



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشاذلي بن جديد
Université Chadli bn djid

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention d'un Diplôme de master 2
En : ressources phytogénétique et phytothérapie

**Essai d'isolement et d'identification des *Rhizobia*
chez *Vicia faba*(L.) dans la région de bougous au
niveau de la wilaya d'el tarf (Nord Est Algérien)**

- **Présenté par:**

Kablouti marwa
Bounouar fatma zohra

- **Devant le jury:**

- Présidente : M^{me} Azizi N .Nawel MAA
- Examinatrice : M^{me} Hacini Nesrine MCB
- Promotrice : M^{me} Touil Wided MAA

Année Universitaire : 2015-2016



Remerciement

Nous remercions avant tout, Dieu tout puissant de nous avoir accordé l'effort et la patience en vue de terminer ce manuscrit.

Nous tenons en premier lieu à exprimer nos gratitudee à notre encadreur M^{eme} Touil Weded pour son soutien, sa disponibilité, ainsi que ses précieux conseils et ses orientations pertinentes.

Nous remerciments s'adressent également à tous nos professeurs.

Nos remerciments à tous les personnels de laboratoire pédagogique d'universitaire Chadli ben jdid d'El Tarf.

En terminant, il nous est agréable de remercier infiniment Ceux et celles qui ont participés de près et de loin afin d'achever ce projet.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail avec un très grand respect et amour

Aux deux êtres qui m'entourent de tendresse et de bonheur tout au long de ma vie et ont fait de moi ce que suis aujourd'hui, meschers parents « ma mère akila et mon père malek ». et à eux je souhaite une longue vie.

Et tous mes frères (ouahid, sami, hamza)

Et toute la famille keblouti et chabbi

Tous mes amis et mes collègues de toutes les promotions, et surtout la promotion master 02ressources phytogénétiques et phytothérapies

Tous mes enseignants qui ont supporté le fardeau de mon épanouissement

Marwa

DEDICACE

Je dédié ce travail :

A Mon très cher père Ahmed la source de patience et de tendresse
Qui ma donne le courage pour aller de l'avant et pour suivre ce travail.

A mes frères et mes beaux frères

A mes sœurs et mes belles sœurs

A toute la famille : Bounouar et Triki

A Mon cœur mon fiancé : Ahmed

A Tous mes amis et mes collègues de toutes les promotions, et surtout la
promotion de Master 02 ressources phytogénétique et phytothérapie

Et Mes spéciaux amis : Zahia, Rahma, Marwa, Hayat, Fatiha, Warda, et ghalia.

A Tous mes enseignants qui ont supporté le fardeau de mon épanouissement.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment

Fatma zohra

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure n° 01	Photo d'une plante de <i>Vicia faba</i> (L.).	07
Figure n° 02	Les principaux stades de développement de la fève du printemps.	07
Figure n° 03	Représentation schématique des différences de la colonisation de racine par un champignon ectomycorhizien.	18
Figure n° 04	: Représentation schématique et photographies (après coloration) des différences structurent des champignons mycorhiziens à arbuscules.	21
Figure n° 05	Représentation schématique du volume de sol influencé par les racines et les microorganismes associés et du volume de sol qui environne une racine colonisée par un champignon mycorhizien à arbuscules	23
Figure n° 06	Etapas de la formation d'un nodule racinaire chez une légumineuse infectée par rhizobia.	28
Figure n° 07	une coupe longitudinale d'un nodule fonctionnel	32
Figure n° 08	Carte de localisation et limites du P.N .E .K	35
Figure n° 09	Carte de la localisation et limites de la région d'étude	36
Figure n° 10	Diagramme Embrothermique de la région de Bougous	39
Figure n° 11	Les différentes étapes de prélèvement et de préparation des échantillons racinaires.	44
Figure n° 12	Conservation des nodules.	47
Figure n° 13	Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide YMA.	48

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau n° 01	classification d'espace récolté vicia faba (L.)	05
Tableau n° 02	Critères de distinction entre les trois variétés de <i>Vicia faba</i> (L.).	08
Tableau n° 03	Température moyenne de l'année 2013(Source station météorologique d'El Tarf, 2013)	37
Tableau n° 04	pluviométrie de l'année 2013 (Source station météorologique d'El Tarf, 2013).	37
Tableau n° 05	: Humidité moyenne de l'année 2013 et la moyenne des Dix dernières années (Sources station métrologique d'El Kala ,2013).	38
Tableau n° 06	Température mensuelle moyenne et précipitation mensuelle moyenne de Dix dernières années. Sources : station métrologique d'El Kala ,2007	39
Tableau n° 07	Echelle de la texture.	42

Liste des photos

Photo	Titre	Page
Photo n°01	détermination de Ph eau du sol	41
Photo n°02	détermination de la texture	42
Photo n°03	Les différentes étapes de prélèvement et de préparation des échantillons racinaires au laboratoire	45
Photo n°04	rinçage des racines et les nodules	46
Photo n°05	Isolement des nodules à l'aide d'une pince	47
Photo n°06	la stérilisation des nodules	48
Photo n°07	L'isolement des bactéries sur boîte de Pétri.	49
Photo n°08	La mesure du pH du sol au laboratoire au moyen d'un PH mètre	52
Photo n°09	Différentes formes de manifestation de l'infection endomycorhizienne.	54
Photo n°10	Différentes formes de manifestation de l'infection endomycorhizienne.	55
Photo n°11	la coloration de Gram des isolats	56
Photo n°12	test de 3-cétolactose (distinction entre Rhizobium et Agrobacterium)	58

LISTE DES ABREVIATIONS

% : Pourcentage

° : Degré

A : Argiles

C° : Degré celsuse

Ca : Calcium

CL : Chlore

cm : Centimètre

g: Gramme

H: Heure

H : Humidité

K : Potassium

L : Litre

min: Minute

mL: Millilitre

N : Azote

N2 : Azote gazeux

Na : Sodium

P : Pluviométrie

P2O5 : Phosphore

RF : Rhizobia fève

T° : Température

V : Vent

YMA : Yeast Mannitol Agar

YMB : Yeast Mannitol Broth

Résumé

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes proposés d'étudier la relation entre la fève (*Vicia faba*) (L.), la symbiose mycorhizienne et la symbiose fixatrices d'azote dans la station de Bougous (W.d'El-tarf, Nord-est Algérien) en analysant le sol, en estimant l'infection racinaire et en évaluant la diversité des bactéries fixatrices d'azote.

Les résultats obtenus ont été les suivantes :

- Le sol est de texture sableux limoneuse avec un Ph acide.
- La fève est mycorhizée et nodulée dans le sol de cette station.
- Les racines sont colonisées par les endomycorhizes à arbuscules et vésicules.

Mots clés : *Vicia faba* (L.)-Mycorhizes-champignon-infection racinaire-*Rhizobia-bougous*.

Abstract

In our study, we proposed to study the relation between the bean *Vicia faba* (L.), mycorrhizal symbiosis and nitrogen-fixing symbiosis in bougous station (W.d'El-tarf, northeast Algeria) by analyzing the soil, estimating root infection and evaluating the diversity of nitrogen-fixing bacteria.

The results obtained were as follows:

- the Ground is loamy sandy texture with an acidic Ph.
- The Bean is nodulated and mycorrhizal soil of this station.
- The Roots are colonized by arbuscular endomycorrhizae and vesicles.

Keywords: *Vicia faba* (L.) - Mycorrhizes- -mushroom root -Infection -Rhizobia-bougous.

المخلص

اعتمدنا في هذا البحث على دراسة العلاقة بين نبات الفول البلدي وبعض الفطريات وهي علاقة تعايشيه متمثلة في تثبيت النتروجين للتربة.

فقمنا بدراسة هذه العلاقة عن طريق تحليل التربة لمحطة بوقوس (الحظيرة الوطنية للقاله) ولاية الطارف واعتمدنا في هذه الدراسة على تقدير العدوى الجذرية و تقييم التنوع للبكتيريا المثبتة للنتروجين فكانت النتائج كالتالي.

تتميز منطقة بوقوس بطبيعة تربة طينية مع درجة في الحموضة حيث تسمح هذه الاخيرة بتنوع البكتيريا المثبتة لنتروجين.

كلمات مفتاحية

نبات الفول البلدي - بوقوس - بكتيريا تعايشيه - عدوى جذرية.

TABLE DES MATIERES

Remerciement

Dedicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des photos

Liste des abréviations

Résumé

Introduction1

Partie bibliographique

Chapitre I : revue bibliographique

1- la fève	3
1-1 Généralité	3
1.2 Classification des légumineuses	3
1-3 la définition des fèves.....	4
1-4- Origine et histoire	5
1-5 systématique	5
1-6 – Caractéristiques botaniques de la plante.....	6
1-6-1-Description morphologique	6
1-6-2- stades phonologique	7
1-7- Critères de distinction.....	8
1-8- Exigences de la culture	8
1-8-1-Besoins en eau.....	8
1-8-2--Exigences pédoclimatique	8
1-8-3-Exigences agro-techniques	9
1-8-3-1-place dans la rotation.....	9
1-8-3-2-préparation du sol.....	9
1-8-3-3-semis	9
1-8-3-4-fertilisation	10
1-8-3-5-Entretien de la culture.....	11

1-8-3-6-Récolte.....	11
1-8-3-7-Rendement.....	12
1-9- Situation de la culture des fèves en Algérie	12
1-9-1-Importance des fèves en Algérie.....	12
1-9-2-Utilisation des fèves	13
1-9-2-1-l'alimentation humaine et animale.....	14
1-9-2-2-Contraintes de la culture des fèves en Algérie.....	14
1-9-3-Contraintes biotique	15
1-10-la production Algérienne.....	15
2-les symbioses de la fève	16
2-1-La symbiose mycorizienne	16
2-1-1-Généralité	16
2-1-2-Déférents types de mycorizienne	17
2-1-3-classification.....	18
2-1-4-Patenaires.....	19
2-1 -4-1-Plantes hôtes	19
2-1-4-2-champignons.....	20
2-1-4-3-Développement de la symbiose.....	20
2-1-4-4-Importance des CMA	22
2-1-4-4-1-Avantages pour le champignon.....	22
2-1-4-4-2-Avantages pour le plante-hôte.....	22
2-2-1-la symbiose Rhizobienne.....	25
2-2-1-Caractéristiques des rhizobia.....	25

2-2-1-2-Diversité et classification des rhizobia.....	26
2-2-1-3-L'établissement de la symbiose rhizobienne.....	26
2-2-2-Formation des nodules	26
2-2-2-1-Les étapes de la nodulation.....	29
2-2-2-2-Structure et morphologie des nodules.....	31
2-2-2-3Fonctionnements de la symbiose Rhizobienne	32

Partie expérimentale

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1-Présentation de la zone d'étude (Parc National d'EL KALA)	34
1-1-Situation géographique et administrative.....	34
1-2-Caractéristiques de la région de bougous.....	36
1-2-1-Situation géographique.....	36
1-2-1-Relief	36
1-2-3-Etude climatique.....	37
1-2-3-1-La température	37
1-2-3-2-La pluviométrie.....	37
1-2-3-3-L'Hygrométrie.....	38
1-2-4-Synthèse climatique.....	38
1-2-4-1-Diagramme Embrothermique de Gausсен.....	38
1-2-4-2-Quotient pluviométrique de Gausсен ou Diagramme d'Emberger.....	40
2-Modalites de prélèvement des racines et du sol.....	41
3-Préparation au laboratoire.....	41
3-1-Le sol.....	41
3-1-1-Paramètres physico-chimique	41
3-2-Les racines.....	43

3-2-1-La recherche de l'infection par les champignons endomycorhizogènes.....	43
3-2-2-Observation et estimation du taux d'infection par les champignons AM.....	46
4- Isolement des bactéries Rhizobium à partir des nodules.....	46
4-1 Conservation des nodules	46
4-2-Stérilisation des nodules	47
4-3- Isolement selon la méthode du nodule écrasé	48
4-4- Détermination des souches selon la méthode de la coloration de Gram.....	49
4.5. Purification des isolats	49
4.6. Test distinctif entre Rhizobia et agro bactéries	50
4.6.1. Test de 3-cétolactose	50

Chapitre III : résultats et discussions

1-L'analyse du sol	52
1-1-Le ph eau.....	52
1-2-La texture du sol.....	52
1-2-1-Estimation de la colonisation endomycorhizienne.....	53
1-2-2-Characterisation phénotypique des Rhizobia.....	56
1-2-2-1-Isolement et identification.....	56
1-2-2-2-Examen microscopique.....	56
1-2-2-3-Examen morphologique.....	57
2-1-Croissance sur les différents milieux de culture.....	57
2-1-1- Sur le milieu YMA-Rouge congo(RC).....	57
2-1-2-Sur le milieu GPA+Poupre de bromocrésol(BCP).....	57
2-2- Test distinctif entre Rhizobium et Agrobacterium.....	57
Conclusion.....	59

Référence bibliographique

Annexes

Introduction
Générale

Introduction Générale

Au sein d'un écosystème, aucun organisme ne peut vivre de façon isolée et autonome. Il doit partager les ressources nutritives et énergétiques s'accommoder des rejets métaboliques et d'autres colocataires et réagir, voire se défendre des initiatives et attentions des voisins plus ou moins coopératif ou parfois même hostile. Parmi ces nombreuses interactions, la symbiose. Elle est une vie commune, temporaire ou permanente, d'espèces différents sous la forme d'une association morphologique étroite et vue d'une manière globale, à bénéfices réciproques qui donne naissance à un organe mixte (Gobat et al, 2003).

Cet organe peut être un mycorhize dans la symbiose mycorhizienne, ou un nodule dans la symbiose rhizobienne.

Le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne est basé sur des échanges réciproques entre les racines des végétaux et certains champignons du sol. Certaines espèces végétales ne peuvent croître normalement sans leur symbiote fongique (Gobat et al, 2003). Le nouvel organe mixte résulte de l'assemblage de tissus de la plante hôte et du champignon mycorhizien. (Gobat et al, 2003).

Dans certains cas, le phénomène de symbiose ne concerne pas un seul organisme symbiotique ; il peut y avoir collaboration entre, par exemple, des champignons mycorhiziens et des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique N₂ (BFA).

Certaines plantes vivent en symbiose avec BFA, les Rhizobia, qui forment, sur les racines des plantes de la famille des légumineuses (fève, trèfle, haricot, arachide etc.), des renflements de quelques millimètres de diamètre, appelés nodosités. Les légumineuses trouvent leur source d'azote organique (le seul qu'elles puissent assimiler) dans les produits synthétisés par ces bactéries à partir de la molécule atmosphérique (Gobat et al, 2003).

Pour notre part, nous nous intéresserons au cas particulier d'une plante de la famille des Fabacées, *Vicia faba* (L.). Nous avons essayé d'analyser le sol de la station de Bougous qui se trouve dans la région d'El-Kala (wilaya D'El-Tarf), d'estimer leur potentiel infectieux et d'évaluer leur biodiversité en Bactéries fixatrices de N₂. (Gobat et al, 2003).

Introduction Générale

Notre mémoire s'articulera en trois parties :

Dans la première, nous dresserons un état des connaissances bibliographiques concernant la plante de Fève et les deux symbioses (mycorhizienne et rhizobienne).

Dans la seconde, nous exposerons notre propre étude expérimentale

Dans la troisième nous discuterons les résultats auxquels nous aurons aboutis.

Revue
Bibliographique

I. REVUES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. La fève :

1.1- Généralités :

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, avec plus de 650 genres et 18000 espèces. Cette famille comprend des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses ; elle colonise aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre.

Cette famille présente une importance économique majeure ; de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides, la fève), ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants. (Patriarca et al ,2004)

1-2-Classification des légumineuses :

La famille des fabacées est une famille des plantes dicotylédones. Pendant longtemps, elles portaient le nom Papilionacées à cause de la forme particulière de leurs fleurs où l'on reconnaît un pétale supérieure ou étendard, deux pétales latéraux ou ailes et deux pétales inférieurs unis ou carène. De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et huiles végétales (Graham et Vance, 2003) et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. La plus grande partie des légumineuses (88%) des espèces étudiées interagissent avec les bactéries du genre *Rhizobium* pour former des nodules fixateurs d'azote (De Faria et al, 1989) De ce fait les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées .

Le nom de la Famille des Fabacée, découle du nom de genre *Faba*. Or, il se trouve que ce nom de genre n'est plus utilisé, ayant laissé place au genre *Vicia*. Un représentant de l'ancien genre *Faba* (du latin faba, fève) est la fève, anciennement *Faba vulgaris*, maintenant *Vicia faba* (L.). La famille est aussi appelée couramment Légumineuses (Légumineuse) ou Papilionacées (Papilionacée), mais ces ne sont pas de vrais synonymes.

Chaque nom s'applique à une condition particulière. Selon les classifications, la composition de cette famille varie: 28

- Les Fabacées, au sens limité, est adoptée en classification classique (1981). Ce groupe est nommé Fabacée (stricto sensu) ou Papilionacée. Cette famille comprend 12 000 espèces réparties en plus de 400 genres. (En classification phylogénétique, ce groupe des plantes serait la sous-famille Faboideae.) .
- Les Fabacées, au sens large, est adoptée en classification phylogénétique de APG II (2003). Ce groupe est nommé Fabacée (lato sensu) ou Légumineuse. Cette famille comprend 18 000 espèces réparties dans trois sous-familles. (En classification classique, ce groupe des plantes serait l'ordre des Fabales avec trois familles.) .
- Dans la classification des légumineuses, il apparaît les trois sous-familles :
 - ✚ sous-famille Caesalpinioideae avec une fleur pseudo-papilionacée ;
 - ✚ sous-famille Mimosoideae avec une fleur régulière;
 - ✚ sous-famille Faboideae ou Papilionoideae avec une fleur typique en papillon.

1.3. La définition des fèves (*Vicia faba* (L.) :

Vicia faba (L.) est une plante herbacée annuelle à tige creuse et de section carrée. La croissance de cette plante est naturellement indéterminée. Cela signifie qu'elle n'est pas limitée par une fleur au sommet, qui bloque sa croissance végétative. Toutefois, des types de fève à croissance déterminée ont été obtenus par mutagenèse provoquée (Helyette, 2002).

Les nœuds de cette plante sont en nombre variable entre 10 et 40. Cette variabilité est en fonction du génotype et des conditions de la culture (Dajoz ,2000 in Mezani ,2011).

A partir de ces nœuds, les feuilles prennent naissance. Ces dernières comprennent une ou plusieurs folioles et sont terminées par une arête étroite sans vrille. Les fleurs sont hermaphrodites. Elles possèdent une structure papilionacée typique : La corolle est constituée de cinq pétales inégaux : un étendard, deux ailes latérales et deux inférieures soudées sur leurs bords extrêmes constituant la carène. La surface du stigmate est couverte de papilles qui, lorsqu'elles sont brisées, forment une ouverture libérant un exsudat facilitant la pénétration du pollen (Helyette, 2002).

Chaque fleur comporte dix étamines dont la plus haute est libre et les neuf autres sont unies en une gaine renfermant l'ovaire. Elles sont de couleurs blanches, roses, violets ou

Autres. Les petites fèves fraîches sont souvent appelées =févettes= et peuvent être consommées crues à la croque au sel (Helyette, 2002).

1.4. Origine et histoire :

La fève est un des plus anciens légumes cultivés (Helyette, 2002). La fève (*Vicia faba major*) aurait été cultivée dès la fin du néolithique .

