éléments minéraux et en eau provenant du substrat (HODGE *et al.*, 2010 ; HOPKINS, 2003 ; SMITH *et* READ, 2008).

I.3.2. Types de Mycorhizes

Il existe plusieurs formes d'associations mycorhiziennes. Le résultat est donc une multiplicité des formes de détail qui gravitent autour de 7 types de mycorhizes : Mycorhize à Arbuscule, Ectomycorhize, Ectendomycorhize, Arbutoïde, Éricoïde, Orchidoïde et Sebacinioïde (SANDERS *et al.*, 1995 ; REDECKER *et* RAAB, 2006).

La classification des mycorhizes est basée donc sur le type de champignon associé, selon que celui-ci est asepté, c'est-à-dire Zygomycète de l'ordre des Glomales, ou septé, comme les Ascomycètes ou Basidiomycètes (SMITH *et* READ, 1997).

I.3.2.1. Les ectomycorhizes

Du grec *ectos*, extérieur, les ectomycorhizes sont une association fréquente entre les arbres des régions tempérées (fagacées, bétulacées, pinacées) et les Basidiomycètes ou les Ascomycètes. Environ 5% des trachéophytes ont des ectomycorhizes (MAYER *et al.*,2008).

Chez les ectomycorhizes, le mycélium ne se développe pas dans les cellules hôte, mais plutôt à l'extérieure des cellules. Les hyphes en s'accolant les unes aux autres forment un manchon autour des racelles et pénètrent aussi dans la racine, mais en se confiant aux espaces intercellulaires. Les réseaux ainsi formés, porte le nom de Hartig. Le mycélium formé n'est plus cénocytique mais plutôt formé d'hyphe cloisonnée (FORTIN *et al.*,2008).

I.3.2.2. Les ectendomycorhizes

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

I.3.2.3. Les endomycorhizes

Les champignons endomycorhiziennes ne sont pas spécifiques et sont normalement associés aux plantes comme les plantes forestières agricoles et horticoles.

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

Il existe trois types d'endomycorhizes :

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

I.3.2.3.1. Les mycorhizes à arbuscules (MA)

Parmi les associations endomycorhiziennes, ce sont les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) qui sont de loin les plus répandues à la surface du globe. Ils se sont adaptés à de nombreux environnements et différentes plantes hôtes. Ils peuvent former des

associations mutualistes avec les racines fines d'environ 80 % de toutes les plantes terrestres (SMITH et READ, 1997) ligneuses, herbacées, les mousses, fougères, gymnospermes et angiospermes plusieurs conifères et la majorité des plantes à fleurs, mono et dicotylédones.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sont des composantes importantes des écosystèmes terrestres (LIU et CHEN, 2007; SMITH et READ, 1997). Des techniques de biologie moléculaire ont permis de démontrer que les premières mycorhizes arbusculaires sont apparues au dévonien, il y a environ 450 millions d'années.

Le champignon mycorhizien à arbuscule forme plusieurs structures à l'intérieur des racines (Figure 3), 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).

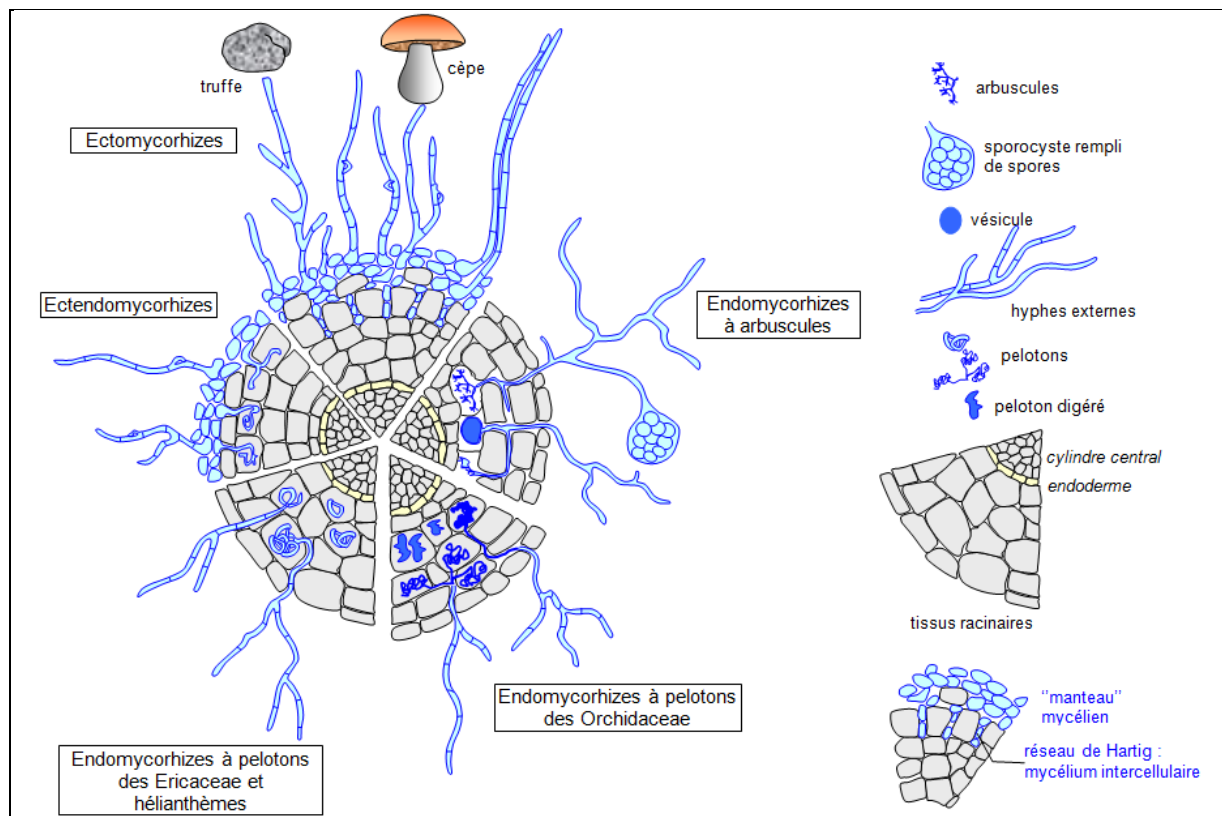


Figure 4 : Principaux types mycorhiziens représentés sur une coupe transversale de racine d'après de Le Tacon, 1985.

I.3.3. Classification des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

La taxonomie des CMA a d'abord été construite par morphotypage des spores, en tenant compte à la fois des similitudes structurales entre les spores mais aussi des caractères ayant une importance phylogénétique (MORTON et BAENNY, 1990).

Les études morphologiques et phylogénétiques récentes ont permis de regrouper toutes les espèces mycorhiziennes à arbuscules en un nouvel embranchement, les *Glomeromycota*, répartis en quatre ordres composant dix familles et quinze genres et environ 200 espèces. Le tout est associé à environ 225000 espèces végétales terrestres (SCHÜBLER *et al.*, 2007).

L'emploi d'outils de biologie moléculaire a permis de situer l'origine de ces endosymbiotes à environ 400 millions d'années avant notre ère, soit en même temps que l'apparition des premières plantes terrestres (JEFFRIES *et al.*, 2003 ; GIANINAZZI *et al.*, 2010).

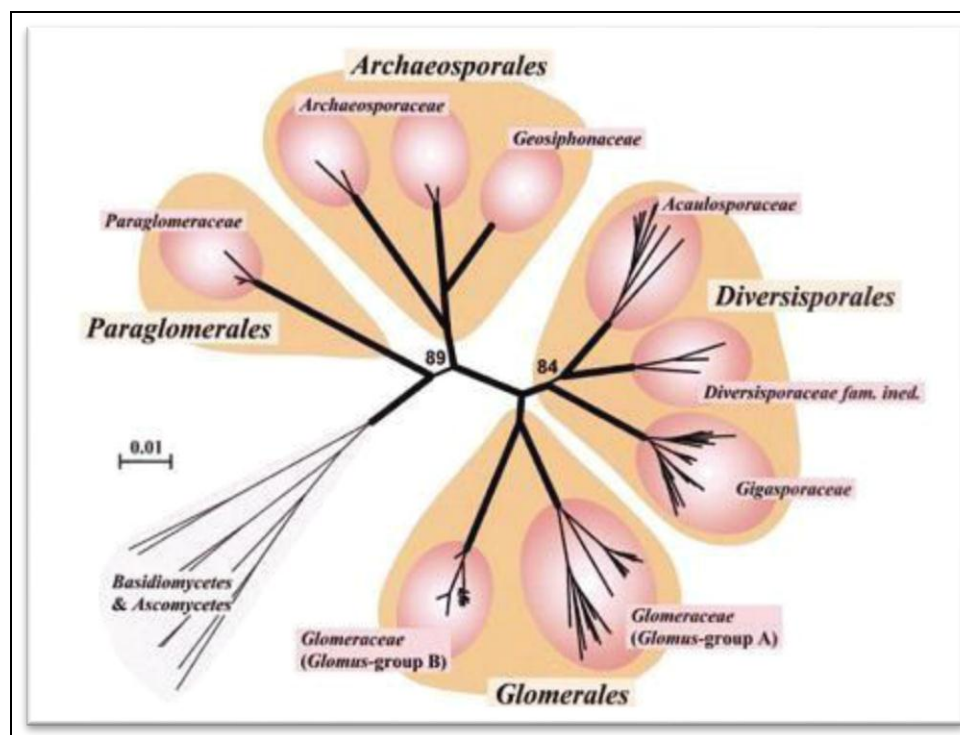


Figure5 : Arbre phylogénétique des champignons mycorhiziennes (slideplayer.fr)

Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1. Présentation de la zone de prélèvement

II.1.1. Situation géographique

La wilaya de Sétif a une superficie de 6504 Km², soit 0,27 % du territoire national. Elle se situe entre Alger à l'Ouest (300 Km), Constantine à l'Est (120Km), Bejaia (110 Km) et Jijel (le littoral) au Nord et M'sila au Sud. Elle est caractérisée par un climat continental semi-aride avec des étés torrides et des hivers rigoureux. La précipitation annuelle dans la zone Nord : 700m, la zone des hauts plains : 400 m.