A l'heure actuelle on ne la trouve pas sous forme sauvage, ce qui confirme son antiquité, ses deux principaux centres d'origine sont les pays du bassin méditerranéen et l'Ethiopie (Cubero, 1974 in Timoussarh, 2006).

1.5. Systématique :

D'après Dajoz, 2000, la fève est classée comme suit :

Règne :	Plantes
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Dialypétales
Série :	Caliciformes
Ordre :	Rosales
Famille :	Fabacées (Légumineuses)
Sous-famille :	Faboideae
Genre :	<i>Vicia</i>
Espèce :	<i>Vicia faba</i> L.

Tableau 01 : Classification de l'espèce ce récolté *Vicia faba* (L.)

Sa classification se fonde sur la taille des graines et des gousses. Les formes à petites, moyennes et grosses graines en constituent les catégories classiques (Smal *et al*, 1998). La variété "*minor*" correspond aux types à petits grains, la variété botanique "*équina*" aux types à types à grains moyens, alors que la variété "*major*" représente les cultivars à gros grains. Dans le langage courant *V. faba major* correspond à la fève potagère, *V. faba minor* et *V. faba equina* représentent la fêverole au sens large (Dajoz ,2000 in Mezani (2011)).

1.6. Caractéristiques botaniques de la plante :

1.6.1. Description morphologique :

La fève est une plante herbacée annuelle de taille qui peut dépasser 1.80 m. Présente une tige simple, dressé, creuse et de section quadrangulaire (Peron 2006 in Mezani, 2011). Les feuilles de couleur vert clair, ovales, entières (Dominique, 2010). Elles comportent 2 folioles à la base de la tige puis 3 ou 4 par la suite.

Les racines pivotantes parfois, superficielles plus généralement, portant des nodosités renfermant la bactérie spécifique fixatrice d'azote atmosphérique, *Rhizobium leguminosarum*. Selon (Gallais et Bannerot ,1992), Les fleurs classiques de Légumineuses sont portées aux aisselles des nœuds reproducteurs en grappes de 2 à 12 selon le type. Les fleurs sont grandes, 2 à 3 cm, blanches tachées de noir (Patrick *et al*, 2008).

Les fruits sont des gousses contenant, selon le type, de 3 à 12 grains (Gallais et Bannerot, 1992). Les graines sont charnues, vertes et tendres à l'état immature, à complète maturité, elle développe un tégument épais et coriace de couleur brun-rouge, à blanc verdâtre et prend une forme aplatie à couleur presque circulaire (Chaux et Foury, 1994 in Mezani, 2011).



Figure n°1: Photo d'une plante de *Vicia faba* (L.) (Mesquida.J et al, 1990).

1.6.2. Stades phonologiques :

Les stades phénologiques de la fève sont représentés dans la figure 02.

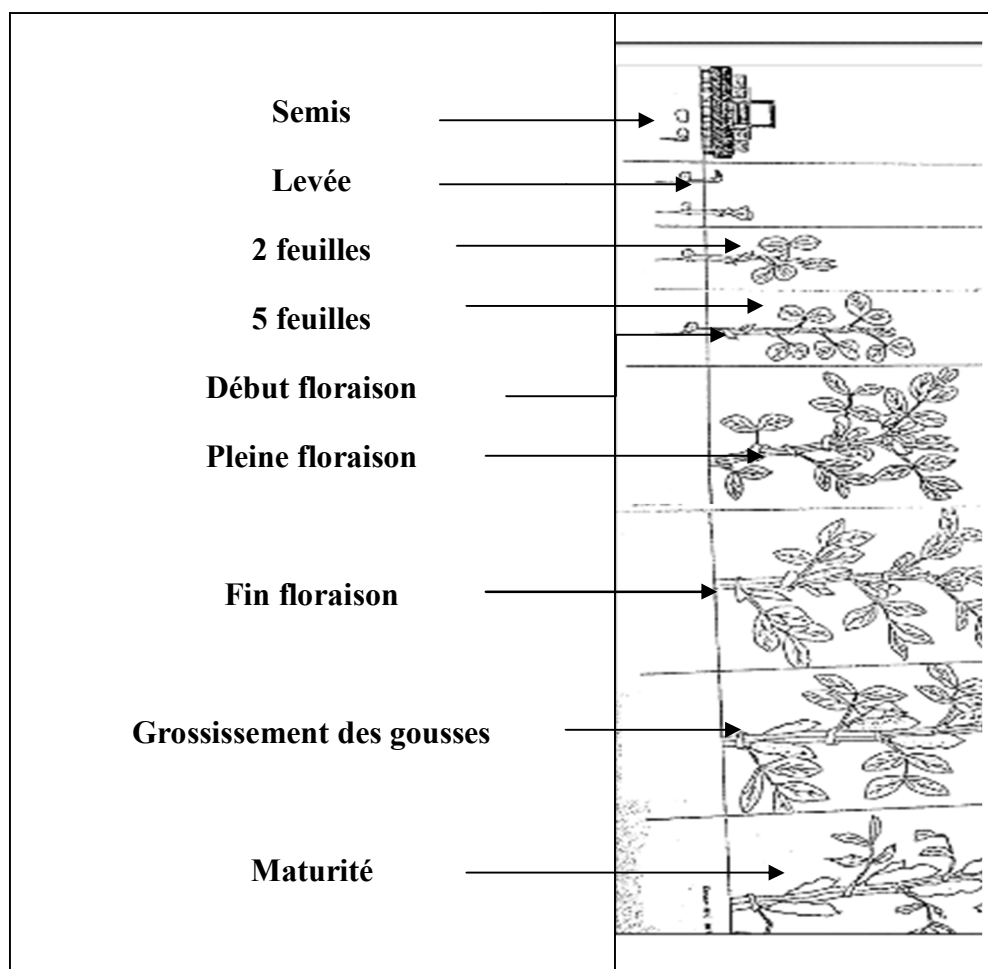


Figure n° 02. Les principaux stades de développement de la fève du printemps. (Mesquida.J, 1990).

1.7. Critères de distinction de *Vicia faba* (L.) :

variétés Traits	Major (fève)	Equina (fêvete)	Minor (féverole)
Taille des grains	Gros ou très gros (poids de 1000 grains >1200g)	Moyens (poids de 1000 grains entre 800 et 1200 g)	Petits (poids de 1000 grains <800g)
Forme des grains	Grains larges et plats	Grains présentant une dépression latérale des Cotylédons	Ovoïdes réguliers et lisses
Taille des gousses	Gousse très longue (nombre d'ovules de 7 à 13)	Gousse longue (nombre d'ovules 3 à 4)	Gousse courte (nombre d'ovules de 2 à 3)
Forme des gousses	Aplatie souvent recourbée	Moins aplatie	Cylindrique
Port des gousses sur les tiges	Retombantes et traînant généralement à terre	Généralement semi-érigées ou à port horizontal	Port érigé sur les tiges

Tableau 2 : Critères de distinction entre les trois variétés de *Vicia faba* (L). (Brink et Belay, 2006).

1.8. Exigences de la culture :

18.1. Besoins en eau :

Selon (Anonyme ,2002), la fève a des besoins en eau relativement élevés et craint les fortes températures pendant la phase fin floraison-remplissage du grain. Le stade critique où il est absolument nécessaire de faire des apports si nécessaires est lors de la formation et du développement des gousses.

1.8.2. Exigences pédoclimatiques :

a. Type de sol :

D'après Girard et *al*,1987, pour satisfaire l'alimentation hydrique de la fève, il faut dans les zones de cultures qui conviennent, lui réserver les sols profonds, ayant une bonne capacité de rétention et tout mettre en œuvre pour emmagasiner le maximum de réserves en eau. La fève valorise les sols à forte teneur en argile. La fève *V. faba* aime les sols frais qui se réchauffent facilement. Aussi elle réussit bien dans des sols à très bon pouvoir de rétention en eau (sols argileux, riches en humus).

b. Température :

Selon Wolfgang et Sadiki, 1996, ce facteur, plus néfaste dans les zones sahariennes. Les vents chauds et secs (Sirocco) desséchants affectent la production des gousses et limitent aussi la production et la grosseur des graines.

Les fèves de printemps exigent une température de 18 à 22 C° (Anonyme, 2010). Résistent à des températures de - 5°C, elles ne sont donc pas sensibles aux faibles gelées printanières (Anonyme, 2009).

c. Lumière :

D'après Claude et Gilbert, 1999, les plantes ont besoin de lumière pour vivre et se développer. Par le processus de photosynthèse, elles utilisent la lumière directement comme source d'énergie.

La fève a besoin de lumière pour la fécondation des fleurs et le mûrissement des graines (Anonyme, 2012).

d. Humidité :

La fève est parmi les cultures les plus exigeantes en humidité, surtout dans les périodes initiales de son développement où elle nécessite une quantité importante d'humidité au niveau du sol (Bedjaoui, 2000 in Ghalbi et Mouada, 2008).

1.8.3. Exigences agro-techniques :

1.8.3.1. Place dans la rotation :

Dans la rotation, la fève, légumineuse à système racinaire puissant, peut constituer une tête d'assolement très intéressante (Marcel *et al*, 2002). La fève est considérée comme un relais azoté dans la rotation. Elle constitue ainsi un excellent précédent pour les céréales, notamment le blé dont les besoins azotés sont importants (Anonyme, 2009).

1.8.3.2. Préparation du sol :

Selon Marcel *et al*, 2002, deux objectifs à attendre :

- 1) Préparer un lit de semences régulier de 6 à 8 cm de profondeur, qui assure :

- Un peuplement proche de la valeur souhaitée.
- Une levée régulière permettant un développement homogène jusqu'à la récolte.
- Une bonne efficacité des désherbants de post-semis prélevée, notamment des

Inhibiteurs de germination à base de triflurarine et de pendiméthaline.

2) Laisser un sol frais et bien rappyé en profondeur, poreux et homogène, afin :

- De favoriser le fonctionnement des rhizobiums fixateurs d'azote qui ont besoin de l'oxygène et de l'azote contenus dans l'air.
- De favoriser la bonne installation du système racinaire, ce qui, en créant un enracinement profond et efficace, permet de limiter les risques de sécheresse en juin.

1.8.3.3. Semis :

Selon Marcel *et al*, 2002, les semis précoces sont recommandés. La fève d'hiver doit avoir atteint le stade 3-5 feuilles avant les froid ; la date optimale de semis se situe entre mi-octobre - novembre parfois jusqu'au décembre, avec un semoir monograine.

Un peuplement de 30 plantes au mètre carré, à 40 ou 45 cm d'écartement, est recommandé. En raison de leur grosseur, les graines de fève peuvent être enterrées assez profondément (6 cm), ce qui par ailleurs les protège des oiseaux et des herbicides.

Pour les variétés de printemps, le semis a lieu en mi-février-mars pour limiter au maximum les risques de coups de chaleur et de déficit hydrique pendant les phases floraison/nouaison et de remplissage du grain. Après le début avril, la chute de rendement peut être importante et difficilement «récupérable» même avec l'irrigation.

La fève de printemps ne ramifie pas une graine donne une tige. Il convient donc d'effectuer un semis dense de l'ordre de 50 à 60 plantes/m², avec un écartement peut être ramené à 25 ou 35 cm (Dominique ,2010).

1.8.3.4. Fertilisation :

D'après Dominique, 2010, la fève, qui est une légumineuse, est économe en azote, mais elle exige des apports d'engrais riche en phosphore et potasse. Toutefois, un apport modéré, de l'ordre 20 à 30 unité, peut être nécessaire.

Comme dans le cas du pois, il n'y a pas de règle scientifique concernant la fumure phospho-potassique. Celle-ci dépend des précédents, des teneurs du sol et des exportations de la culture (environ 30 kg pour l'acide phosphorique et 100 à 150 kg pour la potasse) (Marcel *et al*, 2002).

1.8.3.5. Entretien de la culture :

Il est recommandé de biner et de butter lorsque la plante de fève atteint 10 cm de hauteur, car cette opération permet de maîtriser les mauvaises herbes, d'améliorer la structure du sol et d'économiser l'eau (Anonyme, 2002).

Le binage est conseillé car comparé au hersage il permet d'intervenir sur une période de temps nettement plus importante, tandis que son efficacité est moins dépendante des stades de développement des adventices. Le binage sera d'autant plus préféré au hersage lorsque de nombreuses vivaces sont présentes (Anonyme, 2009).

D'après Placquet et Girard, 1987, la fève comme toute culture est très sensible à la concurrence des mauvaises herbes aux différentes époques de sa croissance. Le désherbage mécanique en culture intervient en complément des mesures préventives, en particulier des faux semis réalisables avant implantation.

Selon Marcel *et al*, 2002, en cours de la végétation, la lutte contre les dicotylédones est aléatoire et relativement plus aisée contre graminée, pour lesquelles il existe des désherbants spécifiques.

1.8.3.6. Récolte :

La maturité des fèves est indiquée par le brunissement et la chute des feuilles inférieures. La couleur des gousses devient foncée au fur et à mesure qu'elles durcissent. Les gousses de fève s'ouvrent et perdent les graines si on attend que la culture arrive à la pleine maturité. La récolte manuelle doit commencer dès que les deux gousses inférieures commencent à noircir. A ce stade, la teneur en humidité des graines est entre 35 et 45%, alors que la récolte mécanique doit se faire lorsque la teneur en eau des graines est située entre 13 et 15%. Il sera possible ensuite de faire descendre les 2-3 % excédentaires par simple ventilation dès la mise en stockage (Anonyme, 2012).

La récolte s'effectue après celle du blé pour la fève d'hiver et 15 à 20 jours plus tard (fin août) pour la fève de printemps.

Selon Dore et Fabrice, 2006, le produit récolté peut être :

- La graine encore verte, dans le cas d'une consommation humaine à partir de gousses fraîches récoltées.
- La graine sèche (graine exalbuminée contenue dans la gousse), lorsque la fève est utilisée comme complément protéique pour l'alimentation animale ou en alimentation humaine.
- La plante entière, lorsque celle-ci est utilisée comme fourrage.

1.8.3.7. Rendement :

Les rendements potentiels en grains de la fève d'hiver sont supérieurs à 50 q/ha, et ceux de la fève de printemps dépassent 45 q/ha.

Selon Dore et Fabrice, 2006, en 2004, la production mondiale de fève dépasse 4.4 millions de tonnes. Les principaux pays producteurs sont la Chine (1.98 million de tonnes), l'Ethiopie (0.43 million de tonnes) et l'Egypte (0.4 million de tonnes).

1.9. Situation de la culture des fèves en Algérie :

1.9.1. Importance des fèves en Algérie :

La culture de la fève et la fêverole en Algérie n'ont pas encore bénéficiées de toute l'attention nécessaire devant assurer leur développement et continuent d'être marginalisées à tel point que des régressions importantes en superficies ont été enregistrées depuis 1987.

D'autre part, la productivité et la production (faible) n'ont pas connu d'amélioration ce qui a engendré le recours aux importations pour satisfaire la consommation qui elle a nettement augmentée, La fève *Vicia faba* Linné. Est la culture qui a fait partie de nos systèmes agraires depuis longtemps dans différentes zones agro-écologiques du pays. En Algérie la fève est la plus importante parmi les légumineuses alimentaires avec 58.000 hectares soit 44,3 % de la superficie totale réservée à cette catégorie de cultures. Sa production moyenne annuelle est de 254.000 quintaux au cours de la période 1981-1990.

Cependant les rendements restent les plus faibles dans le monde avec 4,41 q/ha (Bouznad *et al*, 2001).

Sa culture est pratiquée essentiellement au niveau des plaines côtières et de l'intérieur et dans les zones sahariennes. En Algérie, la fève est retenue surtout pour la consommation humaine sous forme de gousses fraîches, ou en grains secs. En cas de fortes productions, l'excédent en grains secs peut être incorporé dans l'alimentation du bétail (Maatougui, 1996, in Lebbal, 2010).

1.9.2. Utilisation des fèves :

Selon Gordon ,2004 in Mezani ,2011, cette légumineuse a une teneur en protéine élevée de l'ordre de 300 g/kg et est une excellente source de fibres solubles et insolubles, de glucides complexes, de vitamines (B9 et C) et de minéraux (en particulière le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium, le cuivre, le fer et le zinc).

Dans le langage courant, *V. faba major* correspond à la fève potagère, essentiellement cultivée dans le Bassin méditerranéen, en Amérique du Sud et en Asie du Sud-Est (Chine en particulier) pour la consommation humaine. *V. faba equina* et *V. faba minor* représentent la

Féverole au sens large, plus répandue en Europe Occidentale et du Nord et plus particulièrement destinée à l'alimentation du bétail (Gallais et Bannerot, 1992).

Selon Brink et Belay ,2006, la fève se cultive en plein champ pour ses graines mûres et sèches, et en jardin potager pour ses graines ou ses gousses immatures. Les gaines mûres et sèches sont un aliment très répandu, et dans de nombreux pays, ce sont les graines vertes que l'on consomme, cuites à l'eau ou crues, comme légume.

Les graines mûres et les parties végétatives de la fève servent de concentré, de foin ou d'ensilage pour les animaux domestiques (lapin, poulet, vache, porc...).

La tige et les feuilles s'utilisent comme engrais vert. En Chine, les graines et parties végétatives possèdent toutes sortes d'applications médicinales.

1.9.2.1. L'alimentation humaine et animale :

Vicia faba var. Pour la consommation humaine, et *Vicia faba. Minor*, souvent utilisée en fourrage *Vicia faba major*, la fève maraîchère à grosses graines destinées à la consommation Humaine. *Vicia faba minor*, la petite fève ou féverole utilisée pour l'alimentation du bétail.

Vicia faba equina, la fève à cheval à grains moyens aussi appelée féverole ou fève dans certaines régions.

1.9.2.2. Contraintes de la culture des fèves en Algérie :

En Algérie la culture de la fève est soumise à un certain nombre de contraintes abiotiques (froid, gelées, chaleurs et salinité), et biotiques, qui limitent sa production, son développement et son extension.

1. Contraintes abiotiques.

2. Froid hivernal et les gelées printanières.

C'est la principale contrainte dans la zone des Hauts Plateaux et les plaines intérieures, elle provoque la coulure des fleurs et la mortalité des plantes (Maatougui 1996 in Mezani, 2011).

- **Sécheresse terminale :**

La sécheresse, caractéristique structurelle du climat sur les Haut Plateaux et les plaines littorales à sol léger, constitue le stress abiotique le plus important, pour l'instabilité et la production de la fève. En zones Sahariennes, l'importance des fèves est liée à celle des ressources hydriques, dans ces zones, la fève doit être impérativement irriguée intégralement (Wolfgang et Sadiki, 1996).

- **Chaleur :**

C'est la plus néfaste surtout dans les zones Sahariennes, ainsi que dans les Haut Plateaux et les plaines intérieures, dans le cas de ces dernières, c'est le Sirocco qui affecte la production de n gousses et limite aussi la grosseur des graines (Maatougui 1996 in Mezani, 2011).

- **Salinité :**

C'est problème spécifique aux zones Sahariennes dans lesquelles la fève est irriguée à l'aide d'eaux assez chargées en sodium. La productivité est directement réduite par les effets du sel sur les plantes et aussi par les effets du sel sur les propriétés physiques et chimiques du sol (Wolfgang et Sadiki, 1996).

1.9.3. Contraintes biotique :

- **Adventices :**

D'après Brink et Belay, 2006, la fève est sensible à la compétition des mauvaises herbes, qu'il est nécessaire de juguler rigoureusement pendant les 3-8 semaines après la levée des plantules.

Le problème des adventices est plus sévère en zone bien arrosées et plus destructif dans les zones moins arrosées (Maatougui, 1996 in Mezani, 2011).

1.10. La production Algérienne :

La culture de la fève et la fêverole en Algérie n'ont pas encore bénéficiées de toute l'attention nécessaire devant assurer leur développement et continuent d'être marginalisées à tel point que des régressions importantes en superficies ont été enregistrées depuis 1987.

D'autre part, la productivité et la production (faible) n'ont pas connu d'amélioration ce qui a engendré le recours aux importations pour satisfaire la consommation qui elle a nettement augmentée, La fève *Vicia faba (L.)* Linné. Est la culture qui a fait partie de nos systèmes agraires depuis longtemps dans différentes zones agro-écologiques du pays. En Algérie la fève est la plus importante parmi les légumineuses alimentaires avec 58.000 hectares soit 44,3 % de la superficie totale réservée à cette catégorie de cultures. Sa production moyenne annuelle est de 254.000 quintaux au cours de la période 1981-1990. Cependant les rendements restent les plus faibles dans le monde avec 4,41 q/ha (Bouznadetal, 2001). Sa culture est pratiquée essentiellement au niveau des plaines côtières et de l'intérieur et dans les zones sahariennes. En Algérie, la fève est retenue surtout pour la consommation humaine sous forme de gousses fraîches, ou en grains secs. En cas de fortes productions,

l'excédent en grains secs peut être incorporé dans l'alimentation du bétail (Maatougui 1996, in Lebbal, 2010).

2. Les symbioses de la fève :

2.1. La symbiose mycorhizienne :

2.1.1 Généralités :

Les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) forment des associations mutualistes avec 80 % des familles de plantes terrestres (Wang et Qui, 2006) et ont une influence majeure sur la croissance, la diversité et la santé des végétaux. Dans la plupart des cas, la mycorhization améliore l'acquisition des nutriments minéraux du sol par la plante et, en retour, le champignon bénéficie des substances élaborées à partir de l'activité photosynthétique de cette dernière (Garg et Cehandel, 2010). Les travaux les plus récents ont démontré que la mycorhization augmente la résistance au stress hydrique ce qui ouvre des perspectives dans la lutte contre la sécheresse, notamment pour les milieux semi désertiques.

Les champignons les plus abondants dans les sols cultivés sont les (CMA). Ils constituent 5 à 50 % de la biomasse microbienne des sols (Olsson *et al*, 1999). La biomasse des hyphes mycorhiziens peut varier de 54 à 900 kg par hectare (Miller, 2003). La croissance des hyphes dans le sol s'accompagne d'une production de glomaline (glycoprotéine) qui améliore l'agrégation des particules de sol et peut représenter de 10 à 20 fois le réservoir de carbone contenu issu de la biomasse microbienne (Rillig *et al*, 2006). Le mycélium extra matriciel peut atteindre 3 % du poids des racines (Lovelock *et al*, 2004). Le mycélium issu de l'établissement de la symbiose peut mesurer de 10 à 100 m par gramme de sol (Miller, 1999). Pratiquement toutes les plantes de culture tropicales évoluent en symbiose avec des CMA et présentent une haute dépendance mycorhizienne (Norman *et al.*, 1995).

Certaines espèces végétales ne peuvent croître normalement sans leur symbiote fongique (ex: la fève) (Gobat *et al*, 2003). La formation de mycorhizes est donc un phénomène général chez les plantes à l'exception de quelques familles comme les Brassicaceae, les Caryophyllaceae, les Cyperaceae, les Juncaceae, les Chenopodiaceae et les Amaranthaceae qui présentent très peu d'associations mycorhiziennes (Norman *et al*, 1995). Leur fonction est primordiale dans tout ou une partie du cycle de la plante, plus particulièrement pour la nutrition du végétal. Le champignon profite des ressources carbonées

synthétisées par la plante *via* la photosynthèse et qui sont indispensables à son métabolisme et à sa fructification. En retour, les hyphes fongiques améliorent la nutrition hydrique et minérale de la plante hôte grâce à l'augmentation du volume de sol prospecté et à la production de divers enzymes extracellulaires (phosphatase, phytase) susceptibles de libérer du phosphore à partir de composés complexes organiques et inorganiques du sol (Gobat *et al*, 2003).

L'établissement de la symbiose mycorhizienne entraîne l'apparition de nouveaux compartiments biologiques dans la rhizosphère. En modifiant la physiologie de la plante et donc les caractéristiques qualitatives et quantitatives de l'exsudation racinaire, le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne va matérialiser au sein de la microflore tellurique différents compartiments microbiens composés par des communautés bactériennes et fongiques présentant des caractéristiques spécifiques (structure, diversité fonctionnelle).

2.1.2. Différents types de mycorhizes :

Il existe deux grands types de symbiose mycorhizienne, les ectomycorhizes (mycorhizes externes) qui se rencontrent chez environ 5% des végétaux et les endomycorhizes (mycorhizes internes) qui sont les plus répandues, environ 80% des végétaux (figure n°3).

Chez les ectomycorhizes, le mycélium du champignon entoure la racine de l'hôte pour former le manteau visible à l'œil nu. A partir du manteau, des hyphes pénètrent entre les cellules corticales et forment le réseau de Hartig, lieu d'échange entre les deux symbiotes. Les champignons impliqués sont cultivables en l'absence de l'hôte.

Chez les endomycorhizes, Les hyphes pénètrent à l'intérieur des cellules corticales de l'hôte où ils forment les arbuscules ou des pelotons, lieu d'échange entre les deux partenaires et/ou des vésicules qui sont des organes de stockage. Les champignons impliqués sont des champignons microscopiques, non cultivables en l'absence de l'hôte.

Il existe un troisième type moins important et intermédiaire entre les deux types, les ectendomycorhizes : elles possèdent à la fois les caractéristiques des ecto et des endomycorhizes. Très peu d'espèces végétales sont représentées par ce système.

On distingue au sein de la symbiose endomycorhizienne des spécificités. Ainsi, on peut citer des endomycorhizes à pelotons des orchidées, des endomycorhizes à Helianthèmes et Bruyères et enfin des endomycorhizes à arbuscules et vésicules (les plus répandues). C'est ce dernier type de symbiose qui nous intéresse dans cette étude.

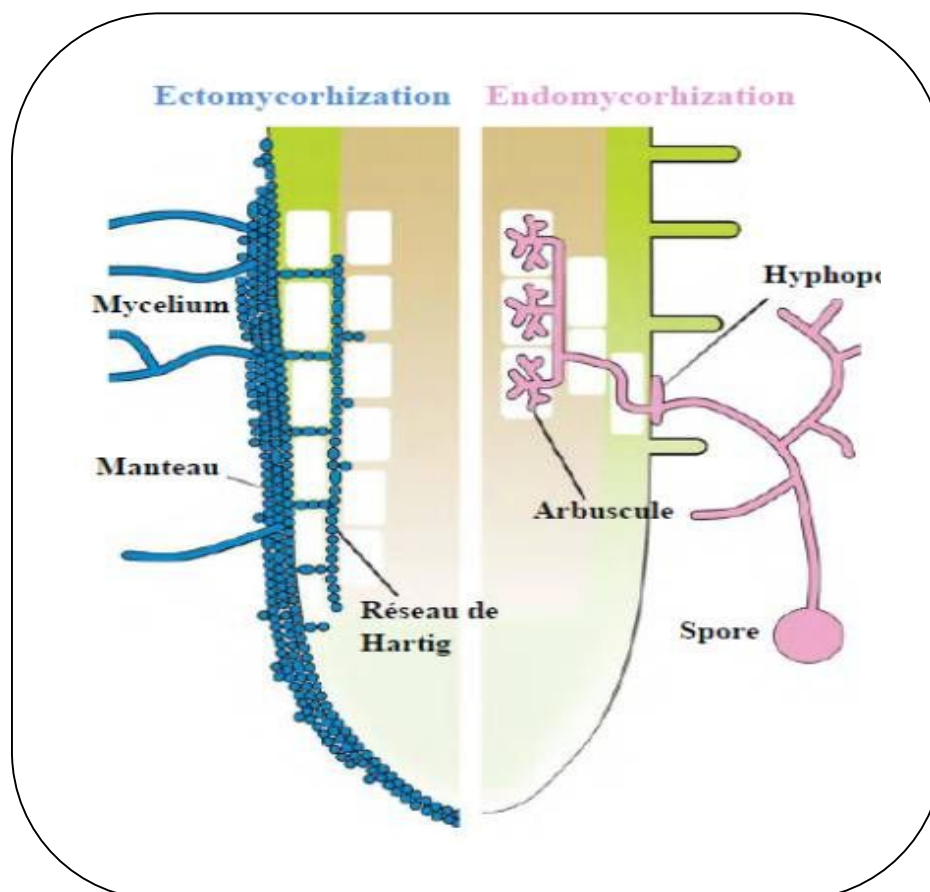


Figure n°03: Représentation schématique des différences de la colonisation de racine par un champignon ectomycorhizien (à gauche) et un champignon endomycorhizien à arbuscules (Bonfante et Genre, 2010).

2.1.3. Classification

En 1809, le mycologue allemand, Link crée le genre *Endogone* dans lequel il regroupe les champignons donnant des mycorhizes à arbuscules (et quelques zygomycètes ECM).

-En 1844, les frères Tulasne font la description du genre *Glomus* dans lequel ils distinguent 2 espèces, *Glomus microcarpum* et *Glomus macrocarpum*.

-En 1875, Berkeley et Broome décrivent le genre *Sclerocystis*.

- En 1922, Thaxter place tous les *Glomus* dans le genre *Endogone*, qu'il place dans la famille des *Endogoneae* avec le genre *Sclerocystis*.
- La même année, (Bucholtz, 1922) place les *Endogonaceae* dans le Mucorales (affinité des *Endogone* avec les *Mortierellaceae*) au sein des Zygomycètes.
- En 1953, Moreau place les *Endogonaceae* dans leur propre ordre, celui des *Endogonales*, et ses travaux sont confirmés par (Benjamin, 1979).
- En 1974, Gerdemann et Trappe font éclater le genre *Endogone* et le remplacent par 4 genres *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora* et *Gigaspora* dans leur monographie des *Endogonaceae*.
- En 1983, Walker standardise la technique de description des parois sporales afin de délimiter les taxons.
- En 1990, deux nouveaux genres *Scutellospora* et *Entrophospora*, sont créés, trois familles (*Glomaceae*, *Gigasporaceae* et *Acaulosporaceae*) reconnues et Morton et Benny créent l'ordre des *Glomales* où ils placent ces champignons AM (*Arbuscular Micorrhizes*).
- En 1995, le genre *Glomites* est créé par Taylor *et al.* Pour nommer les champignons fossiles dont les caractéristiques concordent étroitement avec celles des *Glomus* actuels.
- Fin XXe / début du XXIe siècle, les données moléculaires commencent à arriver et de profonds remaniements commencent. Des nouveaux genres sont créés, d'autres sont renommés.
- De 2001 à aujourd'hui, une nouvelle classification basée sur les caractères génétiques à l'aide de séquences des gènes ARNr multicopie (Oehl *et al.*, 2011).

2.1.4. Partenaires :

2.1.4.1 Plantes hôtes :

Il a souvent été démontré que la plupart des plantes dans les écosystèmes terrestres ont des associations mycorhiziennes (Brundrett, 1991). Les mycorhizes à arbuscules sont le type le plus important dans la plus part des écosystèmes.

Cependant, les plantes avec MA sont toujours importantes dans les habitats les plus extrêmes (Harley et Harley et al, 1987).

Beaucoup de gymnospermes et ptéridophytes ont aussi des associations MA (Brundrett, 2009).

2.1.4.2 Champignons :

Les champignons formant des associations MA comprennent plus de 150 espèces appartenant aux ordres: Glomerales, Diversisporales, Gigasporales, Archaeoporalet Paraglomerales (Oehl., 2011). Les champignons mycorhiziens sont considérés vivre dans un habitat particulier pour des milliers d'années avec peu de modification génétique (Trappe et Molina, 1986).

Le Nombre relativement faible d'espèces existantes de CMA et l'absence de reproduction sexuées dans ce groupe de champignons suggèrent que le potentiel de changement génétique au sein de ces espèces est limitée (Temmerup, 1988; Morton ,1990). Les hyphes et les spores des CMA sont multi nucléées et probablement aussi hétérocaryotes. Les changements génétiques peuvent se produire par anastomose des hyphes ou recombinaison somatiques impliquant différents noyaux (Tommerup, et al 1988). Des études taxonomiques minutieuses réalisées grâce à l'utilisation des iso enzymes et les méthodes basés sur l'ADN et les réponses différentielles et aux conditions environnementales ont démontré des variations considérables dans les taxons actuellement définies des CMA.

2.1.4.3 Développement de la symbiose :

La mise en place de la symbiose MA peut être envisagée comme une séquence programmée de changements phénotypiques, correspondant à des reconnaissances distinctes qui conduisent les deux partenaires, plantes hôtes et symbiote fongique à un degré élevé d'intégration morphologique et physiologique (Garg et Chandel, 2010) (Figure 3).

La mise en place de la symbiose MA commence par la colonisation d'une racine compatible par les hyphes produites par des propagules de CMA du sol, les spores asexuées ou les racines mycorhizées (Requena., 1996). Après la fixation d'un hyphe sur la surface de

la racine par l'intermédiaire d'un appressorium, le champignon pénètre dans le cortex et forme des structures morphologiquement distinctes spécialisées : hyphes inter et intra-cellulaires enroulées et arbuscules (Garg et Chandel, 2010).

Les arbuscules sont des hyphes spécialisées, et sont le site de transfert d'éléments nutritifs, potentiellement le site de l'acquisition du carbone par le champignon (Requena et al, 2007), Après la colonisation de l'hôte, le mycélium se développe hors de la racine explorant le sol à la recherche de minéraux nutritifs, et peut coloniser d'autres racines (Garg et Chandel, 2010). Le cycle de vie fongique est terminé après la formation de chlamydozoospores asexués sur le mycélium (Requena et Breuninger, 2004). Cela montre clairement que la plante hôte joue un rôle clé dans l'organisation du processus de colonisation des MA (Eckardt, 2005).

La séquence des étapes conduisant à une symbiose MA est largement conservée parmi différentes combinaisons d'espèces fongiques et végétales (Garg et Chandel, 2010). Dans l'ensemble, ces processus de développement nécessitent une communication moléculaire entre le champignon MA et la plante, y compris l'échange et la perception de signaux par les partenaires symbiotiques (Brucher, 2007). Ainsi, les altérations morphologiques et physiologiques complexes des partenaires symbiotiques accompagnées par le processus de reconnaissance suggèrent que la symbiose MA est le résultat de multiples facettes, affiné par des événements de signalisations (Paszkowski, 2006).

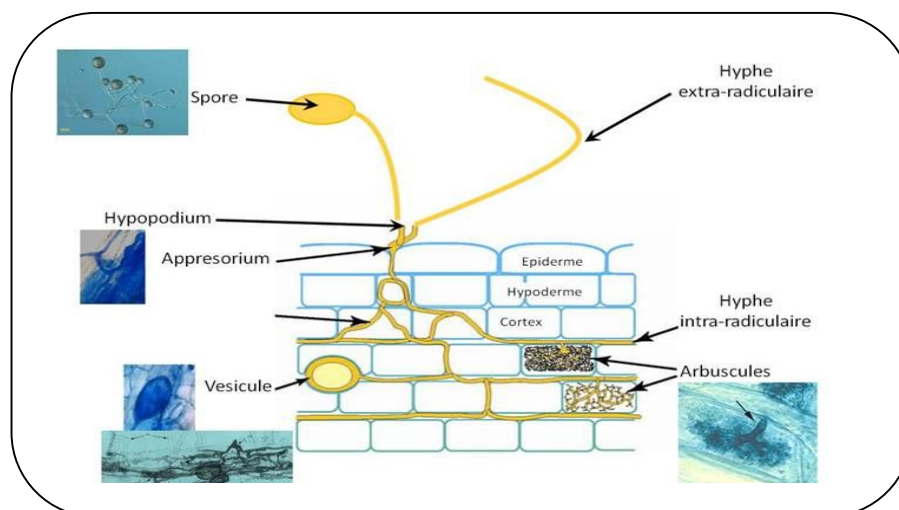


Figure n° 04: Représentation schématique et photographies (après coloration) des différences structurelles des champignons mycorhiziens à arbuscules (Berutti *et al*, 2014)

2.1.4.4 Importance des CMA :

Le mycorhize est réalisé par les deux partenaires de la symbiose, chacun des associés essaie d'obtenir le maximum mais globalement les échanges se produisent avec bénéfices réciproques et chaque symbiote tire avantage de cette vie en commun.

2.1.4.4.1 Avantages pour le champignon :

Le mycosymbiote hétérotrophe ne sait pas fabriquer de glucides à partir de l'eau et du dioxyde de carbone, il n'est pas capable de dégrader la cellulose et la lignine, c'est la plante autotrophe qui va lui fournir ses molécules carbonées, des photosynthétats, principalement des hexoses (sucres en C6 comme le glucose par exemple) qui ont trois utilisations principales :

- être dégradés pour fournir de l'énergie aux cellules fongiques,
- être utilisés comme squelettes carbonés pour la synthèse des composés cellulaires.
- être stockés pour une utilisation ultérieure, sous forme de glycogène dans les hyphes extra-racinaires, sous forme de tri-acylglycérol dans les vésicules (Bago *et al*, 2000).

L'apport n'est pas limité aux molécules glucidiques, des molécules complexes sont également élaborées par la plante, certaines d'entre elles stimulent la croissance des hyphes.

2.1.4.4.2 Avantages pour la plante-hôte :

○ Accroissement du volume de sol exploitable :

Les possibilités d'échanges entre les racines d'une plante et le sol sont limitées au volume de sol accessible aux racines. Ce volume correspond à la rhizosphère. Lorsque les racines sont prolongé par des hyphes fongiques, le volume de sol exploitable augmente, il y a création d'une mycorhizosphère qui amplifie de façon très significative la zone dans laquelle la plante peut extraire de l'eau et des éléments nutritifs et peut explorer des couches humides situées à grande profondeur. Chez certaines plantes de déserts, les hyphes extra-racinaires peuvent aller extraire l'eau à plusieurs dizaines de mètres de profondeur (Lambers *et al*, 2008).

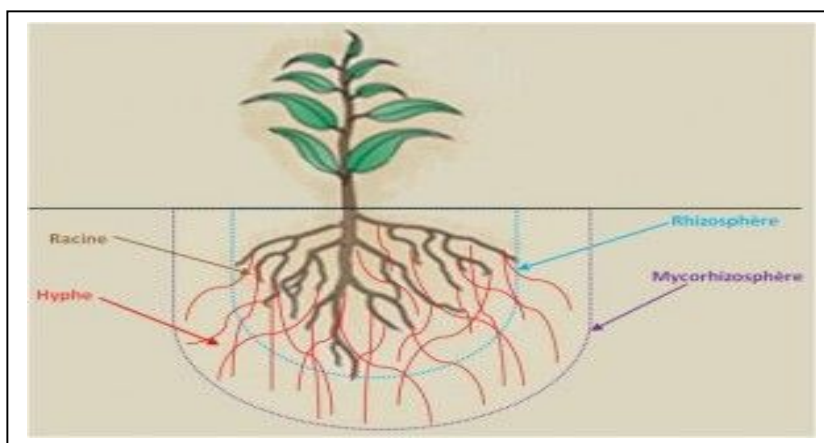


Figure n° 05: Représentation schématique du volume de sol influencé par les racines et les microorganismes associés et du volume de sol qui environne une racine colonisée par un champignon mycorhizien à arbuscules (Berutti *et al*, 2014)

○ **Amélioration de la nutrition minérale [P/N/ oligoéléments] :**

Dans le sol, les ions phosphates sont retenus dans les colloïdes ou immobilisés sous forme de phosphates de fer ou d'aluminium ; bien que présent, la majorité du phosphate est donc indisponible pour les plantes. L'équipement enzymatique des champignons est très vaste, des phosphatases sont présentes et sous leurs actions accompagnées au niveau des membranes fongiques de mécanismes de transport actif, le phosphore se retrouve dans les hyphes extra- racinaires.