- Latitude : 36° 11' 29 N
- Longitude : 5° 24' 34 E
- Altitude : 1080 mètres

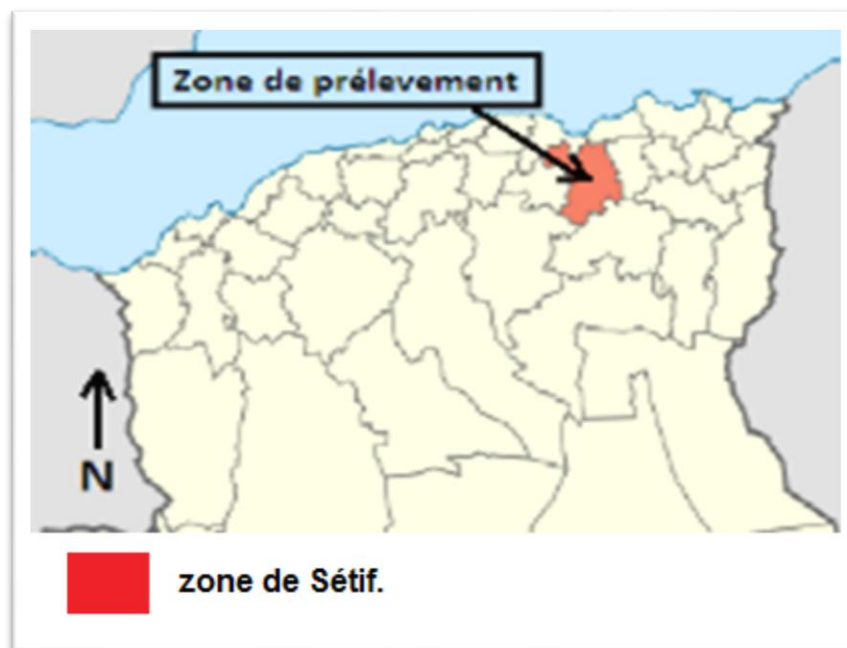


Figure 6 : Localisation géographique de la zone de prélèvement.

II.2. Isolement des bactéries à partir des nodules

II .2.1. Collecte des nodules

La collecte des nodules est réalisée à partir des racines de la plante *OnonisbifloraDesf* située dans la zone de Sétif



Figure7:La légumineuse *Ononis biflora* Desf(W. Sétif).

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent, J.M. (1970) et Somasegaran, P. et J. Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet



Figure 8 : Collecte des nodules (Photo D.P. Beck, 1993)

II.2.2. Conservation des nodules

Pour une courte conservation et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C de 24 jusqu'à 48 heures (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace).

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par Vincent (1970) et Somasegaram et Hoben (1994), qui consiste à remplir la moitié des flacons stériles par du chlorure de calcium

CaCl₂ (pour une meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel les nodules sont déposés (**Figure9**).

Sur chaque flacon, on doit mentionner le nom de la plante, le lieu et la date de prélèvement (Vincent, 1970).

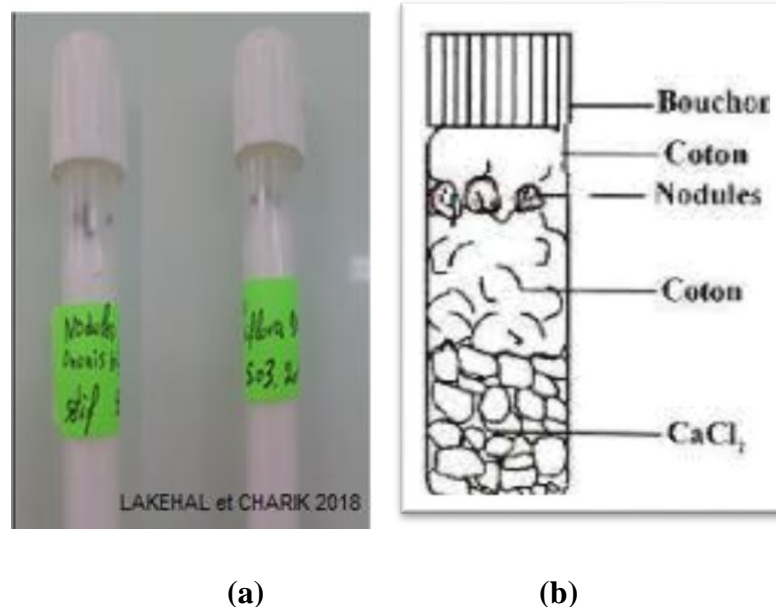


Figure 9 :(a)-Tubes utilisés pour la conservation des nodules dans notre étude

(b)- Conservation des nodules (Vincent., 1970).

II.2.3. Stérilisation des nodules

Si les nodules sont conservés dans un agent dessicatif, ils sont auparavant mis dans l'eau distillée au réfrigérateur toute une nuit. Sous la hotte à flux laminaire les nodules préparés sont immergés dans l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes puis transférés immédiatement dans une solution de Chlorure de Mercure HgCl₂ (1 g HgCl₂ + 5 ml HCl + 1 l'eau distillée) pendant 3 minutes, ensuite sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile (Vincent J.M., 1970).

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

II.2.4. Ecrasement des nodules

Deux méthodes ont été utilisées :

II.2.4.1. Méthode préconisée par Vincent

Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile, ensuite ils sont écrasés avec une pince stérilisée par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen (VINCENT, 1970).

II.2.4.2. Méthode des tubes Eppendorf

Les nodules sont réhydratés avec de l'eau distillée dans des tubes Eppendorf. Après avoir éliminé l'eau, les nodules sont stérilisés par immersion dans une solution de chlorure de Mercure pendant 3 minutes. Ensuite, ils sont rincés 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace de Chlorure de Mercure. Les nodules sont enfin écrasés dans les tubes Eppendorf stériles dans 2 gouttes d'eau distillée stérile.

Les deux méthodes sont réalisées dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée,.....).

II.2.5. Isolement des souches à partir des nodules

Le jus nodulaire obtenu à partir de ces 2 méthodes estensemencé à l'aide d'une anse de platineflambée au bec Bunsen, sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeast-Mannitol-Agar (YMA, Vincent, 1970) additionné de rouge Congo (**Annexe 1**). L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à avoir des colonies isolées et donc faciles à caractériser (**Figure 10**). Les mêmes nodules sontensemencés sur une boîte de milieu Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de Bromocrésol (GPA au BCP. **Annexe 1**). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 24 à 48 heures. Récupérer le jus restant et l'ensemencer sur un bouillon YMB (**Annexe 1**). Incuber à 28°C pendant 24 heures et répéter l'opération pour plusieurs nodules afin d'avoir le maximum de souches.

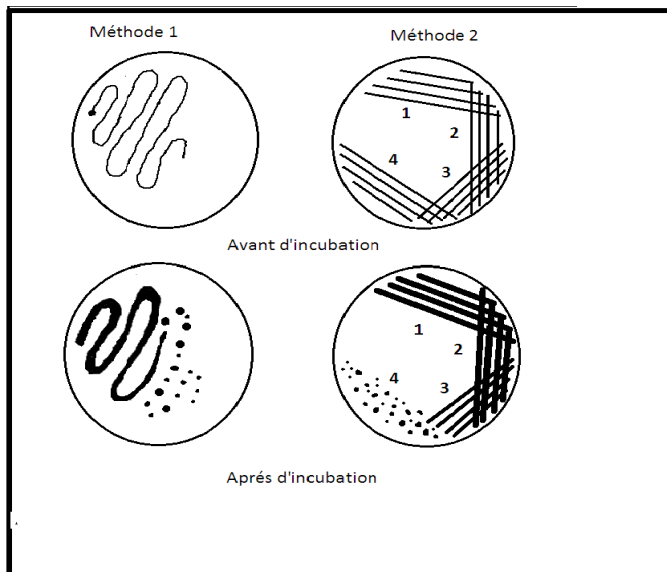


Figure 10 : Méthodes d'ensemencement.

II.3. Caractères morphologique et cultureux

II.3.1. de culture Principaux milieux utilisés

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée.

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants :

- Milieu liquid: YMB (yeast Mannitol Broth).