Les ions phosphates absorbés ont trois devenir possibles :

- une partie est utilisée par le champignon
- une partie cédée à la plante via l'interface arbusculaire,
- le reste mis en réserve dans les vacuoles des cellules fongiques. (Smith et Read, 2008)

Pour l'azote, les mécanismes n'ont pas encore été étudiés en détail et seuls quelques résultats sont actuellement disponibles. Chez certaines *Glomales*, les hyphes extra-racinaires assimilent l'azote sous forme de nitrates, nitrites, ammonium du sol ;

Ces molécules sont transformées par le champignon et stockées dans les cellules du mycélium extra-racinaire sous forme d'arginine. Cet acide aminé est ensuite transféré au mycélium intra-racinaire, dégradé en ammonium qui est ensuite transféré à la plante au niveau de l'arbuscule. Les besoins des plantes en sels minéraux ne sont pas limités au phosphore et à l'azote, d'autres éléments comme le soufre ou des oligoéléments comme le cuivre, le zinc, le fer, le manganèse... sont également indispensables. Ces substances difficilement mobilisables bénéficient également de l'aide fongique surtout suite à une meilleure exploitation du sol par les hyphes extra-racinaires (Vinayak et Bagyaraj, 1990). Dans pratiquement tous les cas, on note que la quantité prélevée est très supérieure à celle qui serait absorbée par l'ensemble racine, racicules et poils absorbants.

○ **Amélioration de l'alimentation en eau et meilleure résistance au stress hydrique :**

La circulation de l'eau dans une plante est due à deux moteurs, les mécanismes d'absorption au niveau des racines et les mécanismes de transpiration au niveau des feuilles. Chez les plantes mycorhizées, les hyphes du réseau extra-racinaire, dépourvues de cloisons transversales et à cytoplasme peu abondant, facilitent le transport de l'eau vers les racines.

Ces racines supportent mieux le dessèchement du sol et récupèrent plus rapidement leur turgescence après un apport d'eau (Auge, 2001).

Les mécanismes sont toutefois complexes, il y a une grande variété de comportements métaboliques. On note toutefois une augmentation de la transpiration, de la conduction racinaire, et lors de périodes de stress hydrique, la turgescence des feuilles est maintenue par un ajustement des pressions osmotiques des vacuoles suite à une augmentation des concentrations en ions organiques.

○ **Production de messagers chimiques (hormones) :**

Des phytohormones, des auxines qui agissent en quantité infinitésimale, stimulent le développement de racines dans lesquelles de jeunes hyphes pourront entrer facilement. Le développement du système racinaire est ainsi facilité (Johansson et al, 2004).

- **Tolérance aux excès de certains éléments minéraux :**

Certains sols (par exemple les terrils laissés à la friche), peuvent présenter un excès de magnésium qui élimine les plantes herbacées. Des études ont montré que les plantes tolérantes étaient protégées par les champignons qui stockaient l'excès de magnésium dans des mycorhizes (Joner et Leyval, 2003)

- **Protection phytosanitaire :**

Dans le sol, tout autour de la racine, dans la rhizosphère, de nombreux micro-organismes sont présents et cherchent à établir des relations avec la racine. Si certains sont symbiotiques ou commensaux, d'autres se comportent parfois en dangereux ravageurs, parasites ou sont phyto pathogènes. L'association des capacités de défense des hyphes et des capacités de défense de la plante permet souvent une lutte beaucoup plus efficace contre les bactéries et champignons pathogènes et même parfois contre les nématodes (Duponnois et Cadet, 1994)

De nombreux champignons sont également capables de produire des substances antibiotiques qui protègent la plante-hôte. Dans 1 gramme de sol de mycorrhizosphère, il est possible d'avoir 12 mètres d'hyphes de champignons endomycorhizogènes. Outre les avantages apportés à la plante-hôte, ce réseau permet la communication entre les diverses plantes d'une même culture (Smith et Read, 2008).

2.2. La symbiose Rhizobienne :

2.2.1. Caractéristiques des rhizobia :

On désigne par rhizobia ou bactéries nodulant les légumineuses toute bactérie capable de former une symbiose se traduit, par la formation sur les racines ou plus rarement sur les tiges ou les feuilles d'une légumineuses, d'un organe particulier (le nodule ou nodosité) capable de fixer ou de réduire l'azote moléculaire (Lebbida, 2009).

Les rhizobia sont des bâtonnets mobiles de 0,5 à 0,9 sur 1,2 à 3,0 mm ; Gram négatif aérobies, non sporulantes (Tortora et al, 2003; Saad et al, 2006).

2.2.1.2 Diversité et classification des Rhizobia :

Pendant longtemps, les propriétés symbiotiques sont restées la seule base de la caractérisation des rhizobia mais actuellement l'on a complété l'étude classique des caractères phénotypiques par celle de la structure génomique (Krishnan et Bennet, 2007).

Les recherches récentes indiquent que la diversité des rhizobia, comme celle de tous les autres micro-organismes, est extrême (Amarger, 2001).

La classification des rhizobia a subi de nombreuses modifications ces dernières années et les propositions de remaniements futurs seront nombreuses tente simplement de refléter l'état des connaissances actuelles sur la taxonomie des rhizobia (D'après Gharam, 2008); mais celle-ci est très probablement appelée à être modifiée à l'avenir (Amarger, 2001).

2.2.1.3. L'établissement de la symbiose Rhizobienne :

L'établissement de la symbiose entre rhizobia et la plante légumineuses est un phénomène complexe. L'interaction symbiotique entre les bactéries rhizobia et les plantes de la famille des Légumineuses se traduit par la formation d'organes spécifiques, appelés nodules ou nodosités, où les bactéries sous leur forme différenciées, Fixent et réduisent l'azote moléculaire en ammoniac (Perry et al, 2004).

2.2.2. Formation des nodules :

La bactérie et la plante hôte mettent en place un système de dialogue basé sur un échange de molécules chimique. Dans un premier temps, les racines excrètent des flavonoïdes (Hirsh et al, 2001; Graham, 2007). Qui attirent le rhizobia dans le voisinage de la racine et activent les gènes bactériens nod, qui codent pour les facteurs de nodulation Nod (Downie, 1998; Ramos et Bisseling, 2004; Downie, 2005). Ces facteurs, sécrétés par le rhizobia stimulent la division des cellules de la partie corticale des racines conduisant à la formation d'un méristème primaire (cellules en division active) (Heller et al, 2000; Macheix et al, 2005).

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, localisé à la surface des cellules de rhizobia. La rhicadhésine est une protéine liant le calcium. Elle permet l'adhésion en complexant le calcium présent à la surface des racines. D'autres substances comme les lectines, qui sont des glycoprotéines végétales, ainsi

Que des récepteurs spécifiques présents au niveau de la paroi des cellules végétales jouent également un rôle dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante (Krishnan et Bannett, 2007).

La phase d'adhésion entraîne une rétractation des racines en réponse à une sécrétion de molécules et la bactérie pénètre dans les cellules par un mécanisme d'invagination. La croissance et le déplacement de la bactérie dans la racine entraînent la formation d'une excroissance ou filament infectieux (ou cordon d'infection) (Panagiota et al, 1995) L'infection s'étend progressivement aux cellules situées à proximité du site d'infection. La division rapide des cellules corticales infectées entraîne la formation du nodule (Borget., 1989; Madigan et Martinko, 2007)

Les bactéries prolifèrent rapidement à l'intérieur des cellules végétales ou elles prennent des formes plus ou moins globuleuses, boursoufflées parfois branchées, devenant ainsi des bactéroïdes. Les bactéroïdes sont enfermés individuellement ou à plusieurs dans des vésicules limitées par une membrane pér bactéroidienne dérivant de la cellule végétale pour former un ensemble nommé symbiosome (une forme fixatrice d'azote) (Parniske, 2000; Werner, 2007)

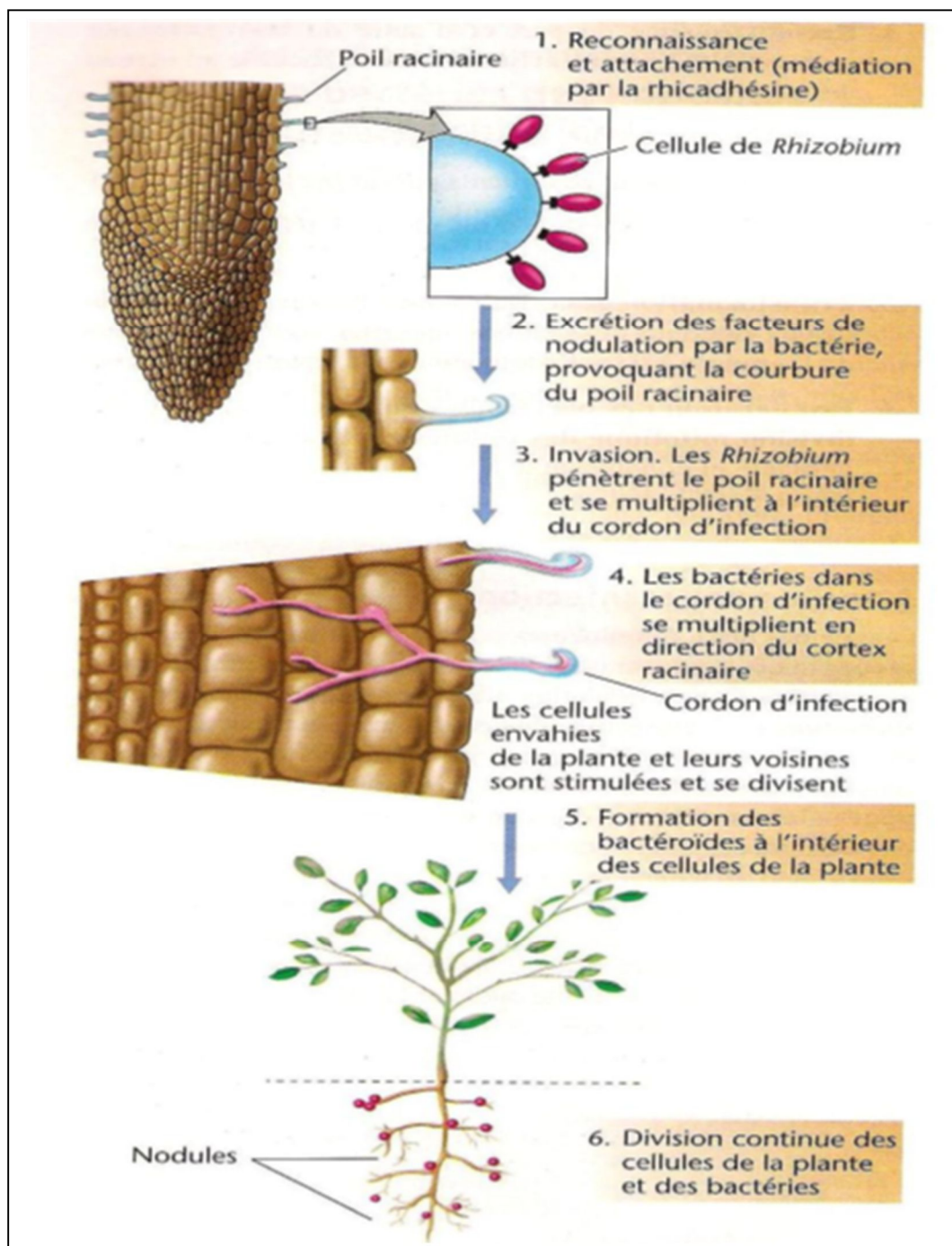


Figure n° 06 : Etapes de la formation d'un nodule racinaire chez une légumineuse infectée par rhizobia (Madigan et Martinko, 2007).

2.2.2.1. Les étapes de la nodulation :

▪ Pré infection :

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la croissance des bactéries se fait de manière sélective par la plante (Savka et col, 2002). Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances de type flavonoïdes et iso flavonoïdes, principalement par les phénylpropanoïdes²²exsudés par la racine (Kape et col. 1991). Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée (Coronado et col. 1995).

Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes nod bactériens qui gouvernent la production des facteurs Nod, des lipochitoooligosaccharides (Perret et col, 2000).

Les facteurs Nod induisent des événements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte; La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures ; les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse de berger, courbés, renflés, entrelacés, déformés, branchés ou joints qui enferme les *Rhizobium* (Wais et col, 2002).

Elle fait intervenir des changements dans l'arrangement des microtubules (Timmers et col, 2007) ; plus précisément, les poils racinaires peuvent adopter différentes formes en fonction de leur stade de développement (Wood et Newcomb, 1989).

▪ L'infection :

L'infection des racines peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002).

Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire et par conséquent la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. Les 23 croissances des nodosités se poursuivent dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité.

▪ Développement du nodule :

L'infection de la plante par les rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi., 2000). Les nodules de type indéterminé (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe. La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé 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 contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée. Dans les deux cas, les cellules du cortex se divisent de manière anticline puis péricline (Timmers et col, 1999).

Toutes les cellules du cortex ne se divisent pas, ce qui semble indiquer que la susceptibilité de ces cellules pourrait être liée à un statut particulier, notamment une modification de la concentration en hormones (Mathesius et col, 2000).

De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de pré infection, constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (Van Brussel et col, 1992).

Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du primordium nodulaire en formation. L'utilisation d'inhibiteurs du transport d'efflux d'auxine entraîne la formation de « pseudonodules » (Fang et Hirsch, 1998) suggérant un rôle de l'auxine dans la formation du nodule. De plus, les facteurs Nod produits par *Rhizobium* avant l'infection entraînent une modification de la balance hormonale de la plante.

Les mécanismes moléculaires responsables de ces changements sont inconnus mais il semble que les facteurs Nod agissent sur les flux d'auxine à deux niveaux : une inhibition du transport de l'auxine (Mathesius et col, 1998 ; Boot et col, 1999) et l'induction de la synthèse de flavonoïdes (Mathesius et col, 2000).

Les flavonoïdes sont susceptibles de provoquer l'accumulation de l'auxine en réduisant son oxydation de manière directe (substrats de l'enzyme) ou indirecte (en réagissant

avec H₂O₂ ; Mathesius, 2001). Leur rôle dans l'inhibition du transport de l'auxine est également supposé (Brown et col, 2001).

Des travaux récents montrent que l'extinction par la technique d'ARN interférent de l'expression du gène de la chalcone synthase (CHS) chez *M. truncatula* entraîne une augmentation du transport de l'auxine associée à une inhibition de la nodulation (Wasson et col, 2006)

2.2.2.2 Structure et morphologie des nodules :

La structure du nodule comporte, en allant du méristème et en se dirigeant vers l'attache du nodule sur la racine on distingue :

- Un méristème, formé de petites cellules non contaminées par les rhizobia et qui assurent la croissance de la nodosité
- La zone de rupture des cordons, dans cette zone, les cellules se multiplient activement et sont contaminées par les rhizobia, mais la fixation n'a pas lieu.
- La zone de fixation, cette zone est le siège de la fixation de N₂ dans les cellules continent un très grand nombre de bactéries.
- La zone de dégénérescence, les cellules de la plante hôte dégénèrent
- Les faisceaux libéro- ligneux, irriguent le nodule, apportent les glucides nécessaires pour la réaction de fixation, et exportent vers les feuilles les composés azotés formés (Odaton, 1992; Elmerich, 1997; Trinchant et al, 1998).

Il existe quelques différences dans la morphologie des nodosités qui peuvent, par exemple, entourer complètement le collet comme chez le lupin, ou bien être individualisées sur la racine et prendre des formes arrondies (soja, haricot) ou allongées (luzerne, féverole). L'activité méristématique continue amène à distinguer des nodosités de type indéterminé, qui sont digitées (*Medicago*) ou coralloïdes (*Vicia*), de nodosités de type déterminé chez les quelles le méristème a une durée d'activité limitée comme chez *Glycine* ou *Phaseolus* (Trinchant et al, 1998).

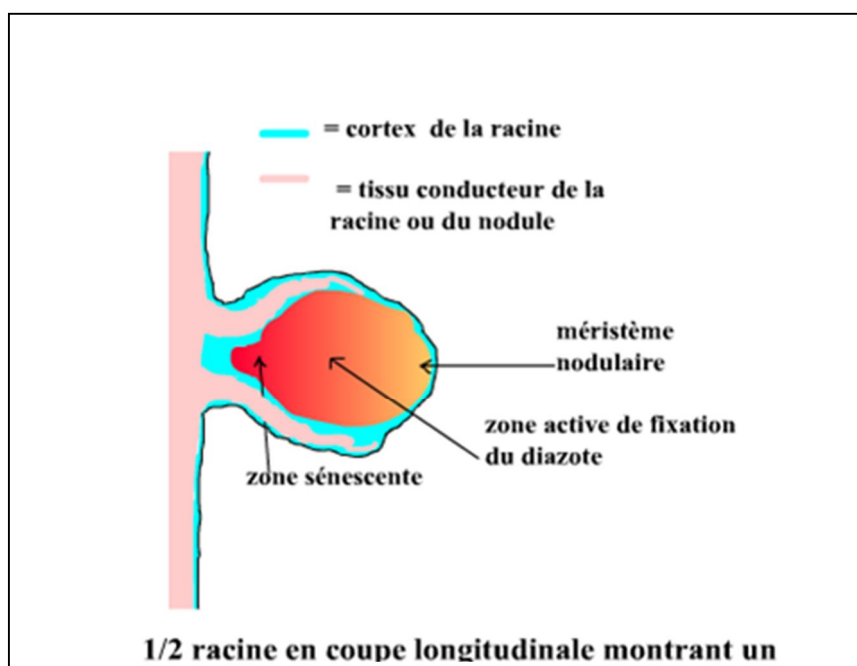


Figure n ° 07: une coupe longitudinale d'un nodule fonctionnel (JF Perrin mise à jour nov.2004/2008)

2.2.2.3 fonctionnements de la symbiose rhizobienne :

Le processus de fixation biologique de N_2 consiste dans la réduction de l'azote atmosphérique (N_2) sous la forme ammoniacale, forme utilisable par la plante. La fixation de l'azote est réalisée par la nitrogénase, une enzyme constituée par l'assemblage de deux protéines nommées dinitrogénase et dinitrogénase réductase. Les deux composants contiennent du fer, et la dinitrogénase contient également du molybdène. Cette nitrogénase reste localisée à l'intérieur des bactéroïdes et n'est pas exportée vers le cytoplasme des cellules végétales (Madigan et Martinko, 2007; Werner, 2007).

Dans les nodules, les bactéroïdes sont entourés de leghémoglobine. La synthèse de leghémoglobine dépend d'information génétique apportée par la plante et la bactérie (Delory et al, 2003).

La leghémoglobine est un pigment rouge contenant une protéine à fer de type hème. En se liant à l'oxygène contenu dans les nodules, elle maintient une tension d'oxygène suffisante pour permettre la respiration des bactéroïdes aérobies et la synthèse d'ATP mais à un niveau

suffisamment faible pour ne pas inactiver le système de la nitrogénase sensible à l'oxygène (Perry *et al.*, 2004)

Les bactéroïdes dépendent totalement de la plante qui leur fournit les sources d'énergie indispensables pour réaliser la fixation de l'azote. Le produit de la réaction est l'ammoniac qui sera utilisé principalement par la plante pour la synthèse de composés organiques (glutamine, acides aminés,...) (Perry *et al.* 2004).

C'est la compartimentation de l'activité nitrogénique des rhizobies au sein d'un organe spécialisé et le couplage de celle-ci avec le pouvoir photosynthétique de la macro symbiote qui font de la symbiose rhizobia-légumineuse, le système biologique fixateur d'azote le plus efficace de la biosphère (Streeter, 1991; Skorpil et Broughton, 2005).

Matériels

Et

Méthodes

II .Materiels et Methodes :

1. Présentation de la zone d'étude (Parc National d'EL KALA) :

Le Parc National d'El Kala (PNEK) parmi les zones protégées les plus prestigieuses de la méditerranée occidentale. Il possède des richesses naturelles exceptionnelles, représentées par une multitude d'espèces végétales et animales.

La juxtaposition d'écosystèmes différents et interdépendants (marin, durain, lacustre et forestier), lui confère un caractère diversifié peu commun (Anonyme, 2011).

1.1. Situation géographique et administrative :

Le Parc National d'El Kala a été créé en 1983, qui constitue un patrimoine naturel important par la richesse biologique de ses habitats.

D'une superficie de 80.000 ha, il est composé d'une mosaïque particulière d'écosystèmes, caractérisée par des zones humides dont l'ensemble constitue un complexe considéré comme unique dans le bassin méditerranéen. En vue d'une gestion rationnelle et une protection de ses divers milieux, la région d'El Kala a été érigée en parc national dès 1983 sous le décret n° 83- 462 du 23 juillet 1983 (Anonyme, 2011).

Elle a en outre été classée en 1990, dans la catégorie du patrimoine national et culturel international et comme réserve de la biosphère par l'UNESCO. A l'intérieur de ce parc sont situés deux des plus belles zones d'expansion touristique à savoir : Messida et Cap Rosa, ainsi que les lacs : Mellah (eau salée), Oubeïra (eau douce), et le lac Tonga. Les deux derniers lacs (Oubeïra et Tonga) ont été considérés comme sites d'importance internationale par la convention de Ramsar (Alloua, 1997).

Le PNEK est situé à l'extrême Nord-est du Tell Algérien à 80 km à l'est d'Annaba. Il est limité à l'Est par la frontière Algéro-Tunisienne, au Nord par la mer Méditerranée, à l'Ouest par les plaines d'Annaba et au Sud par les montagnes de la Medjerda.

Administrativement, Le PNEK' est inclus dans la wilaya d'El Tarf et comprend les communes suivantes : Bouteldja, Ain El Assel, El Kala, El Aioun, Bougons, Souarekh, Ramel El Souk et Zitouna (Anonyme, 2011).

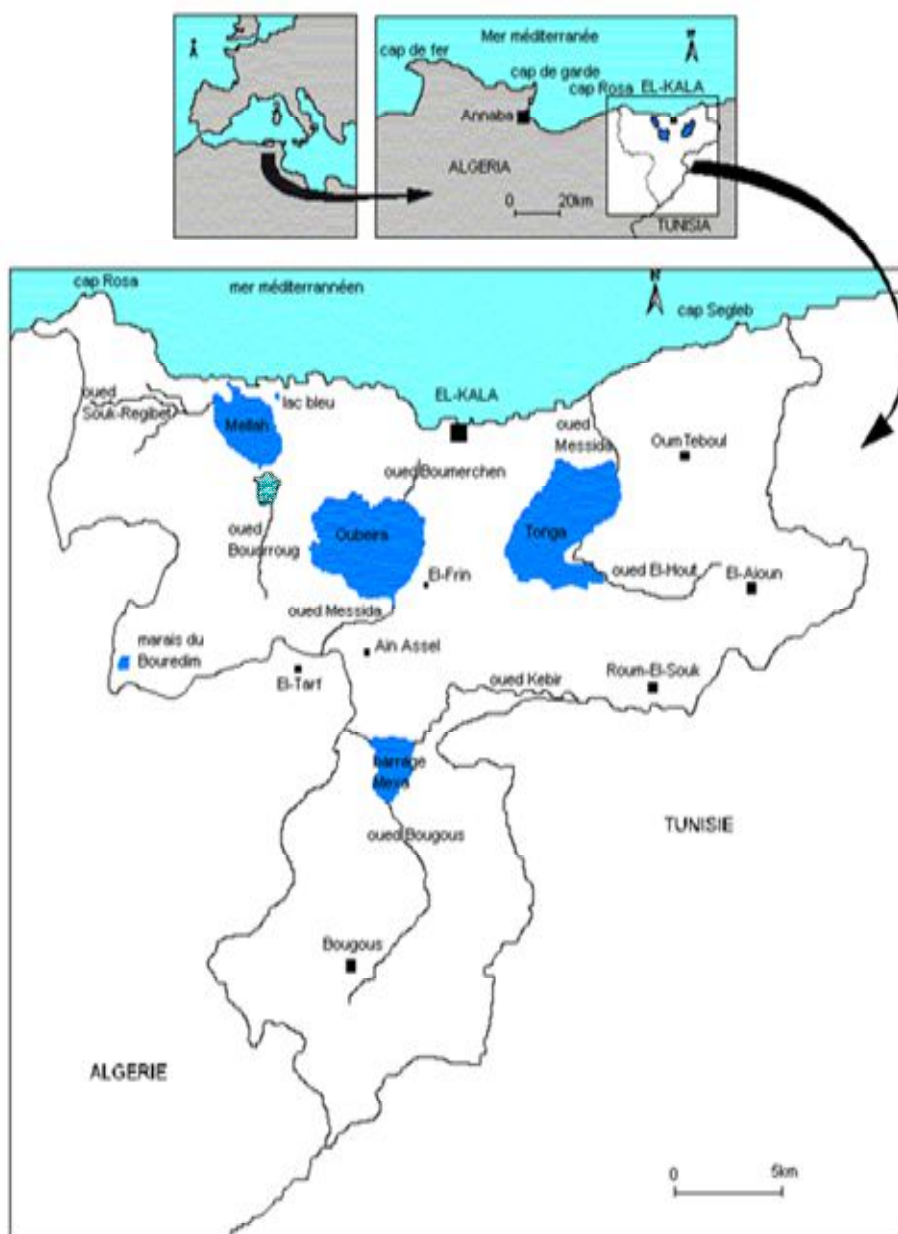


Figure n° 08: Carte de localisation et limites du P.N .E .K (Anonyme, 2011).

1-2 Caractéristiques de la région de Bougous :

1-2-1 Situation géographique :

Située au sud du parc avec une superficie de 21580 ha, la commune de Bougous est à une distance de 20 km du chef lieu de la wilaya d'El Tarf, elle est traversée actuellement par le chemin de la wilaya du Nord au Sud, reliant les différents machats (Medjouda, Ain-El-Kebir. Et...).

Cette commune est limitée au Nord par la commune de Ain- El-Assel, à l'Est par la frontière Algéro-tunisienne, au sud-ouest par la commune de Zitouna et au Nord Ouest par la commune d'El –Tarf.

I-2-2 Relief :

Bougous est une région montagneuse caractérisée par un relief à forte pente, qui englobe une superficie de 16139 ha représentant une totalité de 74.78% du territoire de secteur Cette région montagneuse avec une altitude comprise entre 150 m et 1202 m (Point culminant Djebel El – Ghorra) où se développe la forêt de chêne Zen.

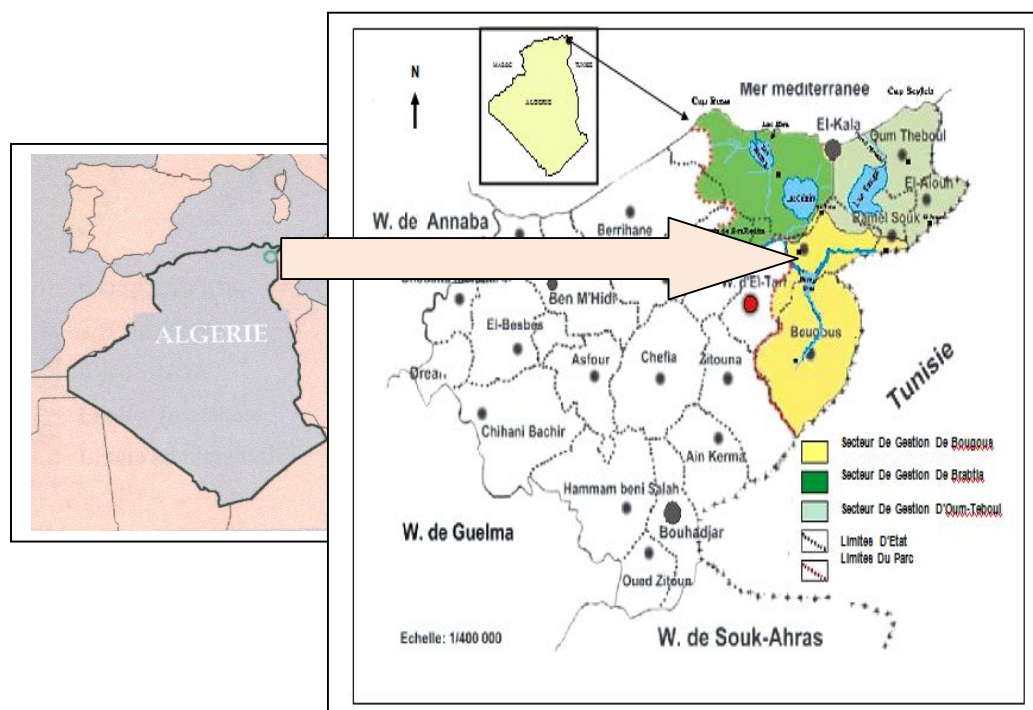


Figure n° 09 : Carte de la localisation et limites de la région d'étude,

Le colleur jaune : la region de bougous

(Source : PNEK)

I-2-3-Étude climatique :**I-2-3-1 La Température :**

La variation de température est représentée dans le Tableau suivant :

D'une manière générale, les températures les plus basses sont enregistrées en altitudes durant l'hiver à Djbel El Ghorrah.

Au niveau de la mer, les températures descendent très rarement à 0 °C. Le mois le plus froid est février avec une moyenne de 19,6°C, alors que Aout avec une température moyenne de 34.9°C reste le mois le plus chaud. Le tableau suivant représente la variation de la température moyenne de ca dernière année.

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
T°M/M de L'année	17.3	19.6	21.3	23.6	28.4	34.3	31	34.9	32.1 8	32.34	25, 6	17.6

Tableau n°03 : Température moyenne de l'année 2013(Source station météorologique d'El Tarf, 2013)

Les températures moyennes de 10 dernières années, nous montrent que les mois les plus froids sont : janvier, février, décembre, tandis que les mois les plus chauds: juin, juillet, août.

I-2-3-2 La Pluviométrie :

La pluviométrie est donnée dans le tableau suivant :

Les données portant sur les précipitations mensuelles enregistrées durant l'année 2013 montrent que le maximum des précipitations a été signalé durant les mois : janvier, février et décembre, et un minimum pendant les mois : juin et juillet.

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Plui de l'année 2013/mm	73.3	110.8	58	45.1	11.8	6.5	3.6	16.5	51. 1	19.4	45.1	61

Tableau n°04 : pluviométrie de l'année 2013 (Source station météorologique d'El Tarf, 2013).

Selon ces résultats on constate que la pluviométrie la plus élevée est observée au mois d'avril et la pluviométrie totale c'est 590 mm.

I-2-3-3 L'Hygrométrie :

L'Hygrométrie est présentée sur le tableau suivant :

Selon les données sur l'humidité mensuelles enregistrées durant l'année 2013, on constate que les mois les plus humides sont les mois de janvier et février, et le mois le moins humide est le mois de mai.

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
H- M/M	70.4	68.8	54.1	68.4	44.3	59.6	60.5	61.5	57.8	64.8	64.1	57.9

Tableau n°05 : Humidité moyenne de l'année 2013 et la moyenne des Dix dernières années (Sources station métrologique d'El Kala ,2013).

Selon le tableau on constate que l'hygrométrie est élevée des variations 44,34% à 70,43%.le tableau indique que Janvier, Février sont les mois les plus humides et Mai, Juin, Juillet les mois les moins humides dans les 10 années.

I-2-4-Synthèse climatique:

Il existe plusieurs méthodes pour caractériser le climat méditerranéen, nous utiliserons la méthode la plus connue basée sur le diagramme Embrothermique de Gausсен et sur le quotient pluviométrique d'Emberger.

I-2-4-1-Diagramme Embrothermique de (Gausсен ,1954):

Gausсен applique son diagramme au climat ou il existe une saison sèche un mois est considère sec si la moyenne de la température en C° :

$$p < 2T$$

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Précipitation mensuelle de 10 dernières années mm	169,16	63,22	89,55	87,32	40,37	38,45	19,22	6,65	55,31	26,91	141,08	181,7
Température Moyenne mensuelle de 10 dernières années C°	14,8	11,7	24,7	18	18,37	24,47	28,9	31,47	28,88	24	20,08	12,7

Tableau n°06 : Température mensuelle moyenne et précipitation mensuelle moyenne de Dix dernières années. Sources : station métrologique d'El Kala ,2007

Les données bioclimatiques de la région de Bougous durant la période (1996-2006) laisse apparaître d'une saison sèche présente dans la (figure 10)

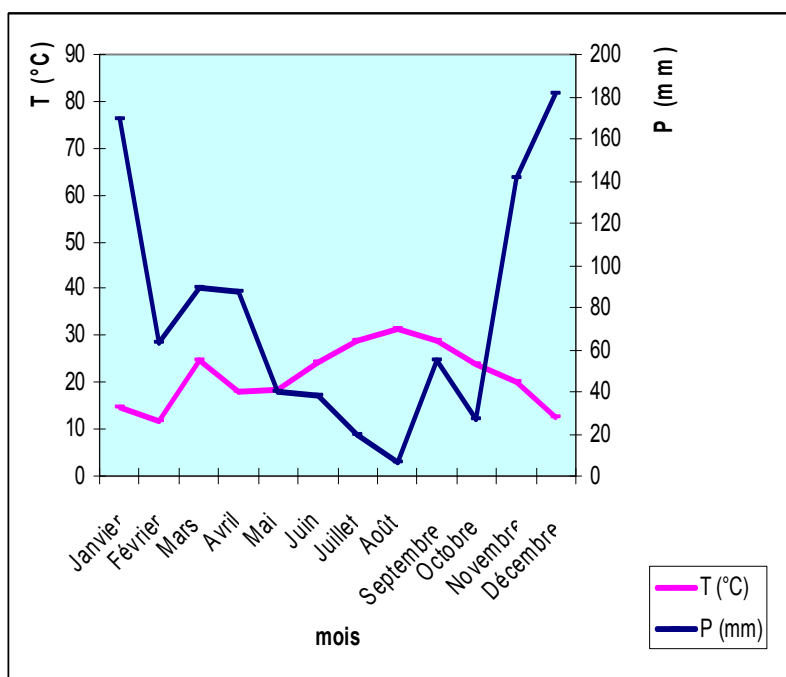


Figure n° 10: Diagramme Embrothermique de la région de Bougous

Le diagramme de la région de Bougous pour le période de 10 ans 1996-2006 montre l'existence de deux périodes l'une sèche s'étendent de Mai à Octobre et l'autre humide s'étalant sur les 6 mois de Novembre à Avril, Ainsi, Août est le mois le plus sec et décembre le plus humide, Février le mois le plus froid et Août le plus chaud.

I-2-4-2-Quotient pluviométrique de Gausсен ou Diagramme d'Emberger:

Le quotient d'Emberger (Q) forme modifiée pour l'Algérie (DE Stewart, 1996) donne :

$$Q=3,43Xp/ (M-m)$$

P:pluviométrie moyenne annuelle 683.

M:Moyenne des maxima des températures du mois le plus chaud 28,28

m: Moyenne des minima des températures du mois le plus froid 13,41

Donc $Q = 3,43 \times 683 / (28,28 - 13,41) = 174,43$

2. MODALITES DE PRELEVEMENT DES RACINES ET DU SOL:

Nous avons réalisé notre échantillonnage en un seul saison (automne 2016), au champ de la station de Bougous avec pour objectif :

- Concernant le sol : procéder à l'analyse physicochimique
- Concernant les racines, évaluer leur colonisation par les champignons endomycorhizogènes et par les *Rhizobium*.

Sur les racines prélevées, nous avons enlevé les nodules puis choisi les racines les plus fines et ce, afin de faciliter la coloration dans le but d'estimer la fréquence de la colonisation mycorhizogène.

Toutes les racines provenant d'un même plant sont convenablement mélangées pour en faire un seul échantillon.

3. Préparation au laboratoire :

3.1 Le sol

3.1.1 Paramètres physico –chimiques :

Une partie du sol prélevé a servi pour l'évaluation de certains paramètres physicochimiques à savoir le pH eau la texture.

- **PH eau du sol :**

Pour déterminer le pH eau du sol:

- Tamiser le sol d'analyse avec un tamis de 2 mm.
- Peser 5 g de sol dans un flacon ou pilulier à agitation et ajouter 25 ml d'eau distillée.
- Agiter avec agitateur culbuteur pendant 2 heures à température proche de 20 °C.
- Laisser reposer la solution 24 h, ensuite mesurer le pH eau moyen d'un pH mètre.



Photo n°01 : détermination de pH eau du sol (Keblouti et Bounouar 2016)

- **La texture du sol :**

Pour déterminer la texture du sol, nous avons utilisés la méthode par saturation qui consiste à mesurer le pourcentage d'humidité du sol (y) et à le comparer à une échelle détermine la texture qui lui correspond.

Nous avons, tout d'abord, pris une petite quantité de sol (= 50 g) et nous l'avons imbibée d'eau au goutte à goutte tout en mélangeant jusqu'au point où la pâte devient luisante et glisse doucement lorsqu'on incline le récipient (**photo02**).

Ensuite, nous avons suivi les étapes suivantes :

- ❖ Peser une capsule vide (P₁)
- ❖ Prendre une petite quantité de pâte (sol mouillé).
- ❖ La mettre dans la capsule puis repeser (P₂).
- ❖ Mettre à l'étuve à 105 °C pendant 24 h

- ❖ Peser une troisième fois la capsule à la sortie de l'étuve (P3). Le poids correspond donc au poids de la capsule vide + le poids du sol sec.
- ❖ Puis calculer :

$$X_1 = P_2 - P_3 \text{ (Poids de l'humidité).}$$

$$X_2 = P_3 - P_1 \text{ (Poids du sol sec).}$$

Ensuite appliquer la règle de trois pour calculer le pourcentage d'humidité.

$$X_1 \longrightarrow X_2 \text{ g du sol sec}$$

$$Y \longrightarrow 100 \text{ g de sol sec}$$

- Enfin, le comparer au tableau suivant pour déterminer la texture :

Pourcentage d'humidité (%)	Texture
< 12	Sableuse
12-24	Sablo – limoneuse
24 - 37.5	limoneuse – sableuse
37.5 – 45	Limoneuse – argileuse
> 75	Argileuse

Tableau n°07 : Echelle de la texture.