- Milieux solids: YMA (yeast Mannitol Agar).

YMA+RC (yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)

YMA+BTB (yeast Mannitol Agar + Bleu de Bromothymol).

GPA+BCP (Glucose Peptone Agar+ pourpre de Bromocrésol).

II.3.2. Purification des isolats

Après l'examen des isolats selon les caractères microscopiques et morphologiques sur les différents milieux (VINCENT, 1970.,SOMASEGARAM et HOBEN, 1994), des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur

purification. La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis les placer dans un bain Marie agitateur de 120 tours/ min à 28°C. Après 24h d'incubation, l'ensemencement se fait sur le milieu YMB+RC. Des examens microscopiques et morphologiques sont enfin réalisés

II.3.3. Examen microscopique

Dans notre étude, on a effectué la coloration de Gram. Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet de diviser les bactéries en deux groupes Gram positif et Gram négatif (TORTORA., 2003).

- Un frottis fixé à la chaleur sous la hotte à flux laminaire, est recouvert par un colorant basique le violet de Gentiane.
- Laisser agir pendant 1 minute.
- Chasser le violet avec le Lugol, ensuite recouvrir le frottis pendant 30 secondes.
- Laver à l'alcool-acétone et le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau courante.
- Recouvrir le frottis par la Fushine et laisser agir durant 1 minute.
- Laver à nouveau avec de l'eau, puis égoutter la lame sur du papier absorbant et enfin observer à microscope.

II.3.4. Observations des colonies et conservation des isolats

Les colonies ayant peu absorbé le rouge Congo sur milieu YMA et n'ayant pas acidifié le milieu GPA (virage du BCP au jaune) sont prises en considération.

Une observation microscopique (coloration de Gram) et un examen morphologique des colonies sur milieu YMA sont réalisés sur les isolats avant d'être conservés sur YMA tamponné avec du CaCO₃ (3 g/l). Après une incubation de 24 heures, les souches sont stockées au réfrigérateur en vue de leur caractérisation.

II.4. Caractéristiques métaboliques des isolats

Dans le premier cas, il s'agit de vérifier la vitesse de croissance des isolats pour la distinction entre les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente sur le milieu YMA contenant le Bleu de Bromothymol, et de tester l'absorption du Rouge Congo sur milieu YMA par les isolats.

II.4.1. le test de bleu Bromothymole

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobia, présentent deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genre *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...). Pour cela on cultive nos isolats et les souches de référence sur milieu YMA+Bleu de Bromothymol. L'aptitude à modifier le pH en 24h distingue les bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente dont l'acidification du milieu est tardive (après 5 à 6 jours).

II.4.2. Test nutritionnel

II.4.2.1. Utilisation des sucres comme seule source de carbone

Les souches sont cultivées sur milieu YMA ou le Mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D-Galactose, D-Glucose, D-Lactose, D-Saccharose, D-Xylose,

On utilise un témoin avec le Mannitol. Incubation à 28°C pendant 24 à 48 heures.

II.4.3. Tests physiologiques

II.4.3.1. Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont ensemencées sur le milieu TYA (**Annexe 1**) par la méthode des stries simples et incubées à différentes températures : 28°C, 37°C.

II.5 Recherche des mycorhizes

II.5.1. Préparation des solutions

- Préparation de 1000 ml de la solution KOH (10%) : peser 100 g de KOH, les dissoudre dans 800 ml d'eau distillée puis compléter à 1000 ml dans une fiole jaugée (attention cette réaction est exothermique).

- Préparation pour 1000 ml de la solution colorante : peser 333 g d'acide lactique dans un bécher de 1000 ml, 333 g de glycérol dans un autre bécher de 1000 ml. Puis peser 500 mg de bleu de trypan dans un bécher de 150 ml. Verser l'ensemble de produit dans une fiole de 1000 ml et compléter avec de l'eau distillée.
- Préparation pour 1000 ml de solution de conservation des racines : faire la même préparation que la solution colorante sans les 500 mg de bleu de trypan.

II.5.2.Prélèvement des racines

Il doit être effectué selon la technique de coloration des racines décrite par **PHILIPS et HAYMAN (1970)**. Les racines sont lavées avec de l'eau. Les plus fines sont découpées en des fragments d'environ 1 cm.

II.5.3.Préparation des racines et coloration

Placer l'échantillon de sol/racines sur un tamis de maille de 1 mm. Laver à l'eau claire (eau de ville) sans trop de pression pour séparer le sol des racines. Mettre éventuellement un récipient sous l'échantillon pour récupérer le sol et/ou les spores sur un filtre de 50 µm.

Une fois que l'échantillon de racines est propre, le placer sur du papier absorbant. Puis homogénéiser l'échantillon et prendre un aliquote (méthode des quartiers) de 2g de matière fraîche de racines. Mettre celui-ci dans un pilulier (30 ml) en verre type «pyrex » avec bouchon à vis métallique(ou équivalent, mais résistant à 90 °C).

Ajouter la solution de KOH à 10 %, jusqu'à recouvrement de l'échantillon. Fermer le pilulier sans visser complètement le bouchon, l'ensemble des piluliers est placé sur un plateau (en cas de débordement).

Mettre à l'étuve (90°C) pendant 1 heure (le temps que passe l'échantillon à l'étuve est à adapter selon le type et l'âge des racines prélevées).

Cette attaque a pour but de vider la cellule de son cytoplasme et d'extraire les tanins des parties lignifiées des racines.

Une fois le passage à l'étuve terminé, laissé refroidir 15 min les échantillons et commencer le rinçage à l'eau claire (eau de ville).

Verser le contenu du pilulier dans une petite passoire en plastique de type « cuisine ».

Rincer abondamment l'échantillon de racines.

Les racines sont récupérées s à l'aide d'une pince fine et replacées dans le pilulier.

Il faut vérifier que l'attaque est suffisante (les racines sont jaunies par l'attaque de la potasse).

La fin de cette réaction est déterminée par une observation à la loupe binoculaire, les racines doivent être translucides, les vaisseaux des racines sont visibles. Il est fortement conseillé de faire une série d'échantillons avec des temps de passage à l'étuve différents puis de les observer à la loupe binoculaire. Une fois le rinçage à l'eau claire (eau de ville) terminé ne pas vider complètement l'eau du pilulier. Mettre quelques gouttes d'acide lactique dans le pilulier pour acidifier le milieu en vue de la coloration par la Fuchsine (ce colorant pénètre plus profondément en milieu acide). Laisser agir 5 min, les racines deviennent blanches. Rincer l'échantillon à nouveau à l'eau claire (eau de ville) comme décrit précédemment

Remettre l'échantillon égoutté dans le pilulier et ajouter la solution colorante jusqu'à recouvrement de l'échantillon.

Mettre à l'étuve (90°C) pendant 30 min.

Laisser refroidir 15 min les échantillons.

Commencer le rinçage de l'échantillon comme décrit précédemment.

La solution colorante peut être recyclée. Pour ce faire, prévoir une fiole 1000 ml avec un entonnoir et un papier filtre. On place la passoire au-dessus de l'entonnoir et on verse le contenu du pilulier.

Rincer abondamment à l'eau jusqu'à ce que l'eau de rinçage ne soit plus colorée.

Récupérer les racines dans la passoire avec une pince fine et les placer dans un pilulier.

Recouvrir l'échantillon avec de la solution de conservation (**Figure 11**). L'échantillon est alors prêt pour l'observation à la loupe binoculaire

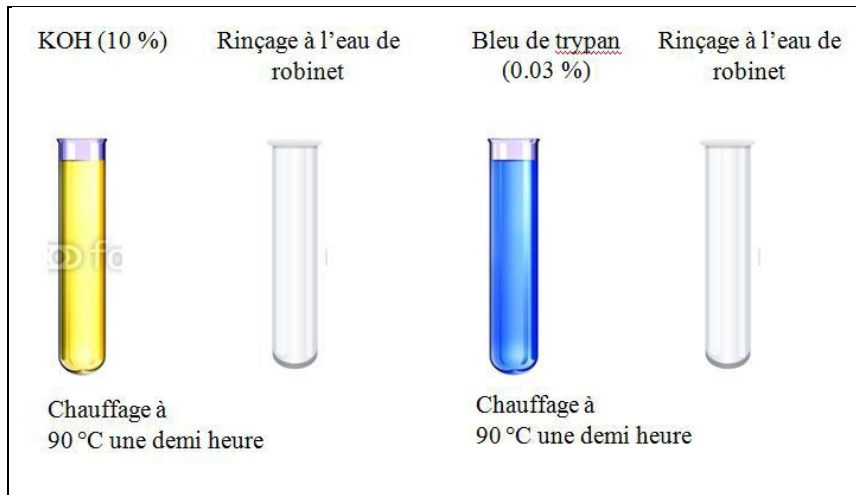


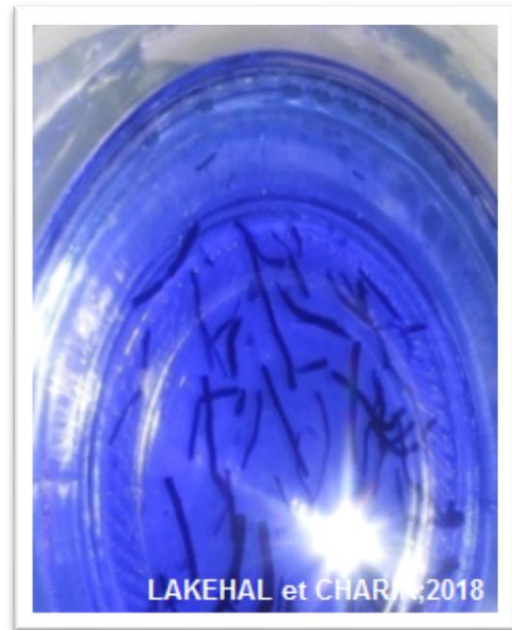
Figure 11 : Schéma de coloration des échantillons racinaires