Photo n° 02 : détermination de la texture (Keblouti et Bounouar ,2016)

3.2. Les racines :

3.2.1. La recherche de l'infection par les champignons endomycorhizogènes :

Les prélèvements racinaires sont lavés et séparés délicatement afin de les débarrasser de toute particule de terre puis découpés en fragments d'environ 1 cm de longueur.

Tous les nodules collés aux racines sont détachés.

Les racines lavées sont recueillies dans des tubes en plastique munis à leur base d'une grille en acier inoxydable. Les tubes sont rassemblés et rangés dans un cristalliseur et traités comme suit:

- Immerger les racines dans une solution d'hydroxyde de potassium (KOH à 10%)
- Mettre le cristalliseur muni des tubes dans un bain marie à 100°C.
- Laisser chauffer pendant 30 minutes, l'utilisation de la potasse a pour effet de vider les cellules de leur contenu cytoplasmique.

- Rincer les tubes à l'eau du robinet afin d'éliminer toute trace de potasse (KOH).
- Plonger les fragments racinaires contenus dans le cristalliseur successivement dans du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 10 vol) puis l'HCl pendant 30 minutes pour éclaircir les racines.

- Rincer de nouveau les racines éclaircies.
- Immerger les racines éclaircies dans le noir de chlorazol voir composition chauffé à 90°C au bain marie pendant 30 minutes.
- Conserver les racines ainsi colorées dans des piluliers étiquetés contenant du glycérol.

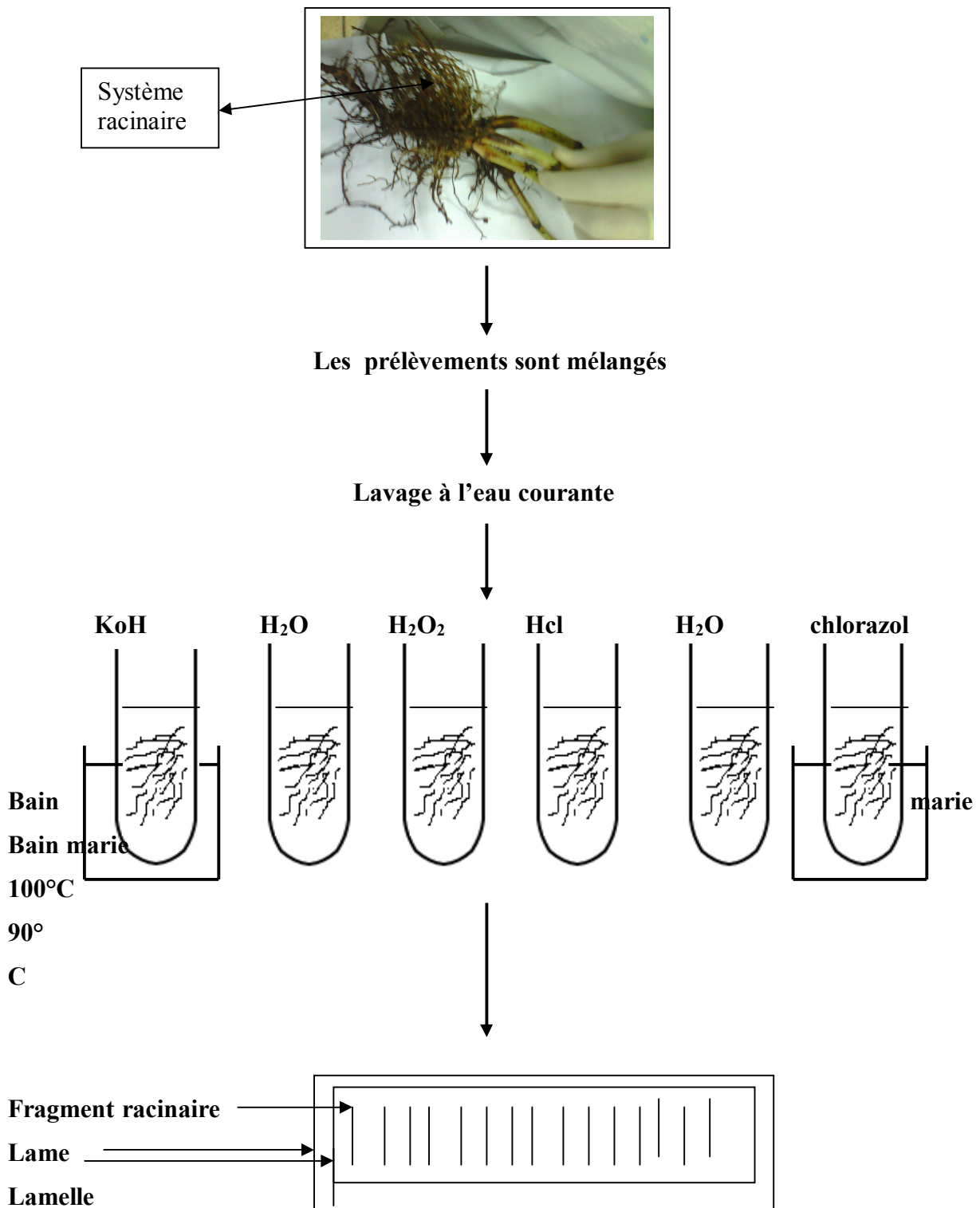


Figure n° 11: Les différentes étapes de prélèvement et de préparation des échantillons racinaires.

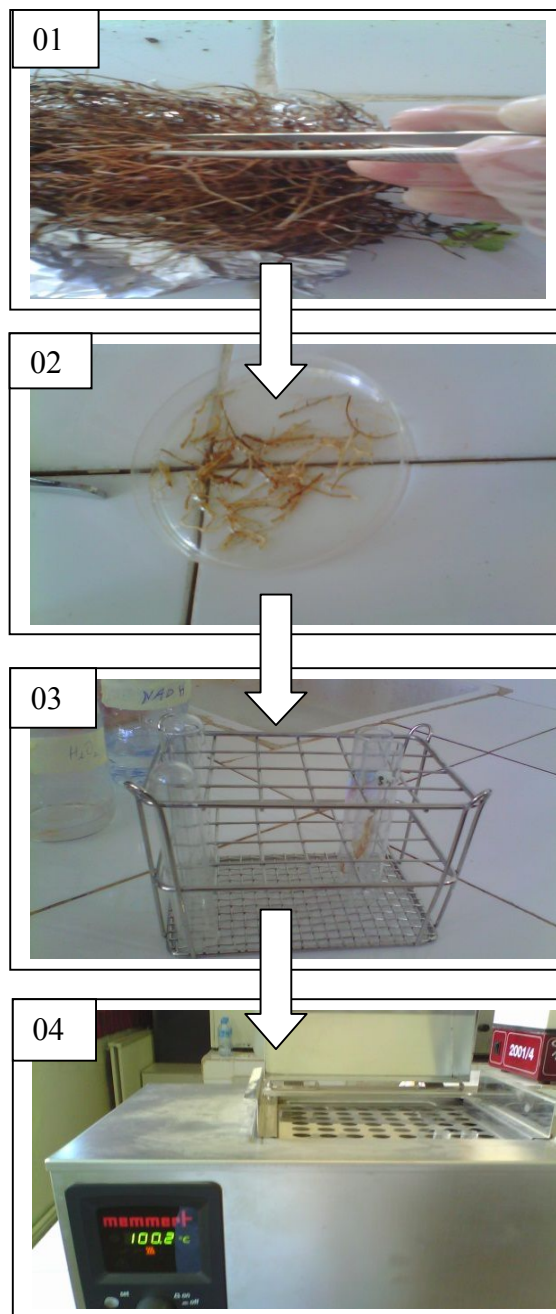


Photo n° 03 : Les différentes étapes de prélèvement et de préparation des échantillons racinaires au laboratoire. (Kablouti et Bounouar 2016).

(1) : détachement des nodules à l'aide d'une pince

(2) Les racines coupent dans l H_2O_2

(3) Les racines dans HCl

(4) Coloration des racines par le bleu tryron

3.2.2 Observation et estimation du taux d'infection par les champignons AM :

L'estimation de l'infection par les champignons AM a été réalisée par la méthode de Trouvelot *et al* (1986). Après coloration, 30 fragments de 1 cm environ sont choisis, placés parallèlement les uns aux autres et légèrement écrasés entre lames et lamelles dans du glycérol, à raison de 15 fragments par lame, puis observés au microscope photonique au grossissement x 10, puis x 40 pour avoir plus de détails et de précision.

4. Isolement des bactéries *Rhizobium* à partir des nodules :

Les nodules détachés des racines sont rincés et séchés dans un papier filtre. (Photo04)

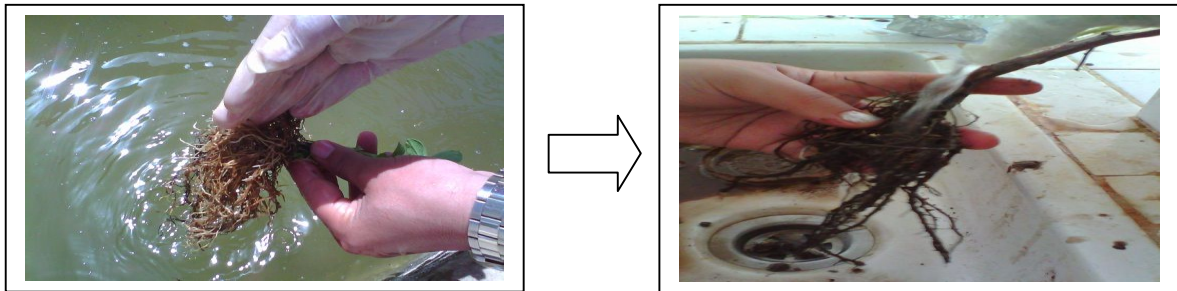


Photo n ° 04 : rinçage des racines et les nodules (photo Keblouti et Bounouar 2016)

4.1. Conservation des nodules

Pour un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 h.

Pour une longue conservation, il est recommandé les dessécher dans des flacons en verre contenant chacun du CaCl₂ (1/4 du volume) et du coton hydrophile (3/4 du volume) sur lequel sont déposés les nodules (**figure12**), le tout étant placé dans un réfrigérateur à 4°C.

Sur chaque flacon sont mentionnées :

- Le nom de la plante hôte.
- Le lieu de la collecte.
- La date de conservation.

Les nodules fraîchement lavés sont détachés de la racine avec une pince (**photo 05**), alors que ceux qui sont conservés par dessiccation sont réhydratés une nuit au réfrigérateur

dans de l'eau distillée, puis abandonnés pendant une heure à température ambiante (Vincent, 1970).

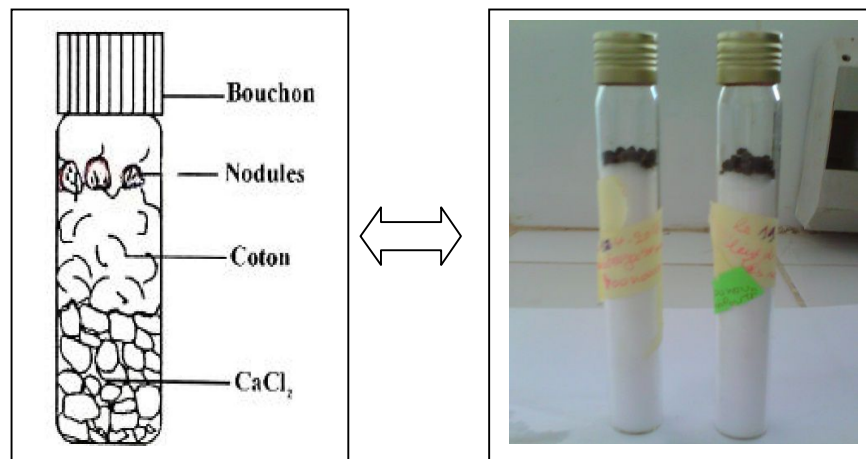


Figure n °12: Conservation des nodules (Vincent, 1970).

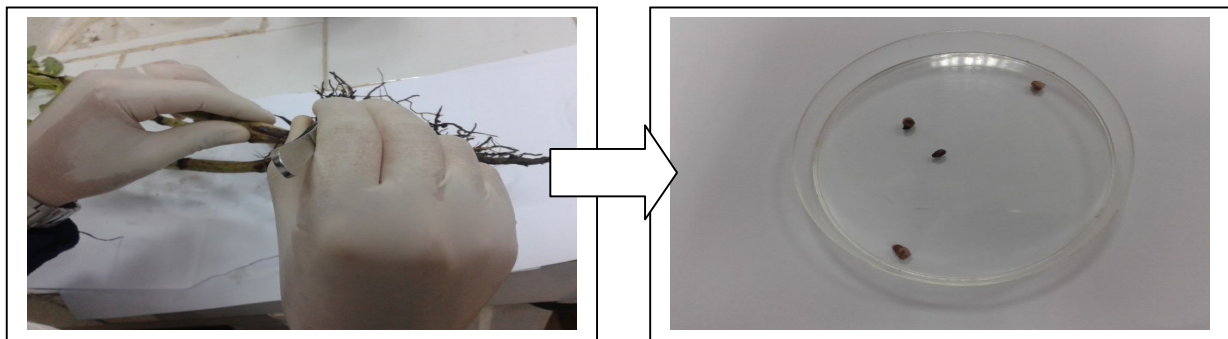


Photo n° 05 : Isolement des nodules à l'aide d'une pince. (Kablouti et Bounouar 2016)

4.2. Stérilisation des nodules :

Les nodules sont immergés 05 à 10 secondes dans de l'éthanol à 95% puis transférés immédiatement dans du calcium hypochlorite à 5 % pendant 3mn ou dans du chlorure de mercure acidifié 0,1% (p/v) pendant 3 minutes.

La stérilisation est suivie par un abondant rinçage à l'eau distillée stérile (7 à 10 fois selon l'agent stérilisant) (Vincent, 1970 ; Beck *et al*, 1993).

4.3. Isolement selon la méthode du nodule écrasé :

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile (**photo 06**). Dans chacune d'elles est déposé un nodule stérilisé. Avec une pince stérile, on écrase le nodule et à l'aide d'une anse de platine, on ensemence une boîte de milieu de Yeast Mannitol Agar (YMA) dont on a ajusté le pH à 6.9 et auquel on a ajouté 10 ml de Rouge Congo à 1 % (p/v) dans l'eau (Vincent, 1970).

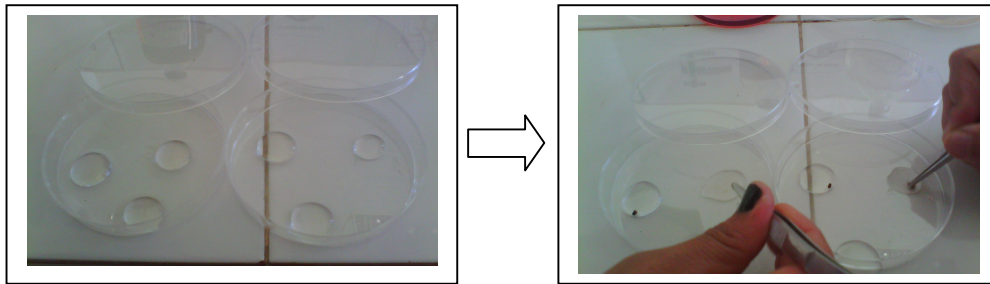


Photo n° 06 : la stérilisation des nodules (Kebblouti et Bounouar 2016)

L'ensemencement est réalisé en suivant les étapes dans l'ordre 1, 2, 3, 4 selon la technique des quatre quadrans (**figure13**) de manière à isoler des colonies simples. Les boîtes sont incubées pendant 72 h à 28-30 °C.

Les colonies ayant peu absorbé le colorant (genre *Rhizobium* ou *Agrobacterium*) sont séparées des autres fortement colorées (contaminants) et testées sur milieu Glucose–Peptone–Agar (GPA) + pourpre de bromocrésol)

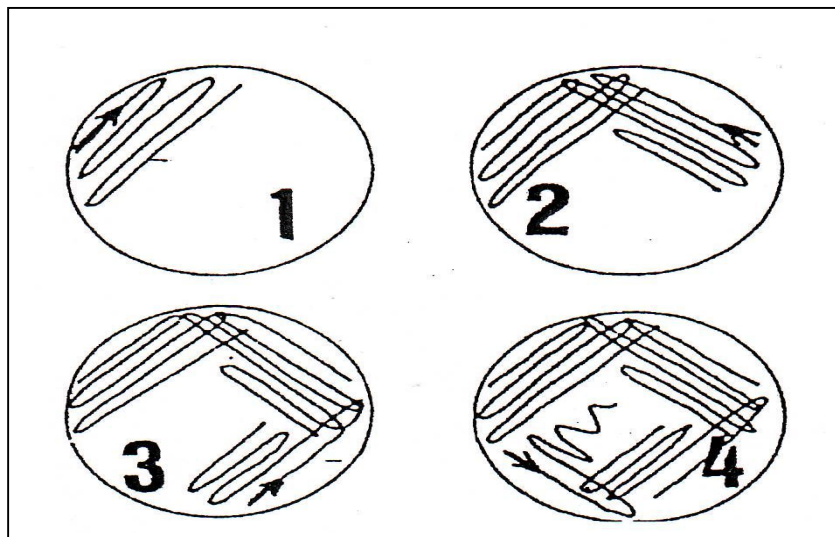


Figure n °13: Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide YMA
(Somasegaran et Hoben, 1994).

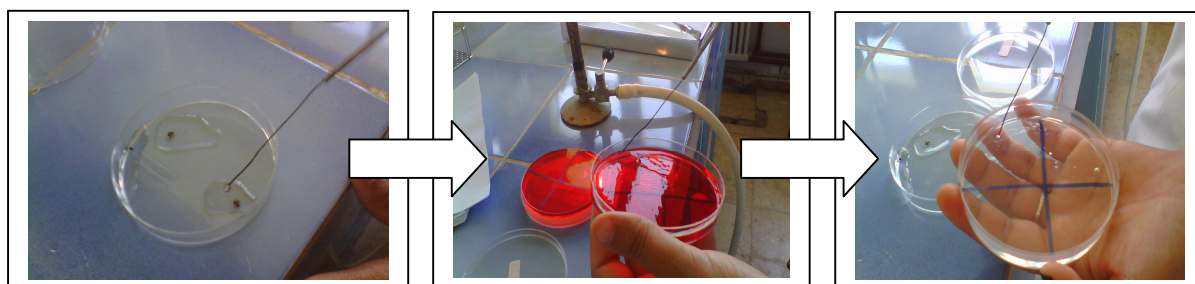


Photo 07 : L'isolement des bactéries sur boîte de Pétri.(Keboulou et Bounouar 2016)

4.4. Détermination des souches selon la méthode de la coloration de Gram :

Une anse est prise de chaque colonie ayant poussée dans les boîtes de Pétri sur un milieu solide Y.M.A, diluée dans une goutte d'eau distillée stérile et déposée sur une lame en verre sous forme de frottis. Prise est effectuée à l'intérieur de la hotte à flux laminaire à côté d'un bec Bunsen.

- L'anse est stérilisée à chaque prise.
- Les lames seront déposées sur un support stérile dans la hotte et mises à sécher.
- L'émulsion est séchée à la flamme.

Sur un support fermé, les lames sont colorées par un colorant basique : le violet de Gentiane pendant une minute. Les lames sont ensuite traitées par la solution de Lugol (augmente les interactions entre le colorant et la cellule pour que celle-ci soit plus fortement contrastée) pendant 30 secondes.

Les frottis sont alors décolorés par lavage avec l'éthanol ou l'acétone puis traités par un colorant acide (Fuschine) pendant une minute; ensuite, ils sont rincés à l'eau.

Les lames sont ensuite mises à sécher. Enfin, l'observation microscopique se fait au grossissement 100 à immersion dans l'huile de cèdre.

La coloration de Gram divise les bactéries en deux classes: Gram négatives (-) et Gram positives (+). Les bactéries Gram positives (+) gardent le cristal violet tandis que les bactéries Gram négatives (-) le perdent et se décolorent (couleur rose ou rouge).

4.5. Purification des isolats :

La purification des isolats est réalisée par des repiquages répétés dans un bouillon Y.M.B (Yeast Mannitol Broth) (**Annexe2**) suivis par des ensemencements sur milieu solide YMA (yeast Mannitol Agar). (**Annexe1**).

L'ensemencement des tubes contenant le milieu de culture liquide YMB se fait à partir de chaque colonie identifiée et numérotée à raison de 3 prélèvements de chaque colonie.

Chaque prélèvement est ensemencé dans un tube à essai contenant 10 ml d'YMB stérilisé à 120°C à la cocotte-minute pendant 20 mn après mise en rotation de la soupape.

L'ensemencement se fait sous une hotte à flux laminaire à côté d'un bec Bunsen. Les tubes sont ensuite incubés à l'étuve à 28-30 °C, pendant 24-72h selon les souches.

Des prélèvements de culture sont opérés et installés dans des boîtes de Pétri sur le milieu YMA, puis incubés à l'étuve à 28-30°C, pendant 24-72h selon les souches.

4.6. Test distinctif entre *Rhizobia* et agro bactéries :

4.6.1. Test de 3-cétolactose :

Le test de 3-cétolactose permet de distinguer le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium* (Jordon, 1984). Il se base sur l'oxydation du C₃ du glycosyl des saccharides (Bernaerts et De Ley, 1963).

Les souches sont cultivées à 30°C, pendant 3 jours sur milieu glucosé (g/l), stérilisé à 120°C, pendant 20 minutes.

Milieu glucosé:

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Carbonate de calcium	20g
Agar	18g
Eau distillée	100 ml

Une anse de cette culture est ensemencée sur milieu lactosé (g/l) stérilisé à 120°C pendant 20 mn.

Milieu lactosé:

Lactose	10g
Extrait de levure	1g
Agar	18g
Eau distillée	100ml

Les boîtes sont incubées 2 jours à 30°C. Pour révéler les résultats, il est nécessaire d'inonder les boîtes avec le réactif de Benedict à température ambiante.

- **Réactif de Benedict:**

Citrate de Sodium	173 g
Carbonate de Sodium Anhydre	100g
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	17.3 g
Eau distillée	100ml

La présence du 3-cétolactose se manifeste par la formation d'un halo jaune de Cu₂O autour des colonies après environ 1 heure. Le diamètre du halo est de 2 à 3 cm, jaune comparativement avec le fond bleu du réactif de Benedict. Seules les souches d'*Agrobacterium* spp produisent l'enzyme 3- Cétoglucosidase.

Résultats

Et

Discussion

1. L'analyse du sol :

Les résultats relatifs aux analyses physicochimiques du sol de la station d'étude sont comme suit :

1.1. Le PH eau :

Nous constatons que le pH de notre sol est un pH acide 4,51.

L'activité biologique d'un sol varie avec le pH ainsi que La diversité, l'abondance et l'activité de la microflore (bactéries, champignons, etc...) sont en effet influencées par le pH. Chaque espèce possède une plage optimale de pH. Par exemple, l'activité bactérienne diminue lorsque le pH est inférieur à 5,5. (Mortreux, 2008).

Selon Dommergues et Mangenot (1970), la mycorhization serait meilleure dans les sols légèrement acides qui conviennent mieux aux champignons qu'aux bactéries dont le pH optimal est variable entre 5,8 et 7,2 en fonction des espèces rhizobiennes (Somasegaran et Hoben, 1994).



**Photo n°08 : La mesure du pH du sol au laboratoire au moyen d'un PH mètre
(Kablouti et Bounouar 2016)**

1.2. La texture du sol :

Nous avons obtenus la valeur de la texture du sol égale à 54,5

D'après ces résultats, nous constatons que notre sol est de texture argileuse.

1.2.1 Estimation de la colonisation endomycorhizienne:

L'observation des échantillons racinaires prélevés des plantes pièges du *Vicia faba* (L.) durant (l'automne 2016) a permis de détecter la présence des champignons AM dans ces racines et d'estimer l'importance de l'infection.

L'infection des racines par les champignons AM est surtout manifestée par la présence vésicules de taille et de formes variables (photo 9 (1 et 2)) ; des spores sphériques extra racinaires (photo 9 (3 et 4)) et des spores sphériques intra racinaire : il s'agit probablement de *Glomus intraradices*.

Le cortex racinaire est envahi par de nombreuses arbuscules (photo 7-8) et des mycéliums en effet, l'extension de l'infection devient plus importante durant la saison de croissance et ceci témoigne de l'importance du rôle que jouent les endomycorhizes et surtout les arbuscules qui sont le site d'échanges fonctionnels entre le champignon endomycorhizien et la racine de la plante hôte.

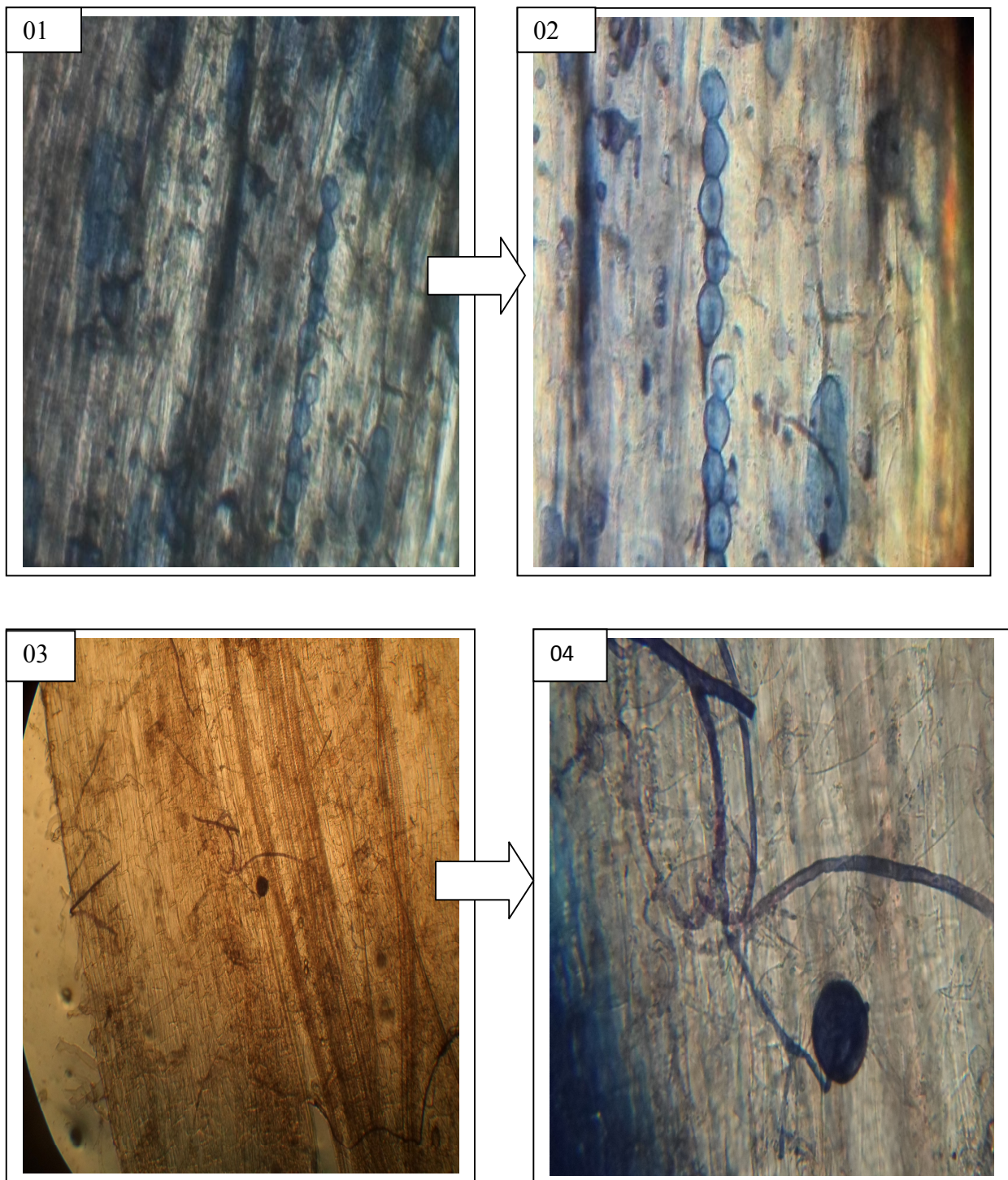


Photo n°09 : Différentes formes de manifestation de l'infection endomycorhizienne.

1-2 : vésicule (**Gx100-gx400**), **3-4**: une spore sphérique extra racinaire (**Gx100-Gx400**)

(Keblouti et Bounouar 2016).

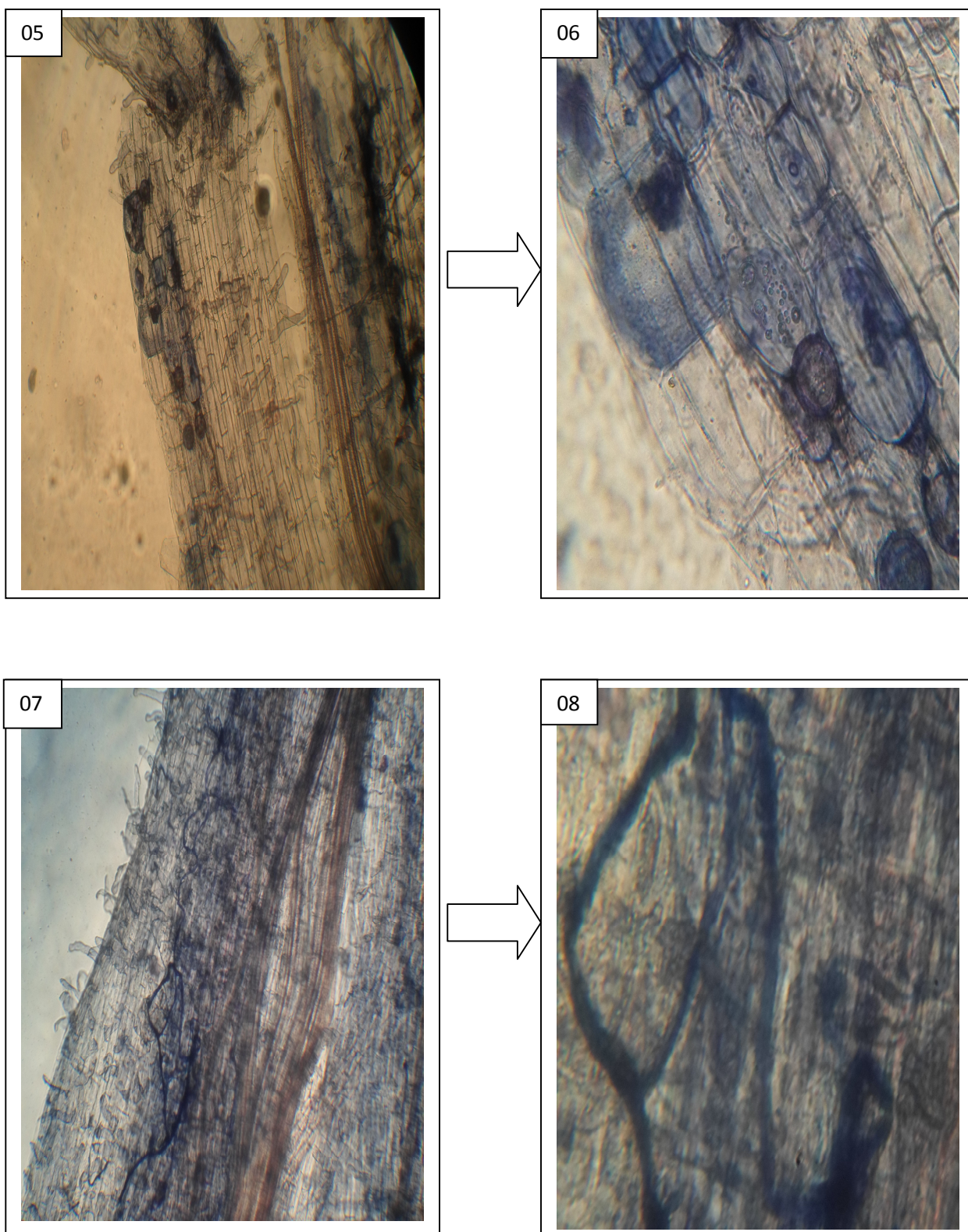


Photo n°10 : Différentes formes de manifestation de l'infection endomycorhizienne.
05-06 : des spores sphériques intra racinaire (**Gx100-gx400**), 07-08 : des arbuscules et
mycéliums (**Gx100-Gx400**), (Kablouti et Bounouar 2016).

1.2.1. Caractérisation phénotypique des *Rhizobia* :

1.2.2.1. Isolement et identification :

Le premier objectif a été d'isoler un nombre aussi important que possible de souches de *Rhizobium* à partir des nodosités racinaires de fève (*Vicia faba* (L.)) et de les identifier morphologiquement et culturellement.

Dans cette étude, 12 isolats ont été isolés à partir des nodules prélevés sur les Légumineuses (*Vicia faba* (L.)). Mais seulement 2 ont été retenus pour la suite de notre travail.

Plusieurs méthodes permettent d'identifier le genre *Rhizobium*. Ces méthodes sont citées par (Vincent ?1970), (Beck *et al* ,1993) et Somasegaran et Hoben ,1994).

1.2.2.2. Examen microscopique :

La coloration de Gram révèle des bâtonnets courts Gram négatif caractérisés par virage de la couleur des cellules bactériennes du violet vers le rose (**figure 14**). Cette caractérisation reste l'un des tests fondamentaux dans la classification de *Rhizobium* (Zhang *et al*, 1991) et présente un premier pas classique pour mieux étudier cette bactérie. Elle reste insuffisante, car la coloration de Gram n'est jamais définitive, du fait que dans la nature un grand nombre d'organismes sont Gram négatif (Clet-Marel, 1992 in Mokrani, 2001).

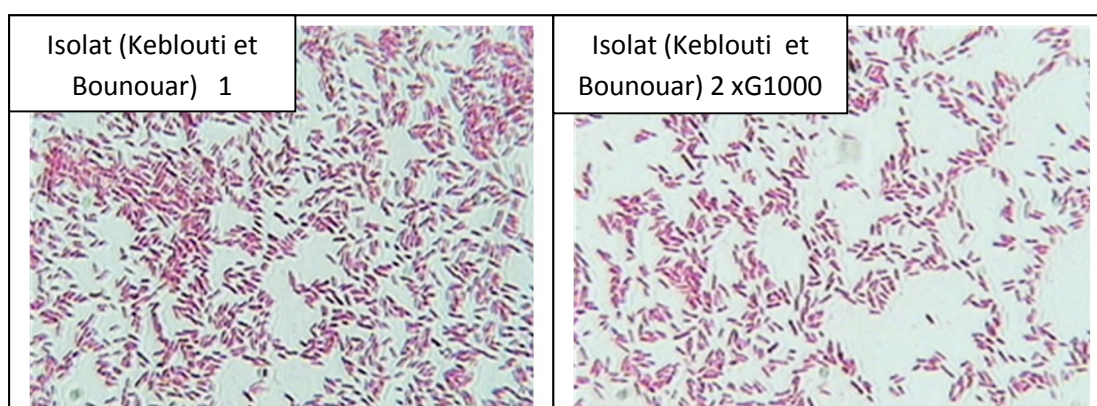


Photo n°11: la coloration de Gram des isolats.

1.2.2.3. Examen morphologique :

Les colonies sur milieu YMA ont été détectées après 120 heures d'incubation à 28 °C. Elles sont de formes circulaires, convexes, semi-transparentes et lisses (**Photo 12**): c'est le cas de *Brady rhizobium* (Bergues *et al*, 1994), qui demeurent très abondantes après 6 à 7 jours,

2.1. Croissance sur les différents milieux de culture :

2.1.1. Sur le milieu YMA –Rouge Congo (RC) :

Les 2 isolats n'absorbent pas ou peu le Rouge Congo, restant ainsi blanchâtres à roses. Ce résultat confirme bien qu'on a affaire à des *Rhizobium* (Vincent, 1970, Jordan, 1984).

2.1.2. Sur milieu GPA + Pourpre de bromocrésol (BCP) :

Les isolats poussent faiblement en ne provoquant pas de changement de pH. Ce qui prouve qu'il s'agit bien de *Rhizobium* et non de contaminants car les contaminants changent la couleur violacée en jaune (Beck *et al* 1993, Somasegaran et Hoben 1994).

Tous ces caractères morphologiques et culturaux sont des tests fondamentaux dans la classification des *Rhizobia* (Zhang *et al*, 1991) mais ils sont insuffisants car ils ne permettent pas la distinction entre les deux genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*.

2.2. Test distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*: Test du 3-Cétolactose :

Après l'inondation des boîtes avec le réactif de Benedict, la plupart des colonies restent toujours blanchâtres (**figure15**), ce qui indique la non-oxydation du C3 glycosyl des saccharides (Bernearts et Deley, 1963). Donc, les isolats ayant donné ce résultat appartiennent bien au genre *Rhizobium*. En effet, seules les souches d'*Agrobacterium* produisent l'enzyme 3-Cétoglucosidase (Kerstens et Deley, 1984) qui se manifeste par la formation d'un halo jaune de $Cu_2 O$ autour des colonies (Kerstens *et al*, 1975).

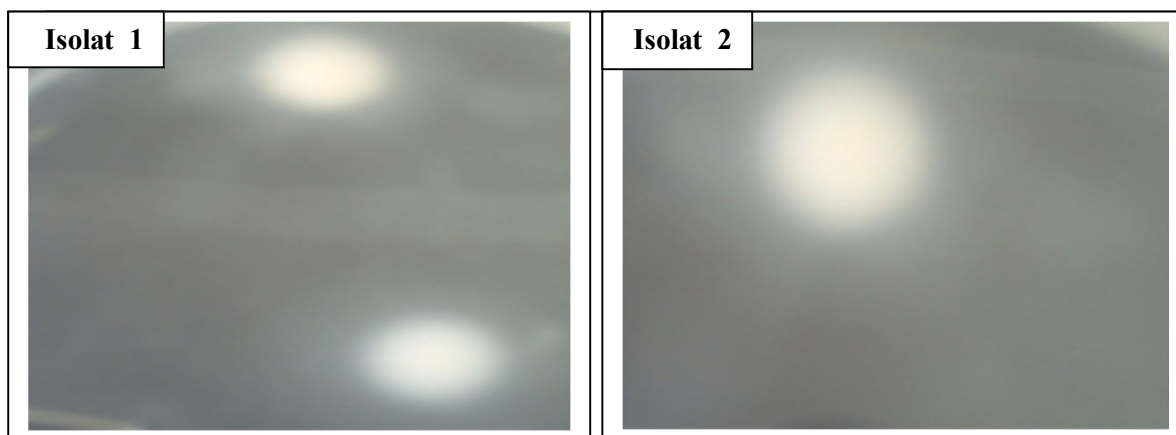


Photo n°12 : test de 3-cétolactose (distinction entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*)
(Kablouti et Bounouar 2016)

Conclusion
Générale

Conclusion et perspectives

Lors du choix de notre thème d'étude, nous nous étions assigné comme objectifs d'analyser le sol de la station de Bougous (W.d'El-Tarf, Nord-Est algérien), de déterminer l'état mycorhizien naturel de la Fève, d'isoler des bactéries fixatrices d'azote N₂ (*Rhizobium*) à partir des nodules racinaires de la plante-hôte et enfin d'essayer de les caractériser.