II.5.4.Préparation des lames

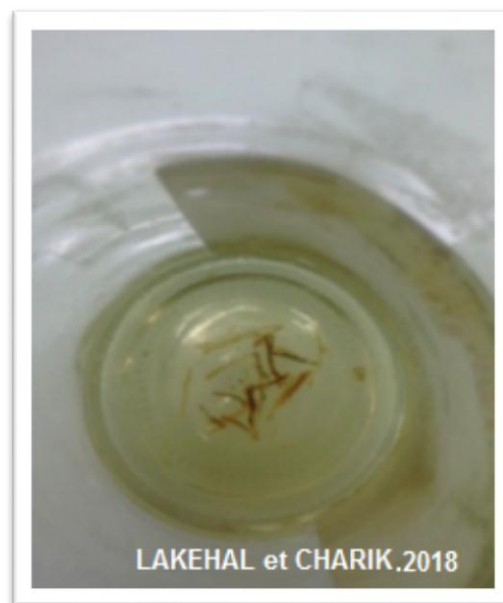
Les fragments des racines (30) ont été placés entre lames et lamelles, en présence de glycérol, afin de permettre leur observation au microscope optique.



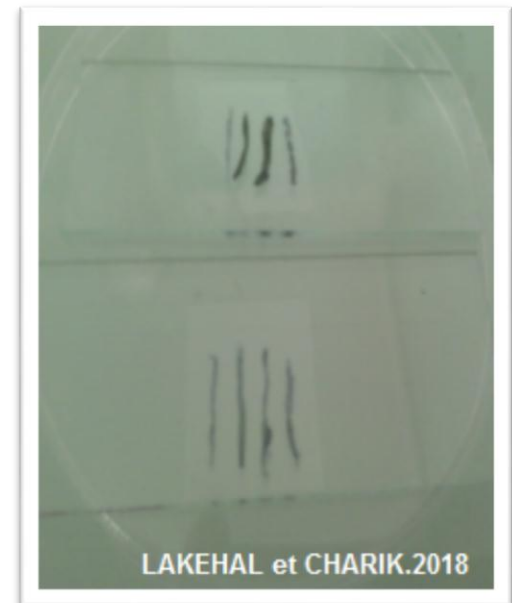
1-Laver des fragments des racines



2-Coloration des racines.



3-Conservation des racines.



4-L'observation sous microscope optique.

Figure 12 : Les étapes de préparation des échantillons du mycorhize.

II.5.5. Estimation de la mycorhization

L'estimation de la mycorhization est faite selon la méthode décrite par (TROUVELOT *et al.*, 1986). Le système de notation proposé repose sur l'appréciation globale de chacun des 30 fragments (figure). Les paramètres évalués sont : Fréquence de l'infection (F) (% du nombre de fragments racinaires endomycorhizés).

$$F (\%) = 100(N-n_0) / N$$

F = fréquence de mycorhization

N = nombre de fragments observés

n₀ = nombre des fragments mycorhizés

- Intensité de mycorhization (proportion de cortex colonisé, exprimée en %) :

$$M (\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2) / N$$

M : intensité de mycorhization relative, $m (\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2) / (N-n_0)$

m : intensité de mycorhization absolue.

- Teneur arbusculaire de l'infection ramenée au système racinaire entier (proportion du cortex racinaire renfermant des arbuscules, exprimée en %).

$$A = (100 m_{A3} + 50 m_{A2} + 10 m_{A1}) / 100$$

$$\text{Avec } m_{A1} = (95n_{5Ai} + 70n_{4Ai} + 30n_{3Ai} + n_{1Ai}) / N$$

Ces trois paramètres sont fonction de la teneur en spores, vésicules et hyphes de racine

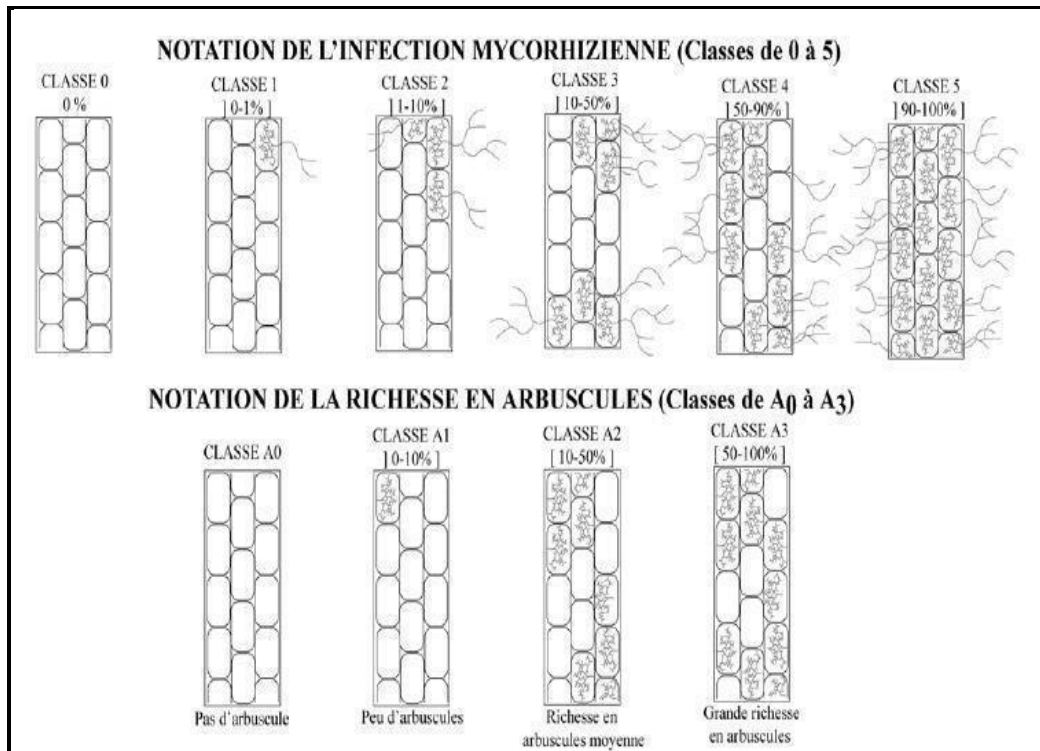


Figure 13 : Répartition en classes de la colonisation du cortex racinaire par les CM et la présence d'arbuscules (Trouvelot et al., 1985).

Chapitre III

Résultats et Discussion

III.1. Test de stérilisation

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez les rhizobiums, la base de la description formelle. Par ailleurs, elle a été beaucoup exploitée chez les bactéries endophytes associatives pour la séparation des espèces (**Baldani et Baldani, 2005**).

En dehors de ces informations dans l'étude de la biodiversité et la taxonomie, notamment polyphasique, les caractères phénotypiques offrent des opportunités pour sélectionner des souches compétentes et indifférentes aux divers stress environnementaux.

Sur le nombre total des nodules récoltés à partir des racines de *Ononis biflora*, nous avons tenu compte de 3 isolats : Epp, A.N, et E₃N₃. Ces isolats ont été identifiés par comparaison avec des souches de référence : *M. lotononidis* et *Mésorhizobium*.

III.2.Caractères morphologiques et culturaux

III.2.1. Croissance sur YMA

Au bout de 24 à 48 heures, une croissance très importante est détectable sur milieu YMA. Les colonies sont d'une couleur blanchâtre ou crème, d'un diamètre qui varie entre 3 et 5 mm, sous forme circulaire avec un contour régulier. Elles sont bombées et semi bombées, lisse, Muqueuse pour toutes les souches. (**Figure14**)

Tableau 02 : Caractères morphologiques des colonies.

Les souches	Forme	Taille	Aspect	Couleur	Elévation	Mucoïdité
Mésorhizobium	Circulaire	3à5mm	lisse	crème	bombée	Muqueuse
M.lotononidis	Circulaire	4mm	lisse	blanche	bombée	Muqueuse
EPP	Circulaire	3à4mm	lisse	blanche	Semi bombée	Muqueuse
AN	Circulaire	3à5mm	lisse	blanche	bombée	Muqueuse
E₃N₃	Circulaire	4mm	lisse	crème	bombée	Muqueuse

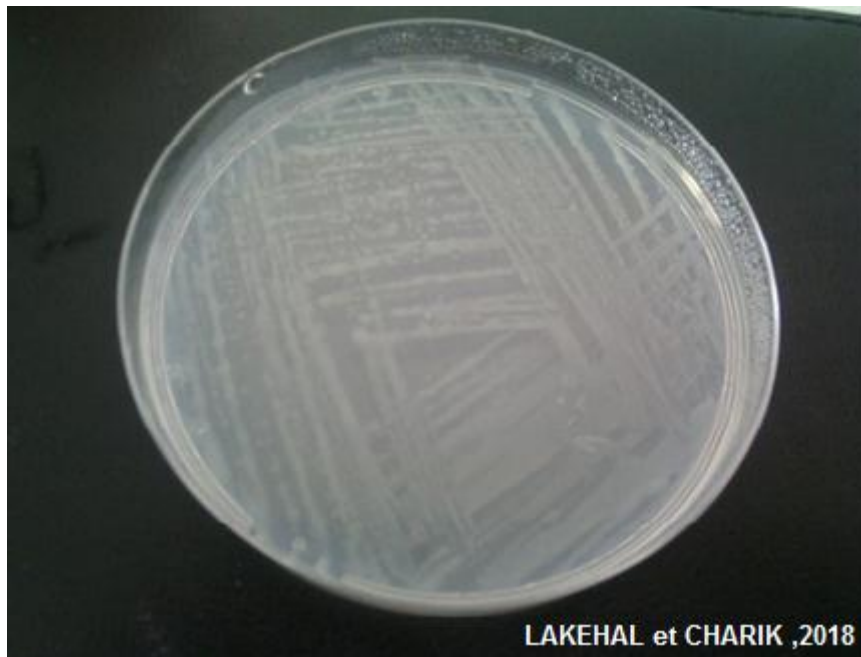


Figure14 : Aspect des colonies sur YMA

III.2.2.Croissance sur YMA+ RC

En général, les rhizobia produisent des colonies blanches ou absorbent faiblement le Rouge Congo. Malgré que ce dernier soit souvent rajouté au milieu de culture pour isoler les rhizobia ou pour tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être un agent sélectif pour distinguer les rhizobia des autres bactéries (*in. Torche, 2006*).

Nos isolats n'absorbent pas le rouge Congo et apparaissent avec la couleur initiale (couleur blanche) (**Figure 15**).

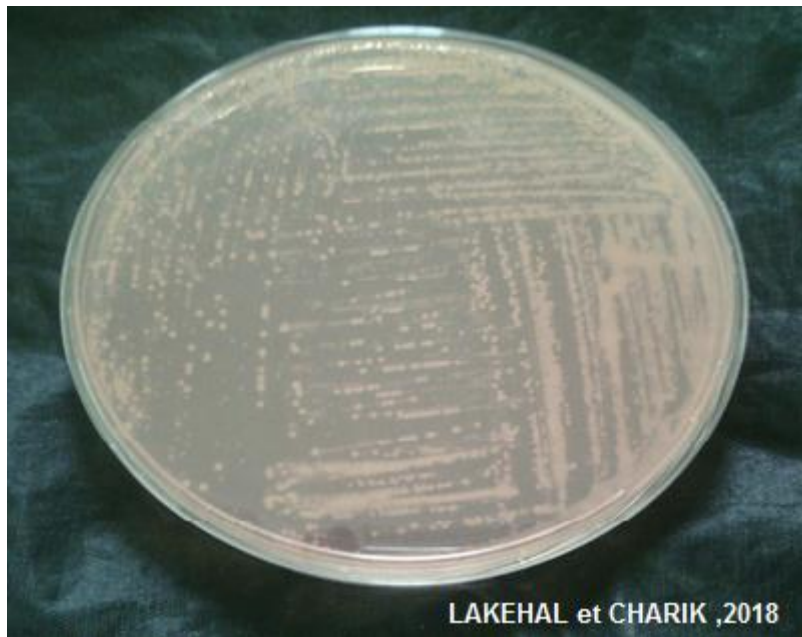


Figure15 : Croissance sur milieu YMA+ RC

III.2.3. Croissance sur GPA+BCP

Sur le milieu GPA, le développement des bactéries se fait avec acidification milieu après 24 à 48 heures. Le virage de couleur vers le jaune indique une acidification (**figure16**).

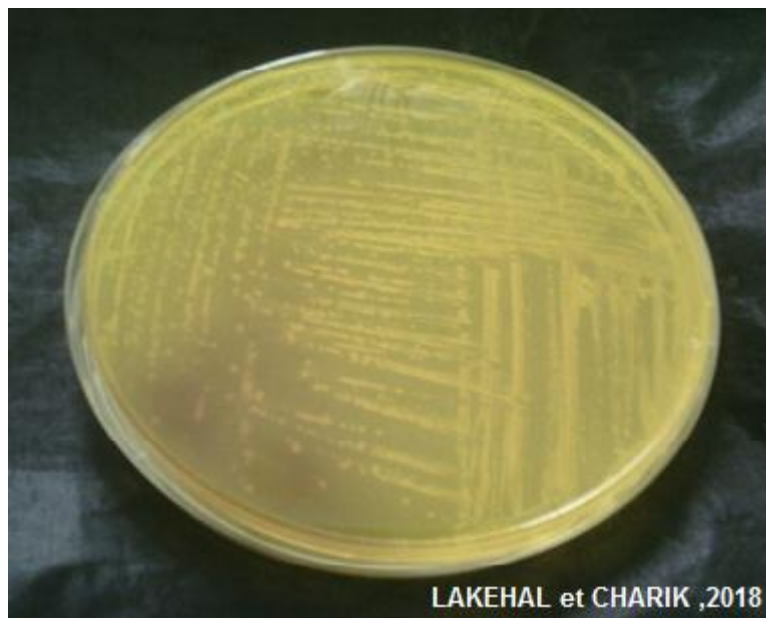


Figure16 : Acidification sur milieu GPA+ BCP

III.2.4. Aspect microscopique

L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets de taille différente et des coccobacilles roses à Gram négatif compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia (**Figure 17**).

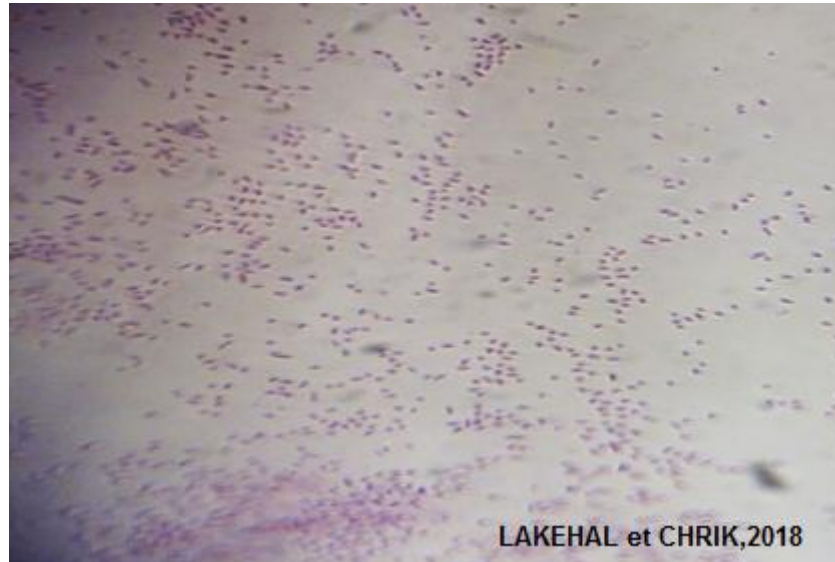


Figure 17 : Observation microscopique des bactéries isolées (**G ×100**).

III.3. Caractérisation phénotypique des isolats**III.3.1. le test de Bleu de Bromothymol**

En fait, le Bleu de Bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7.6. Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu (*Jordan, 1984., Beck et al., 1993., Pagano, 2008*).

Pratiquement la croissance sur milieu YMA+BTB après 24 à 48 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boîtes, ce qui indique que nos souches présentent une croissance rapide (**Figure 18**).

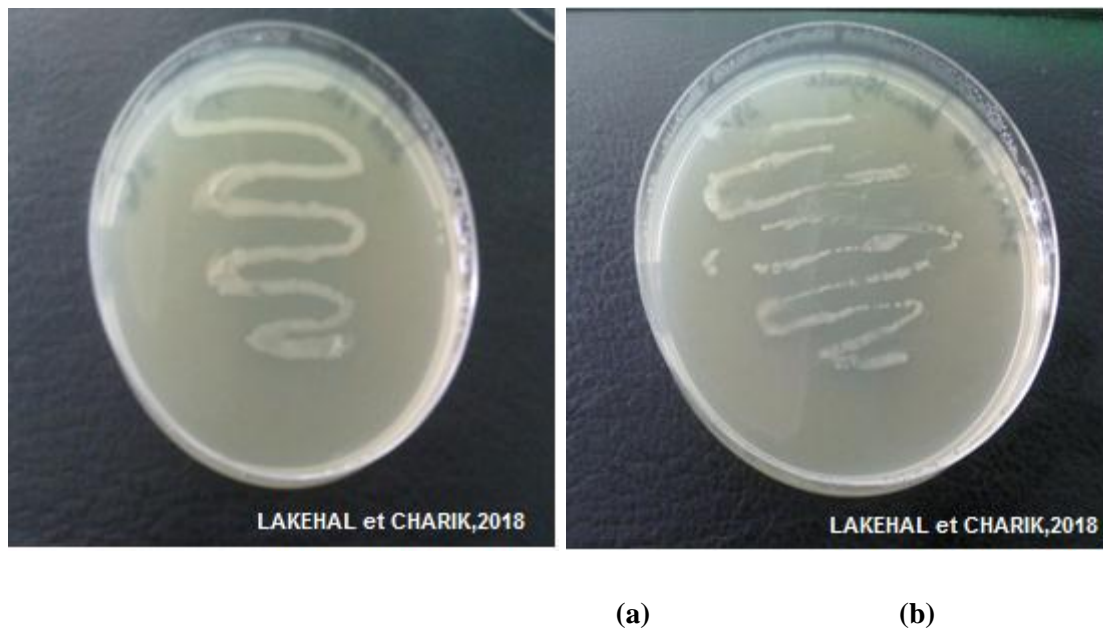


Figure 18 : (a) Isolat à croissance rapide sur milieu YMA+BTB
 (b) Isolat à croissance lente sur milieu YMA+BTB

III.3.2. Assimilation de la source de carbone

L'évaluation de la croissance après 48 heures d'incubation montre que les sucres testés comme seule source de carbone sont assimilables par les souches (isolats et souches témoins).

Les résultats consignés dans le tableau 03 montrent que le degré d'utilisation des substrats carbonés varie d'une souche à l'autre.

Tableau 03: Utilisation des sucres comme source de carbone par le groupe des souches testée

	Saccharose	Lactose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannitol
<i>Mésorhizobium</i>	+++	+	+++	+++	+	+++
<i>M. lotononidis</i>	+++	±	+++	+++	+	+++
EPP	±	±	±	++	±	+++
A.N	±	±	±	+++	+	+++
E3N3	+++	±	+++	+++	+	+++

(+) : Croissance faible,

(++) : croissance moyenne,

(+++) : Croissance forte,

(±) : pas de croissance.

Les résultats obtenus montrent une croissance importante de toutes les souches en présence du Mannitol et du Glucose, ce qui signifie leurs utilisations. Alors que les sucres les moins utilisés sont le Lactose et le Xylose pour toutes souches

Une différence significative est observée dans l'utilisation des sucres : Glucose, Galactose et Saccharose ; Les souches témoins et l'isolat E3N3 ont assimilé les sucres beaucoup plus que les isolats A.N, Epp.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Jordan (1984) qui a montré que la croissance des *Bradyrhizobium* est faible lorsque la source de carbone du milieu est constituée de monosaccharides.

D'autres travaux (STOWERS, 1985) ont montré que les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, notamment le galactose ou à certains polyalcools tels que le mannitol ou le glycérol.

III.3.2. Tests physiologiques

III.3.2.1. Effet de température

Les résultats de la figure 18 montrent que la plupart des isolats étudiés sont capables de se développer à de température 28C°, par contre la température 37C° non adaptée.

Les températures de croissance des rhizobia qui sont mésophiles du fait qu'elles poussent bien entre 20 et 30°C (Jordan, 1984). Il a été également rapporté que les *Bradyrhizobium* sont plus thermo tolérantes que les souches à croissance rapide (ROBERT et al., 1982).

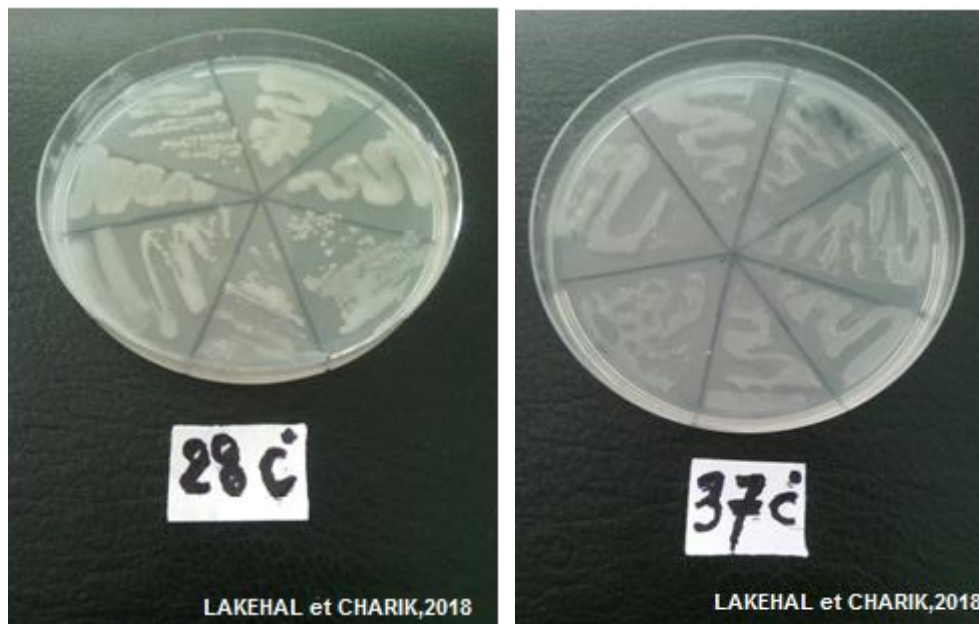


Figure 19 : Test de culture sur températures 28°C et 37°C.

III.4. Détection des mycorhizes

III.4.1. Mise en évidence de l'infection endomycorhizienne

III.4.1.1. Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne

Les examens microscopiques effectués sur des racines collectées *Ononis biflora* Desf ont montré la présence de mycorhization chez l'espèce. La fréquence, l'intensité de mycorhization et la teneur arbusculaire ont été calculées dans le but de dans le caractériser et d'identifier le type de mycorhize de cette espèce.

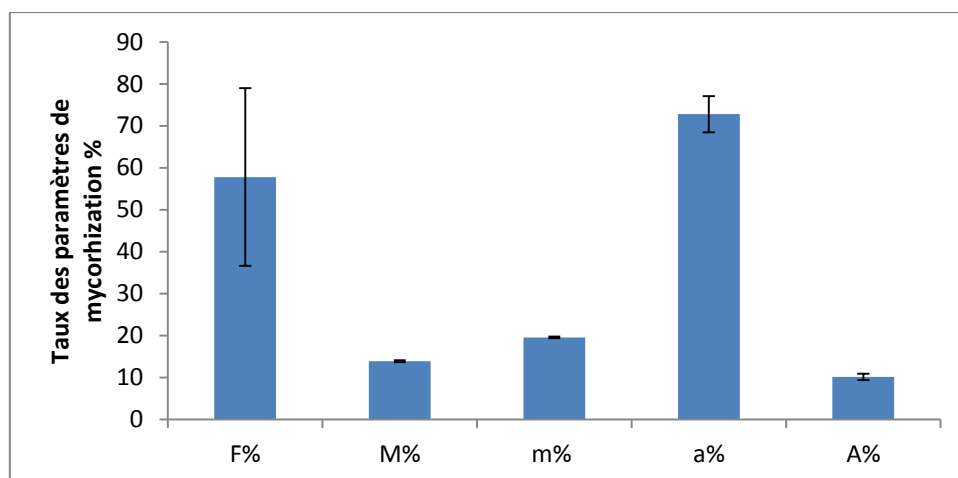


Figure 20 : Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne.

Représentation graphique (histogramme **2D**) représente l'estimation des paramètres d'infection mycorhizienne, le pourcentage de la fréquence de mycorhize est **57%**.

L'intensité de mycorhization est représentée dans l'intensité relative (**M**) à **14%** quant à l'intensité absolue (**m**) représenté par **20%**. On observe aussi la teneur arbusculaire (**A%**)représente par **10%**, contrairement la valeur a absolue (**a**) a pourcentage élevée estime par **73%**.

Les racines de *ononis biflora Desf* sont totalement colonisées par les CMA, il est claire que toutes les cellules contiennent des arbuscules bien développées, il n'existe pas d'une forme claire des vésicules au niveau des fragments examinés caractériser et d'identifier le type de mycorhize de cette espèce.

Fréquence, l'intensité de mycorhization et la teneur arbusculaire ont été calculées dans le but de caractériser et d'identifier le type de mycorhize de cette espèce.

III.4.2. Observation microscopique des mycorhizes

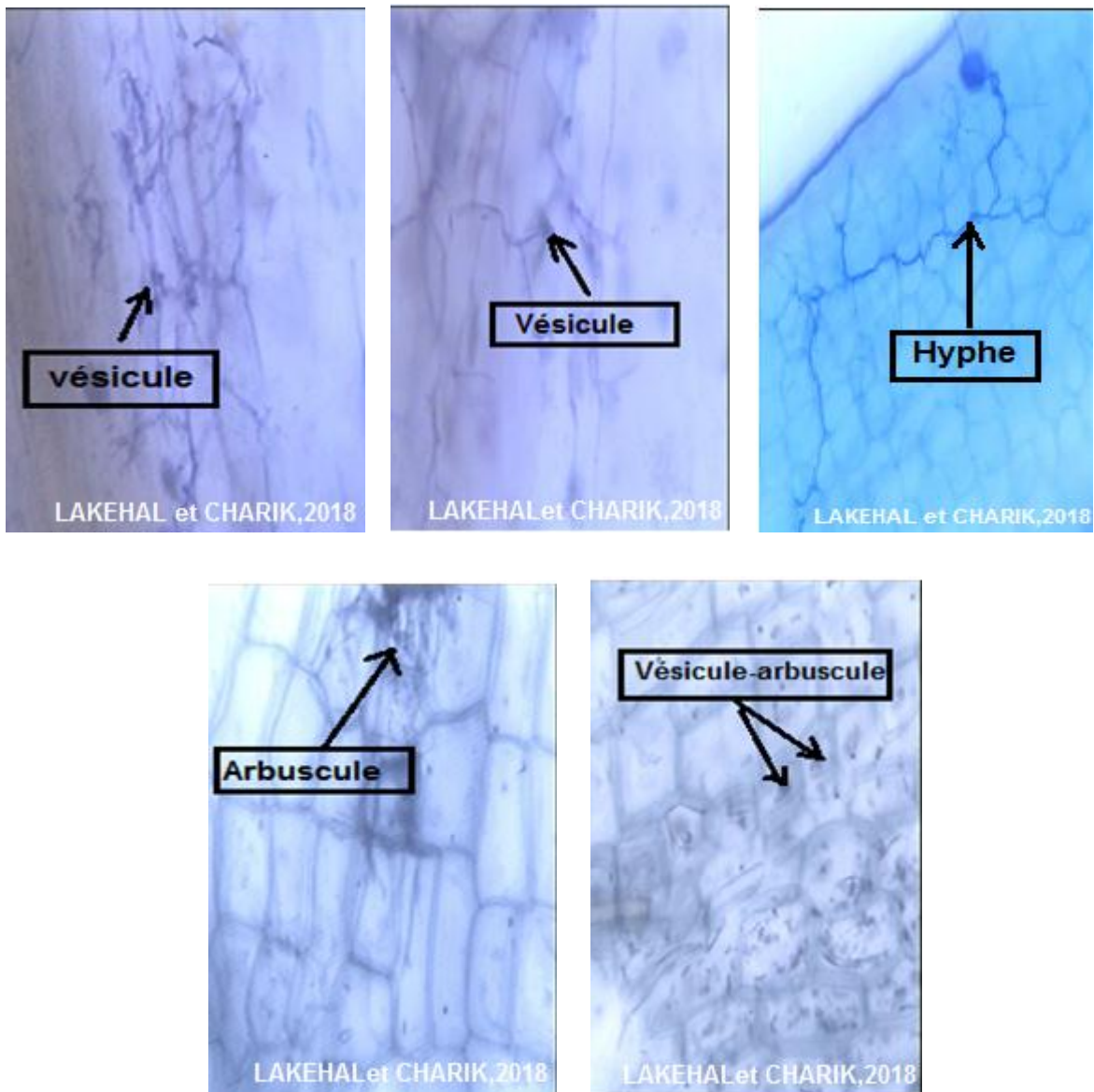


Figure21 : Racines d'*Ononis biflora Desf* traitée et observée sous microscope optique (Gx40)

Nous avons observé les racines de *Ononis biflora Desf* sont totalement colonisées par les CMA, il est claire, la plupart les cellules contiennent des arbuscules bien développées, il n'existe pas d'une forme claire des vésicules au niveau des fragments examiné.

Conclusion

Conclusion :

Par la présente étude, nous avons procédé à un isolement suivi d'une caractérisation phénotypique des bactéries nodulant la légumineuse *Ononis biflora Desf.*, collectée de site (Sétif).

Cette recherche a pour but de déceler d'une part les caractéristiques des souches et leurs diversités, et d'une autre part la détermination de la position taxonomique des isolats.

Notre étude a porté sur 3 isolats : Epp, A.N, et E₃N₃. Ces isolats ont été identifiés par comparaison avec des souches de référence : *M. lotononidis* et *Mésorhizobium*.

En effet, les aspects microscopiques et morphologiques des colonies des souches étudiées sont en accord avec la description faite par les auteurs (**VINCENT, 1970., SOMASEGARA et HOBEN, 1994., JORDAN, 1984**). Notre étude microscopique montre des bacilles de différentes tailles à Gram négatif ; ces aspects sont observés par ailleurs avec les souches de référence utilisées dans nos expérimentations.

L'étude phénotypique des souches basée sur les caractères morphologiques, biochimique et physiologiques. A l'exception des souches qui ont donné une réaction acide (virage du milieu au jaune), la majorité des souches testées alcalinisent le milieu YMA additionné du bleu de bromothymol, ceci est traduit par le virage de la coloration du milieu au bleu foncé, indiquant que ces bactéries sont à croissance lente.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Jordan (1984) qui considère que les bactéries qui alcalinisent le milieu sont dites à croissance lente et appartiennent au genre *Bradyrhizobium*. Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par (**MOREIRA et al., 1993**).

A travers ces résultats, nous pouvons admettre que nos isolats possèdent un profil de bactéries nodulant les légumineuses (**ZAKHIA et de LADJUDIE, 2001., BENHIZIA et al., 2004**), ou de rhizobia (**Vincent, 1970., 1982**). Par conséquent, nous n'avons pas pu ressortir une distinction appréciable afin de confirmer que nos isolats appartiennent au genre *Rhizobium* ou B.N.L à cause de l'absence de l'examen génotypique basé sur les techniques moléculaires.

Conclusion

Dans notre étude d'espèce *Ononis biflora* Desf. , On distingue deux types des champignons mycorhiziennes sont arbusculaires et vésiculaires.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

ANDRE. J.F., PLANCHETTE .C., PICHE .Y.(2004). Les mycorhizes. La nouvelle révolution verte. Edition *multi mondes*.

BALDANI ,J. I., BALADANI ,V. L.(2005). History on the biologicalnitrogen fixation research graminaceous plants: spezialemphasis on the Brazilianexperience. An. Acad. Brass. Sci. 77:PP549 - 579.

BAREA ,J.M.,AZCON,R.,AGUILAR,C.(1983).Interaction between phosphate solubilizikg bacteria and VA mycorhiza to Improve plant utilization of rock phosphate in non – acidic soils.IMPHOS Proceeding of the 3rdinternational congress on phosphorus compounds,Brusseels ,1983.PP 127-144.

BECK,D.P.,MATERON,L.A.,AFANDI,F.(1993).Practical Rhizobium-legume Technology Manual.ICARDA,Syria.

BENGADOEUAR ,A. (2000). Etude de la symbiose : *Rhizobium – Hedysarumcoronarum*. Essai de la caractérisation de l'espèce *Rhizobium hedysary*. Thèse de doctorat de l'université deConstantine. Algérie.

BOVIN , C., GIRAUD, E., MALPIA C,Aand Rosenberg, C.(1997). Geneticanalysis of the *Rhizobium melilotip*Symplasmidspecifyingcatabolism of trigonelline, a second arymetabolite presente in legumes. Journal of Bacteriology ,2 (9), pp2809 – 2817.

BOWEN ,G.D., AND ROVIRA ,A.D.(1991). The rhizosphere, the hiddenhalf of the hiddenhalf. In Plant Roots, the hiddenhalf, Eds Y Waisel, A Eshel and U Kafkafi. PP641-629. Marcel Dekker, New York.

DARRAH P, R. (1991).Models of the rhizosphere. I. Microbial population dynamicsaround a root releasing soluble and isolublecarbon. *Plant and Soil*, 133,PP 187-199.

DENEUX-MUSTIN,S.,LARTIGES,S. B.,VILLEMIN,G., THOMAS,F., YVON,J., BERSILLON, J.L AND SNIDARO ,D.(2001). Ferricchloride and lime conditioning of activatedsludges : an electronmicroscopicstudy on resinembeddedsamples. *Water research*, 35,PP 3018-3024.

Reference Bibliographique

DREYFUS, B., GARCIA, J.L and GILLS, M.(1988). Characterisation of *Azorhizobiumcaulnodans*gen.sp. nov., a stem nodulation fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int.J. syst.Bacterial*,38(1), pp 89-98.

FORTIN ,J. A., PLENCHETTE ,C., PICHÉ , Y.(2008). Les mycorhizes. La nouvelle révolution verte.*MultiMondeQuae*. (Eds.), Québec,P 131.

JEFFRIES, P., GIANINAZZI S., PEROTTO S., BAREA, J.M.(2003). The contribution of arbuscularmycorrhizalfungi in sustainable maintenance of plant health and soilfertility *.Biol fertile Soils*, 37 (1), pp 1-16.

JORDAN,D.C.(1984). Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: N.R. Kreig and J.H. Holt (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.1 the Williams &Wlkins Co. Baltimore. pp. 234 - 254.

HARLEY,J.L.,SMITH,S.(1983).*Mycorhizal symbiosis*,Academic,1-32,New York.

HIRSCH, A.M.,LUM, M.R.,DOWNIE,J.A.(2001).Whatmakes the rhizobia-legume symbiosis s specia *Plant Physiol*. **127**: PP1484-1492.

HODGE ,A .,HELGASON,T.,FTTER,G.(2010).Mini-review :nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* ,3, pp 267-273.

HOFLICH,G.,W IEHE,W.,KUHN, G.(1994). Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganismes. *Experientia*, 50, pp897-905.

HOPKINS, W.G. (2003).*Physiologie végétale*.2^{ème} éd , Bruxelles, De Boeck Université, P352. **HYNES, M. F and CONNELL, M.P. (1990).**Host plant effect on competitionamongstrains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J.Microbiol*. **36**: pp 864-896.

ICCARINO , M.(2004). Organogenesis of legumeroot nodules. *Int RevCytol*. 234:PP 201 - 62.

LAJUDIE , P., WILLEMS, A., DEWETTING , D., MAESTROJUAN , G., NEVRAM., COLLINS ,M.D., DREYFUS , B., KESTERS , K and GILLS , M .(1994). Polyphasictaxonomy of Rhizobia:Emendation of the genus*Sinorhizobium*and description of *Sinorhizobiummeliloti*comb.Nov.,*Sinorhizobiumsahe*lisp. *Bacteriol*. 44 :PP 715 - 733.

Reference Bibliographique

LARANJO , M. C.,BRANCO., SOARES, L. ALLO, M.,CARVALLO, OLIVEIRA, S.(2002).Comparison of chickpea rhizobial isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *Journal of Applied Microbiology* , 92 (6), pp 10-43.

LEYVAL, C., BERTHELIN , J., SCHONTZ D., WEISSEHORN I AND MOREL J, L.(1991). Influence of endomycorrhizas on maize uptake of Pb, Cu, and Cd applied as mineral salts and sewage sludge. In *Heavy metal in the environment*. Wiken R.D., Forstner U. and Knochel A. Farmer J. ed, CEP Consultants Ltd. Edinburgh. pp 204-207.

LIN,R.J.,CHEN,Y.L.(2007).*Mycorrhizology* .Science Press ,Beijing (in Chinese).2nd ed.Academic. London.

LONG, S.R. (1996) .Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant cell*.**8**: pp1885-1898.

MADIGAN ,M., MARTINK , J.(2007). Brock Biologie des microorganismes 11e edition. Person Education France. pp 599 -60.

MOREIRA,F.,GILLIS ,M.,POT,B.,KERSTERS,K.,FRANCO,A.A.(1993).Characterisation of Rhizobia isolated from different groups of tropical leguminous by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins .*Sys :Appl.Microbiol*.16:PP135-146.

MORTON J.BA and BENNY G.L.(1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, Two New suborders, Glomineae and Gigasporineae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, 37 :pp 471-491.

NDIAYE ,A. A.(1996). Diversité et fixation d'azote des *rhizobiums* d'Acacia. Dakar, Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Cheikh Anta Diop.P 43.

PAGANO,M .C.(2008) .Rhizobia associated with neotropical tree *Centropogon tomentosum* used in riparian restoration plant *Soil Environ* ,54(11):pp 498-508.

PATRIARCA, E.J., TATE, R., FERRAIOLI ,S., IACCARINO , M.(2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol*.62 :PP201- 234.

Reference Bibliographique

- PATRICIA,P.P.,RAPOSEIRAS,R.,MACEDO,A.M.,SELDIN,L.,PAIV,E.,NADM,H.(1998).** Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating rhizobium strains. *Revista de Microbiologie*. Print ISSN.
- PATTEN ,C.L AND GLICK B,R.(1996).** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*,(42).pp207-220.
- PELMONT,J.(1995).** Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2:pp 541 -572.
- PHILIPS ,J . M . ,HAYMAN ,D.S.(1970).** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans.Br.Mycol.Soc.*55:pp 158-160.
- Raposeiras , R. P. P .,Patrícia, V.M. P ., Raul., S. Lucy., E. Paiva., M. R. Scotti., N. M. H. Sá., 2002.** Variability of isolated colonies in bean nodulating *Rhizobium* strains before and after exposure to high temperature. *Brazilian Journal of Microbiology*. Print ISSN. pp1517 - 8382.
- REDECKER,D.,RAAB,P.(2006).** Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologie*,98:PP 885-895.
- ROBERT,G.P.,LEPS,W.,T.,SILVER,L.E.,BRILL,W.J.(1980).** Use of two -dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*39(2).PP414-422.
- ROVIRA, A. AND DAVEY, C. B.(1971).** Biology of the rhizosphere. In *The Plant root and its Environment*, Ed C E.W. University Press of Virginia, Charlottesville.
- ROVIRA ,A. D., BOWEN,G.D AND FOSTER,R.C.(1983).** The significance of rhizosphere microflora and mycorrhizal in plant nutrition. In *Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology*, Ed LABRL. PP 61-93.
- SANDERS , I., GROPE ,K., BOLLER ,T., WIEMKEN ,A.(1995).** Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol* 130:PP 419-427.

Reference Bibliographique

SCHUBLER, A., WALKER, C., VESTBERG ,M.(2007). Nomenclatural classification of in Glomeromycota. *Mycol. Res.*, 111:pp 253-255.

SMITH ,S.E and READ ,D.J.(1997), Mycorrhizalsymbiosis. Second edition. AcademicPress ; Harcourt Brace and Compan y Publishers,P 605.

SMITH, S.E. and READ, D.J.(2008). Mycorrhizalsymbiosis. Troisièmeédition, New York, AcademicPress, P800.

SOMASEGARAN , P., HOBEN ,H.J.(1994). Handbook for Rhizobia. Sringerverlage New York. Inc.p 450.

STOWERS ,M.D. (1985). Carbonmetabolism in Rhizobium species .Ann. RevMicrobial 39 :PP89-108.

TOMMERUP,I.C.(1984).Persistence of infectivity by germinated spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil.Trans Br Mycol Soc 82:pp 275-282.

TORCHE ,A. (2006). Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, Algérie.

TORTORA , G. , FUNK , C., CASE,L. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. p 945.

TROUVELOT, A .,KOUGH,J.L., GIANINAZZI-PEARSON ,V.(1986).Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: physiology and genetics aspects of mycorrhizae. Gianinazi-Pearson V et Gianinazzi S (Eds), 1st ESM, INRA Press, Paris,PP 217-221.

VINCENT,J.M. (1970). A manual for the practicalstudy of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No15. BlackwellScientificPublishers, Oxford.

WERNER ,D.(1992). Symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany.Edition Chapman & Hall.

ZAKHIA , F., LAJUDIE , P.(2001). Taxonomy of rhizobia Agronomie. 21: PP569 – 576.

Annexes

Milieux de culture et solutions utilisés

Annexe 1

Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
Na Cl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB	1000ml
Agar	18
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	18
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu YMA + Bleu de Bromothymol en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5ml
Agar	15
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + Pourpre de Bromocrésol (g/l) (Vincent, 1970).

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de pourpre de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	18
Ph	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement du milieu.

Composition de milieu TYA (TryptoneYeast Agar) en g/l (Beringer, 1974)

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O	0.87
Eau distillée	1000ml
Agar	18
PH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Les solutions stocks colorants

- Solution stock de RC : 0.25g de Rouge Congo dissous dans 100ml d'eau distillée.
- Solution stock de BCP : 1g de BCP dissous dans 100ml d'éthanol.
- Solution stock de BTB : 0.5g de BTB dissous dans 100ml d'é

Résumé

Nous avons procédé dans ce travail à une caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules racinaires de la légumineuse *ononis biflora Desf.*, du site de (Sétif). Notre étude a porté sur isolats : Epp, A.N, et E₃N₃. Ces isolats ont été identifiés par comparaison avec des souches de référence : *M. lotononidis* et *Mésorhizobium*. . Notre étude microscopique montre des bacilles de différentes tailles à Gram négatif et d'autres caractères. Une étude a été réalisée sur la croissance de ces isolats dans le milieu bleu de bromothymole, qui est classé des isolats à croissance rapide (Rhizobium), et des isolats à croissance lents (Bradyrhizobium). Le test nutritionnel Une différence significative est observée dans l'assimilation des sucres d'une souche à l'autre. Une étude menée sur Mycorhizes Arbusculaires qui coexistent avec cette plante.

Mots clés :

nodules, *ononis biflora Desf.*, *Rhizobium*. *Bradyrhizobium*, Mycorhizes Arbusculaires

ملخص

في هذه الدراسة أجرينا توصيفا للبكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للبقوليات *Ononis biflora Desf.* من منطقة سطيف. أجريت دراستنا على ثلاث عزولات Epp, A.N, E₃N₃ ، تم تحديدها بالمقارنة مع السلالات المرجعية *M. Lotononidis-Mésorhizobium*، اظهرت الدراسة المجهرية للعزلات عصيات ذات احجام مختلفة Gram سلبي، وتوصيفات اخرى ، كما اجريت دراسة على نمو هذه العزلات في الوسط المغذي BTB+YMA ، التي تصنف الى عزلات ذات نمو سريع (*Rhizobium*) ، والى عزلات ذات نمو بطيء (*Bradyrhizobium*). كما لاحظنا في الاختبار الغذائي فرقا كبيرا في استهلاك السكريات من سلالة الى اخرى . كما اجريت دراسة على الفطريات الجذرية المتعايشة مع هذه النبتة.

الكلمات المفتاحية :

العقد، *ononis biflora Desf.* ، *Rhizobium*. *Bradyrhizobium* ، الفطريات الجذرية