Au terme de cette étude, il nous est permis d'évoquer les principaux résultats auxquels nous sommes parvenus.

Notre travail nous a permis de mettre en évidence les aspects biologiques et écologiques qui entourent les symbioses endomycorhiziennes (à vésicules et arbuscules) et les symbioses fixatrices d'azote chez la Fève (*Vicia faba l.*) dans la station d'étude.

Nous avons prouvés que notre sol est de texture argileux avec un ph acide(4,51)

Nous avons démontré aussi que les racines prélevées de la station étaient colonisées par les endomycorhizes à vésicules et arbuscules, nous avons pu distinguer la présence de plusieurs spores extra et intra racinaires ainsi que des vésicules de taille et de forme variable.

En ce qui concerne la bactérie fixatrice d'azote nous avons essayé d'isoler plusieurs souches de bactéries puis les purifier ensuite faire un examen microscopique qui est la coloration de Gram qui révèle des bâtonnets courts Gram négatif caractérisés par le virage de la couleur des cellules bactériennes du violet vers le rose et un autre examen morphologique qui démontre que les colonies sur milieu YMA ont été détectées après 120 heures d'incubation à 28 °C. Elles sont de formes circulaires, convexes, semi-transparentes et lisses c'est le cas de *Bradyrhizobium* (Berguey's *et al*, 1994), qui demeurent très abondantes après 6 à 7 jours et pour définir une position taxonomique des souches isolées à partir des nodules de racines de la légumineuse *Vicia faba*. Nos isolats répondent aux deux premiers critères fondamentaux: les caractéristiques culturales et morphologiques et les performances symbiotiques avec la plante –hôte.

En effet, l'aspect, la taille et la couleur des colonies sur Yeast Mannitol Agar, sur le milieu YMA –Rouge Congo (RC) et sur milieu GPA + Pouppe de bromocrésol (BCP) permettent de classer nos souches dans le genre *Rhizobium* à croissance lente.

Devant l'absence de matériel et des réactifs ainsi que l'insuffisance de souches de référence permettant une comparaison avec nos isolats, nous avons été dans l'impossibilité d'identifier les espèces. Nous avons été, par conséquent, contraintes de nous arrêter au rang genre.

Conclusion et perspectives

Associée à la mycorhization, la symbiose fixatrice d'azote ouvrirait des perspectives prometteuses à l'agriculture algérienne et lui éviterait en même temps, l'utilisation massive des engrais permettant, par là- même, des économies budgétaires notables et la protection de notre environnement.

Pour cela, les conditions obligatoires suivantes s'imposent:

- La caractérisation (identification) de souches performantes de bactéries et de champignons pouvant infecter un large éventail de cultures.
- Leur sélection et leur production à une grande échelle en vue de leur mise à disposition des agriculteurs.
- La sensibilisation du monde agricole par l'importance des champignons mycorhiziens et des bactéries fixatrices d'azote dans l'accroissement des rendements (et par conséquent de la production), la diminution de l'utilisation et du coût des intrants (engrais et pesticides), l'amélioration de la qualité des produits ainsi que la préservation de l'environnement par un développement durable où les produits chimiques seront faiblement utilisés.

Références bibliographique

Références bibliographique

A

- **Alloua, 1997** : Contribution à l'étude du sol du complexe humide de l'Algerie.Nord orientale.Cas de "Ain Keiar, Demnet errihane et elKhoubzi .Mémoire d'ingéniorat d'écologie ISN Annaba. **p34**
- **Amarger, 2001** : Rhizobia in the Field. In: Sparks D.L. (Ed): Advances in Agronomy. Academic Press. **p26**
- **Anonyme ,2002** : Larousse agricole publiée sous la direction de Marcel .M.Ed Larousse **p8-p10**
- **Anonyme, 2009** : phytothérapie (aurl/http://aromalive.com/html) **p9-p10**
- **Anonyme, 2010** : utilisant, généralité (pavarde) (www.phytomania.com). **p9**
- **Anonyme, 2011** : encyclopédie des plantes médicinales Larousse **p 34 –p35**
- **Anonyme, 2012** : phytothérapie (url/http://aromalive.com/html) **p9- p10**
- **Auge, 2001** : Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp *raddiana* in Africa. Syst. Appl. Microbio **p24**

B

- **Bago et Lengeter J.W., Drews G., Schlegel H., 2000** : Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. Plant Soil, **P22**
- **Beck et Luttge G., Pienaar B.J., Braune K, 1993** : Pratical Rhizobium-légume technologie manual. Thechnical manual N°19, **p 50-p57**
- **Beck et Leguen J et Duc G., 1993, Somasegaran et Hoben 1994** : Pratical Rhizobium-légume, Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin. **p58**
- **Bedjaoui ,2000 in Ghalbi et Mouada, 2008** : Caractérisation phénotypique et phélogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre

Références bibliographique

Hedysarum: H.carnosum Desf., Hspinossissimum subsp. capitatum Desf. Et H.palidum Desf. Doctorat d'Etat. Université de Constantine. Algérie. **p9**

- **Benjamin.f ,1979** : Medicago-Sinorhizobium symbiotic specificity evolution and the géographique expansion of the Medicago. J.Evol.Biol **p18**
- **Bernearts et Deley, 1963** : A biochemical test for crown gall bacteria. Nature 199, **p59**
- **Berutti, Leary J.K., Singleton P.W., 2014** : Biological nitrogen fixation for sustainab , **p21-p23**
- Borget., 1989; Madigan et Martinko, 2007 : Les légumineuses vivrières. Ed. Maisonneuve et Larose. Paris, **p27**
- **Bucholtz ,1922** : Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New SouthWales. Aust. J. Exp. Agric 31, **P18**

C

- **Chaux et Foury ,1994 in Mezani, 2011** : Production légumière : légumineuses potagères, légumes fruits. Ed. TEC et DOC. Lavoisier. **p6**
- **Claude et Gilbert ,1999** : Agrobacterium transcriptional regulator Ros is a prokaryotic zinc finger protein that regultats the plant oncogene ipt. Proc. Natl. Acad. Sci. **p9.**
- **Clet-Marel, 1992 in Mokrani, 2001** : Protocole de prélèvement et conservation de nodosités récoltées sur des racines de légumineuses. In: Neyra M(Ed): Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse/ rhizobium. INRA. Rome. **p58.**

Références bibliographique

- **Coronado et col. 1995** : The microbial species concept and biodiversity. En: Allsopp, D, Colwell, R. R. et Hawksworth, D. L. (Eds.), Microbial Diversity and Ecosystem Function. CAB International, Cambridge, **p28**.

D

- **Dajoz ,2000 in Mezani ,2011** : Précis d'écologie. Ed. Dunot. Paris. **p3-p6**.
- **De Faria et col. 1989; Hirsh et col, 2001** : La salinité abaisse la conductance des nodosités de légumineuses à la diffusion de l'oxygène, in: Drevon J.J. (Ed), Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin méditerranéen, INRA Editions, les colloques, **p3**.
- **DE Stewart, 1996** : Les arbres fixateurs d'azote: Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Y. Dommergues (ed.). Édition espaces 34. Paris. **p40**
- **Delory et le Clech B., 2003** : Réaménagement forestier des carrières de granulats. Ed. Quae. **p32**.
- **Dominique.m ,2010** : Physiological Mechanisms of Nitrogen Absorption and Assimilation in Plant Under Stressful Condition. In: Pessarakli M. (Ed): Handbook of Plant and Crop Physiology. Marcel Dekker. New York. **p6-p10**
- **Dore et Fabrice ,2006** : L'agronomie aujourd'hui. Ed. Quae. Paris. **p10-p11**
- **Downie, 1998; Ramos et Bisseling, 2004; Downie, 2005** : Function of rhizobia nodulation genes. In: Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykas P.J.J (Eds): the Rhizobiaceae. **p26**.

Références bibliographique

- **Duponnois et Cadet, 1994** : *Sesbania rostrata et Medicago arborea*: des légumineuses fixatrices d'azote. IRD. **p25**.

E

- **Eckardt.j, 2005** : Fixation de l'azote et interactions bactéries-plantes **p20**.

F

- **Fang et Hirsch, 1998** : Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. Plant Physiol. **p30**
- **Foucher et Kondorosi., 2000** : Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. Plant Mol Biol **p2**

G

- **Gallais et Bannerot ,1992** : Amélioration des espèces végétales cultivées. Ed. INRA. Paris. **p6-p13**
- **Garg et Cehandel, 2010** : Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. Braz J Plant Physiol , **p15-p20-p21**
- **Gaussen ,1954** : applique son diagramme au climat **p39**
- **Gharam, 2008** : Stress tolerance in rhizobium and Bradyrhizobium and nodulation under adverse soil conditions. Canandian Journal of Microbiology. **p26**
- **Girard et Borthakur D., 1987** : Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. Antonie van Leeuwenhoek , **p8**
- **Gobat et Scowcroft P. , 2003** : Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. Lett. Appl. Microbiol. **p16**

Références bibliographique

- **Gordon ,2004 in Mezani ,2011** : Evidence of carbon flux shortage and carbon/nitrogen interactions in pea nodules in conditions of water stress. J Exp Bot, **p13**
- **Graham et Vance, 2003** : Legumes:importance and contraintes to greater use. Plantphysiol, **p3**

H

- **Harley et Harley, 1987; Koske et al, 1992 ; Brundrett, 1999** : Effect of P on nodule formation and N fixation in bean, Agron. Sustain. Dev **p19.**
- **Heller et Leary J.K., Singleton P, 2000; Macheix et al, 2005** : Physiologie végétale : Développement. Ed. Dunod. Paris, **P26**
- **Helyette, 2002** : Rhizobium population genetics: genetic
- variation within and between populations from diverse locations. J. Gen. Microbiol **p3-p4-p5**
- **Hirsh et, Lazali M. 2001; Graham, 2007** : What makes the rhizobia. Legume symbiosis so special? Plant Physicol., **P26**

J

- **JF Perrin mise à jour nov.2004/2008** : Diversité des rhizobia associés aux légumineuses pastorales des régions arides, **P31**
- **Johansson et Jeder.H. , 2004** : bacteriol classification. III. Nucleic acids in bacterial classification. Dans *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. sous la direction de: N.R. Krieg et J.G. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland **P25**
- **Joner et Leyval, 2003** : Le role des légumineuses dans la pollution par les nitrates **P25**

Références bibliographique

K

- **Kape et col. 1991** : Identification and typing by of bacteria by protein electrophoresis **P28**.
- **Kerstens et Deley, 1984** : Identification and typing by of bacteria by protein electrophoresis, In Priset F.G., Ramos Comenzan A., Tyndall B. Bacterial diversity and systematics. Ed Plenum Press, New-York., **P59**
- **Krishnan et Bannett, 2007** : Oxidative stress during phosphate deficiency in roots of bean plants, **p26-p27**

L

- **Lebbida.j, 2009** : Caractérisation des rhizobia de quelques acacias d'Algérie en vue de la production d'inoculum pour la bactérisation des acacias en pépinières. Mémoire. Magister. INA. Alger, **P25**
- **Lovelock et al, 2004** : Biodiversité : Dynamique biologique et conservation. Ed. Dunod. Paris. **P16**

M

- **Maatougui ,1996 in Mezani, 2011** : Situation de la culture des fèves en Algérie et perspectives de relance. Céréaliculture, numéro spéciale Fève. ITGC. El Harrach **p14-p15**
- **Maatougui 1996, in Lebbal, 2010.** : Situation de la culture des fèves en Algérie et principales contraintes. Céréaliculture, numéro spécial fève. Ed. ACTES Rabat. **p11-p1**
- **Madigan et Martinko, 2007** : Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson. Paris **P28**
- **Marcel et Kassem M., ,2002** : Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteo bacteria. Nature 411, **p8-p9-p10**

Références bibliographique

- **Mathesius et col, 1998 ; Boot et col, 1999** : Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white, **P30**
- **Maurice et Khadiri M., , 1999** : **Luzerne** : culture, récolte, conservation, utilisation. Ed. France Agricole. Paris, **P5**
- **Miller.b, 1999** : Osmoadaptation by rhizosphere bacteria, Annu. Rev. Microbiol P16
- **Miller, 2003** : Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends Plant Sci. **P16.**
- **Mortreux.s, 2008** : Les légumes du Canada. Ed. NRC Research Press p51
N
- **Norman et Soussi M. 1995** : *Rhizobium ciceri* sp. nov. consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Syst. Bacteriol , **P16**
O
- **Odaton, 1992; Elmerich, 1997; Trinchant et al, 1998** : Influence du déficit hydrique sur la nutrition azotée du soja (*Glycine max* L.). In: Drevon J.J. (Ed): Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin méditerranéen. INRA. Paris. **P31**
- **Oehl et Ocana A., 2011** : Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. Soil Sci. Soc, **p16-p19**
P
- **Parniske, 2000; Werner, 2007** : Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease? Curr. Opin. Plant. Biol. 3: 320-328. Paul S., 1999. Bactériologie. Ed. INRA. Paris .
P27

Références bibliographique

- **Paszkowski, 2006** : La biodiversité. Edition de boeck. **P21**
- **Patriarca et col, 2004 ; Gage, 2004; Stacey et col, 2006** : Organogenesis of légume root nodules. *Int Rev Cytol* 234, **P3**
- **Patrick et al, 2008** : Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* **P6**.
- **Peron 2006 in Mezani, 2011**, Mechanism of soybean nodule adaptation ta different oxygen pressures.
- **Plant, Cell et Environment,:** Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. **Trends** in Microbiology, **P6**
- **Perret et col, 2000** : Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Molec. Biol.* **P29**.
- **Perry et Lawes D., 2004** : Microbiologie : Cours et questions de révision. Ed. Dunod. Paris. **P26**
- **Perry et Lawes D. , 2004; Raven et al, 2003; Dupuy et Nougier, 2005** : Biologie végétale. Ed. De Boeck université. Paris, **P32**
- **Placquert et Girard ,1987** : Comportement biologique comparé d'*Astragalus armatus* Willd. Subsp. **P10**

R

- **Rasanen, 2002** : Biotic and abiotic factors infl uencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis* thèse de doctorat de l'université de Hlsinki. Finlan ,**P29**
- **Requena et Breuninger, 2004** : Biologie végétale. 6ème Edition de boeck ,Paris., **P20**
- **Requena, 2007 ; Pumplin et Harrison, 2009** : Bactérie et environnement. **P20**

Références bibliographique

- **Rillig et Gillis M. , 2006 :** Soybean root nodule acid phosphatase. *Plant Physiol* **P16**
- S**
- **Savka et col, 2002 :** Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes, **P28**
 - **Small et Lluch C, 1998 :** The effect of salinity on the nitrogen fixation in four cultivars of *Medicago sativa* L. in the seedling emergence stage. *Research journal of Agriculture and Biological Sciences*, **P6**
 - **Smith et Read, 2008 :** *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico population genetics and biogeographic implications. *Appl. Environ. Microbiol*, **p23-p25**
 - **Somasegaran et Hoben, 1994 :** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, Berlin, **p48-p51.**
 - **Source station météorologique d'El Tarf, 2013 : P36-38**
 - **Streeter, 1991; Skorpil et Broughton, 2005 :** Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodule. *Adv. Bot*, **P32**
- T**
- **Temmerup, 1988; Morton ,1990 :** What does a bacterial genome sequence represent? Mis-assignment of MAFF 303099 to the genospecies *Mesorhizobium loti*. *Microbiology*, **P20.**

Références bibliographique

- **Timmers et col, 1999** : Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Développement, **P30**.
 - **Tommerup, 1988 ; Trappe et Molina, 1986 ; Sanders, 1996 ; Bever et Moton, 1999 Lanfranco.k, 1999** : taxonomic note: nécessaire correction of specific epithets formed as substantives (nouns) in "apposition". Int. J. Syst. Bacteriol, **P20**
 - **Tortora et Khechai S., 2003**; Saad et al, 2006 : Introduction à la microbiologie. Ed. Renouveau Pédagogique Inc., **P26**
 - **Trappe et Molina, 1986** : Nodulation in legumes. Dickerson (Eds). Royal botanical garden. Kew. united Kingdom, **P20**
 - **Trinchant et La pevronie A., 1998** : Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de Magister. Département de Biologie. Université de Constantine, **P31**
 - **Trouvelot et Bennett J. ,1986** : Fixation symbiotique de l'azote. In: Morot-Gaudry (Ed): assimilation de l'azote chez les plantes; aspect physiologique, biochimique et moléculaire. Eds., **p46**
- V**
- **Van Brussel et col, 1992** : Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: the fate of fast and slow growing microorganisms in soil from different climates. Soil Biology and Biochemistry, **P30**
 - **Vinayak et Bagyaraj, 1990** : **P24**
 - **Vincent ,1970** : The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication. Oxford, United Kingdom, **P57**

Références bibliographique

- **Vincent, 1970, Jordan, 1984** : The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. In: Vincent, J.M. (Ed.). A manual for the practical study of root-nodule. Blackwell Scientific Publications, **P58**

W

- **Wais et col, 2002** : Root growth maintenance at low water potentials increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid. Plant Physiol, **P29**
- **Wang et Qui, 2006** : *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. Int. J. Syst. Bacteriol, **P15**
- **Wasson et col, 2006** : Silencing the Flavonoid Pathway in *Medicago truncatula* Inhibits Root Nodule Formation and Prevents Auxin Transport Regulation by rhizobia. Plant Cell. **P30**
- **Wolfgang et Sadiki, 1996** : Symbiosis of plants and microbes. Edition Chapman & Hall. Germany, **p9- p14**
- **Wood et Newcomb, 1989** : Soil acidity factors and nodulation of *Trifolium repens*. Plant **P29**

Z

- **Zhang et Kvien C., 1991** : Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection, **P58**

ANNEXES

Annexes 1 : Milieux de Culture

- Yeast-Mannitol-Agar (YMA) (Vincent, 1970)

(g/l) :

K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Mannitol	10
Extrait de levure	0.4
Agar	15
Eau distillée	1000

Yeast-Mannitol-Agar + Rouge Congo : Avant de stériliser le milieu on rajoute 10ml d'une solution aqueuse de Rouge Congo à 0.25%.

Annexes 2 : Milieux de Culture

- Yeast-Mannitol- broth (YMB) (Vincent, 1970)

(g/l) :

K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Mannitol	10
Extrait de levure	0.4
Eau distillée	1000

Annexes 3 : Milieux de Culture

- **Composition du milieu YMA + rouge Congo en g/l (Vincent, 1970).**

Solution stock de rouge Congo (250mg/100ml) 1ml

YMB	1000ml
Agar	15
Ph	6, 8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes.

- **Composition du milieu YMA+BTB (bleu de bromothymol) (g/l) :**

YMB	1000ml
Agar	15
Ph	6, 8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes.

- **Composition du milieu GPA (Glucose peptone agar) + BCP (pourpre de bromocrésol) (g/l) :**

Glucose	10
Peptone	5
Eau distillée	1000ml
Agar	15
Ph	6, 8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes.