

# UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologies

## MÉMOIRE DE MAGISTER

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Phytopathologie

**ESSAI DE RHIZODÉGRADATION DES ÉLÉMENTS DE TRACE MÉTALLIQUES  
(CAS DU CUIVRE ET DU CADMIUM) PAR *Bradyrhizobium* sp. PRÉLEVÉ SUR  
*Lotus ornithopodioides* ET ANALYSE DE SON ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE.**

Par

**Hoceme DEGAÏCHIA**

Devant le jury composé de :

H. BELKAHLA	Professeur	U.Blida 1	Présidente
F.Z. CHAOUCH	Maître de conférences A	U.Blida 1	Promotrice
A. BADIS	Professeur	U.Blida 1	Examineur
S. AMRANI	Maître de conférences A	USTHB	Examineur
A. ALI OUSALAH	Maître assistant A	U.Blida 1	Invité

Blida, Octobre 2015

## RÉSUMÉ

### **Essai de rhizodégradation des Éléments de Trace Métalliques (cas du cuivre et du cadmium) par *Bradyrhizobium* sp. prélevé sur *Lotus ornithopodioides* et analyse de son activité antifongique.**

La capacité de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) à promouvoir le contournement du stress abiotique chez *Lotus ornithopodioides*, ainsi que son rôle potentiel comme agent de bio contrôle à l'égard de trois champignons phytopathogènes fut l'objet de notre étude.

Notre microorganisme test a subi une caractérisation ciblée, une détermination de sa métallosensibilité envers le cuivre, le cadmium et leur association. La CMI pour ces deux ETMs a également été explorée. Une étude de l'effet antifongique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albiginosum* (FOA), *Diplodia seriata* (DS) et *Neofusicoccum parvum* (NP), a également été abordée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne et la mise en évidence de certains composés impliqués dans cette activité (Acide indole acétique, Ammoniac, Acide cyanhydrique).

*Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) affiche une haute résistance à l'encontre du cuivre et du cadmium. Elle est de 3000 µg/ml pour le cuivre et supérieure à 6000 µg/ml pour le cadmium. La croissance bactérienne est de ce fait en corrélation positive avec la concentration en cuivre et en cadmium. *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) ne présente pas d'activité antifongique envers *Diplodia seriata* (DS), *Fusarium oxysporum* f.sp. *albiginosum* (FOA) et *Neofusicoccum parvum* (NP). Par contre une production d'AIA à une concentration de 70,2 µg/ml, et de NH<sub>3</sub> a été remarquée, mais pas de production d'acide cyanhydrique (HCN).

Le rôle de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) inoculé dans le contournement du stress métallique chez le lotier a été abordé. Les perturbations physiologiques et biochimiques observées ont permis d'évaluer la tolérance des graines (inoculées et non inoculées) vis à vis du cadmium, du cuivre et de leur mélange et suggère que les graines germées, pré-inoculées par *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*), en conditions métalliques, mettent en place un système d'exclusion des éléments toxiques. Plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques, caractéristiques des stress,

ont été étudiés, d'une part le taux, la moyenne, la cinétique, la vitesse, le taux cumulé et l'inhibition de la germination d'autre part la réversibilité de l'inhibition, l'action toxique des ETMs, la teneur en sucres solubles totaux, la proline, les acides aminés solubles, l' $\alpha$ -amylase et enfin la teneur en ADN.

Nos résultats révèlent une augmentation statistiquement significative des valeurs de l'ensemble des paramètres physiologiques des essais inoculés par *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*). *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) influence également le comportement du cuivre et du cadmium en mélange. Le rapport d'inhibition (R.I) diminue significativement. L'interaction entre les deux ETMs à la concentration de 3000 : 6000  $\mu\text{g/ml}$  (Cu : Cd) est du type « antagonisme » contrairement aux essais non-inoculés où cette dernière est du type « additivité ». Les solutés compatibles (sucres solubles totaux, acides aminés, proline) voient leurs valeurs diminués significativement par rapport aux essais non-inoculés, contrairement aux teneurs en  $\alpha$ -amylase et en ADN qui augmentent significativement en présence de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*).

Nos résultats suggèrent que *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) agit, non pas par stimulation des défenses naturelles du végétal, mais par chélation des ETMs afin de les rendre moins disponible dans le milieu ou encore par la production de phytochélatines et ainsi contribuer à l'installation d'une tolérance de *Lotus ornithopodioïdes* envers le cuivre et le cadmium.

**Mots clés** : ETMs, Rhyzodégradation, *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*), *Lotus ornithopodioïdes*, cuivre, cadmium, CMI, inoculation, germination, bio contrôle

## REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma reconnaissance à ma promotrice, Mme. **CHAOUCH. F.Z.** ainsi qu'à **Mr ALI OUSALAH A.** pour m'avoir supervisé directement, tout en me laissant une grande marge de manœuvre et de liberté pour gérer mon projet. Ils ont toujours été présents et disponible quand cela s'avérait nécessaire.

A Mme **.Pr. BELKAHLA H.** qui m'a facilité grandement l'exécution du travail pratique en m'accueillant au sein de son équipe de recherche et qui cerise sur le gâteau m'a fait l'honneur de présider le jury.

Mes remerciements vont également vers le **Pr. BADIS. A.** et le **Dr. AMRANI.S** qui ont acceptés d'examiner ce modeste travail. La contribution de ces deux compétences « l'une du département d'environnement de l'US Blida, l'autre de l'USTHB » enrichira certainement le débat, nous en sommes plus que convaincus.

A Mme. **Dr BOUCHENAK. F.**, qui mérite tout mon respect et ma profonde gratitude pour ses précieux conseils tout au long de mon humble travail.

Je remercie également Mme. **BRIKI F.** qui grâce à elle, ce projet a pu voir le jour, elle m'a toujours guidé, aider et cru en moi même dans mes moments de doutes.

A Mme. **BOUDJEMIA. M.** ; Mme **HADJ KADDOUR .A.** Mme **BOUHADHJA. H.** ; Mme **SABRI K.** et Mme. **REMMINI. L.** qui m'ont encouragée, non seulement dans le laboratoire, mais également dans les couloirs du département. Qu'elles trouvent ici l'expression de mon profond respect et de ma parfaite ma gratitude.

Je remercie Mme. **Pr. BENRIMA. A.** et Mme. Dr. **CHAOUIA. C.** de m'avoir épaulé tout au long de mon cursus universitaire, lors de la réalisation de ce travail et encore plus en phase finale.

Je remercie chaleureusement Mme. **MOKHTARI. A.** avec qui j'ai passé les trois plus belles années d'université et qui a laissé un énorme vide derrière elle.... merci à toi.

Mes remerciements vont également à tout le staff administratif et le corps enseignant du département des biotechnologies et surtout à Mme. **BERRAI H.** sans oublier **Malika** et **Amina.** Ma gratitude va également aux ingénieurs et techniciens des laboratoires du département : **Walid, Samia, Nassima, Ghania, Zakia, Nadjia, Amina et Djamila.**

**Housseem.**

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION .....	5
CHAPITRE 1 : LES ÉLÉMENTS-TRACES MÉTALLIQUE .....	8
1.1. Introduction .....	8
1.2. Notions de dose et de temps d'exposition .....	9
1.3. Transferts sol-plante des éléments-traces.....	9
1.4. Mécanismes de prélèvement des éléments-traces.....	10
1.5. Offre du sol en éléments-traces .....	12
1.6. Facteurs de prélèvement des ETM .....	13
1.7. Devenir des éléments-traces dans la plante.....	18
1.8. Mécanismes de transport des éléments-traces au sein du végétal .....	19
CHAPITRE 2 : LA GERMINATION.....	22
2.1. Introduction .....	22
2.2. Morphologie de la graine.....	23
2.3. Dormance et levée de dormance .....	24
2.4. Conditions de la germination.....	25
2.5. Physiologie et biochimie de la germination.....	27
2.6. Activité enzymatique au cours de la germination.....	29
2.7. Enzymes d'hydrolyse des réserves .....	31
CHAPITRE 3 : COMMUNAUTÉ MICROBIENNE RHIZOSPHERIQUE .....	33
3.1. Introduction .....	33
3.2. Effets bénéfiques des rhizobactéries.....	34
3.3. Les champignons phytopathogènes ( <i>Fusarium</i> et <i>Botryosheria</i> ) .....	39
3.4. La résistance des bactéries aux éléments-traces métalliques .....	40

CHAPITRE 4: GÉNÉRALITÉS SUR LA PHYTOREMÉDIATION.....	43
4.1. Introduction .....	43
4.2. Définitions et généralités .....	43
CHAPITRE 5 : INTÉRÊTS DES LÉGUMINEUSES .....	47
5.1. Intérêts agronomiques des légumineuses .....	47
5.2. Intérêt alimentaire des légumineuses .....	47
5.3. Intérêts scientifiques des légumineuses .....	48
CHAPITRE 6 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	50
6.1. Métallo-résistance et activité biocontrôle de Bradyrhizobium sp. (Lotus).....	50
6.1.1. Objectif du travail .....	50
6.1.2. Souche bactérienne .....	50
6.1.3. Détermination in-vitro de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des éléments-traces métalliques (ETMs) .....	51
6.1.4. Activité biocôntrole de Bradyrhizobium sp. (Lotus) .....	52
6.1.4.1. Effet antifongique de Bradyrhizobium sp. (Lotus) .....	52
6.1.4.2. Production de l'acide indole acétique (AIA) .....	52
6.1.4.3. Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ) .....	53
6.1.4.4. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) .....	53
6.2. Implication de Bradyrhizobium sp. (Lotus) dans le contournement du stress métallique chez le lotier. ....	54
6.2.1. Objectif du travail .....	54
6.2.2. Données pédoclimatiques et matériel végétal .....	54
6.2.3. Protocole de germination et capacité germinative .....	62
6.2.4. Effet de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur les paramètres physiologiques en présence des éléments-traces.....	63
6.2.4.1. Cinétique de germination .....	64
6.2.4.2. Taux de germination final .....	64
6.2.4.3. Moyenne de germination journalière .....	65
6.2.4.4. Taux cumulé de germination .....	65
6.2.4.5. Vitesse de germination.....	65
6.2.4.6. Inhibition de la germination .....	65

6.2.4.7. Réversibilité de l'action du cuivre et du cadmium .....	66
6.2.4.8. Toxicité des ions et des effets osmotiques sur la germination .....	66
6.2.3. Effets de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur les paramètres biochimiques en présence des éléments-traces métalliques.....	69
6.2.3.1. Dosage de l' $\alpha$ -amylase.....	69
6.2.3.2. Teneur en sucres solubles totaux.....	71
6.2.3.3. Dosage des acides aminés solubles et de la proline .....	73
6.2.3.4. Détermination de la teneur en ADN.....	75
6.2.4. Analyses statistiques.....	77
 CHAPITRE 7 : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	 79
7.1. Métallo-résistance et activité biocontrôle de Bradyrhizobium sp. (Lotus).....	79
7.1.1. Détermination de la CMI du cuivre .....	79
7.1.2. Détermination de la CMI du cadmium .....	81
7.1.3. Activité biocontrôle de Bradyrhizobium sp. (Lotus) .....	87
7.2. Effets de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur les paramètres physiologiques en conditions métalliques .....	90
7.2.1. Évolution du taux de germination final.....	90
7.2.2. Cinétique de germination .....	93
7.2.3. Moyenne de germination journalière .....	96
7.2.4. Taux cumulé de germination .....	98
7.2.5. La vitesse de germination .....	99
7.2.6. Inhibition de la germination .....	101
7.2.7. Réversibilité de l'inhibition de la germination.....	102
7.2.8. Détermination de la toxicité des ions sur la germination.....	103
7.2.9. Combinaison du cuivre et du cadmium.....	104
7.3. Effets de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur les paramètres biochimiques en conditions métalliques .....	106
7.3.1. Teneur en sucres solubles totaux.....	106
7.3.2 Teneur en acides aminés solubles .....	107
7.3.3. Teneur en Proline .....	109
7.3.4. Teneur en $\alpha$ -amylase .....	111
7.3.5. Teneur en ADN .....	102
7.4. Interactions inter-paramètres .....	104

7.5. Discussion générale.....	122
7.5.1. Métallo-résistance de Bradyrhizobium sp. (Lotus).....	122
7.5.2. Activité bio contrôle de Bradyrhizobium sp. (Lotus).....	124
7.5.3. Effets de l'inoculation par Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur la germination du lotier sous stress métallique. ....	126
CONCLUSION.....	134

## APPENDICES

APPENDICE A: Préparation des milieux et réactifs.

APPENDICE B: Courbes étalons.

APPENDICE C: Analyses statistiques

APPENDICE D: Tableaux des calculs

APPENDICE E: Liste des symboles et abréviations

## REFERENCES



## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1. 1 : Répartition des élément-traces dans les différentes phases du sol à un instant 't'.....	14
Figure 1. 2 : Réponse des plantes à la présence de métaux dans le sol. ....	16
Figure 1. 3: Circulation de la sève brute et de la sève élaborée au sein d'une plante verte.....	21
Figure 2. 1 : Morphologie d'une graine de <i>Fabaceae</i> .....	24
Figure 2. 2 : Courbe théorique d'imbibition.....	29
Figure 2. 3: Structure d'amylopectine.....	31
Figure 2. 4 : Hélice d'amylose.....	31
Figure 3. 1 : Rôle de l'AIA dans l'amélioration de la croissance des plantes .....	39
Figure 4. 1 : Les processus impliqués dans la phytoremédiation.....	47
Figure 6.1 : Incubation de <i>Bradyrhizobium</i> sp. (Lotus) avec agitation en conditions métalliques (100rpm).....	52
Figure 6.2 : Lotus ornithopodioïdes au stade floraison .....	56
Figure 6.3 : Stations d'échantillonnage de Lotus ornithopodioïdes .....	57
Figure 6.4 : Diagramme Ombrothermique de Gaussen pour la région du Blida (1995-2010).....	60
Figure 6.5: Climagramme d'Emberger pour la région de Blida .....	62
Figure 6.6 : Scarification des graines .....	63
Figure 6.7: Mise en germination des graines.....	64
Figure 6.8: Dosage de l' $\alpha$ -amylase.....	71
Figure 6.9: Dosage des sucres solubles totaux.....	73
Figure 6.10: Dosage des acides aminés solubles et de la Proline.....	75

Figure 6.11: Dosage de l'ADN.....	77
Figure 7.1: Effet du cuivre sur la croissance de Bradyrhizobium sp. (Lotus).....	80
Figure 7.2: Répartition des concentrations en cuivre dans des sous-ensembles homogènes. ....	82
Figure 7.3 : Effet du cadmium sur la croissance de Bradyrhizobium sp. (Lotus).....	84
Figure 7.3 : Répartition des concentrations en cadmium dans des sous-ensembles homogènes .....	84
Figure 7.5 : Effet prédictif in-silico du cadmium sur la croissance de Bradyrhizobium sp. (Lotus) basé sur le modèle de la régression linéaire simple.....	88
Figure 7. 6. Activité bio contrôle de Bradyrhizobium sp. (Lotus) .....	90
Figure 7. 7 : Effets du stress métallique sur le taux de germination final en (%) des graines du lotier en présence et en absence de Bradyrhizobium sp. (Lotus).....	91
Figure 7. 8 : Effets du stress métallique sur la cinétique de germination du lotier non inoculé par Bradyrhizobium sp. (Lotus) .....	94
Figure 7.9: Effet de l'inoculation par Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur la cinétique de germination du lotier sous stress métallique.....	95
Figure 7.10: Effet de l'inoculation par Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur la variation du taux moyen de germination journalier (%) du lotier.....	97
Figure 7.11 : Effet de l'inoculation par Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur le taux cumulé de germination (%) du lotier. ....	99
Figure 7. 12 : Effet de l'inoculation par Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur le temps moyen de germination (jours) du lotier. ....	100
Figure 7.13: Effet de l'inoculation par Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur le taux d'inhibition de germination (%) du lotier.....	102
Figure 7.14 : Absence de réversibilité de l'inhibition de la germination du lotier .....	104
Figure 7.15 Taux de germination final du lotier sur les solutions iso-osmotiques comparé aux différentes concentrations d'ETMs.....	105

Figure 7.16 : Germination du lotier sur les solutions iso-osmotiques de mannitol...	105
Figure 7.17 : Effet de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur le rapport d'inhibition de la germination (R.I)(%) et la combinaison cuivre/cadmium.....	106
Figure 7.18 : Effet de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur la teneur en sucres solubles totaux ( $\mu\text{g/g M.F}$ ) des graines du lotier en conditions métalliques. ....	107
Figure 7.19: Effet de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur la teneur en acides aminés solubles ( $\mu\text{moles eq. leucine/g M.F}$ ) des graines du lotier en conditions métalliques.....	109
Figure 7.20 : Effet de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur la teneur en Proline ( $\mu\text{g/g MF}$ ) des graines du lotier en conditions métalliques. ....	110
Figure 7. 21: Effet de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur la teneur en $\alpha$ -amylase (U/ml) des graines du lotier en conditions métalliques. ....	112
Figure 7.22 : Effet de Bradyrhizobium sp. (Lotus) sur la teneur en ADN ( $\mu\text{mol/g MS}$ ) des graines du lotier en conditions métalliques. ....	117
Figure 7.23: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cadmique sans inoculation) .....	115
Figure 7.24: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cadmique avec inoculation) .....	117
Figure 7.25: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cuprique sans inoculation).....	118
Figure 7.26: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cuprique avec inoculation).....	119
Figure 7.27: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cuprique/cadmique sans inoculation) .....	121

Tableau 1. 1 : Teneur « normale » en ETM dans les plantes. ....	17
Tableau 1.2: Interactions positives et négatives entre éléments présents dans le sol. ....	19
Tableau 5.1 : Composition chimique de Lotus ornithopodioïdes au stade floraison..	49
Tableau 7.1 : Corrélacion entre la concentration en cuivre et la croissance de Bradyrhizobium sp. (Lotus) .....	81
Tableau 7.2: Corrélacion entre la concentration en cadmium et la croissance de Bradyrhizobium sp. (Lotus) .....	83
Tableau 7.3 : analyse de variance pour le modèle de régression .....	86
Tableau 7.4 : Récapitulatif du modèle de régression.....	86
Tableau 7.5 : Paramètres de l'équation du modèle de régression .....	87
Tableau 7.6 : Matrice des composantes (milieu cuprique/cadmique avec inoculation).....	122

## INTRODUCTION

Le développement durable prend de plus en plus de place dans les politiques de développement à l'échelle mondiale. Il est donc hautement incompatible avec un environnement pollué par des composés toxiques comme les éléments-traces métallique. Ces derniers, composés stables et hautement persistants, voir récalcitrants sont considérés comme composés hautement contaminants de l'environnement ; pouvant être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique [1], [2]

Certains métaux sont toxiques même à faible concentration [3], les microorganismes se trouvent être les premiers organismes subissant le contre coup de cette toxicité [4]. Ces composés provoquent divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence [5], l'inhibition des activités enzymatiques [6], l'altération de la structure de l'ADN [7]; [8], la modification de la répartition des populations microbiennes [9]; [10], jusqu'à la réduction de la diversité microbienne [11]. Les microorganismes (surtout les bactéries) considérés comme édificateur, régulateur, fixateur, stabilisateur jouent un rôle prépondérant dans l'environnement tel que la fixation de l'azote atmosphérique par les rhizobactérie. Les facteurs affectant leur diversité ainsi que leur activité peuvent grandement menacer la fertilité des écosystèmes et de fait leur pérennité.

Pour faire face à la profusion d'éléments-traces métallique dans l'environnement, les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes leur permettant de persister et/ou de croître, ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculés par des plasmides [12].

La présence des éléments-traces métallique dans le milieu édaphique est souvent rapportée dans la littérature, et il est d'autant plus surprenant qu'aucune étude comparée de la survie (*in situ* ou *in vitro*), des bactéries sensibles ou résistantes aux éléments-traces métallique n'ait reçu l'importance qu'elle mérite.

Pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), étudier la toxicité, mesurer l'accumulation des éléments-traces métallique chez les bactéries, il est pratiquement impossible d'échapper aux problèmes de complexations (ou de chélation) et de précipitation provoqués par l'interaction composants organiques ou minéraux des milieux de cultures - éléments-traces métallique. Les chercheurs, ont recours à des artifices divers comme tamponner les milieux, diminuer le pH du milieu, réduire la concentration des composés organiques du milieu, éliminer certains composants, mise au point de milieux adaptés, méthodes diverses basées sur la mesure de l'activité respiratoire, l'observation au microscopique à épi fluorescence, bioluminescence, mesure de la consommation de substrats marqués, etc...[8]

La toxicité due aux fortes concentrations en ions métalliques dans le sol induit diverses modifications structurales, biochimiques, physiologiques des semences [13] et réduit le taux de germination entraînant un retard dans le développement des plantes [14].

Beaucoup de travaux ont été menés dans le but de réduire l'effet du stress métallique sur la croissance et la productivité des plantes. La plupart ne s'intéressent qu'au développement des variétés résistantes aux ETMs.

En effet, certaines variétés ont développé moult mécanismes biochimiques et/ou physiologiques pour lutter contre ce type de stress. Un tel mécanisme, observé chez beaucoup de plantes, se résume en l'accumulation de certains métabolites organiques de faible poids moléculaire, en particulier lors de la germination et la croissance précoce [15]; [16] ;[17]

Si les variétés de fabacées capables de procurer des rendements élevés sur les sols modérément affectés par les ETMs pourraient être améliorées, les productivités de ces terres n'en seraient que multipliées. Il est donc urgent de développer des techniques appropriées pour une meilleure capacité de production des fabacée à caractère fourragé dans les endroits irrationnellement cultivés ou encore pas cultivés.

L'approche biologique existe et consiste en l'inoculation des plantes par des rhizobactéries induisant leur croissance et leur résistance au différent stress biotiques et abiotique. Cette dernière constitue une solution prometteuse aux problèmes posés par les ETMs dans les zones agricoles.

Toutefois, la capacité à coloniser les racines, de survie de ces bactéries dans le sol est souvent limitée [18]. Ainsi, la sélection et l'utilisation des rhizobactéries, devrait tenir compte de l'adaptation de l'inoculum à la plante et à l'écosystème particulier. L'élaboration de mesures efficaces pour les *inocula* microbiens demeure un défi scientifique majeur [19]. Sous des conditions de stress métallique, les rhizobactéries ont montrées des effets positifs chez les plantes, en particulier sur les paramètres physiologiques tels le taux de germination [20].

Ces rhizobactéries sont capables de s'adapter à des conditions défavorables ainsi que d'améliorer la croissance des plantes dans des milieux à forte osmolarité [21];[22]. Elles ont développé des mécanismes moléculaires leur permettant de survivre et de croître avec l'augmentation de la concentration en ETMs [23]. Selon de nombreux auteurs, la plupart des bactéries métallo-tolérante accumulent ou synthétisent des solutés organiques compatibles, tels la proline, la glycine, la bétaine et la bétaine- glutamine.

Au vu de ces études, il ressort que l'inoculation par les rhizobactéries (rhizodégradation) pourrait atténuer les effets négatifs du stress métallique sur la croissance d'une fabacée fourragère à savoir (*Lotus ornithopodioïdes*).

Les objectifs tracés de ce modeste travail s'appuient grandement de ces assertions. Il s'agit à travers la présente étude d'évaluer les conséquences de l'inoculation par une souche de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur la germination des graines et sur les paramètres physio-biochimiques du le lotier sous stress métallique.

## CHAPITRE 1

### LES ÉLÉMENTS-TRACES MÉTALLIQUE

#### 1.1. Introduction

Les éléments sont dits traces par rapport à leur concentration massique dans un certain milieu. Lorsque leur teneur est inférieure à un pour mille en moyenne dans la croûte terrestre, ce sont des éléments-traces de la croûte terrestre. Lorsque leur concentration est inférieure à 0,1 pour mille dans les êtres vivants (certains auteurs donnant une limite de 1 % dans les plantes), ils sont qualifiés d'éléments-traces des êtres vivants. Certains métaux sont des éléments majeurs (Ca, Mg, K), d'autres des éléments-traces (Zn, Cd, Cu, Co, Cr, Tl, Hg, Ni, Mo, Pb). Certains métalloïdes ou non-métaux sont des éléments majeurs (C, O), d'autres des éléments-traces (Se, As).

La dénomination élément-trace est parfois confondue avec celles de métal lourd, de micro-polluant métallique ou encore d'oligo-élément. Le terme de micro-polluant métallique implique trois notions :

- élément-trace,
- qui pollue (c'est-à-dire dont l'accumulation, au-delà d'un certain seuil dans le milieu, revêt un danger pour les organismes),
- métallique.

Les oligo-éléments sont des éléments-traces indispensables aux êtres vivants. Ces derniers sont carencés si la concentration de ces éléments dans leurs tissus est inférieure à un seuil. Les oligo-éléments ne sont pas les mêmes pour les animaux et pour les plantes.

Les **métaux lourds** sont des métaux formant des précipités insolubles avec les sulfures. D'autres définitions existent : métaux dont la masse volumique est supérieure à



6 g.ml<sup>-1</sup> (parfois la définition donne une limite de 4,5 ou 5,0 g.ml<sup>-1</sup>) ; métal dont le numéro atomique est supérieur à 20.

Les métaux lourds sont réputés toxiques, d'autres sont dits oligo-éléments (Cu, Zn, Fe). Ainsi le terme de métal lourd est souvent appliqué à tort à des éléments en raison de leur toxicité. De plus, certains éléments sont déclarés métaux lourds alors qu'ils sont des métalloïdes (Se, As) ou qu'ils ne sont pas « lourds » (Be, Al). De ce fait, il est préférable de ne pas utiliser ce vocable, pour moins d'ambiguïté.

### **1.2. Notions de dose et de temps d'exposition**

Les notions de dose et de temps d'exposition sont fondamentales pour l'étude des éléments-traces. L'exposition aiguë des organismes vivants à une dose élevée d'élément-trace (qu'il soit oligo-élément ou contaminant strict) ou bien l'accumulation dans les tissus suite à une exposition chronique, entraînent des effets de toxicité. Le passage de la fonction d'oligo-élément à celle d'élément toxique dépend de la nature, de la teneur et de la disponibilité de l'élément et du milieu considéré.

### **1.3. Transferts sol-plante des éléments-traces**

Les plantes sont exposées de deux façons aux éléments-traces : par les parties aériennes ainsi que par parties souterraines (les racines).

Les éléments-traces peuvent être déposés à la surface des feuilles et des racines (dans ce cas un lavage à l'eau en enlève une partie) ou pénétrer dans la plante. Ils peuvent y pénétrer par les parties aériennes (feuilles, tiges, fruits), à partir de particules en suspension dans l'air, de composés gazeux (notamment pour le Hg et le Se) ou de composés dissous dans l'eau de pluie ou d'irrigation.

Ils peuvent pénétrer par les racines à partir du sol. Une fois prélevés par la plante, les éléments-traces peuvent être piégés et ne pas circuler dans la plante, ou alors être transportés du lieu de l'absorption vers un autre organe végétal.

Dans les zones de forte pollution atmosphérique, comme à proximité d'une usine de fabrication d'alliages de métaux ou aux abords d'une autoroute, les retombées atmosphériques de métaux sur les parties aériennes des plantes, par les pluies ou par les poussières (projections de terre polluée ou poussières émanant des industries), sont importantes. Dans ce cas, la contamination des feuilles, tiges et fruits est élevée. Une partie de cette contamination peut être enlevée par simple lavage à l'eau, preuve qu'elle reste à la surface des parties aériennes en dépôt superficiel. Une autre partie reste piégée dans les feuilles. Il est vraisemblable qu'une troisième partie des éléments-traces peut être transportée dans la plante, mais son importance reste controversée.

#### **1.4. Mécanismes de prélèvement des éléments-traces**

La phytodisponibilité d'un élément-trace peut être définie comme la quantité d'élément pouvant être transférée (« prélevée ») dans la plante durant son développement [24]. Elle est la résultante d'un ensemble de processus successifs qui contribuent au transfert de l'élément de la phase solide du sol à la solution du sol puis aux tissus de la plante : l'offre du sol, le transport vers les racines, et le prélèvement par les racines en lui-même. Les éléments-traces se retrouvent sous deux formes dans le sol : soluble ou solide. Les formes solides sont quantitativement majoritaires. Dans la phase solide, un élément peut être réparti en deux compartiments : des ions pouvant passer en solution et des éléments non mobilisables. Les formes solubles, bien que minoritaires, jouent un rôle prépondérant, puisque les racines des plantes prélèvent les éléments-traces uniquement dans la solution du sol (c'est-à-dire l'eau du sol : composée d'eau, d'éléments et de molécules dissous) [24].

Plus la concentration d'un élément (sous sa forme chimique absorbable par la plante) est importante dans la solution du sol, plus la plante peut prélever cet élément. La répartition des éléments-traces entre la phase solide et la phase liquide du sol est en perpétuel changement. Il s'agit d'une suite d'équilibres chimiques, modifiés par les conditions physiques et chimiques du sol, ainsi que par l'intervention des organismes vivants. L'action anthropique notamment peut exercer une influence sur ces équilibres, par le chaulage, l'épandage des matières organiques, l'apport d'éléments sous forme soluble (engrais aux Cu), en acidifiant les sols par les retombées de l'activité industrielle,

etc... La fourniture de l'élément à la solution du sol par la phase solide peut être qualifiée d'« offre » du sol [25]; [24]. L'offre du sol n'est pas forcément plus importante quand la concentration totale de l'élément dans le sol est élevée

Les éléments-traces de la solution du sol sont transportés vers la rhizosphère, zone de sol proche de la racine, et en interaction avec elle. Une fois dans la rhizosphère, ils sont prélevés par la racine. Presque tous les éléments absorbés par la racine sont sous forme minérale [26].

Les cellules végétales disposent d'une paroi, perméable à la solution du sol, entourant la membrane plasmique. La plante prélève essentiellement l'élément sous forme ionique, mais les complexes inorganiques semblent pouvoir être absorbés (CdCl<sup>+</sup> par exemple) bien que ne traversant généralement pas la membrane cytoplasmique des cellules racinaires. La paroi peut être considérée comme une éponge pouvant fixer les éléments-traces, mais ne faisant pas partie du milieu intérieur de la plante. Quand on récolte une plante à tubercules, type carotte, une bonne partie des éléments-traces contenus dans le tubercule sont en réalité dans la paroi.. ***Ceci explique que de nombreuses plantes ont tendance à accumuler les éléments-traces plutôt dans les racines que dans les parties aériennes.***

Une partie des éléments-traces peut pénétrer réellement dans les cellules des racines par des voies plus ou moins spécifiques et plus ou moins régulées. Dans ce cas, il s'agit d'une réelle absorption, qui permet aux éléments-traces de migrer dans le végétal vers d'autres organes. Le prélèvement du Zn, oligo-élément des transporteurs membranaires spécifiques actifs. Le Cd, élément non essentiel, semble pénétrer dans les cellules racinaires en empruntant les voies d'autres cations, comme les transporteurs du Fe, du Mn. La simple fixation dans la paroi et l'absorption sont regroupées sous le terme général de « prélèvement » par la plante.

### **1.5. Offre du sol en éléments-traces**

Lorsque l'élément est dissous dans la solution du sol, il n'a aucune liaison chimique avec la phase solide du sol. Les concentrations en éléments-traces de la solution sont toujours extrêmement faibles, par exemple  $1-8 \times 10^{-8}$  mol/l (Cu),  $2-8 \times 10^{-8}$  mol/l (Mo) ou  $3 \times 10^{-3} \times 10^{-6}$  mol/l (Zn) [27].

Différentes formes chimiques coexistent dans la solution du sol :

- des cations libres (exemple :  $Zn^{2+}$ ,  $CdCl^+$ ,  $Cd^{2+}$ ) ;
- des anions libres (exemple :  $As_2O^{2-}$ ,  $SeO_4^{2-}$ ) ;
- des complexes minéraux neutres (exemple :  $CuCO_3$ ,  $CdSO_4$ ) ;
- des complexes organo-métalliques solubles (avec des acides fulviques, des acides organiques simples, des acides aminés, des acides phénols, des sidérophores). L'affinité des éléments avec les acides fulviques est par ordre décroissant : Cu, puis Ni et enfin Zn [28] ;
- des formes méthylées, c'est-à-dire contenant  $CH_3$ , pour As, Se et Hg (exemple :  $(CH_3)_2As(III)H$  ou  $(CH_3)_2Se(II)$ ). Ces formes sont généralement volatiles et partent vers l'atmosphère.

La plupart des ions métalliques peuvent exister dans la solution du sol avec divers états d'oxydation. Généralement (pH modéré et conditions oxydantes), + 1 à + 3 sont les états d'oxydation les plus courants. On notera toutefois quelques exceptions, telles que  $Mo^{6+}$  et  $V^{4+}$  [29].

Les métaux ont des affinités différentes pour les autres éléments, ce qui influence la formation des complexes et leur fixation sur différentes macromolécules. Les métaux montrent des aptitudes variables à former des composés stables [29].

Dans les sols, certains éléments-traces sont plus mobiles que d'autres (e.g. Cd et Zn), tandis que d'autres sont immobiles (e.g. Cu et Pb) et forment facilement des

complexes organiques avec les acides fulviques [29].

La répartition des éléments-traces entre la phase solide et la phase liquide change constamment puisque les éléments se dissolvent/précipitent, se désorbent / s'adsorbent, se complexent / se décomplexent, la plante en prélève, l'humidité du sol se modifie, etc. [30]. La répartition entre les phases liquide et solide est étroitement dépendante du temps (Figure 1.1).

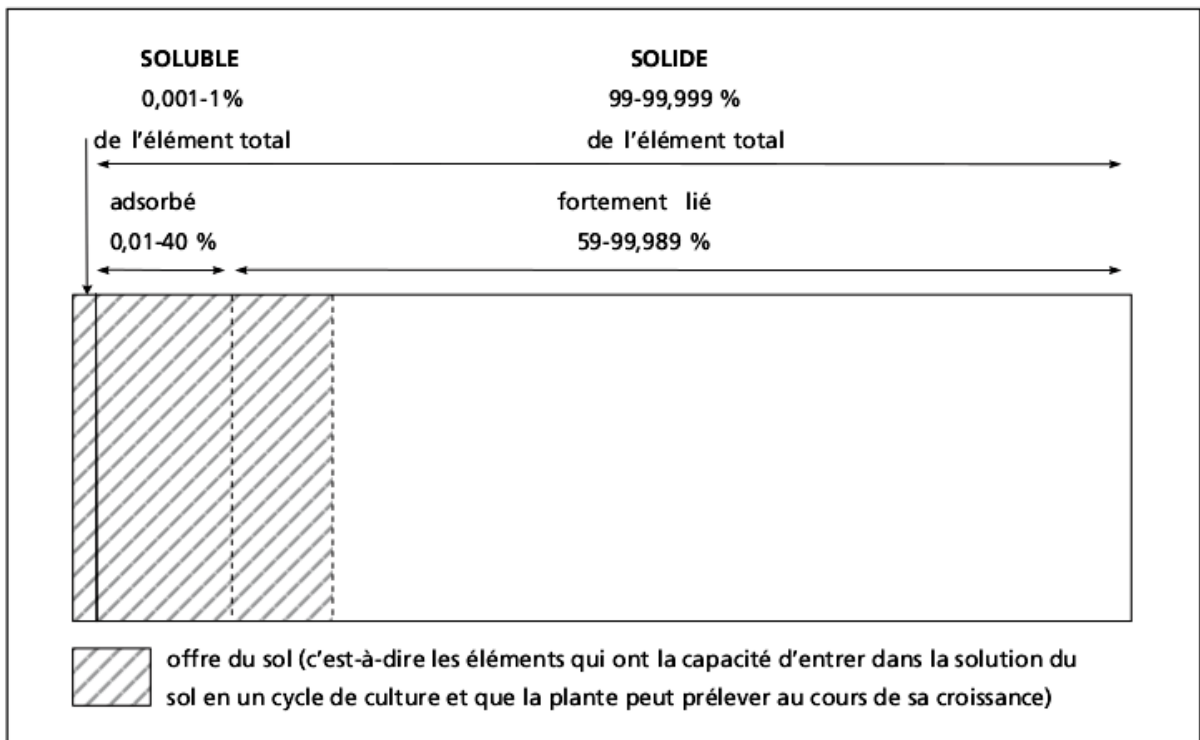


Figure 1. 1 : Répartition des élément-traces dans les différentes phases du sol à un instant 't'.

### 1.6. Facteurs de prélèvement des ETM

- *Espèce végétale*

Des végétaux d'espèces différentes, cultivés des conditions identiques, n'absorbent pas les mêmes quantités d'éléments-traces, et ne les stockent pas dans les mêmes organes. Il semble qu'en général, les légumes contiennent plus d'éléments-traces que les plantes monocotylédones [31].

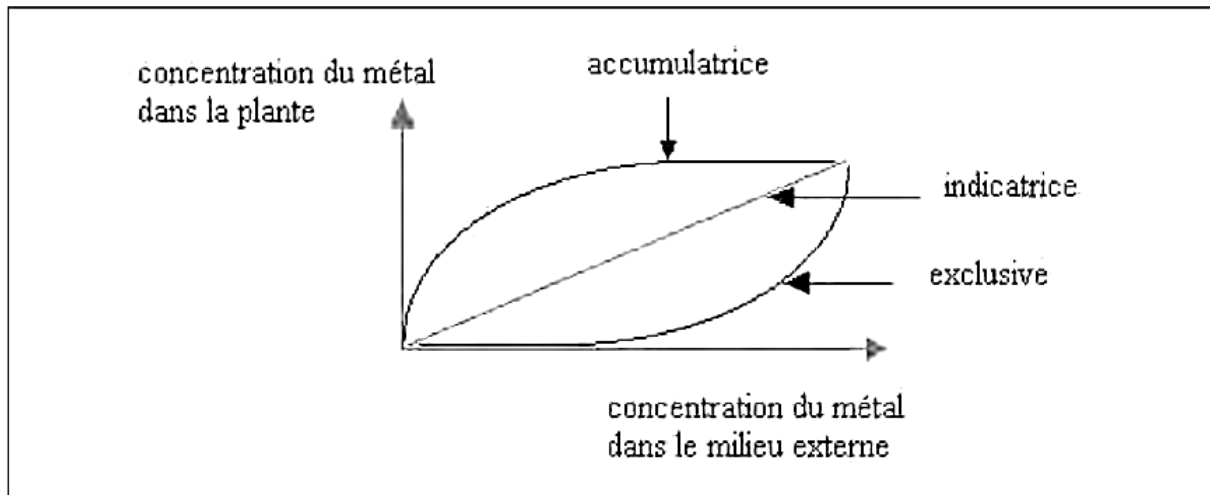
Les concentrations en Zn, Cd, Ni et Cu dans les parties aériennes du trèfle blanc sont mieux corrélées aux teneurs dans le sol que le sont celles des feuilles de graminées. [31]

Le prélèvement des métaux peut différer selon les différents génotypes de plantes, en relation avec la concentration externe du métal. Trois grandes stratégies existent (Figure 1.2) :

- Certaines plantes dites « exclusives » prélèvent très peu les métaux, même quand ils sont à des concentrations élevées dans le sol. Ces plantes possèdent des barrières empêchant le prélèvement, mais quand les concentrations en métaux deviennent trop élevées, ces barrières perdent de leur efficacité, probablement à cause de l'action toxique des métaux, et le prélèvement augmente alors massivement.

- D'autres, dites « accumulatrices », présentent de fortes accumulations de métaux même à de très faibles concentrations de métaux dans le sol. Ces plantes présentent certains mécanismes de détoxification dans leurs tissus, qui leur permettent d'accumuler. Toutefois, lorsque la concentration de métaux dans le sol augmente, ces plantes n'augmentent plus leur prélèvement, probablement à cause de compétitions entre ions métalliques pour les sites de prélèvement.

- Les dernières, dites « indicatrices », ont des concentrations de métaux dans leurs tissus qui reflètent la concentration du métal dans le sol et qui augmentent de façon linéaire avec elle.



**Figure 1. 2 : Réponse des plantes à la présence de métaux dans le sol.[29]**

Parmi les plantes accumulatrices, certaines le sont pour un élément spécifique (comme le colza pour le TI), et d'autres ont tendance à accumuler plusieurs éléments (comme le tabac, la laitue ou le thym).

Les plantes hyper accumulatrices ont une production de biomasse faible car elles utilisent leur énergie dans les mécanismes de défense face à ces hautes concentrations de métaux dans les tissus [29]. On notera néanmoins que ces plantes hyper accumulatrices sont très rares (1 seule espèce connue en 1998 dans le monde pour le Cd, 28 pour le Co, 37 pour le Cu, 14 pour le Pb, 9 pour le Mn, 317 pour le Ni et 11 pour le Zn) [32] ;[33] . De plus il ne s'agit pas de plantes cultivées à valeur alimentaire (bétail ou homme).

Comme on vient de le constater, les différentes plantes ont des capacités de prélèvement des élément-trace différentes et il est donc difficile de savoir si ce prélèvement est bas, normal ou élevé. On a tenté de donner les valeurs de concentrations en métal d'une « plante normale », avec lesquelles on peut comparer les prélèvements d'une espèce donnée (Tableau 1.1) [34].

**Tableau 1. 1 : Teneur « normale » en ETM dans les plantes. [34]**

Élément-trace	Teneur (µg/g)	Élément-trace	Teneur (µg/g)
Al	80	Fe	150
Cd	0,05	Pb	1,0
Cr	1,5	Mn	200
Co	0,2	Hg	0,1
Cu	10	Mo	0,5
Au	0,001	Ni	1,5
Zn	50	Ag	0,2

- ***Influence des micro-organismes***

La présence de carbone dans les exsudats racinaires multiplie le nombre de micro-organismes dans la rhizosphère. Ces micro-organismes influencent les flux et le cycle des éléments-traces, car ces éléments peuvent être mobilisés, complexés et/ou accumulés par les processus bactériens [31]. Les micro-organismes modifient le statut des éléments-traces autour de la racine, en minéralisant la matière organique, en complexant les éléments, en changeant le pH du sol, etc. Ils peuvent modifier la solubilité des éléments-traces et augmenter ou diminuer leur absorption par les racines.

Certains excrètent des ligands organiques qui maintiennent les métaux en solution, les sidérophores. Les mycorhizes sont des champignons qui forment une symbiose avec les racines. La plupart des plantes cultivées (plus de 80 %) vivent en symbiose avec des endomycorhizes, dont les filaments se trouvent dans la rhizosphère et à l'intérieur des cellules racinaires. Elles permettent d'augmenter la surface d'échange entre le sol et la racine, et favorisent l'absorption de P, mais aussi de certains éléments-traces comme le Cu et le Zn [26]. [35] ont observé que 53 à 62 % du Cu prélevé par le trèfle blanc étaient dus aux mycorhizes.

Les champignons métalliques peuvent, dans certains cas, ralentir le transfert des éléments-traces du sol vers la plante, notamment lorsque les teneurs en éléments-traces dans le sol sont élevées sur un site pollué. Le mycélium peut diminuer le prélèvement de métaux dans les tissus racinaires (par fixation aux parois cellulaires,



grains de polyphosphates, acides organiques et peptides de type métallothionine dans le mycélium) [29]. Le fait que le prélèvement d'un métal décroisse ou augmente lors de la présence de mycorhize dépend de l'espèce et du métal

Les micro-organismes détruisent la matière organique et libèrent les éléments-traces chélatés par les acides humiques, qui entrent alors dans la solution du sol [36]. D'autres micro-organismes entrent en compétition avec la plante pour l'absorption de certains éléments, comme le Zn [37].

- **Interactions entre éléments**

Les interactions entre éléments-traces sont assez complexes, et la croissance et la reproduction optimum des plantes ne nécessitent pas seulement une absorption adéquate d'éléments-traces mais ces éléments doivent également être dans les bonnes proportions [31].

Les racines des plantes sont exposées simultanément à une multitude d'éléments dans le sol et ces éléments interagissent de différentes manières. L'absorption d'un ion est influencée par la présence d'autres éléments ou molécules dans la solution du sol ou dans la plante. Les influences peuvent être positives ou négatives (Tableau 1.2). Par exemple, un élément peut stimuler ou inhiber l'absorption d'autres éléments, tandis que le manque d'un autre peut aggraver la toxicité de certains autres. Par ailleurs, l'effet physiologique combiné de deux ou plusieurs éléments peut être plus grand (interactions synergiques) ou plus petit (interactions antagonistes) que la somme des effets physiologique séparés de chaque élément [31].

**Tableau 1.2: Interactions positives et négatives entre éléments présents dans le sol [31].**

<b>ETM</b>	<b>Interaction négative</b> <i>(inhibition du transfert)</i>	<b>Interaction positive</b> <b>ou négative</b> <i>(selon les conditions)</i>	<b>Interaction positive</b> <i>(stimulation du transfert)</i>
<b>Cd</b>	Zn, Fe, Ca, P, K, Mn	—	N, <b>Cu</b>
<b>Cu</b>	Mo, Zn, Al, Mn	<b>Cd</b> , Ca, P, N	<b>Cd</b>
Pb	Ca, P, S	—	—

### **1.7. Devenir des éléments-traces dans la plante**

Une fois entrés dans la racine de la plante, les éléments-traces peuvent circuler dans le végétal. Une partie des éléments-traces reste immobilisée dans les parois des cellules racinaires. Une autre partie entre dans les cellules racinaires et se trouve piégée par des acides organiques (exemple : acide citrique) ou d'autres molécules et stockée dans les vacuoles.

Chez la plupart des espèces végétales, les racines retiennent la majeure partie des éléments-traces prélevés, ce qui explique que les teneurs y soient souvent plus élevées que celles dans les parties aériennes.

Enfin, une dernière partie est transportée par les parois cellulaires, puis entre dans les cellules et circule de cellule en cellule (voie symplasmique) jusqu'aux vaisseaux conducteurs de la sève brute, le xylème, qui les emmènent vers les parties aériennes. Le passage d'un organe à l'autre se fait via des transporteurs qui régulent la migration de l'élément et des mécanismes chimiques (complexation avec des molécules organiques, précipitation) qui en facilitent le déplacement ou le réduisent (séquestration). De ce fait, on observe soit une réduction des teneurs en éléments-traces de la racine à la graine (cas du Ni ou du Pb), soit des concentrations homogènes

dans toute la plante, voire croissantes de la racine à certains organes.

Les éléments-traces sont distribués dans les différents organes, puis peuvent être remobilisés, c'est-à-dire changer d'organe ultérieurement en passant par les vaisseaux conducteurs de sève élaborée, le phloème, notamment selon les stades de développement de la plante. Le Zn et le Cu, par exemple, sont en partie remobilisés des feuilles vers les grains lors du remplissage des grains chez les céréales. Ce phénomène touche moins le Cr et le Cd ce qui explique que les quantités de Cr et Cd sont faibles dans les grains, alors que celles en Cu ou Zn sont plus importantes.

D'une façon générale, les teneurs en éléments-traces sont supérieures dans les organes végétatifs (feuilles et tiges) que dans les organes reproducteurs (grains et fruits.

De fortes teneurs en éléments-traces dans les végétaux ont deux conséquences :

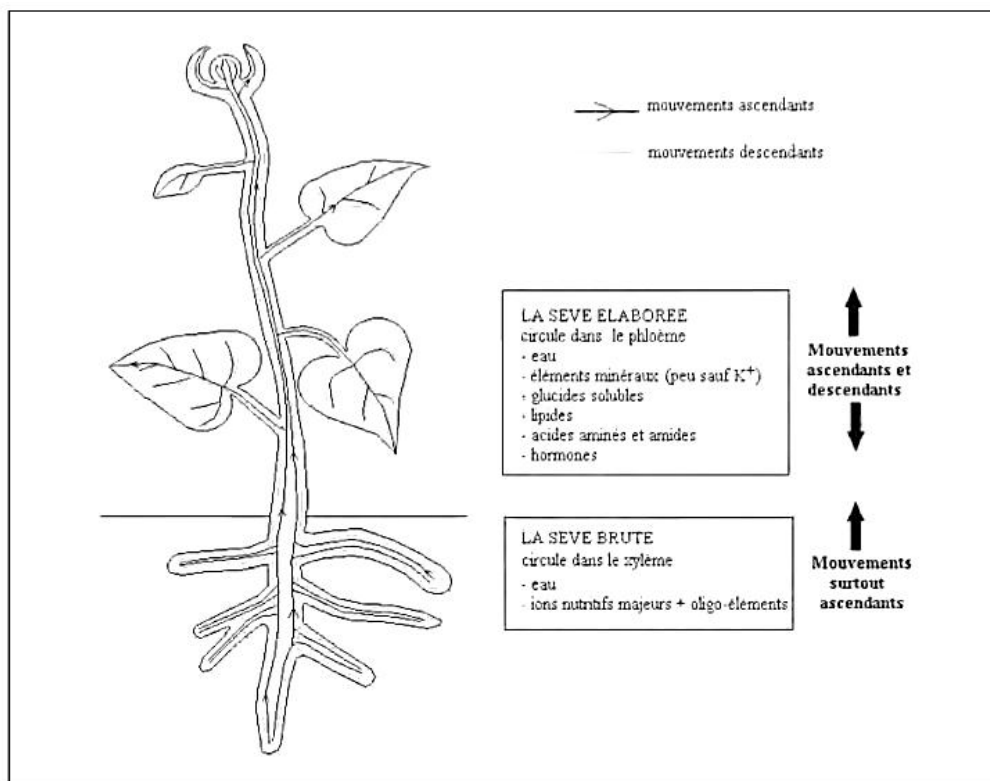
- la première est une toxicité potentielle directe pour la plante (phytotoxicité), c'est-à-dire un dysfonctionnement pouvant aller jusqu'à une diminution du rendement et de la qualité industrielle des récoltes ;

- la seconde est une toxicité potentielle pour les animaux ou les hommes qui ingèrent les végétaux.

### **1.8. Mécanismes de transport des éléments-traces au sein du végétal**

Le prélèvement, puis le transport des éléments-traces peuvent varier considérablement et dépendent non seulement des éléments-traces mais aussi des espèces végétales. Les différents métaux ne présentent pas la même mobilité et, à l'intérieur d'une plante, le Cd et le Zn sont par exemple plus mobiles que le Cu et le Pb. Il peut également y avoir de grandes variations entre espèces et même entre génotypes d'une même espèce végétale [29]. Les éléments-traces sont surtout transportés par voie apoplastique dans les tissus des plantes. Afin d'atteindre les vaisseaux xylémiens des racines, les éléments-traces doivent d'abord traverser l'endoderme et les bandes de Caspary subérifiées, ce qui est difficile [29].

En conséquence, la majeure partie du prélèvement des métaux est effectuée par les parties les plus jeunes de la racine où les bandes de Caspary ne sont pas entièrement développées. Par contre, on ne sait pas comment les métaux sont ensuite véhiculés vers les vaisseaux xylémiens [29]. La sève xylémienne représente le principal moyen de transport des racines vers les parties aériennes pour les ions minéraux. La circulation de la sève brute (contenant les ions métalliques) dans le xylème se fait de bas en haut (des racines vers les parties aériennes) par poussée radiculaire et par appel foliaire lors de la transpiration [38] (Figure 1.3).



**Figure 1. 3: Circulation de la sève brute et de la sève élaborée au sein d'une plante verte. [38]**

La paroi du xylème contient des groupes chargés négativement qui peuvent lier les ions positifs libres de la sève, comme les métaux, et freiner ainsi leur progression. Les éléments peuvent se lier avec des ligands de faible poids moléculaire, de façon à rester en solution pendant le transport. Ils peuvent aussi être incorporés dans les métabolites [39]. Le transport des éléments-traces dans le phloème est probablement difficile car ce

dernier est constitué de cellules vivantes contenant des substances et des ions sur lesquels il est facile de se fixer. Dans le cas du pois et après un traitement foliaire, le Cd semble être transporté vers les stipules situées à la base des pétioles des feuilles, mais il ne va pas plus loin et, au-delà de 40 h, ni le Cd, ni le Cu, ni le Zn n'atteignent les racines. Ceci a également été montré chez la betterave sucrière [29].

Les éléments-traces ont tendance à rester dans les racines, surtout quand l'apport est suffisant (pour les oligo-éléments). Il existe des « barrières physiologiques » empêchant le transfert de certains éléments (Cu, Zn, Co) des racines vers les parties aériennes. Le Pb est fortement immobilisé dans la paroi des cellules racinaires sous forme de pyrophosphate de Pb [40].

## CHAPITRE 2

### LA GERMINATION

#### 2.1. Introduction

La germination est un stade physiologique correspondant à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase du développement de la plantule, elle commence dès que la graine sèche est hydratée [41].

Plusieurs auteurs adoptent la conception de [42] qui définit la germination d'une graine comme étant la somme des événements qui commencent avec l'imbibition et se termine par l'émergence d'une partie de l'embryon, généralement la radicule, à travers les tissus qui l'entourent.

On rapporte que l'eau est d'abord absorbée par les ouvertures naturelles de la graine, puis diffusée à travers ses tissus. Les cellules devenues turgescentes, la graine grossit alors en volume et devient davantage perméable à l'oxygène et au dioxyde de carbone. À la suite de l'hydratation, sous l'effet de la dilatation de la graine, les téguments s'ouvrent, et l'embryon subit des changements métaboliques qui réamorcent sa croissance [43].

Des enzymes commencent à dégrader les réserves contenues dans l'albumen ou dans les cotylédons, et les nutriments parviennent aux régions en croissance de l'embryon [44]. La synthèse de nouvelles molécules donne lieu à une augmentation en taille de l'embryon jusqu'à ce que ce dernier émerge de la graine [45]. Le premier organe à émerger de la graine est généralement la radicule qui constitue la racine embryonnaire [46]. S'ensuit l'émergence de l'épicotyle et des cotylédons, qui constituent la partie aérienne de la plantule [43].

Mais pour mieux comprendre le processus de la germination, il est préférable d'élucider la constitution de son site de déroulement, la graine.

## 2.2. Morphologie de la graine

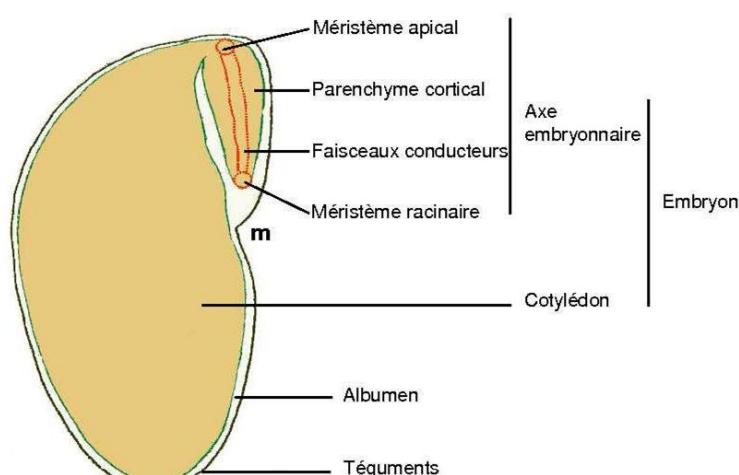
La graine est un organe de réserves, qui permet la pérennité de l'espèce par multiplication et franchissement des saisons défavorables [41]. Elle est constituée, de l'intérieur vers l'extérieur, de l'embryon, l'albumen et les téguments qui sont des tissus d'origines différentes [43]. (Figure 2.1)

L'embryon et l'albumen sont issus de la fécondation [47]. L'embryon, représentant l'élément principal de la graine, est formé d'une radicule, d'un ou plusieurs cotylédons, selon qu'il s'agit des monocotylédones, dicotylédones ou gymnospermes, d'un épicotyle, d'une plumule et enfin d'une hypocotyle qui relie les parties aériennes aux parties souterraines de la future plante [43].

L'albumen constitue, chez les plantes à graines albuminées, la zone de stockage des réserves nécessaires au développement de la plantule avant l'acquisition de l'autotrophie ; mais pour celles à graines exalbuminées telle que la fève, ce sont les cotylédons de l'embryon qui assument ce rôle [41].

A la périphérie de la graine, on retrouve les téguments, enveloppes protectrices plus ou moins résistantes [48], qui dérivent des tissus de l'ovaire entourant le sac embryonnaire [43].

Les téguments renferment des macrosclérides, épaissements ligneux responsables de la résistance physique, et des anthocyanines qui colorent la graine [46].



**Figure 2. 1 : Morphologie d'une graine de *Fabaceae***

### **2.3. Dormance et levée de dormance**

En règle générale, les graines mûrissent, deviennent quiescentes puis germent dès que l'eau, l'oxygène et la température favorable seront disponibles [49].

Néanmoins, il arrive chez plusieurs espèces qu'après la quiescence, les graines ne germeront pas et entrent en dormance, bien que les conditions environnementales leur sont optimales [50]. La dormance est une caractéristique spécifique des graines qui peut se définir comme le blocage de la germination d'une graine intacte et viable malgré des conditions environnementales favorables [51]. Ceci permet à la graine d'échapper une germination spontanée qui pourrait survenir trop précocement [52]. La dormance peut être due à des facteurs propres à la graine ou qui lui sont imposés par le milieu externe.

#### **2.3.1. Dormance primaire**

Elle s'explique par des raisons internes à la graine à cause de l'embryon, dormance embryonnaire, ou à cause du tégument, dormance tégumentaire [46]. Elle est initiée par l'ABA endogène produit par l'embryon au cours de la maturation [43]. Cet état disparaît progressivement lors du stockage dans des conditions sèches ou grâce à des traitements imposées à la graine comme la stratification par le froid ou le chaleur [52], la lumière, les gibbérellines et d'autres hormones telles que les buténolides et l'oxyde nitrique [41]. La dormance primaire peut être tégumentaire ou embryonnaire.

- **Dormance tégumentaire**

Elle est due à une imperméabilité à l'eau, une limitation de l'entrée d'oxygène, une résistance mécanique lors de la sortie de la radicule, ou la présence d'inhibiteurs chimiques causant le piégeage d'oxygène, le blocage du développement embryonnaire ou l'inhibition de certaines enzymes [46]. Les téguments sont dégradés dans le sol grâce aux conditions climatiques tel que le gel, les incendies, le lessivage par de l'eau ou les animaux ; les techniques de scarification et de lixiviation sont les plus courantes [52].



- **Dormance embryonnaire**

D'après [53], elle a son origine dans l'embryon lui-même, c'est-à-dire qu'elle n'est pas levée par des traitements effectués sur les téguments; elle survient lorsque l'embryon n'est pas complètement développé ou est causée par la présence d'inhibiteurs de croissance. Elle est due principalement à l'acide abscissique qui bloque l'action de l'acide gibbérellique, responsable du déclenchement de la germination [43].

On peut lever les dormances embryonnaires par surmaturation en laissant la graine sur la plante, par stratification avec un froid humide (5 à 10°C), par anoxie qui consiste en la privation partielle d'oxygène entraînant un stress ou avec plus ou moins de lumière selon l'espèce [46].

### **2.3.2. Dormance secondaire**

La levée de dormance permet en général la poursuite de la germination, mais il n'en est pas toujours ainsi, car il peut persister ou s'installer une dormance secondaire [53]. Elle est imposée à la graine après la récolte et est due aux conditions de milieu telles que des températures trop basses, un manque d'eau, une semence enfouie trop profondément, pas assez de lumière, une teneur trop faible en oxygène et CO<sub>2</sub> [41] et prend fin quand les bonnes conditions reviennent [43].

## **2.4. Conditions de la germination**

Selon [54] et [41], la germination est influencée par des conditions internes et d'autres externes.

### **2.4.1. Conditions internes**

Sont propres à la graine elle-même telle que la maturité, la longévité et la photosensibilité [55].

- **La maturité** : La graine doit être complètement différenciée morphologiquement et ses réserves bien constituées [56].

- **La longévité** : qui varie, selon les espèces, de quelques jours à quelques années [53]. En effet, la capacité germinative est plus faible pour plantes ligneuses

que pour les herbacés [54].

- **La photosensibilité** : En général, on distingue trois catégories de quant-à leur sensibilité et leur exigence à la lumière [52] et [57]:

- Les graines à photosensibilité positive dont la germination est induite par la lumière.

- Les graines dites à photosensibilité négative et dont la germination est retardée ou inhibée par la lumière.

- Les graines apparemment non photosensibles et capables de germer indifféremment à la lumière ou à l'obscurité.

#### **2.4.2. Conditions externes**

Dépendent des paramètres environnementaux tels que l'eau, la température, l'oxygène et la lumière.

- **L'eau** : La quantité d'eau nécessaire à la réhydratation des tissus varie, selon le type des graines et la nature des téguments, de 50% à 250% du poids sec de la graine [42]. Ces besoins en eau sont plus importants chez les graines protéagineuses que chez les Amylacées que chez les Oléagineuses [53]. L'eau y pénètre par voie passive sous l'effet de la forte succion que possèdent les graines. Cette capacité leur permet de germer dans des sols présentant de faibles teneurs en eau. Par contre si on met trop d'eau elles sont asphyxiées par l'absence d'oxygène [42]. Seules les plantes marécageuses telle que le riz y sont adaptées.

- **La température** : Elle influe sur les activités enzymatiques, la perméabilité des membranes et l'entrée d'oxygène [41]. On peut donc parler de température optimale de germination qui s'entoure d'une plage de tolérance. On a, ainsi, une gamme de températures variant d'une espèce à l'autre et permettant de déterminer la date des semis [42] ;[41]

- **L'oxygène** : qui est indispensable à la respiration et à la production d'ATP. La concentration en Oxygène nécessaire est inférieure à la concentration en Oxygène atmosphérique et représente 5 à 10% [42] ; [53]. Cependant, les teneurs perçues par

l'embryon sont plus faibles que celles indiquées, car l'oxygène traverse plusieurs couches en pénétrant à travers les téguments où la présence de phénols oxydables, inhibiteurs de germination, peut empêcher son passage par piégeage [53]. C'est pourquoi, on procède au rinçage des graines pour débarrasser ces particules inhibitrices [41].

- **La lumière** : La germination est également influencée, selon les espèces, par l'éclairement [46]. La lumière est perçue par la graine au niveau des phytochromes qui sont impliqués dans la modulation des hormones endogènes, les gibbérellines et l'acide abscissique [58].

## **2.5. Physiologie et biochimie de la germination**

D'après, [59] ; [50], la cinétique de prise d'eau permet de caractériser la germination en trois phases (Figure 2.2) :

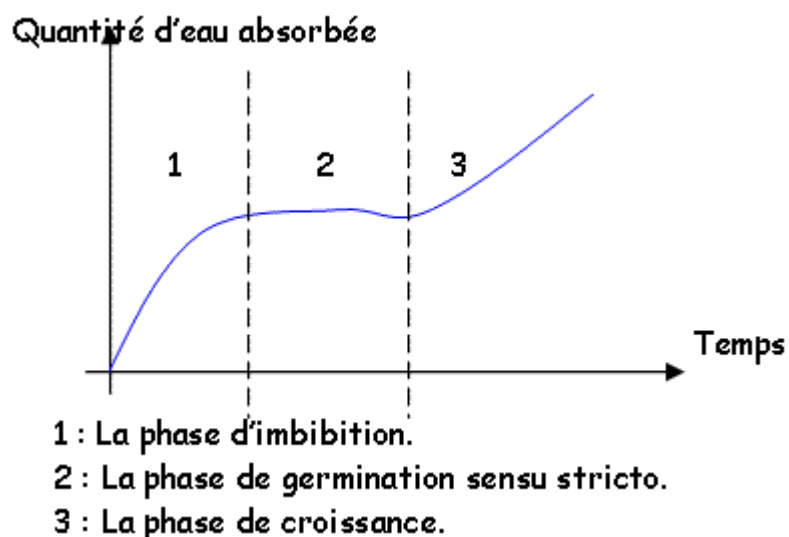
### **2.5.1. Phase d'imbibition**

C'est une étape rapide et réversible ; caractérisée par une entrée massive et passive d'eau ; elle se déroule même si la graine n'est pas viable [41]. Cette entrée d'eau, servant à hydrater les tissus, est accompagnée d'une augmentation de la consommation d'oxygène attribuée à l'activation des enzymes mitochondriales [55]. Les structures et les enzymes nécessaires à cette reprise d'activité sont supposé avoir résisté à la déshydratation et être présentes dans les graines sèches [42].

### **2.5.2. Phase de germination *stricto sensu***

Caractérisée par une stabilité de la prise d'eau et de l'oxygène [50]. L'hydratation des tissus et des enzymes est totale ; l'activité respiratoire est ralentie [41]. C'est à ce stade que se préparent les événements métaboliques associés à l'allongement de la radicule qui émerge du tégument [46].

Cette émergence, rendue possible grâce à l'élongation des cellules [42], coïncide avec la fin de la deuxième étape et la perte de la tolérance à la dessiccation [50].



**Figure 2. 2 : Courbe théorique d'imbibition**

D'après [51], l'eau entrée rend mobiles et active les phytohormones hydrosolubles en stock dans la graine telles que les gibbérellines qui sont véhiculées vers la couche à aleurones où elles vont activer la synthèse d'hydrolases,  $\alpha$ -amylases, nucléases et protéinases, nécessaires à la dégradation des réserves, à la division et l'élongation cellulaire.

Ainsi, ajoute la même source :

- **Les  $\alpha$ -amylases** : hydrolysent l'amidon stocké dans l'albumen et libèrent des molécules de glucose, substrat du métabolisme respiratoire.
- **Les nucléases** : permettent la libération d'acides nucléiques impliqués dans la formation des cytokinines, hormones qui stimulent la division cellulaire.
- **Les protéases** : lysent les réserves protéiques qui favorisent la formation de phytohormones telles que l'auxine responsable de l'élongation des cellules.

### **2.5.3. Phase de post-germination**

Distinguée par une reprise de l'absorption d'eau et une élévation de la consommation d'oxygène, dues probablement à l'activité des enzymes néosynthétisées [41]. Certains auteurs ne considèrent pas cette phase comme faisant partie de la germination au sens strict [59].

## **2.6. Activité enzymatique au cours de la germination**

La reprise d'activités métaboliques est liée à l'augmentation du niveau d'activité de certaines enzymes que possède la graine et qui sont étroitement liées avec son contenu en réserves [42] et [50].

### **2.6.1. Nature biochimique des réserves**

Ces réserves ont une grande importance car elles assurent l'alimentation du jeune embryon en cours de germination avant d'atteindre son autotrophie [43]. Elles occupent 80 % de la taille de la graine [42]. Même dans de petites graines comme celles de Laitue (*Lactuca sativa*) pesant seulement quelques mg les réserves peuvent autoriser la croissance de l'embryon pendant plusieurs jours [43]. Chez des graines comme la fève pesant jusqu'à 1 g les réserves sont suffisantes pour plusieurs semaines [42] et [43]. Ces réserves sont également importantes pour la nutrition de l'homme et des animaux.

#### **2.6.1.1. Les protéines**

Les légumineuses représentent une source importante de protéines végétales; la fève, par exemple, en contient 5,4 g aux 100 g [60]. Plusieurs auteurs, entre autres ce dernier, subdivisent les protéines, selon leur solubilité, en 4 classes : les albumines, les globulines, les gluténines et les prolamines.

Les légumineuses contiennent des légumines et des vicilines appartenant à la classe des globulines. Elles sont stockées dans des corps protéiques de 0,1 à 25 $\mu$  de diamètre, grains d'aleurones, répartis dans tout l'organe de réserves, les cotylédons [41].

Ces corps protéiques contiennent 70-80 % de protéines, 10 % de phytine et des enzymes telles que les protéases, les phosphatases, les glucidases, les phytases et les ribonucléases [42] et [41]. La phytine, sel complexe de P, K, Mg, Ca, Zn, et Fe, représente une vraie réserve minérale pour la graine [42].

### 2.6.1.2. Les glucides

Ils sont présents sous forme d'amidon et de sucres solubles :

- **L'amidon** : constitue la forme principale des réserves glucidiques, notamment chez les graminées dont il forme presque tout l'albumen [61]. Quoique sa présence chez la plupart des Légumineuses, soit moins importante que celle des protéines, la fève (*Vicia faba* L.) en contient beaucoup plus (tableau 3). L'amidon est formé de deux polysaccharides (dont 15 à 30 %) et l'amylopectine (70 à 85 %) (Figure 2.3). L'amylopectine est organisée en feuillets entre lesquels l'amylose forme une zone amorphe [59]. (Figure 2.4)

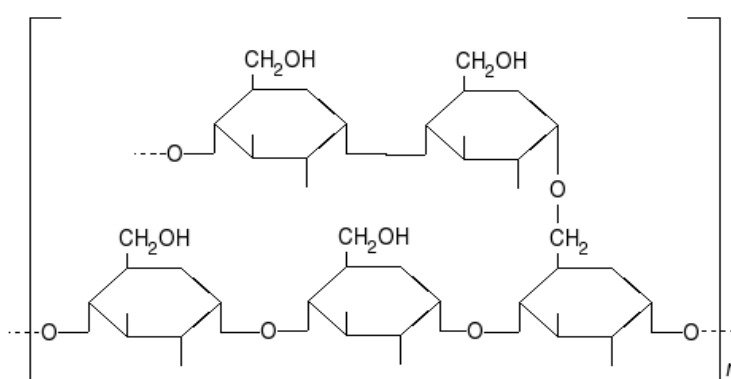


Figure 2. 3: Structure d'amylopectine

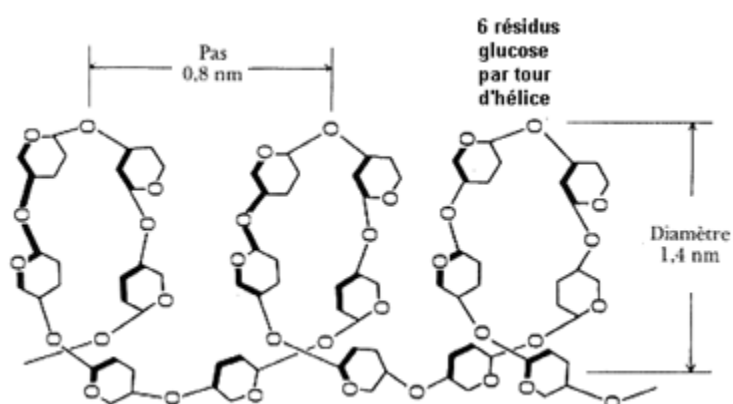


Figure 2. 4 : Hélice d'amylose

- **Les sucres solubles** : L'hydrolyse enzymatique de l'amidon donne naissance au maltose et à la dextrine, qui sont des formes intermédiaires et qui se dégradent, à leur tour, en glucose [41]. Il est à noter que les sucres solubles sont en petites quantités dans la graine au repos [42].

### **2.6.1.3. Les lipides**

Bien que leur présence dans les graines des Légumineuses soit moins importante en comparaison avec les protéines et les glucides, les lipides constituent la forme de réserve la plus répandue, dans 9/10 des plantes [46]. La plus grande partie de ces réserves est constitué d'ester, de glycérol et d'acides oléique et palmitique, présents en gouttelettes de différentes tailles appelées oléosomes [53].

## **2.7. Enzymes d'hydrolyse des réserves**

Elles aboutissent à la formation de substrats qui entrent dans la synthèse des constituants des nouvelles cellules ou qui seront utilisés par la voie respiratoire [62]. Notons que chaque catégorie de graines possède des enzymes en relation avec son contenu en réserves ; nous trouvons, ainsi, l'amylase, la maltase et la phosphorylase servant à hydrolyser les réserves amylacées ; les lipases pour les lipides et les protéases pour les protéines [43]. [43] et [46] rapportent que certaines de ces enzymes sont déjà présentes dans la graine sous une forme inactive et la réhydratation des tissus permet leur activité ; c'est le cas des protéases et des enzymes de la respiration.

### **2.7.1. Mise en évidence de l'activité amylasique**

La germination des graines requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon [59]. On assiste à une reprise de synthèse d'enzymes, notamment les amylases :  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase et enzymes débranchantes [63]. Ce dernier ajoute que ces hydrolases néosynthétisées en réponse à l'acide gibbérellique, sont capables d'hydrolyser l'amidon, et de libérer le glucose qu'il contient.

L'hydrolyse d'amidon se passe comme suivant [62], [59] et [63] :

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme endo-glucosidase qui catalyse l'hydrolyse aléatoire des liaisons glucosidiques  $\alpha$  (1-4) de l'amylose et de l'amylopectine. Les produits d'hydrolyse sont des oligoholosides de 6 à 7 résidus en moyenne et un disaccharide réducteur, l' $\alpha$ -D- glucosyl-(1-4)-D-glucose appelé maltose.

La  $\beta$ -amylase est une exo-glucosidase qui catalyse l'hydrolyse de la liaison glucosidique  $\alpha$  (1-4) à partir des extrémités libres, non-réductrices, de l'amylopectine, et libère séquentiellement du maltose.

Les liaisons  $\alpha$  (1-6) de l'amylopectine n'étant pas reconnues par la  $\beta$ -amylase, l'hydrolyse s'arrête quand l'enzyme atteint les points de branchement. La molécule d'amylopectine partiellement hydrolysée est appelée dextrine limite. Elle ne peut être ultérieurement dégradée qu'après l'action d'enzymes spécifiques des liaisons glucosidiques  $\alpha$  (1-6), les enzymes débranchantes ou déramifiantes. Le maltose, ainsi produit de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon par les amylases, sera hydrolysé par l'  $\alpha$ -glucosidase (maltase) pour finir en glucose [64].



## CHAPITRE 3

### COMMUNAUTÉ MICROBIENNE RHIZOSPHERIQUE

#### 3.1. Introduction

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contiendrait de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries [65], de 6000 à 50000 espèces bactériennes [66] et jusqu'à 200 m d'hyphes fongiques [67]. De plus, les microorganismes jouent un rôle clé dans un grand nombre de processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition d'éléments nutritifs pour les plantes [68];[69], les cycles biogéochimiques de l'azote [70] et du carbone [71] et la structure du sol [72]. Alors que le rôle des microorganismes est largement établi dans les cycles biogéochimiques, leur impact sur la productivité et la diversité des plantes est encore insuffisamment compris. Un processus majeur dans la rhizosphère consiste en la rhizodéposition de composés carbonés par les racines. Un tiers de ce carbone permet l'élaboration de la biomasse racinaire, un second tiers est respiré par les racines, alors qu'un dernier tiers correspond à la rhizodéposition qui constitue une source d'énergie essentielle pour les microorganismes du sol. Ainsi, les racines et leurs rhizodépôts (notamment les exsudats racinaires) jouent un rôle majeur en stimulant les activités microbiennes et l'ensemble des chaînes trophiques qui en découlent. La densité des populations de la microflore associée aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu [73]. Ces modifications quantitatives de la microflore ou « effet rhizosphère », s'accompagnent également de modifications qualitatives. En effet, la diversité et la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère [74] ; [75] et leur activité métabolique [76] ; [77] diffèrent de celles du sol nu. Les composés organiques exsudés par les plantes dans la rhizosphère augmentent l'activité et la prolifération de différents groupes de microorganismes et augmentent leur prolifération [78].

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée de procaryotes et d'eucaryotes [79]. Certains sont sans effets sur le développement des végétaux (microorganismes commensaux), d'autres encore sont favorables (mutualistes) alors que d'autres, enfin, ont des effets délétères (parasites et phytopathogènes). [80]. La rhizosphère joue un rôle actif dans la régulation des interactions entre plantes et microorganismes [81]. De ce fait, il a été suggéré que la plante favorise celles qui lui sont bénéfiques [82]; [83]. Afin d'optimiser les interactions favorables et développer des pratiques agricoles respectueuses de l'environnement il est nécessaire de mieux connaître le mécanisme de ces interactions. Actuellement, l'inoculation par les microorganismes tels que les champignons mycorhizogènes [84]; [85] et les bactéries fixatrices d'azote [86] ; [84] représentent un potentiel important pour l'amélioration de la croissance et la lutte biologique contre les maladies d'origine tellurique. La variabilité des résultats obtenus par l'utilisation d'organismes vivants est souvent supérieure à celle obtenue par l'application de produits de synthèse. De meilleures connaissances des mécanismes d'interaction permettraient de développer des pratiques autres que l'utilisation d'inocula notamment celle consistant à favoriser des populations déjà présentes dans la rhizosphère et bénéfiques pour les plantes.

### **3.2. Effets bénéfiques des rhizobactéries**

La microflore rhizosphérique bénéfique pour les plantes peut avoir soit un effet direct via les organismes associés à la racine (relations mutualistes) ou indirect via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère [87]

#### **3.2.1. Effets directs**

Différents microorganismes de la rhizosphère mettent en place des associations symbiotiques avec les plantes et stimulent leur productivité et leur diversité. Les associations les plus connues sont celles des bactéries fixatrices d'azote appartenant aux actinomycètes et aux *Rhizobiaceae*. Les *Rhizobia* sont particulièrement bien étudiées, elles établissent des relations symbiotiques avec les plantes appartenant à la famille des légumineuses [88]. Cette symbiose entre les *Rhizobia* et les légumineuses se caractérise par la formation sur les racines hôtes de nodosités dans lesquelles ces bactéries se logent [89], [90] ; [91]. L'association symbiotique permet aux *Rhizobia* de bénéficier d'un micro-habitat favorable dans

lequel ces bactéries ont accès aux substrats carbonés issus de la photosynthèse. En échange, les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammonium et le rendent, ainsi, directement assimilables par les plantes-hôtes. Les bactéries fixatrices d'azote sont des régulateurs importants de la productivité des plantes incapables d'utiliser l'azote atmosphérique sans ces microorganismes.

### **3.2.2. Effets indirects**

Les microorganismes vivant librement dans la rhizosphère ont un effet bénéfique indirect sur la plante [87] caractérisé d'une manière générale par le processus de minéralisation, voie importante par laquelle ces microorganismes décomposent la matière organique insoluble et soluble et libèrent ensuite des éléments minéraux disponibles pour les plantes.

La fixation de l'azote atmosphérique est un mécanisme permettant aux microorganismes fixateurs dits 'libres' de favoriser l'amélioration de la croissance de la plante. Ces bactéries appartiennent à différents genres tels que *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter* et *Azoarcus* [92]. Elles fixent l'azote à des taux relativement faibles mais néanmoins significatives (< 3 kg/ha) [93]. Ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la biofertilisation des sols lorsque l'azote du sol est un facteur limitant [88]. Certaines bactéries sont utilisées pour améliorer le développement de la racine via la production de phytohormones [88] telles les auxines dont l'acide indole acétique (AIA), les cytokinines et les gibbérellines [92]; [93]; [94]. Alors que d'autres sont capables de favoriser la croissance des plantes par de la mise en place des symbioses entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote [95] et les champignons mycorhizogènes [96]; [97]; [98]. Les bactéries ayant la capacité de promouvoir l'établissement des mycorhizes en améliorant le contact des champignons avec les racines des plantes hôtes et la colonisation de ces racines, sont appelées MHB (Mycorrhiza Helper Bacteria) [96].

Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique [88]; [80].

Ces bactéries sont capables d'avoir un effet protecteur en induisant des mécanismes de défense chez les plantes par la résistance systémique induite (ISR :

Induced Systemic Resistance ) [99] permettant aux plantes de mieux se protéger contre l'attaque éventuelle de pathogènes. D'autres bactéries peuvent contrôler la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, pour le carbone [100] et pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible [101]. L'antagonisme microbien lié à la production de métabolites ayant des propriétés antibiotiques est également un mécanisme par lequel les bactéries rhizosphériques protègent les plantes contre les phytopathogènes [99] ; [102]. Ces bactéries existants à l'état libre dans la rhizosphère et dont l'effet global favorise la croissance de la plante [103] sont désignées collectivement par le terme PGPR [104]. Au cours des dernières années, le nombre des PGPR identifiées a connu une grande augmentation 2 à 5% des rhizobactéries

### **3.2.2.1. La production de phytohormones**

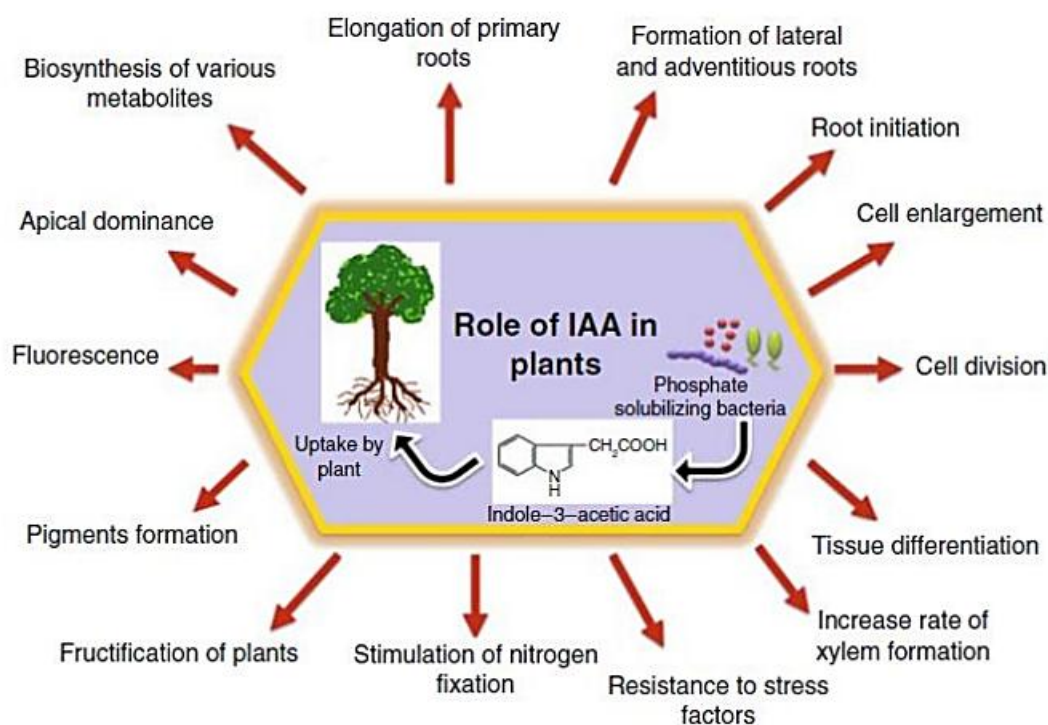
Les hormones végétales sont des messagers chimiques qui affectent la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stressés biotiques et abiotiques. De nombreux travaux indiquent l'utilisation des hormones en tant que molécule- signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres microorganismes tels le « quorum sensing » ou la résistance systémique induite **ISR** [105]. Il existe cinq principaux groupes d'hormones: les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique. L'acide indole-3-acétique (AIA) est le plus important du groupe des auxines [106]

- **L'acide indole acétique (AIA)**

L'acide indole acétique AIA est une auxine primaire active dans la majorité des plantes. Il fonctionne comme une molécule - signal importante dans la régulation du développement des plantes. L'AIA intervient dans les premiers stades de l'embryogenèse. Il contrôle aussi bien l'organisation du méristème apical (phyllotaxie), la ramification des parties aériennes de la plante (dominance apicale), la formation de la racine principale, l'initiation des racines latérales et adventives (rhizogénèse) et intervient également dans les tropismes en réponse à la gravité (gravitropisme) ou à la lumière (phototropisme). Ces multiples effets sur les différents

stades de la croissance de la plante résultent du contrôle que cette phytohormone exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation (Figure 3.1). Diverses espèces bactériennes possèdent la capacité de produire de l'AIA. Celle-ci peut être utilisée comme outil de dépistage des souches PGPR performantes [107]. Les PGPR libèrent ces auxines dans la rhizosphère comme des métabolites secondaires [108]. Les PGPR synthétisent et sécrètent l'AIA qui sera absorbé par la graine ou la racine à partir du tryptophane et d'autres petites molécules présentes dans les semences ou les exsudats racinaires [109], [110]. Le tryptophane est le principal précurseur pour la biosynthèse d'AIA. Les exsudats des racines sont la ressource principale de tryptophane dans le sol [105]. Une partie de l'AIA est reprise par la plante qui s'ajoute à l'AIA endogène de la plante pour stimuler la prolifération cellulaire des plantes et l'allongement racinaire.

L'analyse du rôle de l'AIA montre que les bactéries utilisent cette phytohormone pour établir des interactions avec les plantes dans le cadre de leur stratégie de colonisation notamment la phytostimulation et l'intervention dans les mécanismes de base de défense des plantes [111]. Certains PGPR dont *Pseudomonas putida* synthétisent et sécrètent des régulateurs de croissance telle que l'AIA qui infiltre les cellules végétales et stimule la croissance racinaire en augmentant la longueur de 35-50% [112]. En outre, l'AIA active l'ACC synthétase pour produire plus d'ACC qui sera transformé en éthylène par l'ACC oxydase [113]. Simultanément, l'ACC désaminase hydrolyse l'ACC et inhibe ainsi la production de l'éthylène. En conséquence, l'effet final de la production d'éthylène sur la croissance racinaire dépend de l'équilibre entre l'AIA et l'ACC désaminase produits.



**Figure 3.1 : Rôles de l'AIA dans l'amélioration de la croissance des plantes**  
[108]

### 3.2.2.2. Composés volatiles

Les microorganismes agissant comme agents de lutte biologique contre les mauvaises herbes comprennent les rhizobactéries qui colonisent la surface des racines de ces plantes et sont capables de les supprimer [114]. Certains gaz volatiles sont connus par leur action négative sur le métabolisme des racines [115] et constituent un moyen efficace et compatible avec l'environnement dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes [116]. L'acide cyanhydrique est un métabolite secondaire dont la glycine est le précurseur. Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition. Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien [117]. La production de HCN est une activité très commune chez *Pseudomonas* (88,89%) et *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphériques [118], [119]. Plusieurs études montrent que l' HCN améliore la croissance des plantes [114]. D'autres composés volatiles sont également identifiés : Le 2,3-butanediol et l'acétoïne libérés par des PGPR entraînent une amélioration appréciable de la

croissance de la plante en induisant sa résistance aux maladies [120]. **Howell et al.** [121] ont remarqué l'inhibition de *Pythium* par *Enterobacter cloacae* dans des boîtes de Petri cloisonnées et ont suspecté l'implication de substances volatiles. L'ammoniac est l'agent inhibiteur identifié. Il est produit comme un intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie.

### **3.3. Les champignons phytopathogènes (*Fusarium* et *Botryosphaeria*)**

*Fusarium oxysporum* est un agent fongique ubiquiste bien représenté au sein de la communauté microbienne tellurique, notamment dans la microflore rhizosphérique. Cette espèce présente des formes phytopathogènes hautement spécifiques sur des hôtes variables induisant des flétrissements, unilatéralement ou généralisés, causant ainsi la mortalité des plants.

Le genre *Fusarium*, se caractérise par une production asexuée, en produisant trois types de spores : les macroconidies, les microconidies et les chlamydospores [122]. Les microconidies sont les plus abondantes et produites par champignon dans toutes les conditions, c'est aussi le type spore le plus fréquemment présentes sur la surface des plantes tuées par cet agent pathogène, et les chlamydospores sont moins produites comparées aux autres [123]

La famille des *Botryosphaeriaceae* englobe une gamme de divers champignons qui sont soit des agents pathogènes, des endophytes ou des saprobes, principalement sur des hôtes ligneux. Ils sont présents dans tous géographiques et zones climatiques du monde, à l'exception des régions polaires. Leur association fréquente avec les maladies des plantes a stimulé l'intérêt substantiel dans ces champignons, et une grande partie de cet intérêt a été portée sur la systématique des espèces et des genres [124].

*Botryosphaeria* dépérissement est une maladie de la vigne du tronc fongique qui représente actuellement une menace pour la viticulture dans le monde entier en raison des importantes pertes économiques dus à une baisse de plantes touchées et leur mort prématurée. *Neofusicoccum parvum* et *Diplodia seriata* sont parmi les agents causaux.

Les différents champignons de cette famille se conservent sur et dans le bois de vigne, sous la forme de pycnides essentiellement et/ou de périthèces quand le téléomorphe est formée. En effet, ces structures sont présentes sur les écorces, les parties de bois malades, ainsi que sur les débris de bois de taille laissés sur le sol. Soulignons que ces champignons disposent de potentialités saprophytiques très importantes leur permettant de survivre aisément sur de nombreux substrats et divers hôtes [124].

### **3.4. La résistance des bactéries aux éléments-traces métalliques**

#### **3.4.1. Notion de toxicité, résistance et tolérance**

Une substance est dite toxique lorsque mise en contact avec un organisme vivant, elle peut entraîner chez lui une réaction spécifique ou un stress compromettant la réalisation de ses fonctions physiologiques au point d'avoir des effets néfastes sur lui-même et sur sa progéniture [125]. Dans la littérature scientifique courante, se rapportant à la croissance ou à la survie des microorganismes en présence de certaines concentrations en éléments-traces métallique, on parle souvent soit de tolérance soit de résistance. Il est très difficile de distinguer une différence entre les deux termes. Cependant, le Conseil de la Recherche National de Canada définit globalement résistance et tolérance comme " la capacité d'un organisme à diminuer sa réponse face à un composé chimique relatif auquel il a été exposé précédemment" [126].

Pratiquement ou techniquement, la résistance, la sensibilité et/ou la tolérance à un composé inhibiteur ou toxique donné, chez une population bactérienne, peuvent être visualisés en traçant la courbe de distribution d'une population de souches bactériennes (%) en fonction des concentrations minimales inhibitrices (CMI) aux éléments-traces métallique correspondantes. La forme de cette courbe renseigne si cette population présente ou non une communauté tolérante. Si la courbe est de type modale, la population présente trois communautés (sensible, tolérante, résistance). Par contre, si elle est de type bimodal, cette population ne présente que deux communautés (sensible, et résistante).



### **3.4.2 Mécanismes de résistance aux éléments-traces métalliques**

La résistance bactérienne aux ions métalliques est apparue probablement tôt dans l'évolution due à la dispersion des métaux par un événement géologique. Deux mots sont communément utilisés pour décrire la direction de transport d'un ion par une cellule: absorption et efflux. L'absorption signifie que les ions toxiques entrent dans la cellule alors que l'efflux décrit l'expulsion de ces ions par la cellule. La résistance à un métal donné peut être inductible ou constitutive. Beaucoup d'auteurs ont trouvé deux types de système d'absorption pour les ions métalliques dont l'expression est inductible ou constitutive. L'un est rapide, non spécifique et généralement conduit par le gradient chimiosmotique (gradient du potentiel membranaire, habituellement 200 mV) à travers la membrane cytoplasmique des bactéries (constitutif), alors que l'autre est plus lent et a une haute spécificité du substrat. Ce dernier utilise souvent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie, ce qui revient plus coûteux à la cellule en cas de besoin ou de privation de nourriture (inductible).

En générale, Hobman [127] et Bruins [128] distinguent 4 mécanismes de résistance bactérienne aux ETM :

- 1- Exclusion du métal par la barrière de la perméabilité ou maintien de l'ion toxique hors de la cellule (réduction de l'absorption);
- 2- Pompage par efflux très spécifique (élimination des ions toxiques qui sont entrés dans cellule au moyen de systèmes impliqués dans le transport de cations ou d'anions). Les pompes efflux peuvent être des ATPases ou des canaux chimiosmotiques. Les ATPases sont des enzymes qui utilisent l'énergie chimique de scission de la liaison haute énergie phospho-ester de l'ATP, conduisant à la formation d'un gradient de concentration ;
- 3- Séquestration intracellulaire ou extracellulaire par des composants fixateurs d'ions métalliques spécifiques (par exemple : métallothionéine) et/ou ségrégation en composés complexes ;
- 4- Détoxification enzymatique (oxydoréduction) qui convertit un ion très toxique en un ion moins toxique. Les deux premiers mécanismes peuvent être groupés sous le terme éloignement (maintenir à distance) alors que les deux derniers

sont connus comme des mécanismes de séquestration. Les pressions sélectives exercées par les environnements chargés de métaux ont entraîné le développement de systèmes de résistance pour la plupart des métaux.

## CHAPITRE 4

### GÉNÉRALITÉS SUR LA PHYTOREMÉDIATION

#### 4.1. Introduction

La phytoremédiation n'est pas un concept nouveau [129], [130]: il y a 300 ans, on utilisait déjà les plantes pour le traitement de l'eau. Cependant, depuis le milieu des années 70, suite à différents rapports indiquant que les pesticides persistent souvent plus longtemps dans les sols non végétalisés que dans les sols végétalisés, la remédiation basée sur les plantes a été proposée pour les boues draguées et les sols contaminés par les métaux et les toxiques organiques.

Cette méthode s'est aussi développée dans le contrôle de la pollution de l'air. Dans les années 1990, différents chercheurs ont suggéré que la végétation pourrait être utilisée pour augmenter la dégradation microbienne des polluants. Après l'étude des pesticides, l'intérêt se porte sur les polluants organiques : leur dégradation pourrait être favorisée, in situ, lorsque les plantes et les microorganismes de la rhizosphère sont exposés longtemps à une toxine [129].

Lors d'une exposition chronique, les microorganismes qui peuvent dégrader une toxine ou survivre à des concentrations de toxine élevées dans un sol, ont naturellement des chances de devenir plus abondants sur un terrain pollué. De plus, les taux de dégradation microbienne peuvent être accélérés par une plante-hôte associée. On comprend donc l'avantage des espèces végétales natives de la région ou très adaptées au site, à son environnement

#### 4.2. Définitions et généralités

La phytoremédiation est une technique à développements récents mettant à profit les propriétés des plantes et de leurs flores microbiennes associées, l'amendement du sol et les techniques agricoles pour dépolluer des milieux contaminés (sols, eaux, air). Elle utilise les capacités des plantes à **extraire**, **transformer** ou **accumuler** les contaminants environnementaux, et est particulièrement adaptée au traitement de

larges superficies contaminées par des niveaux faibles de polluant [131].

Deux grandes catégories de polluants susceptibles d'être traités par phytoremédiation :

#### **4.2.1. Polluants élémentaires**

- Les éléments-traces métalliques (communément appeler "Métaux lourds") ou métalloïdes toxiques tels l'arsenic, le cadmium, le chrome, le plomb ou le mercure
- Radionucléides tels le césium, le strontium, le technétium ou l'uranium.

La phytoremédiation des polluants élémentaires consiste généralement à convertir l'élément sous une forme chimique moins toxique ou à les extraire du milieu puis à les déplacer vers les parties aériennes en vue d'une récolte.

#### **4.2.2. Polluants organiques**

- \* Carbohydrates linéaires halogénés : trichloréthylène (TCE)
- \* Composés nitro-aromatiques : trinitrotoluène (TNT)
- \* Polychlorés diphényliques (PCBs) : dioxine

La phytoremédiation des composés organiques consiste généralement en leur dégradation.

Dans des conditions de forte pollution métallique, la plupart des végétaux sont éliminés, cependant une flore peut se développer sur des sols éminemment intoxiqués par la présence des éléments-traces métalliques (ETM). Cette aptitude particulière montrée par certaines espèces végétales leur a valu l'appellation de « **métallophytes** » ou d'être qualifiées selon le métal dominant dans le sol, le type de minerai ou le type de roche métallifère, d'espèces *cupricoles*, *cobalticoles*, *calaminaires*, *serpenticoles*,...

Certaines espèces ne se rencontrent, dans un territoire donné, que sur sols toxiques (**métallophytes locales**) ou à la fois sur sols toxiques et sur sols normaux (**pseudo-métallophytes**). Les métallophytes locales sont donc fortement indicatrices d'un niveau de pollution par les ETM, aussi les a-t-on utilisées dans la prospection

minière.

Dès 1934, les métallophytes sont interprétées comme le résultat de la sélection naturelle qui a permis de retenir, au sein des populations végétales soumises au stress des teneurs métalliques élevées du sol, les individus tolérant les métaux présents (les chimio-écotypes). Cependant, les recherches actuelles révèlent que certaines espèces de milieux normaux présentent une tolérance constitutive et accumulent des ETM de façon importante. Ce cas est rencontré chez *Arabidopsis halleri* [132] et chez *Thlaspi coerulescens* [133]

### **4.3. Différentes techniques de phytoremédiation**

Lorsque la phytoremédiation est utilisée pour l'élimination des métaux toxiques du sol (ETM et radionucléides), elle fait appel à l'utilisation de plantes sélectionnées et accumulatrices de ces métaux [134]

Elle comprend alors trois aspects [135] (Figure 4.1) :

1. **Phytostabilisation** : utilise des plantes afin de réduire la **biodisponibilité** des polluants dans les sols, cela engendre une réduction du lessivage ou de la dissipation dans l'air

2. **Phytovolatilisation** : utilise les plantes pour **volatiliser** les polluants.

3. **Phytoextraction** : utilise les capacités des plantes à **extraire** du sol des polluants et à les concentrer dans les parties aériennes (ou racinaires), ensuite récoltées. Cela sous-entend l'utilisation de plantes à croissance rapide et produisant une biomasse importante. Malgré cela, il s'agit d'une méthode lente.

4. **Rhizodégradation** (Phytodégradation): utilisation des plantes en association avec des microorganismes pour **dégrader** des polluants organiques du sol. Les racines absorbent, précipitent et concentrent les métaux des effluents pollués ; cela requière l'utilisation de plantes dont les racines ont une croissance rapide ; les mécanismes de prélèvement des métaux varient selon les plantes : processus biologique ou absorption de surface par les racines, c'est-à-dire combinaison de processus physiques et chimiques tels que la chélation, les échanges d'ions et l'adsorption spécifique (ne requérant pas d'activité biologique, elle peut se faire sur

des tissus morts). Les auteurs de cette classification [135] ajoutent qu'il existe également une « bioremédiation assistée par les plantes » : les racines des plantes, conjuguées à leurs microorganismes rhizosphériques sont utilisées dans le cadre de la remédiation des sols contaminés avec des composés organiques. *Anderson* et ses collaborateurs [136] précisent que les microorganismes de la rhizosphère augmentent les transformations biochimiques des polluants.

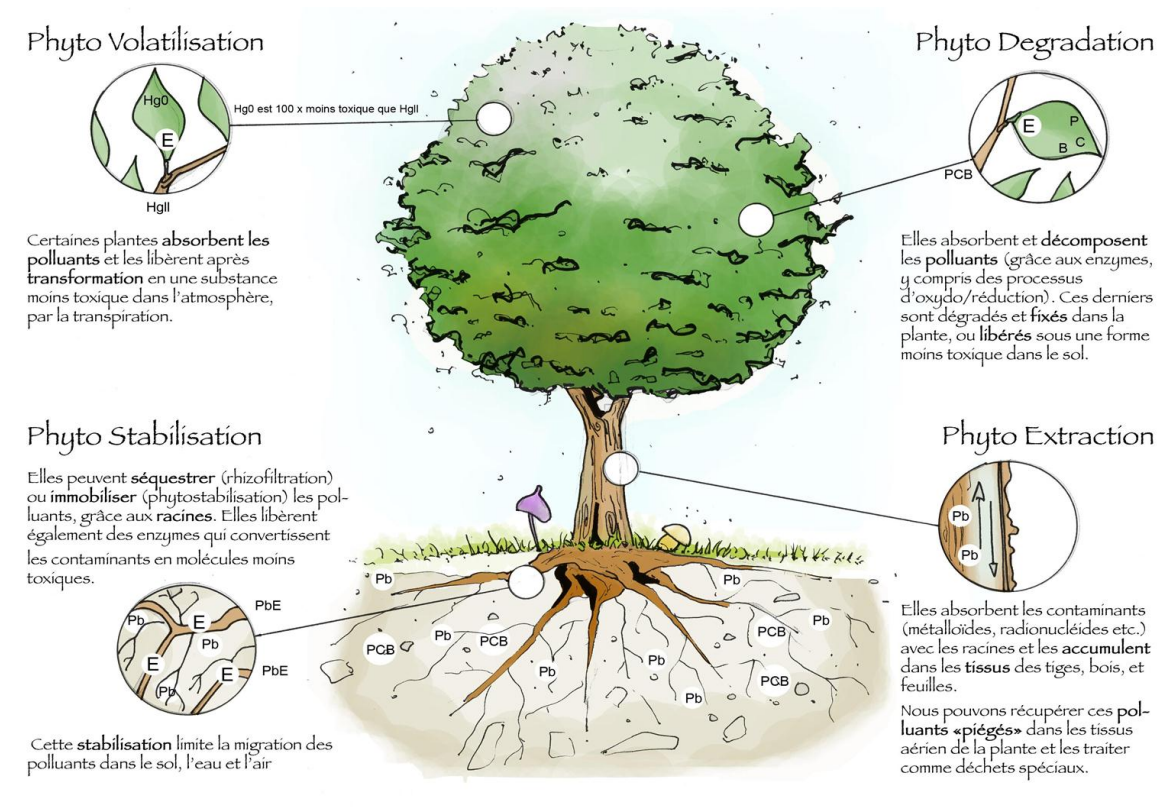


Figure 4. 1 : Les processus impliqués dans la phytoremédiation [135]

## CHAPITRE 5

### INTÉRÊTS DES LÉGUMINEUSES

#### 5.1. Intérêts agronomiques des légumineuses

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée, d'où leur intérêt également dans le cadre d'une agriculture "durable" (réduction des intrants, préservation et enrichissement des sols en azote) [137]. Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec les souches de *Rhizobium*. Elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la rotation des cultures [138].

Selon Abdelguerfi [139], *Lotus edulis* présente un nombre important de nodosités tout au long de son cycle de développement d'où l'intérêt à le conseiller pour améliorer les sols les moins fertiles.

#### 5.2. Intérêt alimentaire des légumineuses

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des *Fabaceae*. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale [139]. Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18 à 30% de la graine sèche) [138]

Les légumineuses spontanées sont une source alternative pour l'alimentation du bétail sachant que l'Algérie connaît une augmentation de son bilan énergétique et une nette diminution de la production fourragère [140], [141]. De ce fait, l'utilisation d'espèces spontanées afin de remédier à ce déficit peut augmenter le taux de couverture des besoins à plus de 65% [142].

En effet, *Lotus ornithopodioides* est riche en matière azotée totale ce qui lui confère une place de choix parmi les sources protéiques et énergétique utilisable par le cheptel en général et les ruminants en particulier, du fait que leur digestibilité s'élève à 70% [142]

Selon Nacef et al. [142], la digestibilité de la matière sèche de *Lotus ornithopodioïdes* évolue au cours de leur cycle de développement où elle diminue significativement du stade végétatif au stade grenaison [139]; [143]; [144] ; [145].

Les résultats de Boutahraoui [146] concernant la composition chimique de *Lotus ornithopodioïdes* au stade floraison sont synthétisés dans le tableau 5.1

**Tableau 5.1** : Composition chimique de *Lotus ornithopodioïdes* au stade floraison [146]

Espèce		<i>Lotus ornithopodioïdes</i>
Composant		
<b>MS%</b>		31.24 ± 2.29
<b>En % de MS*</b>	<b>MO*</b>	89.86 ± 0.15
	<b>CB*</b>	24.23 ± 1.54
	<b>MAT*</b>	14.52 ± 0.35
	<b>MM*</b>	10.13 ± 0.15
	<b>P*</b>	0.17 ± 0.08

\*MS : Matière sèche ; \*MO : Matière organique ; \*CB : Cellulose brute ; \*MAT : Matière ; \*MM : Matière minérale ; \*P : Phosphore

*Lotus ornithopodioïdes* est riche en cellulose brute qui est une source non négligeable d'énergie pour les ruminants, et bien pourvus en matière azoté totale, source de protéines. Le caractère spontané de ces espèces et leur adaptation aux conditions pédoclimatiques locales leur confère une très riche composition chimique qui les rend susceptibles d'augmenter en qualité et en quantité l'offre fourragère en Algérie [146]

### **5.3. Intérêts scientifiques des légumineuses**

Les légumineuses tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie [138].



Les principaux objectifs de recherche, sur les légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée [137].

La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des coûts et bilans énergétiques sont aujourd'hui un objectif commun à plusieurs filières dans la perspective, non seulement d'améliorer une compétitivité économique, ou de réduire des impacts environnementaux, mais surtout de développer des biocarburants [138]

Les légumineuses en générale et les *Lotus* en particulier sont d'excellents dépolluants telluriques qui peuvent être préconisé en phytoremédiation [147].

## CHAPITRE 6

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### **6.1. Métallo-résistance et activité biocontrôle de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)**

##### **6.1.1. Objectif du travail**

L'objectif de notre étude se situe dans un cadre éco-toxicologique, par la détermination du seuil de tolérance d'une bactérie symbiotique vis-à-vis d'un stress abiotique généré par deux éléments-traces métalliques (le Cuivre et le Cadmium) en vue d'introduction à la *rhizodégradation*.

Le choix de ces deux éléments est lié, principalement, à leur comportement toxicologique. Le premier ETM ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) élément indispensable aux êtres vivants, il joue un rôle crucial dans les processus métaboliques des plantes et des microorganismes, pouvant être toxique dans certaines conditions. Le second ( $\text{CdCl}_2$ ) n'a apparemment aucun rôle physiologique mais fortement toxique qui entre dans l'industrie phytopharmaceutique. Le cadmium est accumulé dans les sols, après emploi d'engrais super phosphatés qui favorise son passage dans les végétaux.

Afin de tester l'effet du chlorure de cuivre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et du chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) sur la croissance et la survie de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*), le milieu TYB (Appendice A) a été additionné de différentes concentrations de ces ETMs allant de 0 à 6000  $\mu\text{g/ml}$

##### **6.1.2. Souche bactérienne**

La bactérie choisit pour notre expérimentation appartient au genre *Bradyrhizobium*, famille des *Bradyrhizobiaceae* elle a été isolée des nodosités de *Lotus ornithopodioides* et caractérisée durant nos travaux antérieurs (Tableau 6.1).

*Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) est une bactérie à Gram négative à croissance lente, sécrétant des Exo polysaccharides, mobile possédant une activité uréasique. N'utilisant pas le rouge Congo du milieu spécifique YMA+RC et n'acidifie pas le milieu GPA+BCP. Elle présente des colonies convexes translucides sur le milieu

YMA[148]

**Tableau 6.1 : Caractéristiques culturaux de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) [148]**

Bactérie	Gram	Croissance	EPS	Mobilité	Uréase	YMA+RC	GPA+BCP
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ( <i>Lotus</i> )	<b>négative</b>	<b>Lente</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

### **6.1.3. Détermination *in-vitro* de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des éléments-traces métalliques (ETMs)**

Deux (02) millilitres d'une pré-culture diluée à 1% ont été prélevés puis ensemercer dans deux séries de flacons contenant le milieu TYB (Appendice A) ayant reçus au préalable différentes concentrations (0 à 6000  $\mu\text{g/ml}$ ) de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et de  $\text{CdCl}_2$  et incubés à une température ambiante (de 28 - 30°C) durant 07 jours en agitation de 100 rpm (Figure 6.1). La densité optique à  $\lambda=600\text{nm}$  ( $\text{D.O}_{\lambda 600}$ ) a ainsi été mesurée afin d'évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des ETMs. La CMI est définit comme étant la plus basse concentration qui n'occasionne aucun développement visible [149]



**Figure 6.1 : Incubation de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) avec agitation en conditions métalliques (100rpm)**

Les densités optiques ont été converties en unités formants une colonie (UFC) en se basant sur la méthode de Mc Farland proposé par Sutton [150] pour la détermination de la concentration cellulaire approximative :

$$\text{Concentration cellulaire approximative } (\times 10^8 \text{ UFC/ml}) \cong \frac{DO_{600nm}}{0,0662}$$

#### **6.1.4. Activité biocôntrole de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)**

##### **6.1.4.1. Effet antifongique de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)**

La détermination de la capacité antagoniste de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) a été testée *in vitro* sur milieu PDA (Appendice A) [151]. Où on a testé la souche bactérienne à inhibée la croissance de champignons phytopathogènes. Les souches fongiques utilisées sont: *Fusarium oxysporum* f sp. *albidinis*, *Diplodiaseriata* et *Neofusicoccum parvum* provenant de la collection du laboratoire de microbiologie de l'université de Blida 1

Un disque de gélose de 6mm de diamètre de la culture de chaque champignon a été déposé au centre de la gélose PDA. Cinq (05) microlitres de la culture bactérienne (âgée de 24 heure) ont étéensemencés en spots à une distance de 3 cm de la souche fongique. Un témoin négatif de la souche fongique a été testé en absence de bactéries. Les boites ont été incubées à 25°C pendant 04 jours. Le pourcentage d'inhibition a été obtenu par la formule préconisée par Kumar [151]

$$I\% = 1 - (a/b) \times 100$$

**a:** distance de la croissance du champignon en présence de la colonie bactérienne,

**b:** distance de la croissance du champignon seul (témoin) jusqu'au bord de la boite.

##### **6.1.4.2. Production de l'acide indole acétique (AIA)**

La production de l'AIA a été testée sur milieu de Winogradsky [152] (Appendice A) additionné de tryptophane (5g/l). Le milieu a été inoculé par 100 µl de culture bactérienne incubée à 30°C pendant 96 h.

Le dosage colorimétrique a été réalisé selon la méthode de Loper et Scroth [153]. Les cultures ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 20min. 1ml du surnageant a été additionné de 2 ml du réactif de **Salkowski** (50ml d'acide perchlorique 35% et

1ml de  $\text{FeCl}_3$  à 0.5 M) et quelque gouttes d'acide ortho-phosphorique. La DO a été mesuré à 530 nm après 30 mn d'incubation.

Les concentrations de l'AIA ont été déterminées à l'aide d'une courbe étalon obtenue dans un intervalle 0 à  $10^{-3}$  M d'AIA (Fluka) (Appendice B).

#### **6.1.4.3. Production d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ )**

Ce test qualitatif a été réalisé selon la méthode de Cappuccino et Sherman [154]. Il consiste à inoculer 100 $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne dans 10ml d'eau peptonée (EP) (Cheminova). Après incubation 30°C/96h, 500 $\mu\text{l}$  du réactif de **Nessler** (Prolabo) ont été ajoutés dans chaque tube de EP. L'apparition d'une couleur jaune ou orange atteste de la production de  $\text{NH}_3$ .

#### **6.1.4.4. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)**

Elle a été évaluée selon la méthode de Lorck [155] sur gélose nutritive (GN) additionnée de glycine (4,4g/l). La culture bactérienne a étéensemencée par stries sur la gélose en boîtes de Pétri. Un disque de papier Whatman N°42 de 09 cm de diamètre imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) a été déposé au fond du couvercle de la boîte. Celle-ci a été scellée avec du papier para film et incubée à 30°C pendant 96 h. Le résultat positif se traduit par le virage de la couleur du papier Wattman du jaune vers une couleur marron orangée indiquant la production de HCN volatile.

## **6.2. Implication de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) dans le contournement du stress métallique chez le lotier.**

### **6.2.1 Objectif du travail**

La germination est un ensemble d'événements commençant par l'étape primordiale d'absorption de l'eau par la graine [156] et se terminant par l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule à travers les structures qui entourent l'embryon [52].

Nombreuses sont les contraintes environnementales compromettant l'aptitude des graines à germer ; la salinité [157], le stress hydrique [156], l'humidité, une température inadéquate [158], [159], [160]. Les travaux ayant étudiés l'impact du stress par les éléments-traces métalliques sur la germination sont très peu nombreux. L'inhibition de ce processus semble dépendre, toutefois, du métal, de sa concentration, de la durée d'exposition des graines, de l'espèce végétale, voire même de la variété [161], [162].

Le but de notre expérimentation est d'apprécier les effets de l'inoculation d'une rhizobactérie *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur la germination des graines de lotier en conditions métalliques.

En effet, les expériences présentées dans ce chapitre s'inscrivent dans le cadre de la vérification de l'hypothèse d'une implication de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) dans l'évitement d'un désordre dans la mobilisation des réserves minérales et organiques, qui serait associé à la diminution du pouvoir germinatif des graines du lotier sous stress abiotique (stress métallique par le Cd et/ou le Cu).

### **6.2.2. Données pédoclimatiques et matériel végétal**

Les graines utilisées dans cette expérimentation sont celles de *Lotus ornhithopodioïdes*, fabacée spontanée fourragère. La systématique de l'échantillon est résumée dans le tableau 6.2.

Tableau 6.2: Position systématique de l'échantillon [163]

<b>Règne</b>	<i>Planta</i>
<b>Clade</b>	Angiospermes
<b>Clade</b>	Dicotylédones vraies
<b>Clade</b>	Rosidées
<b>Clade</b>	Fabidées
<b>Ordre</b>	<i>Fabales</i>
<b>Famille</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Sous-famille</b>	<i>Papilionoideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Loteae</i>
<b>Genre</b>	<i>Lotus</i>
<b>Nom binomial</b>	<i>Lotus ornithopodioïdes</i> L.,1753

*Lotus ornithopodioïdes* ou "Lotier à pied d'oiseau" est une plante annuelle, suffrutescente, rameuse, pubescente dont les racines pivotantes pourvues de nodosités. Les feuilles sont trifoliées à folioles entières, stipules ovales, à 03 feuilles florales. Les fleurs jaunes regroupées en 03 à 05. Les gousses sont arquées, stipitées à graines saillantes, rapprochées en faisceaux (Figure 6.2)

Figure 6.2 : *Lotus ornithopodioïdes* au stade floraison



La collecte des graines a été effectuée durant le mois de Juin 2013 au niveau de la parcelle jouxtant les serres de cultures maraîchère et celle du laboratoire de valorisation des ressources agrobiologiques de l'université de Blida 1 (Figure 6.3). Les nodules ayant permis d'isoler et de caractériser la bactérie qui a servi à notre expérimentation ont été prélevés au niveau du même site.



Figure 6.3 : Stations d'échantillonnage de *Lotus ornithopodioides*



- **Données pédologiques**

Selon Ait ouarab [164] ; Amrouche [165] et Mallou [166], lors de travaux traitant des paramètres physicochimiques dans différentes parcelles de la station expérimentale, il ressort :

1. Une texture équilibrée à limoneuse
2. Une structure polyédrique moyennement développée et dépourvue de calcaire.
3. La teneur en matière organique (MO) est moyenne avec un apport C/N compris entre 4,3 et 23,8
4. La capacité d'échange cationique (C.E.C) est comprise entre 11,5 et 26,7 meq / 100g de sol
5. Un sol poreux et perméable
6. Un pH voisin de la neutralité, 6,5 à 7,5.
7. Le complexe absorbant est saturé au niveau de tous les horizons
8. Les sols disposent de bonnes réserves minérales notamment en phosphore assimilable et en potassium
9. La teneur en azote est faible

Les caractéristiques physiques et chimiques du sol sont consignées dans les tableaux 6.3 et 6.4

**Tableau 6.3: Caractéristiques physiques du sol [164], [165], [166]**

Composition granulométrique (%)					MO%	Calcaire%	Cailloux et graviers %	Perméabilité Km/h
Argile	Limon fin	Limon grossier	Sable fin	Sable grossier				
16.36	24.12	16.26	14.28	28.98	1.89	00.00	30	0.242

Il ressort de ces données que le sol est de texture équilibrée, non plastique, caillouteux, non calcaire, ayant tendance à la battance, moyennement pourvue en matières organiques, poreux et perméable.

**Tableau 6.4 : Caractéristiques chimiques du sol [164], [165], [166]**

C.E.C (meq/100g)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> assimilable (ppm)	pH
12.5	189.33	6.9

D'après les paramètres chimiques, on note que le sol est neutre, non salé, très riche en phosphore, disposant d'un complexe absorbant à C.E.C moyenne, saturée en base notamment, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>.

- **Données Climatiques**

- **Température et pluviométrie**

Principaux facteurs influant sur le développement des plantes. L'étude de ces paramètres, objet de notre étude, est plus qu'indispensable. La température et la pluviométrie sont des paramètres climatiques essentiels pour définir la période sèche ainsi que la période humide de l'année.

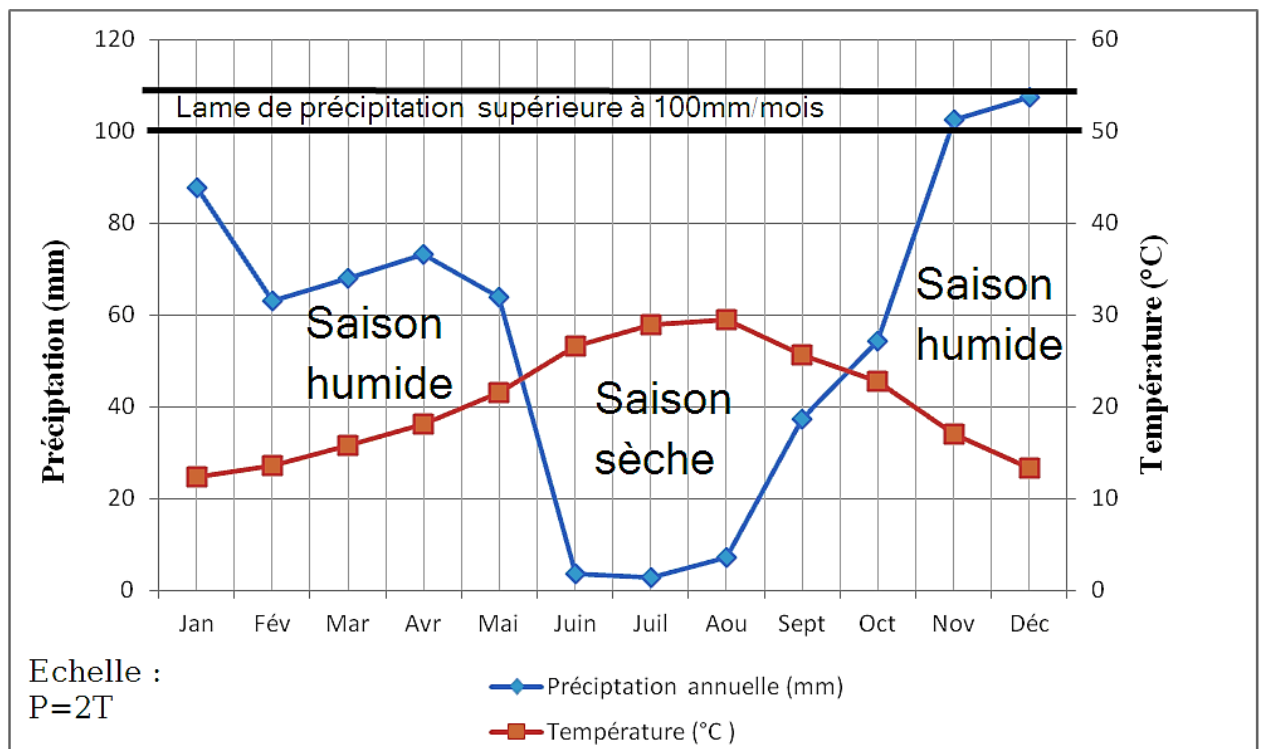
Nous utilisons les variations mensuelles des températures et de la pluviométrie dans la région de Blida 1995 à 2014 (**Tableau 6.5**), afin de pouvoir réaliser le diagramme Ombrothermique de Gaussen et le climagramme d'Emberger.

**Tableau 6.5 : Variations mensuelles des températures et de la pluviométrie dans la région du Blida durant la période 1995-2010 [167]**

Mois	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.	Mai.	Juin.	Juil.	Aou.	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	
m (°C)	4.49	4.48	5.28	8.81	11.07	17.07	20.54	22.01	16.53	13.53	8.23	5.18	
M (°C)	20.31	22.56	26.15	27.38	31.99	36.20	37.2	37.00	34.66	32.05	25.73	21.40	
M+m/2 (°C)	12.44	12.49	15.57	16.11	21.42	25.74	28.53	29.34	25.08	21.92	16.25	13.20	
P (mm)	87.78	62.98	68.03	73.26	63.84	3.62	2.69	7.24	37.16	54.32	102.5	107.4	$\Sigma = 670,82$

### ○ Diagramme Ombrothermique

Le diagramme Ombrothermique de **Gausсен** permet de représenter les précipitations des saisons humides et sèches au cours de l'année. Le mois le plus sec est celui dont les précipitations totales exprimées en millimètre sont égales ou inférieures au double de la température exprimé en degrés Celsius ( $P \leq 2T$ ). Sur ce diagramme Ombrothermique sont représentées les températures mensuelles moyennes, pluviométrie en fonction du temps (**Figure 6.4**).



**Figure 6.4 : Diagramme Ombrothermique de Gausсен pour la région du Blida (1995-2010)**

Nous remarquons nettement sur le diagramme Ombrothermique, que la période sèche s'étale de la fin du mois de mai jusqu'au début du mois d'octobre. La période humide est plus importante, elle s'étale du mois de janvier à la fin du mois de mai, et du début du mois d'octobre jusqu'au mois de décembre. Nous notons également que le mois le plus sec se trouve être le mois de juillet avec une température moyenne de 28.87°C pour une précipitation de 2.69mm ( $2.69 < 57.74$  alors  $P < 2T$ ).

○ **Quotient pluviométrique d'Emberger :**

Le climat de notre région est méditerranéen, caractérisé par un été chaud et sec ( $T^{\circ} : 37.00$  et  $P : 2.69$ ), et un hiver frais et humide ( $T^{\circ} : 4.49$  et  $P : 107.4$ ). Mutin [168], définit un quotient pluviométrique permettant de distinguer les différentes nuances du climat méditerranéen. Nous avons utilisé la formule de Stewart [169] adapté pour l'Algérie, qui se présente comme suit :

$$Q3 = \frac{Q2 \cdot P}{M - m}$$

**Q3** : Quotient pluviométrique d'Emberger. **Q2 = 3.43** : Coefficient de Stewart établis pour l'Afrique du nord. **P** : Précipitation annuelle (mm). **M** : température moyenne maximale du mois le plus chaud (°C). **m** : température moyenne minimal du mois le plus froid (°C). **M-m** : L'amplitude thermique.

Ce quotient nous permet de classer les stations de la zone méditerranéenne au sein d'étages où nous introduisons des divisions on se basant sur la température minimale selon les valeurs de « m ». Selon Mutin [168], nous distinguons pour différents étages : un hiver froid, frais, tempéré ou chaud. Sur cette base nous dressons un graphique pluviométrique de la zone méditerranéenne en portant la valeur de « Q3 » en fonction de « m ». Les calculs du quotient pluviométrique de notre station sont représentés dans le tableau 6.6

**Tableau 6.6 : Calculs du quotient pluviométrique.**

<b>Données</b>	
Précipitation annuelle. <b>P (mm)</b>	<b>670,82</b>
Température moyenne maximale du mois le plus chaud ( <i>Août</i> ). <b>M (°C)</b>	<b>29,34</b>
Température moyenne minimal du mois le plus froid ( <i>Janvier</i> ). <b>m (°C)</b>	<b>12,44</b>
Amplitude Thermique. <b>M-m (°C)</b>	<b>16,9</b>
Quotidien pluviométrique d'Emberger. <b>Q3</b>	<b>136,148</b>

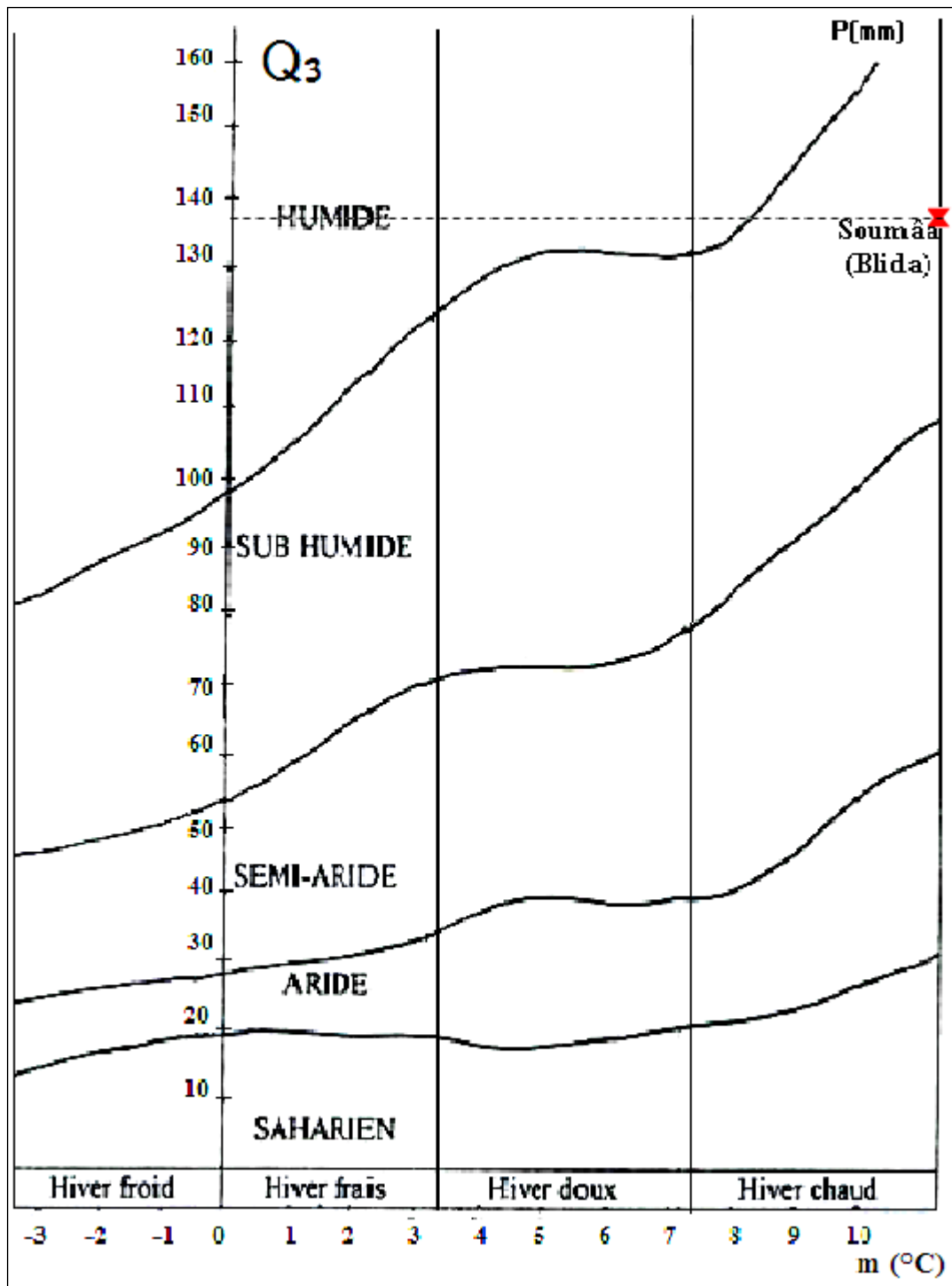


Figure 6.5: Climagramme d'Emberger pour la région de Blida

Le climagramme pluviométrique d'Emberger, nous permet de situer la station expérimentale de l'université de Blida 1 dans l'étage bioclimatique subhumide supérieure, à hiver chaud (Figure 6.5)

De par sa position géographique, notre zone d'étude subit la double influence de la mer et de la montagne. Le climat est de type méditerranéen, à hiver peu pluvieux (86.05mm) et frais, avec une température moyenne minimale de 12.44°C en Janvier, et un été sec (4.51mm).

### **6.2.3. Protocole de germination et capacité germinative**

#### **6.2.3.1. Stérilisation et scarification des graines**

Avant de procéder à la stérilisation des graines, il faut tout d'abord les sélectionner, elles doivent être non endommagées, propres et de taille identique. Pour ce paramètre, 720 graines ont été choisies.

La stérilisation se fait selon la méthode de Vincent [170] et Somasegaran et Hoben [137] comme suite :

- Dans un flacon stérile, mettre les graines avec de l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes.
- Transférer les graines immédiatement dans l'acide sulfurique concentré pendant 3 minutes afin de les scarifier.
- Rincer les graines 10 fois à l'eau distillée stérile, et après le dernier rinçage, on les laisse gonfler pendant 1 heure (Figure 6.6).



**Figure 6.6 : Scarification des graines (A : Graines dures ; B : Graines gonflés après une heure)**

### 6.2.3.2. Mise en germination

Après stérilisation, 720 graines ont été mises à germer sur boîtes de Petri contenant des disques de coton imbibés d'eau distillée, à l'obscurité totale (enveloppées avec du papier aluminium) et à température ambiante pendant 2 à 3 jours, jusqu'à apparition des radicelles. [178] (**Figure 6.7**)



**Figure 6.7: Mise en germination des graines**

### 6.2.4. Effet de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur les paramètres physiologiques en présence des éléments-traces

Les graines de Lotier (*Lotus ornithopodioïdes*) ont été désinfectées et scarifiées suivant le protocole de Vincent [170] et Somasegaran et Hoben[137]

L'inoculation des graines par *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) a été réalisée selon la méthode préconisée par Silini [172] (les graines stériles sont immergées dans une suspension bactérienne âgée de 24 h pendant 30min), afin d'appréhender l'effet de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur le comportement germinatif du lotier en présence de différentes concentrations d'ETMs.

Pour l'ensemble des paramètres étudiés dans cette expérimentation, des graines inoculées et non inoculées (témoin) par *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) ont été utilisées.

Les graines ont été ensuite mises à germer dans des boîtes de Petri, (20 graines par boîte) dont le fond a été recouvert d'une double couche de papier filtre imbibé d'eau distillée (témoin), de solutions de concentration différentes en  $\text{CdCl}_2$  et/ou  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (essais) (Tableau 6.7). La germination a été faite à l'obscurité à une température de  $25^\circ\text{C}$ . [173]

Les concentrations en ETMs ont été choisies après analyse statistique des résultats de la CMI des ETMs vis-à-vis de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*). On a choisi ces concentrations selon leur appartenance à des sous-ensembles homogènes différents sauf pour le chlorure de cuivre.

L'effet des ETMs et de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur la germination a été estimée par la mesure de différents paramètres.

**Tableau 6.7 : Concentration du cuivre et du cadmium utilisées ( $\mu\text{g/ml}$ )**

	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{CdCl}_2$	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} : \text{CdCl}_2$
<b>C1(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	1500	2000	1500 : 2000
<b>C2(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	2000	3500	2000 : 3500
<b>C3(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	3000	6000	3000: 6000

#### **6.2.4.1. Cinétique de germination**

Elle permet d'appréhender la signification de l'effet de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur le comportement germinatif de *Lotus ornithopodioïdes* dans un milieu contaminé par le  $\text{CdCl}_2$  et/ou  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à différentes concentrations (tableau 6.7). Le nombre de graines germées a été noté toutes les 24 heures pendant 7 jours.

#### **6.2.4.2. Taux de germination final**

Ce paramètre constitue un meilleur moyen de déterminer la faculté germinative et d'identification de la concentration métallique qui présente la limite physiologique de germination des graines. Il est exprimé par le rapport nombre de graines germées sur nombre total de graines.

$$TG\% = \left(\frac{n}{N}\right) \cdot 100$$

**n** : nombre de graines germées ; **N** : nombre total de graines mises en germination



#### 6.2.4.3. Moyenne de germination journalière

C'est le rapport entre le pourcentage de germination finale (TG%) et le nombre de jours à la germination finale (N) désigné par MDG « *Mean Daily Germination* » [174].

$$MDG = \frac{TG\%}{N}$$

#### 6.2.4.4. Taux cumulé de germination

L'indice du taux cumulé de germination a été déterminé par l'utilisation de la formule modifiée décrite par Bouton [175]

$$TCG = \frac{G2}{2} + \frac{G4}{4} + \frac{G6}{6}$$

Où G2, G4 et G6 sont les pourcentages de germination à 2, 4 et 6 jours après l'initiation de la germination.

#### 6.2.4.5. Vitesse de germination

Selon Come [56], la vitesse de germination peut s'exprimer en temps moyen de germination (TMG) équivalent à l'inverse multiplié par 100 du coefficient de *Kotowski* [176] et conduisant à la formule suivante :

$$TMG(jours) = \frac{(N_1 \cdot T_1) + (N_2 \cdot T_2) + \dots + (N_n \cdot T_n)}{(N_1 + N_2 + \dots + N_n)}$$

$N_1$  : est le nombre de graines germées au temps T1,

$N_2$  : est le nombre de graines germées dans l'intervalle T1 -T2.....

#### 6.2.4.6. Inhibition de la germination

Le pourcentage d'inhibition de la germination a été calculé selon El Hadji [177]:

$$I_{\text{obs}} = \frac{X_i - Y_i}{X_i} \times 100$$

$X_i$  : nombre de graines ayant germées sur le milieu témoin.

$Y_i$  : nombre de graines ayant germées sur le milieu contenant les ETMs.

#### 6.2.4.7. Réversibilité de l'action du cuivre et du cadmium

Ce paramètre a l'avantage de déterminer l'origine de l'effet dépressif des ETMs, de nature **osmotique** et/ou **toxique** [178]

Les 20 graines mises à germer en présence de C1, C2 et C3 des ETMs (tableau 6.2) pendant 7 jours ont été utilisées. Parmi ces graines on a choisi celles non germées. Elles ont été rincées trois fois pour éliminer le cuivre et le cadmium non absorbé puis transférées sur milieu contenant de l'eau distillée pendant vingt jours supplémentaires. Le pourcentage de la reprise de germination (RG%) a été déterminé par la formule qui suit :

$$RG\% = \frac{(a - b)}{(c - b)} \times 100$$

- a** : nombre total de graines germées après le transfert sur l'eau distillée,
- b** : nombre total de graines germées sur solution contenant les ETMs
- c** : nombre total de graines mises en germination.

#### 6.2.4.8. Toxicité des ions et des effets osmotiques sur la germination

Cette expérience vise à prouver si la sensibilité aux ETMs à la germination, déterminée par la réversibilité, est attribuée à des effets osmotiques ou à la toxicité des ions.

Les traitements ont consisté à mettre 10 graines de *Lotus ornithopodioïdes* non inoculées sur un milieu additionné de 10 ml de solution contenant les concentrations différentes en CdCl<sub>2</sub> et/ou CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (**Tableau 6.7**) ou de solutions iso-osmotiques de mannitol (**Tableau 6.8**). L'incubation a duré 20 jours [178].

Le calcul de la concentration du mannitol pour les solutions iso-osmotiques a été fait grâce à la loi de **Van't Hoff** pour le calcul de la pression osmotique, dérivé de la loi sur les gaz parfaits :

$$\pi = R \cdot T \cdot \left(\frac{n}{V}\right) \cdot i \cdot \varphi$$

Où :

$\pi$  : pression osmotique (Pa).

$R$  : constante des gaz parfaits = 8,314 (UI).

$T$  : température absolue en °K = 273 + température en °C.

$n$  : nombre de moles de soluté.

$V$  : volume (m<sup>3</sup>).

$i$  : nombre de particules formées par dissociation du soluté.

$\varphi$  (phi) : coefficient osmotique = facteur de correction.

**Tableau 6.8 : Concentration des solutions iso-osmotiques de mannitol (g/l)**

	CuCl <sub>2</sub> (C1)	CuCl <sub>2</sub> (C2)	CuCl <sub>2</sub> (C3)	CdCl <sub>2</sub> (C1)	CdCl <sub>2</sub> (C2)	CdCl <sub>2</sub> (C3)	CuCl <sub>2</sub> :CdCl <sub>2</sub> (C1)	CuCl <sub>2</sub> :CdCl <sub>2</sub> (C2)	CuCl <sub>2</sub> :CdCl <sub>2</sub> (C3)
<b>Mannitol (g/l)</b>	5,08	10,16	15,24	0,50	1,01	1,52	6	11,18	16,77

#### 6.2.4.9. Effet de la combinaison du cuivre et du cadmium

Le type d'interaction entre les deux contaminants a été évalué par la formule d'Abbott's [179]

Dans ce modèle, l'inhibition de la germination théorique du mélange,  $I_{th}$ , exprimée en pourcentage a été déterminé selon la formule suivante :

$$I_{th} = I_A + I_B - \left(\frac{I_A \cdot I_B}{100}\right)$$

Où  $I_A$  et  $I_B$  représentent les inhibitions causées par les contaminants seuls, (respectivement cuivre et cadmium).

Le rapport d'inhibition (R.I) correspondant à chaque combinaison a été calculé selon l'équation suivante :

$$R.I = \frac{I_{obs}}{I_{th}}$$

Les valeurs de ce rapport sont comparées à 1 :

- Des valeurs de (R.I) supérieures à 1, indiquent une **synergie** entre les deux contaminants.
- Des valeurs de (R.I) inférieures à 1, signifient un **antagonisme** entre les deux produits.
- Des valeurs de (R.I) égales à 1 correspondent à une **additivité** des effets.

### **6.2.3. Effets de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur les paramètres biochimiques en présence des éléments-traces métalliques.**

Après 03 jours d'incubation (nombre de jours nécessaire à l'obtention du maximum de germination du lot témoin) en conditions métalliques l'appréciation des paramètres biochimiques a été effectuée.

#### **6.2.3.1. Dosage de l' $\alpha$ -amylase**

L'alpha-amylase a été mesurée selon la méthode de Xiao [180] en utilisant le Lugol. Les graines misent en germination (10 mg) ont été broyées dans 3 ml de solution tampon phosphate (pH 7)

Un millilitre (1ml) de l'extrait a été additionné à 1ml d'une solution d'amidon soluble (0,2% ; p/v).Après incubation à 50°C durant 30 min, 500 $\mu$ l d'acide chlorhydrique (HCl) ont été ajoutés pour arrêter l'activité enzymatique. Ensuite, 2,5ml de Lugol (I<sub>2</sub>, KI) ont été additionnés. L'absorbance a été mesurée à 580nm (A<sub>580.E</sub>). (Figure 6.8)

Les résultats ont été exprimés en unité enzymatique par millilitre (U/ml), calculée selon la formule suivante :

$$U/ml = \frac{(A_{580.T} - A_{580.E})}{A_{580.Et} \cdot T \cdot V_{\text{extrait}}}$$

**A<sub>580.T</sub>** : l'absorbance de l'amidon **sans** addition de l'extrait enzymatique ;

**A<sub>580.E</sub>** : l'absorbance de l'amidon **après** addition de l'extrait enzymatique ;

**A<sub>580.Et</sub>** : l'absorbance pour 1 mg d'amidon, dérivée de la courbe étalon (Appendice B)

**T** : temps d'incubation en minutes ;

**V<sub>extrait</sub>** : volume de l'extrait enzymatique en millilitre ;

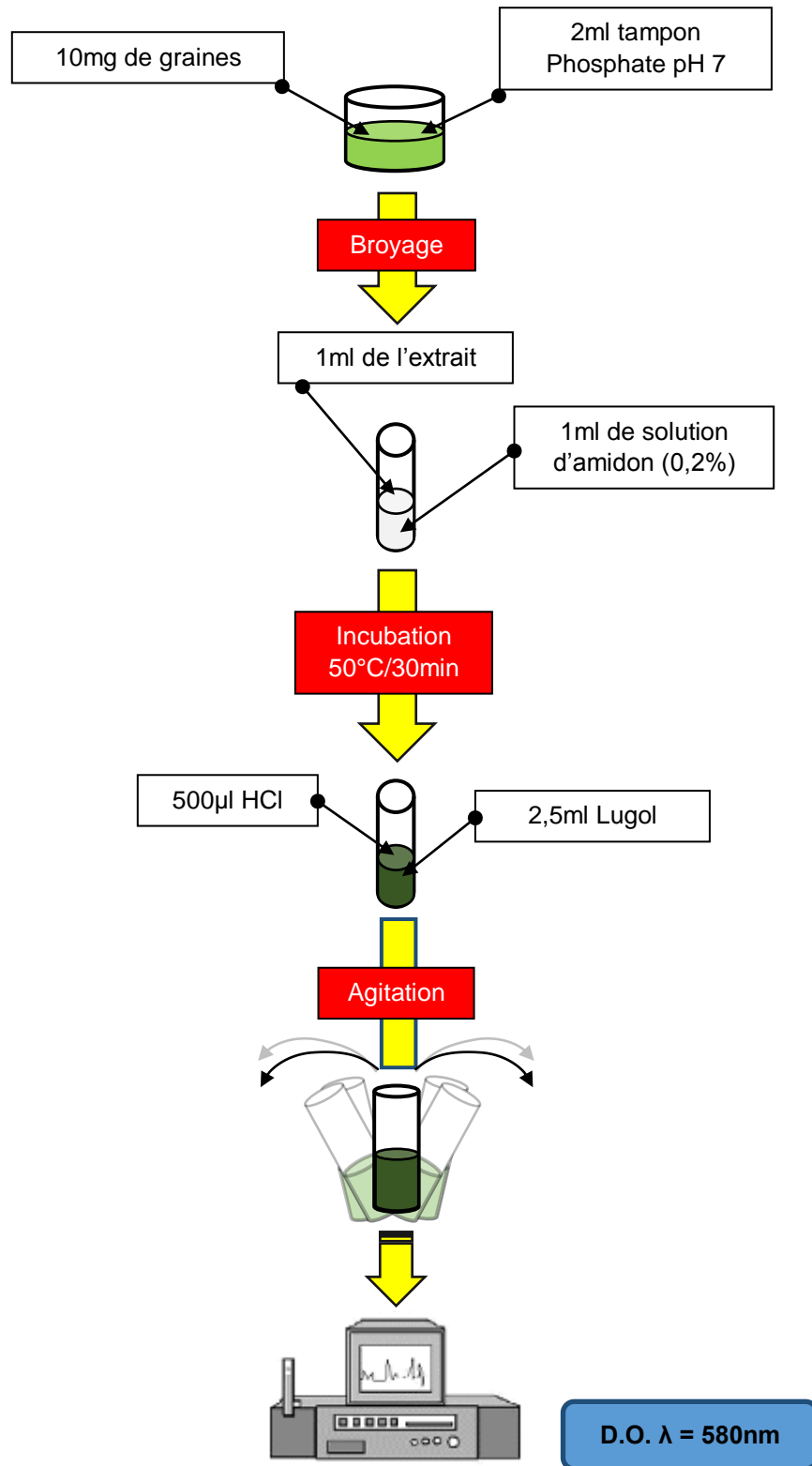


Figure 6.8: Dosage de l'α-amylase

### **6.2.3.2. Teneur en sucres solubles totaux**

#### **6.2.3.2.1. Extraction**

L'extraction des sucres est réalisée à partir des cotylédons. 1g de graines a été broyé dans un mortier, dans 3ml d'éthanol (80%). Le broyât obtenu a été incubé pendant 30 min dans le réfrigérateur à une température de 4°C puis centrifugé à 1500 G durant 15 min à 4°C

Le surnageant constitue la fraction soluble de sucres. Ce dernier est conservé dans des tubes Eppendorf et stocké à (-20 °C) [181]

#### **6.2.3.2.2. Dosage des sucres totaux**

Les oses sont stables en milieu acide. Cependant, chauffés en milieu acide concentré, ils donnent des furfuraldéhydes par cyclisation et déshydratation. Les furfurals et leurs dérivés ont la propriété de se condenser avec le phénol pour former des complexes marron. Le dosage des sucres totaux solubles a été réalisé par la méthode de Dubois [182].

- Dans une série de tubes à essai, 25 µl d'extrait sont additionnés à 500µl de phénol (5%) et à 1,5 ml de solution d'acide sulfurique concentrée (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 96%
- Le mélange est chauffé au bain marie à 100 °C pendant 5 min.
- Après refroidissement dans la glace fondante.
- la densité optique est mesurée à 490 nm. un blanc dans lequel 25µl d'éthanol à 80 % remplace l'extrait brut. (Figure 6.9)
- Un étalon a été construit grâce à une gamme de concentration d'une solution de glucose (0 à 20 µg/ml). Les résultats des densités optiques ont été rapportés sur une courbe étalon des sucres solubles (exprimée en glucose). (Appendice B)

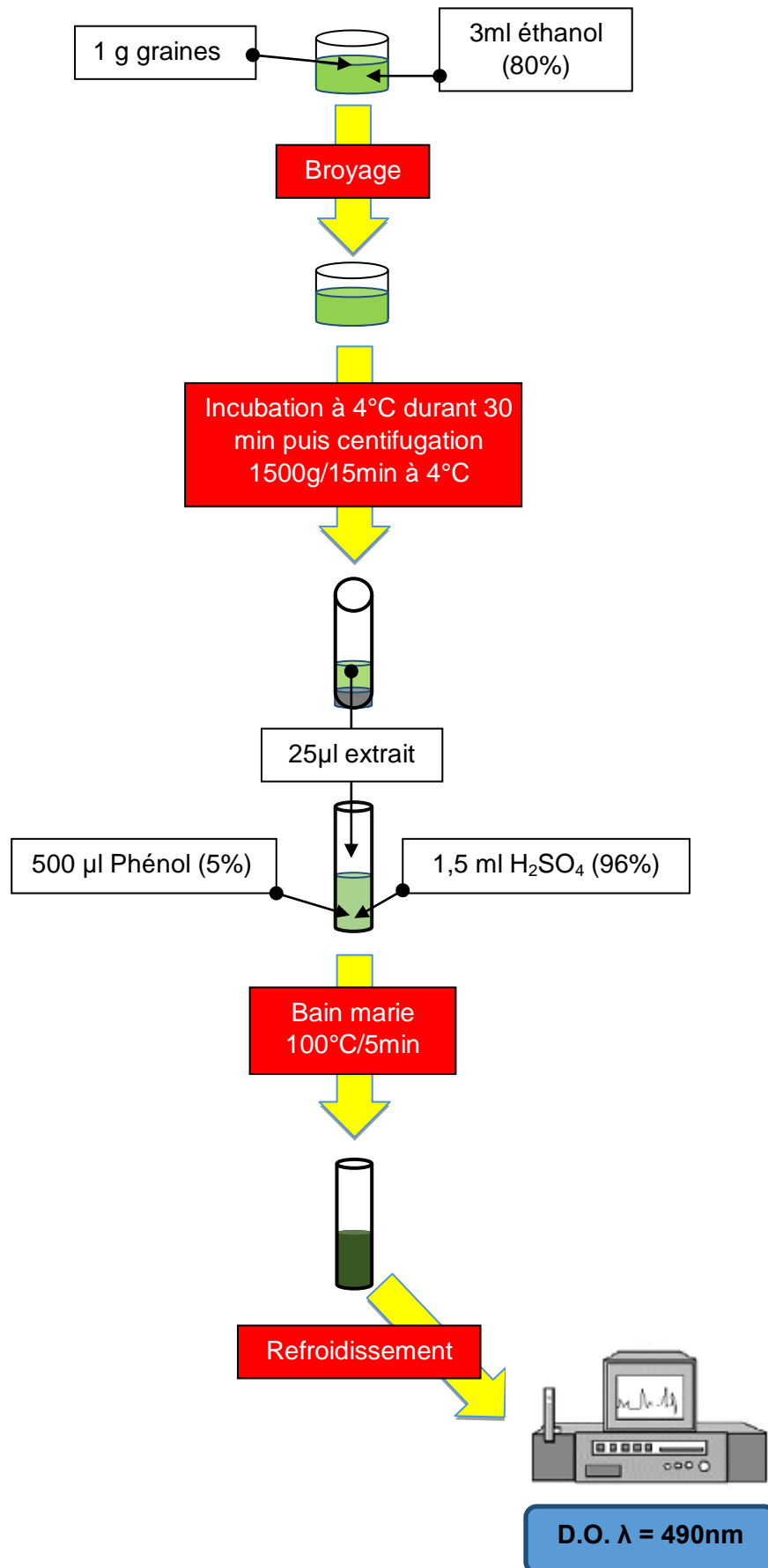


Figure 6.9: Dosage des sucres solubles totaux



### **6.2.3.3. Dosage des acides aminés solubles et de la proline**

Les échantillons ont été conservés en deçà de -15°C avant analyse. L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par Naidu [183] : 50mg d'échantillon ont été placés dans des tubes de centrifugation contenant 5ml d'un mélange (*méthanol : chloroforme : eau*) (60 : 25 : 15 ml). Les tubes scellés ont été chauffés au bain marie (60°C) durant 02 h et centrifugés à 5000 G pendant 10 mn. Le surnageant a servi ensuite aux dosages des acides aminés solubles et de la proline. (Figure 6.10)

#### **6.2.3.3.1. Acides aminés solubles**

Un (01) millilitre de solution tampon acide acétique /acétate de sodium (pH= 4,3) et 1ml de Ninhydrine (5% dans l'éthanol) ont été additionnés à 1ml de surnageant. Les échantillons ont été agités puis chauffés au bain marie (95°C) pendant 15mn. L'absorbance des essais a été déterminée à 570nm.

Une courbe étalon a été réalisée à partir d'une solution mère de leucine à 5 mM préparée dans l'eau distillée pour des valeurs comprises entre 0 et 200 nmoles de leucine. Les résultats ont été exprimés en µmoles d'équivalents leucine/g M.F. (Appendice B)

#### **6.2.3.3.2. Proline**

La proline a été déterminée par une méthode développée par Singh [184]: 1ml de surnageant, 4ml de solution de Ninhydrine, 4ml d'acide acétique glacial et 1ml d'eau distillée sont placés dans des tubes de centrifugation de 10 ml. Ce mélange a été chauffé au bain marie (90°C) pendant 45mn et refroidi à la température ambiante. L'absorbance a été lue à 520 nm. Les résultats sont reportés sur une courbe étalon de Proline (Appendice B)

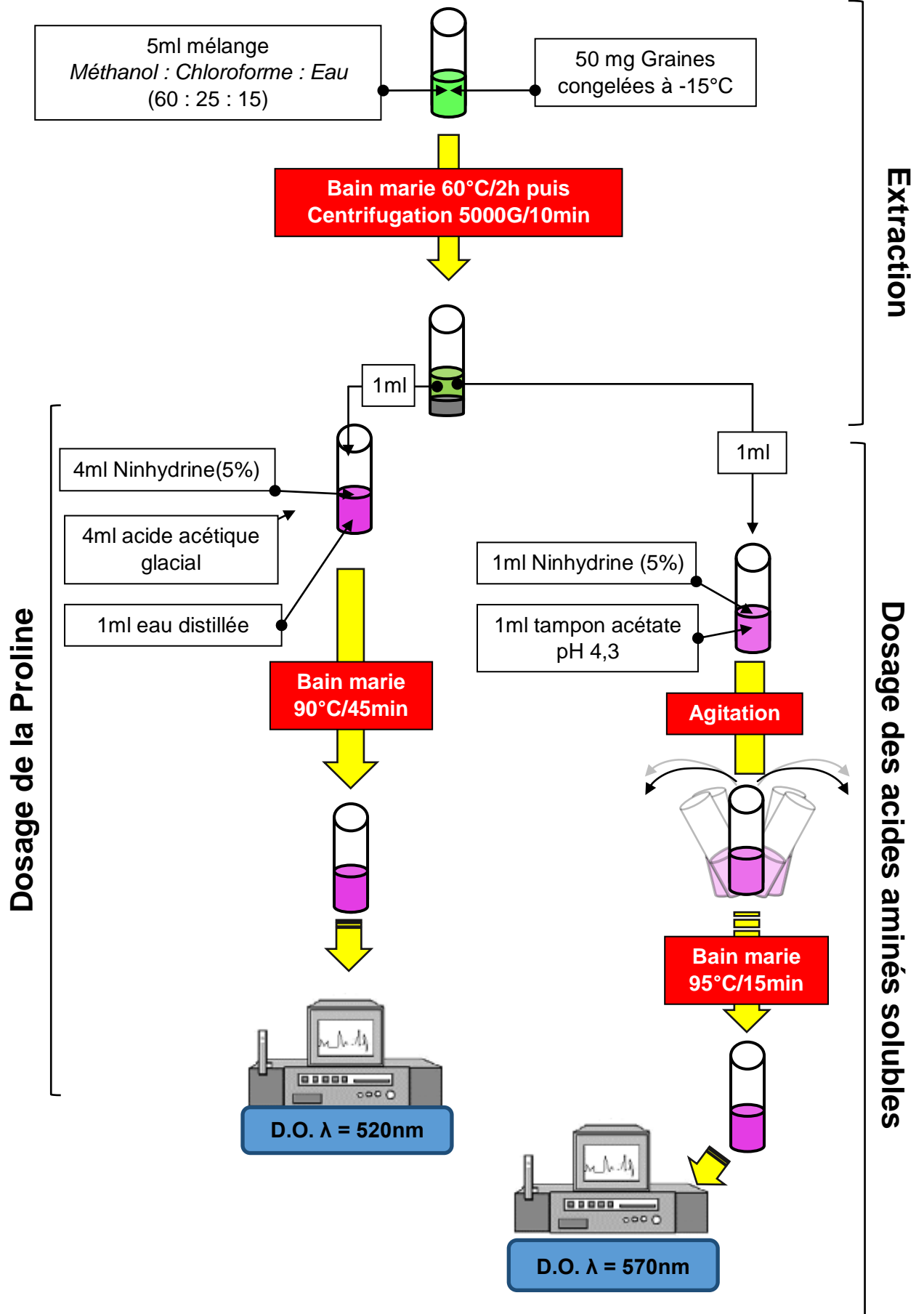


Figure 6.10: Dosage des acides aminés solubles et de la Proline

#### **6.2.3.4. Détermination de la teneur en ADN**

##### **6.2.3.4.1. Extraction de l'ADN**

L'ADN a été dosé selon la technique utilisée par Burton [185]. Dans des tubes de centrifugation, à 0.2g de matière sèche on ajoute 2ml d'acide perchlorique. Le mélange est incubé au le bain marie pendant 20mn à 90°C. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 mn à 2000 G. une solution contenant l'ADN est obtenue.

##### **6.2.3.4.2. Dosage de l'ADN**

Une aliquote de la solution (500µl) a été récupérée et à laquelle on ajoute 500 µl d'acide perchlorique et 2 ml de diphénylamine (Appendice A). Les tubes ont été recouverts et laissés au repos à l'obscurité pendant 18h. La lecture de la densité optique des échantillons a été effectuée 600 nm (Figure 6.11).La teneur en ADN est déterminée selon la formule :

$$\text{ADN } (\mu\text{mol/g. MS}) = \frac{(\text{DO}_{600} - 0.015)}{0.0059862}$$

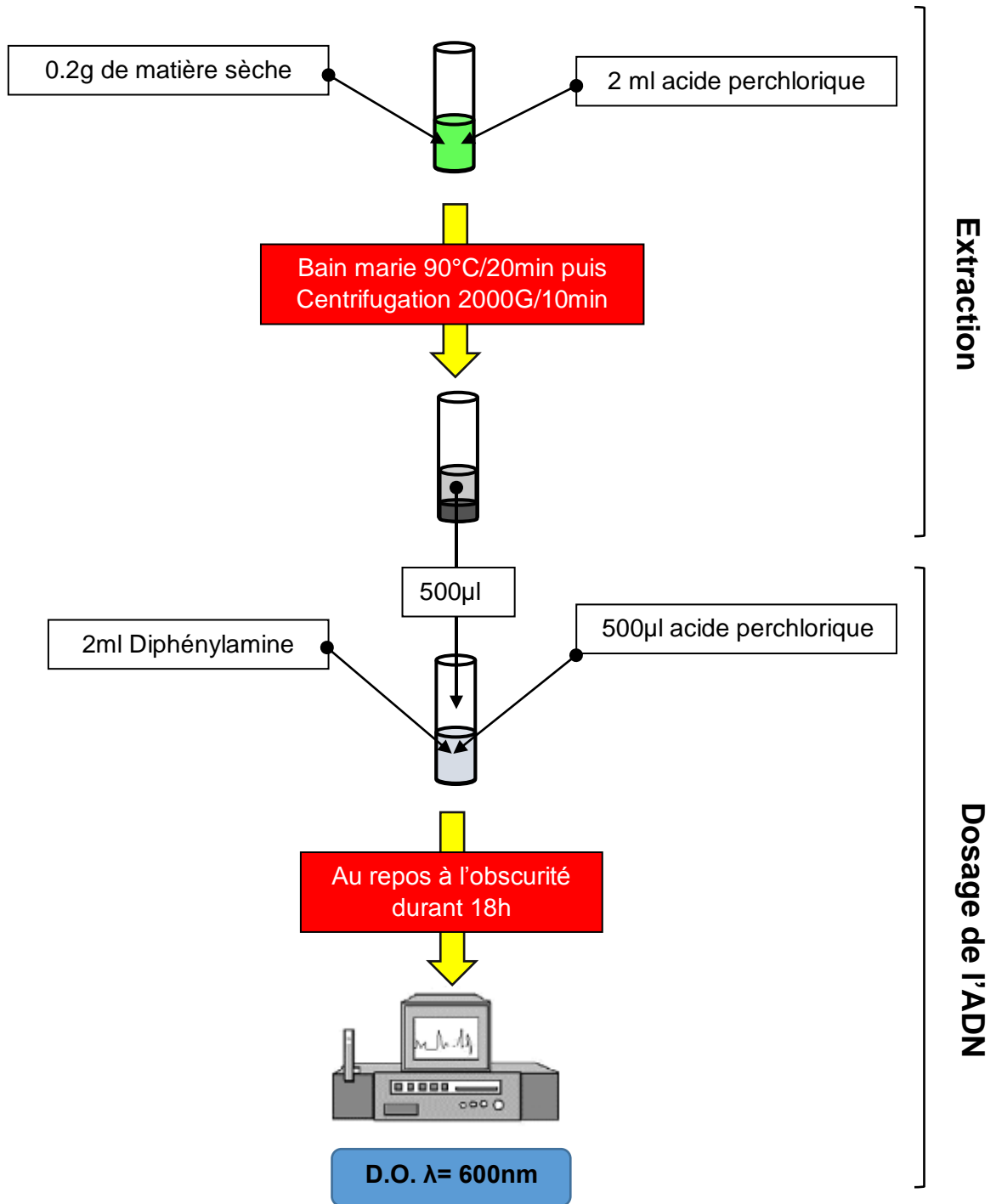


Figure 6.11: Dosage de l'ADN

#### 6.2.4. Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS© version 20.0.0 pour Windows™

- Les expériences concernant les CMI ont été répétées **neuf fois** et les résultats montrent les mêmes tendances.
  - la corrélation de *Pearson* a été étudiée entre la concentration des contaminants et la croissance bactérienne au seuil 5%.
  - Le modèle de régression linéaire simple a été utilisé afin de prédire la CMI du cadmium.
  - La comparaison entre les moyennes des différents traitements a, également, été établie par une ANOVA suivie du test de Tukey pour la comparaison des moyennes. Ceci afin de pouvoir sélectionner les concentrations ayant un impact significatif sur l'inhibition de la croissance bactérienne.
- Les expériences concernant l'implication de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) dans le contournement du stress métallique ont été répétées **six fois** et les résultats montrent les mêmes tendances.
  - L'appréciation de l'effet de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur la germination en conditions métalliques a été faite grâce à un test non-paramétrique, le test binomial.
  - Le test MANOVA a été réalisée au seuil de 5% afin d'apprécier l'effet de de l'absence et de la présence de l'inoculum bactérien sur les différents paramètres physiologiques et biochimiques en conditions métalliques
  - Vu le nombre important des variables à étudier, on a opté pour une méthode d'analyse multidimensionnelle qui vise à réduire le nombre des variables en un nombre limité de facteurs, de façon à ce que chaque facteur résume le maximum d'informations disponibles.

La méthode multidimensionnelle choisie est la méthode d'analyse factorielle ou analyse en composantes principales (ACP) qui permet de dégager les

relations existantes entre les variables, ce choix a été motivé par la nature des variables à analyser (variables quantitatives). Nous avons opté pour la méthode par rotation *Varimax* avec normalisation de *Kaiser*

- De même, la corrélation de *Pearson* entre les paramètres biochimiques et physiologiques aux différentes concentrations selon la nature de l'ETM a également été étudiée.

## CHAPITRE 7

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 7.1. Métallo-résistance et activité biocontrôle de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)

Les résultats obtenus par la mesure du nombre moyen de cellules bactérienne par microlitre nous ont permis de constater que *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) n'a pas les mêmes cinétique de croissance en présence du chlorure de cuivre (Figure 7.1) et du chlorure de cadmium (Figure 7.2)

##### 7.1.1. Détermination de la CMI du cuivre

A une concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{CuCl}_2$ , on observe (figure 7.1) une baisse importante de la croissance de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) ( $3,92 \cdot 10^8$  UFC/ml) par rapport au témoin ( $2,67 \cdot 10^9$  UFC/ml). On note une baisse continue de croissance pour atteindre un minimum de développement à 2000 $\mu\text{g/ml}$  ( $6,61 \cdot 10^7$  UFC/ml).

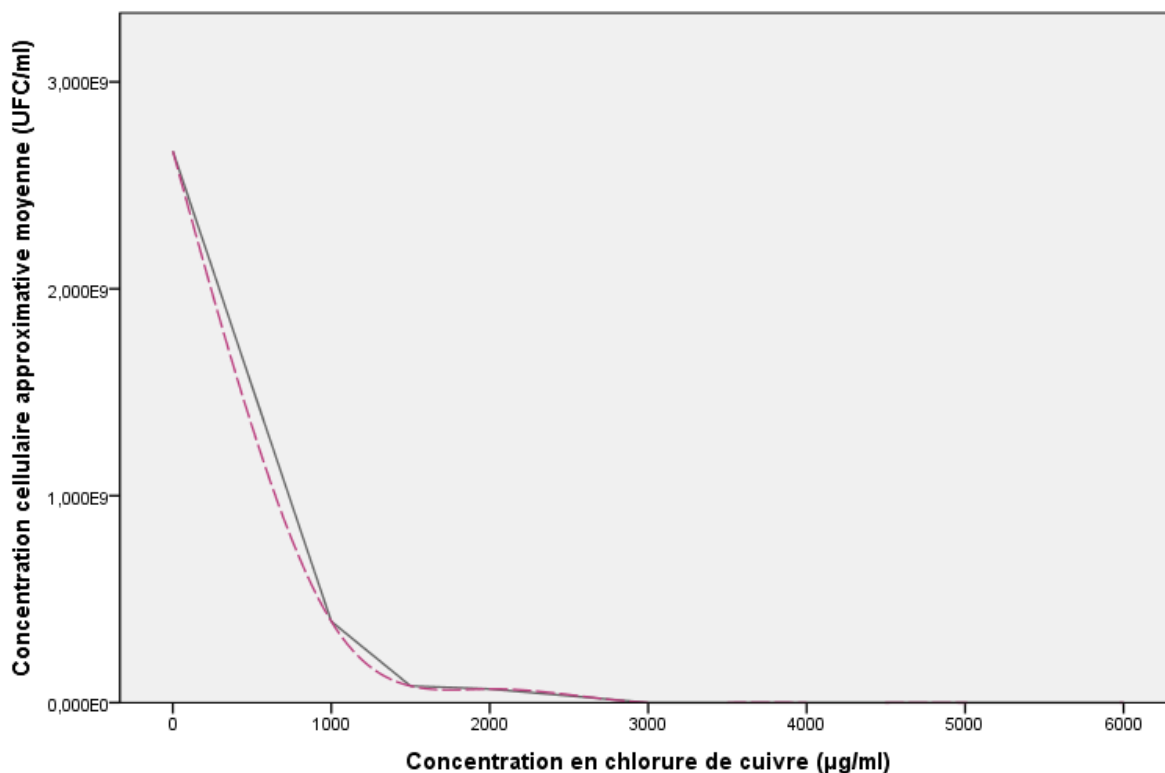


Figure 7.1: Effet du cuivre sur la croissance de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)

A une concentration en cuivre de 3000 µg/ml on constate un arrêt de développement bactérien (0,00 UFC/ml).

Le coefficient de corrélation de *Pearson* (Tableau 7.1) révèle que cette baisse de croissance est en corrélation significative ( $p=0,000 < 0,01$ ) et inversement proportionnelle ( $r = - 0,589$ ) à l'augmentation de la concentration de l'ETM, cette relation est forte car  $0,5 < r < 0,8$ .

**Tableau 7.1 : Corrélation entre la concentration en cuivre et la croissance de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)***

Concentration en chlorure de cuivre (µg/ml)		UFC/ml
	N	89
	Corrélation de Pearson	<b>-0,589**</b>
	Sig. (bilatérale)	0,000

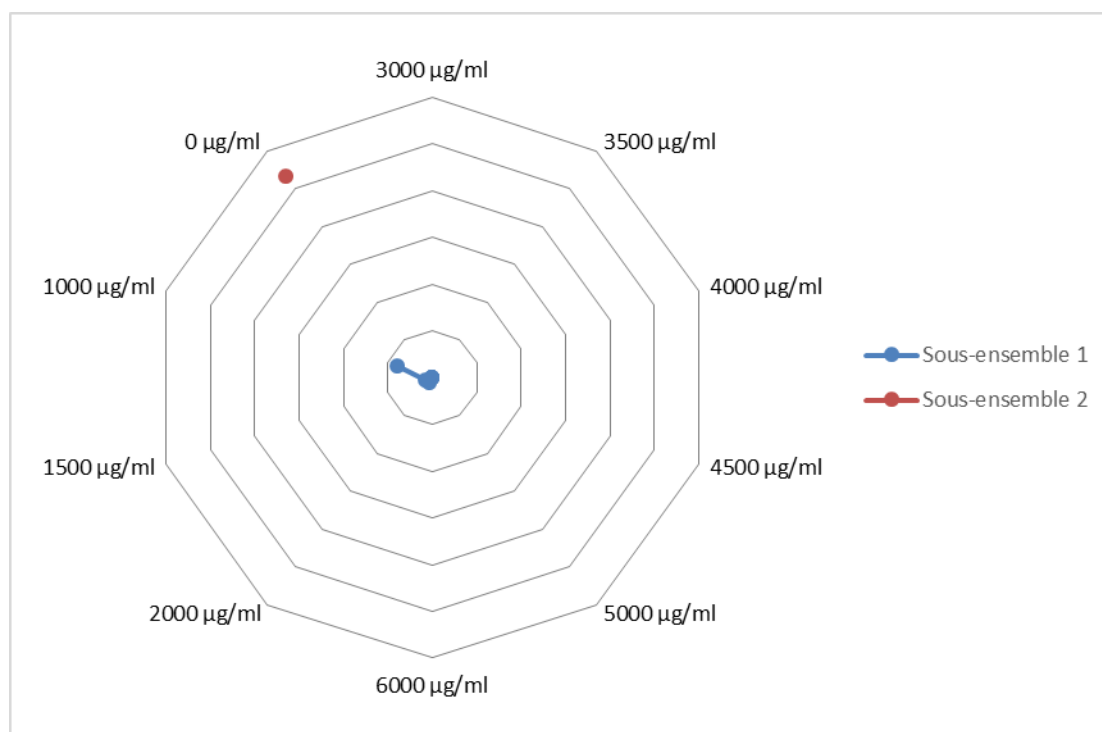
\*\* . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

Les résultats de l'analyse de variance uni variée (One-way ANOVA) (Appendice C) ont révélés que les différentes concentrations de cuivre dans le milieu ont un effet significatif sur le nombre moyen de cellules bactériennes dans la culture ( $p=0,000 < 5\%$ ). Le test de Tukey pour la comparaison des moyennes nous indique que ces concentrations n'engendrent pas de réponses significativement différentes au seuil de 5%. (Figure7.2)

La figure 7.2 révèle que le chlorure de cuivre engendre des différences statistiquement significatives par rapport au témoin (0 µg/l) aux différentes concentrations (1000 – 6000 µg/ml) d'où son appartenance unique au sous-ensemble N°2. Le test de Tukey regroupe l'effet des concentrations 1000, 1500 et 2000 µg/ml dans le même sous-ensemble (N°1) ( $p=0,104$ )

Il est utile de noter que les concentrations appartenant aux mêmes sous-ensembles ne présentent pas de différences statistiquement significatives entre elles.

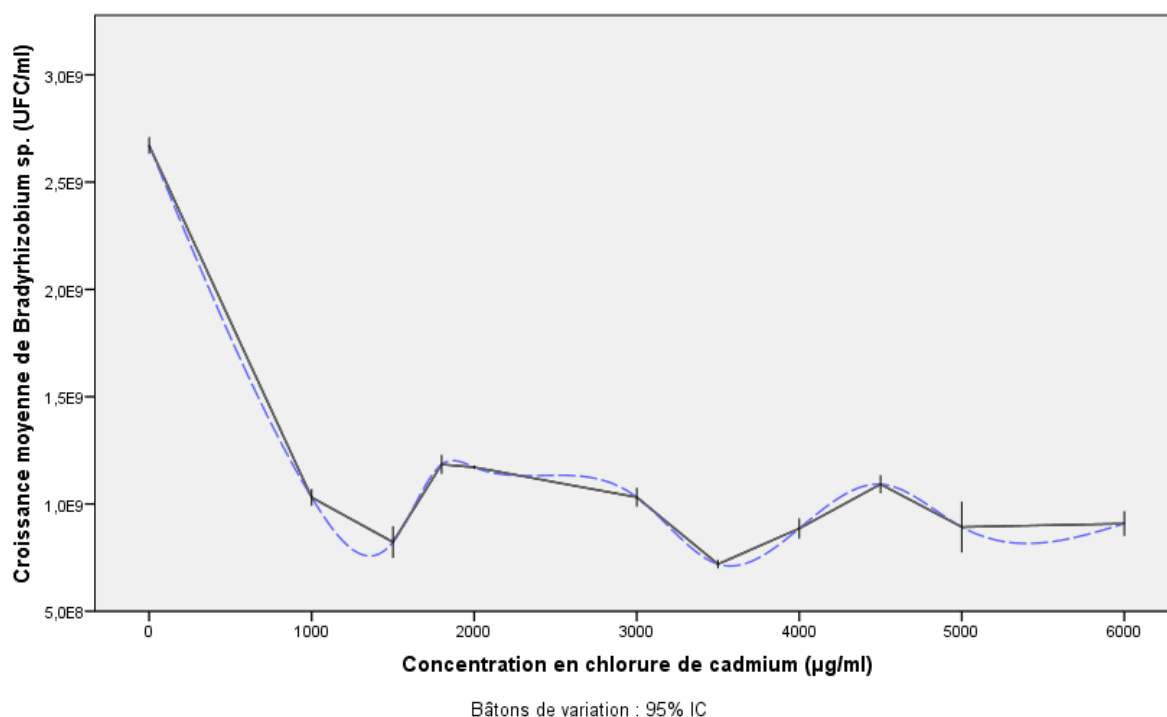




**Figure 7.2: Répartition des concentrations en cuivre dans des sous-ensembles homogènes.**

### **7.1.2. Détermination de la CMI du cadmium**

La figure 7.3 représente la courbe de croissance de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en présence du chlorure de cadmium. On note que le témoin (0 µg/ml) présente une concentration cellulaire moyenne de  $2,67 \cdot 10^9$  UFC/ml, cette valeur chute pour atteindre  $1,03 \cdot 10^9$  UFC/ml à une concentration de 1000µg/ml.



**Figure 7.3 : Effet du cadmium sur la croissance de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*).**

L'augmentation de la concentration du  $\text{CdCl}_2$ , occasionne une fluctuation de la croissance bactérienne sans d'arrêt visible, mais un minimum de croissance pour une concentration de  $3500 \mu\text{g/ml}$  ( $7,20 \cdot 10^8$  UFC/ml).

Le coefficient de corrélation de *Pearson* (Tableau 7.2) indique qu'il existe une corrélation significative entre la concentration du milieu en chlorure de cadmium et la croissance de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) ( $p=0,00 > 0,01$ ). Cette corrélation est inversement proportionnelle de forte intensité [ $0,2 > (r= -0,595) > 0,5$ ] entre les deux variables (Concentration en cadmium et nombre de cellules bactériennes).

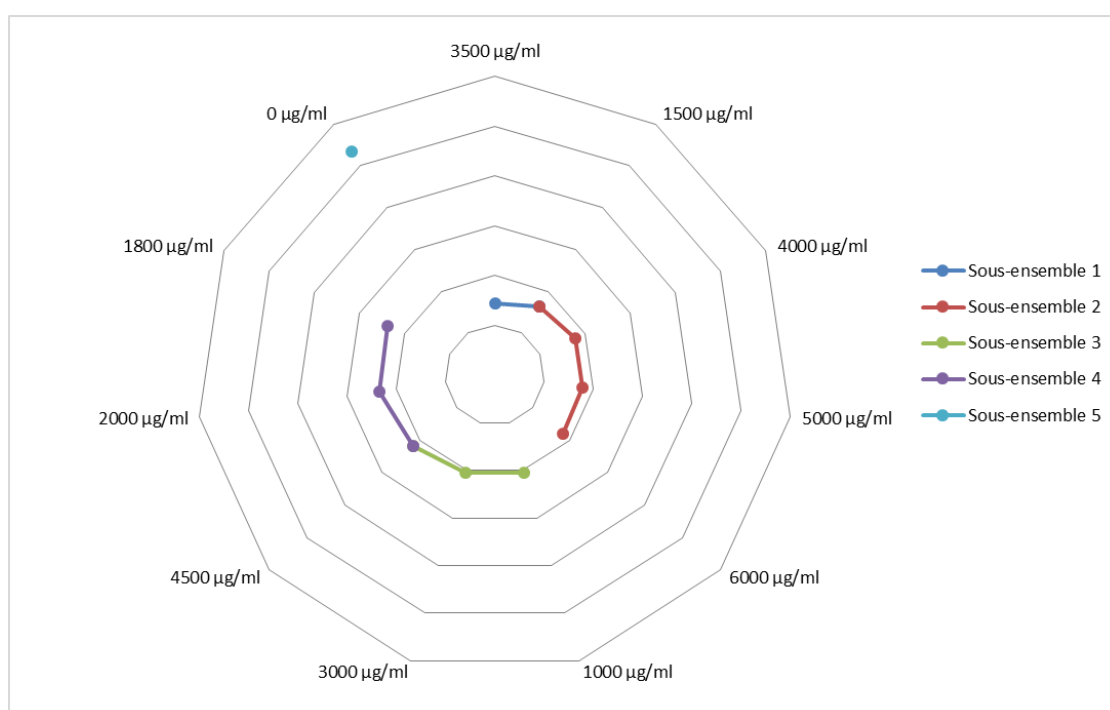
**Tableau 7.2: Corrélation entre la concentration en cadmium et la croissance de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*)**

Concentration en chlorure de cadmium ( $\mu\text{g/ml}$ )		UFC/ml
	N	96
	Corrélation de Pearson	<b>-0,595**</b>
	Sig. (bilatérale)	0,000

\*\* . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

Les résultats de l'analyse de variance univariée (One-way ANOVA) (Appendice C) ont révélés que les différentes concentrations de cuivre dans le milieu ont un effet significatif sur le nombre moyen de cellules bactériennes dans la culture ( $p=0,000 < 5\%$ ). Le test de Tukey pour la comparaison des moyennes nous indique que ces concentrations engendrent des réponses significativement différentes au seuil 5%. (Figure 7.3).

En effet, ce test statistique révèle que le chlorure de cadmium génère des différences statistiquement significatives en comparant le témoin (0,00  $\mu\text{g/ml}$ ) avec les différentes concentrations. Ce même test nous a permis de classer les concentrations en chlorure de cadmium en cinq (05) sous-ensembles homogènes selon la significativité de leurs effets sur la croissance cellulaire approximative moyenne dans le milieu, donc sur la croissance de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*).



**Figure 7.4 : Répartition des concentrations en cadmium dans des sous-ensembles homogènes**

La figure 7.3 révèle que le chlorure de cadmium engendre des différences statistiquement significatives en comparant le témoin (0,00  $\mu\text{g/l}$ ) avec les différentes concentrations (1000 – 6000  $\mu\text{g/ml}$ ) d'où son appartenance unique au sous-ensemble N°5. Le test de Tukey regroupe l'effet des concentrations 1500, 4000, 5000 et 6000  $\mu\text{g/ml}$  dans le même sous-ensemble (N°2) ( $p=0,351$ ) ; les concentrations

1000,3000, et 4500  $\mu\text{g/ml}$  dans le sous-ensemble N°3 ( $p=0,804$ ). En fin, le sous-ensemble N°4 regroupe les concentrations 4500, 2000 et 1800  $\mu\text{g/ml}$ .

Les Concentrations appartenant aux mêmes sous-ensembles ne présentent pas de différences statistiquement significatives entre elles.

La détermination *in vitro* de la CMI du cadmium envers *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* n'as pas pu être effectuée dans la gamme de concentrations étudiées. Ceci nous a amenés à déterminer la CMI grâce à une modélisation statistique en se basant sur un modèle de régression simple qui nous a permis de prévoir la concentration de cadmium pour la quelle *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* cessera de croitre.

- **Détermination *in - silico* de la CMI du cadmium**

Suite aux résultats précédents portant sur la non-détermination *in-vitro* de la CMI du cadmium vis-à-vis de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* dans la gamme de concentration de cet ETM (0 – 6000  $\mu\text{g/ml}$ ), nous avons opté pour une détermination *in-silico* de la CMI en se basant sur les résultats obtenues et cela par une méthode de modélisation prévisionnelle (la régression linéaire simple).

- a. Évaluation de la pertinence du modèle de régression**

- Analyse de variance**

Le calcul de la valeur de F se fait automatiquement et le degré de signification associé est consigné dans la dernière colonne du tableau 7.3.

La valeur de F est de 51,459 ; elle est significative à  $p < 0,0005$ . Ceci signifie que les probabilités d'obtenir une valeur F de cette taille par hasard sont de moins de 0,05 %. Dans ce cas, nous devons *rejeter l'hypothèse nulle*. Il y a donc une relation statistiquement significative entre la concentration en cadmium et le nombre de cellules.

Tableau 7.3 : analyse de variance pour le modèle de régression

ANOVA <sup>a</sup>						
Modèle		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
1	Régression	9,156E+18	1	9,156E+18	51,459	0,000 <sup>b</sup>
	Résidu	1,672E+19	94	1,779E+17		
	Total	2,588E+19	95			

a. Variable dépendante : UFC/ml

b. Valeurs prédites : (constantes), Concentration en chlorure de cadmium ( $\mu\text{g/ml}$ )

### a. Évaluation de l'ajustement des données au modèle de régression

La corrélation multiple (R) représente la corrélation combinée de toutes les variables indépendantes d'un modèle avec la variable dépendante. Comme nous n'avons ici qu'une seule variable indépendante (Concentration en cadmium).

Si nous élevons au carré le coefficient de corrélation, nous obtenons la valeur  $R^2$  (0,354). Celui-ci indique la proportion de la variabilité de la variable dépendante ( $y$ , nombre de cellules) expliquée par le modèle de régression. Nous pouvons donc dire que la concentration en cadmium peut expliquer près de 35 % de la variation de la croissance cellulaire (Tableau 7.4)

Tableau 7.4 : Récapitulatif du modèle de régression

Récapitulatif des modèles				
Modèle	R	R-deux	R-deux ajusté	Erreur standard de l'estimation
1	0,595 <sup>a</sup>	0,354	0,347	4,218E+8

a. Valeurs prédites : (constantes), Concentration en chlorure de cadmium ( $\mu\text{g/ml}$ )

### b. Évaluation de la variabilité expliquée par le modèle de régression

#### - Les paramètres du modèle

Le tableau 7.5 nous donne les paramètres de l'équation du modèle de régression. Les coefficients non standardisés nous permettent de reconstituer l'équation de la droite de régression, qui sera de type :  $y = b_0 + (b_1 \cdot x)$  Sachant que  $b_0 = 1,659 \cdot 10^9$  et  $b_1 = -1,760 \cdot 10^5$

Tableau 7.5 : Paramètres de l'équation du modèle de régression

Modèle		Coefficients <sup>a</sup>			t	Sig.
		Coefficients non standardisés		Coefficients standardisés		
		A	Erreur standard	Bêta		
1	(Constante)	1,659E+9	8,519E+7		19,469	0,000
	Concentration en chlorure de cadmium (µg/ml)	-1,760E+5	2,453E+4	-0,595	-7,173	0,000

a. Variable dépendante : UFC/ml

La colonne des coefficients standardisés indique la valeur du coefficient de corrélation (Bêta). Elle apporte toutefois une nouvelle information: la valence de cette valeur (+ ou -). Donc le sens de la relation entre la croissance cellulaire (y) et la concentration en cadmium (x) est inversement proportionnel.

#### - Détermination de l'équation de régression

Le précédent tableau (Tableau 7.5) nous indique que l'équation de régression est la suivante :

$$y = 1,659 \cdot 10^9 + (-1,760 \cdot 10^5 \cdot x) \dots\dots (1)$$

y : valeur *prédite* de la croissance cellulaire (UFC/ml) ; x : Concentration en cadmium (µg/ml).

#### - Détermination prédictive de la CMI du cadmium

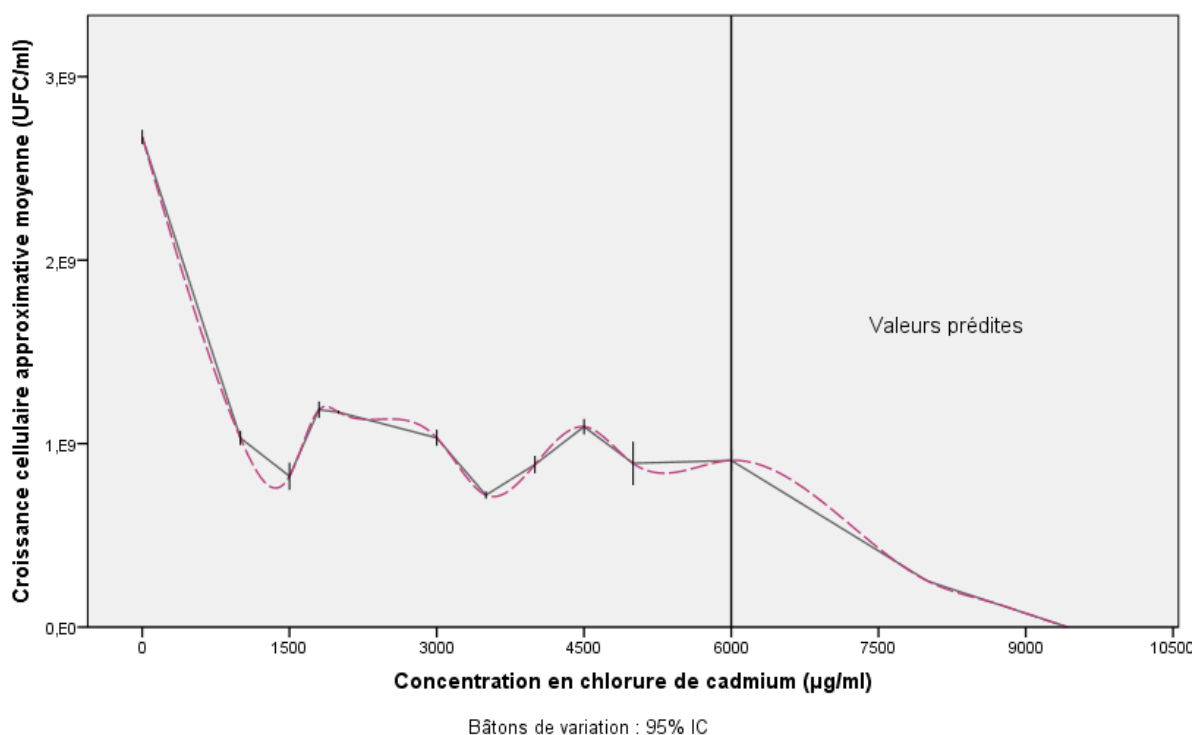
En se basant sur l'équation (1) nous obtenons :

$$x = \frac{(y - 1,659 \cdot 10^9)}{(-1,760 \cdot 10^5)} \dots\dots (2)$$

En remplaçant « y » (nombre de cellules) par « 0 » dans l'équation (2) nous obtenons :

$$x = \frac{(-1,659.10^9)}{(-1,760.10^5)} = 9426,136 \mu\text{g/ml}$$

Selon le modèle de la régression linéaire simple il faut 9426,136  $\mu\text{g/ml}$  de cadmium pour pouvoir observer un arrêt de croissance de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*). Ceci est illustré dans la figure 7.5.



**Figure 7.5 : Effet prédictif *in-silico* du cadmium sur la croissance de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) basé sur le modèle de la régression linéaire simple**

### **7.1.3. Activité biocontrôle de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*)**

Le comportement de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) a été noté suite aux tests expérimentaux établis afin de connaître son potentiel bio contrôle

*Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) produit de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) dans l'eau peptonée à des taux plus ou moins importants selon l'intensité du virage de la couleur du jaune à l'orange après addition du réactif de *Nessler*. (Figure 7.6a)

La suite des tests nous a indiqué que *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* ne produit pas d'acide cyanhydrique (HCN) (Figure 7.6b)

La capacité de production de l'AIA est testée sur milieu Winogradsky additionné de tryptophane (5g/l) après 4 jours d'incubation à 30°C. L'analyse de la variance ne révèle pas une différence significative de production ( $p > 0,01$ ) entre les répétitions. En moyenne, *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* produit 70,6 µg/ml d'AIA. (Figure 7.6c)

L'action inhibitrice se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance du mycélium fongique autour de la colonie bactérienne. Cette zone d'inhibition varie selon l'espèce fongique. Elle est testée sur milieu PDA à 20°C après 7 jours d'incubation vis à vis de trois champignons connus pour leur pouvoir phytopathogène *Fusarium oxysporum* fsp. *albedinis* (FOA), *Diplodia seratia* (DS) et *Neofusicoccum parvum* (NP). L'étude de l'activité antagoniste de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* envers ces champignons phytopathogènes a permis de constater que la bactérie n'a pas un effet notable sur le développement mycélien des espèces fongiques choisis (Figure 7.6d).



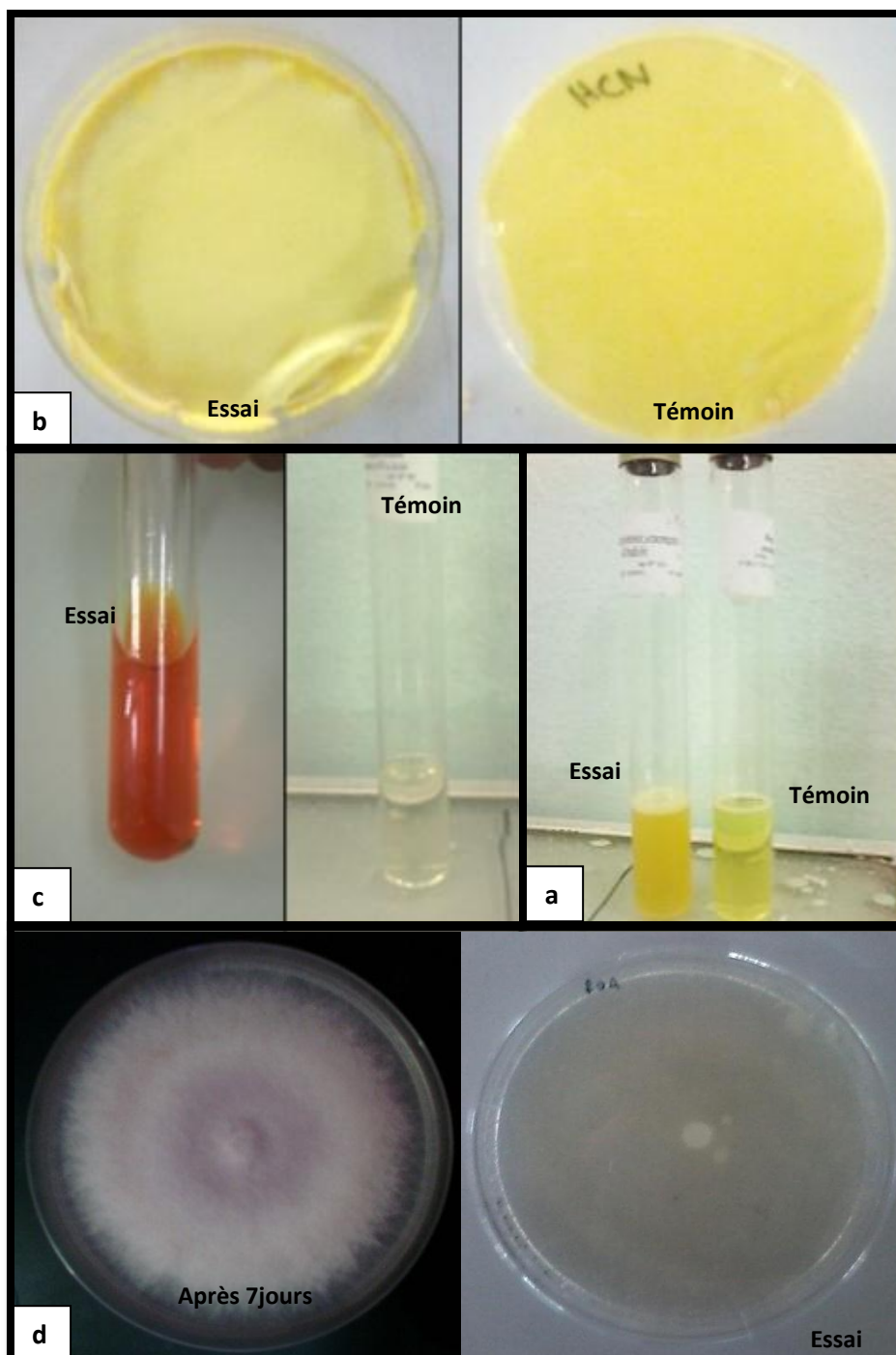


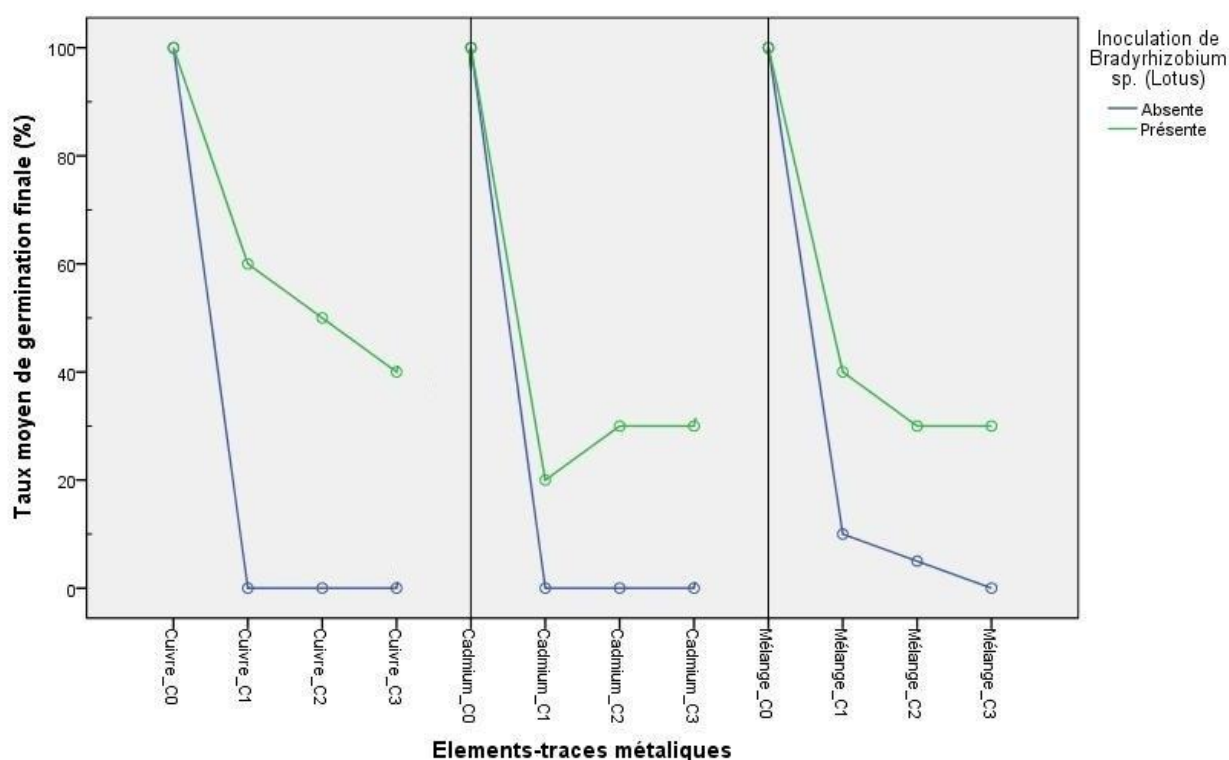
Figure 7. 6. Activité bio contrôle de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus)

## 7.2. Effets de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur les paramètres physiologiques en conditions métalliques

### 7.2.1. Évolution du taux de germination final

Le figure 7.7 illustre le taux de germination final des graines (inoculées et non inoculées par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*) du lotier en fonction des concentrations métalliques

On note que le taux de germination diminue en fonction des concentrations croissantes des ETMs, la capacité germinative du lotier a ainsi été affectée, pour les graines inoculées par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* ou non.



**Figure 7. 7 : Effets du stress métallique sur le taux de germination final en (%) des graines du lotier en présence et en absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)***

- La figure 7.4 montre que les graines du lotier mises en germination dans les solutions métalliques sans présence de la bactérie, présentent un pourcentage de germination des témoins (0 µg/ml) et atteint 100 %.

Le taux de germination des graines placées dans les solutions cupriques et cadmiques **seuls** chute brusquement et atteint 0 % pour l'ensemble des concentrations des ETMs.

D'autre part, on observe une diminution de 90 % du taux de germination des graines mises dans la solution contenant le mélange métallique ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{CdCl}_2$ ) par rapport au témoin (0  $\mu\text{g/ml}$ ). On constate que cette diminution progresse d'un taux de 5 % avec l'augmentation de la concentration en ETMs pour atteindre 0% à la concentration 3000 : 6000  $\mu\text{g/ml}$  (Cu : Cd)

- La même figure met en évidence le taux de germination en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*. L'allure de ces courbes changes considérablement par rapport aux précédentes.

En effet, le lotier a gardé un taux de germination final relativement moyen en conditions de stress. Chez le témoin (0  $\mu\text{g/ml}$ ) on note un taux de 100 %, ce taux diminue en fonction de la concentration en chlorure de cadmium pour atteindre son minimum (40 %) à la concentration 6000  $\mu\text{g/ml}$ . Le taux de germination le plus élevé (60 %) est enregistré à la concentration 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

Pour le chlorure de cuivre, le taux de germination le plus faible (20 %) est enregistré à la concentration 1500  $\mu\text{g/ml}$  puis on observe une augmentation de 10 % à la concentration 2000  $\mu\text{g/ml}$  qui se maintient à la concentration 3000  $\mu\text{g/ml}$

Le taux de germination du lotier dans le milieu contenant le mélange métallique est représenté par une courbe qui a la même allure que celle des graines mises en germination dans le milieu cadmique strict avec une diminution moyenne de 35 % par rapport à ce dernier. Les valeurs enregistrées pour les concentrations 2000 : 3500  $\mu\text{g/ml}$  et 3000 : 6000  $\mu\text{g/ml}$  (Cu : Cd) sont identiques à celles enregistrées dans le milieu cuprique strict.

Les différentes réactions du lotier vis-à-vis des concentrations du cuivre, du cadmium et de leur mélange nous permettent de la classée en deux groupes [179]

- 1- En absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* le lotier est classé dans le groupe des plantes très sensible.
- 2- En présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*, il est classé dans le groupe des plantes tolérantes.

L'analyse statistique par le test binomial que nous avons effectué a pour objet de comparer les fréquences de germinations observées aux fréquences théoriques. Elle nous permet de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse qui stipule que : ***Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a un effet significativement positif sur la germination du lotier confronté au stress abiotique par les ETMs.**

L'analyse des données du présent paramètre révèle que le nombre de graines n'ayant pas germées est supérieur à celui ayant germées dans les milieux contaminés en présence de la bactérie. Cette différence est non significative avec des valeurs binomial allant de 0,115 à 1 ( $>0,05$ ) à  $p_{\text{théorique}}=0,5$ . Contrairement au graines misent à germer dans les milieux contaminés sans pré-inoculation bactérienne où la valeur binomial est significatif (Binomial = 0,00 ( $< 0,05$ ) à  $p_{\text{théorique}}=0,5$ ) (Appendice C)

Ceci nous indique que l'effet des ETMs ainsi que leur mélange aux différentes concentrations n'a pas un effet significatif sur la germination du lotier en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

Ainsi on peut **confirmer** notre hypothèse émise au départ qui stipule que *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a un effet significativement positif sur la germination des lotiers en milieu contaminé par les ETMs.

Ceci est consolidé par l'analyse multivariée de la variance (MANOVA) qui a révélé que *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a un impact significatif sur le taux de germination final ( $p=0,000 < 0,05$ ) (Appendice C). Cette hypothèse sera appuyée d'avantage par les tests biochimiques.

Le test de Tukey pour la comparaison des moyennes nous indique que l'inoculation bactérienne engendre des réponses significativement différentes au seuil 5%.

### 7.2.2. Cinétique de germination

Les figures 7.8 et 7.9 montrent l'effet des différentes concentrations de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , de  $\text{CdCl}_2$  et leur mélange sur l'évolution du taux de germination du lotier au cours du temps en présence et en absence de *Bradyrhizobium sp* (*Lotus*).

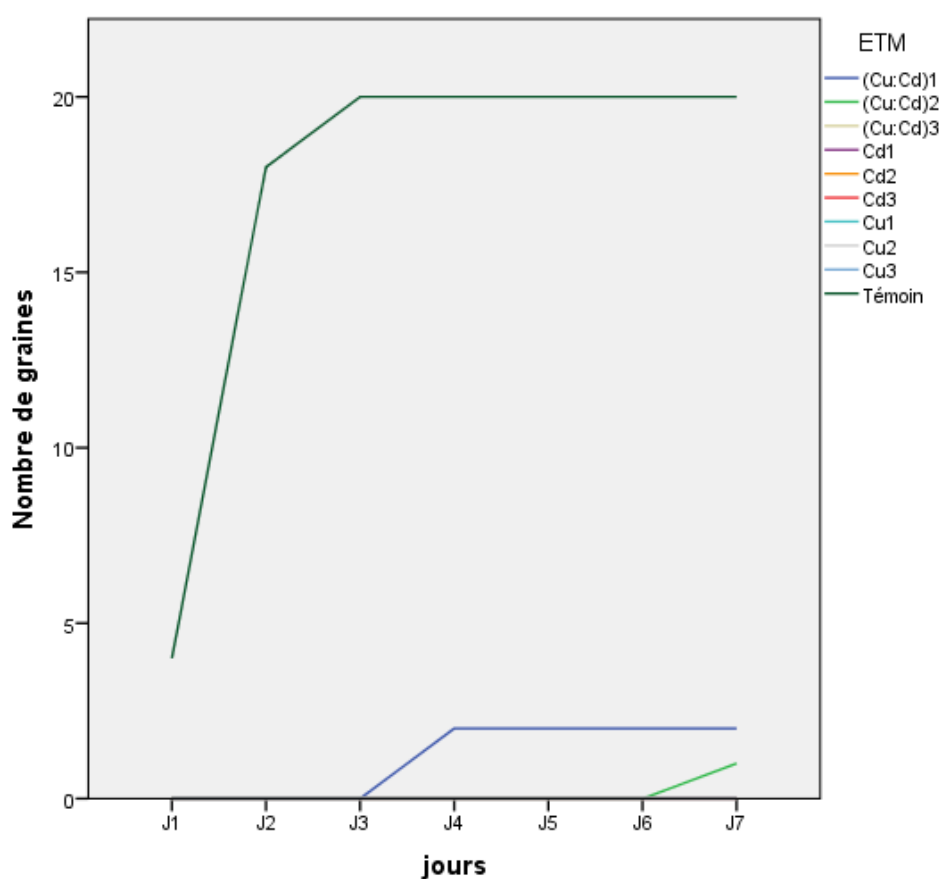
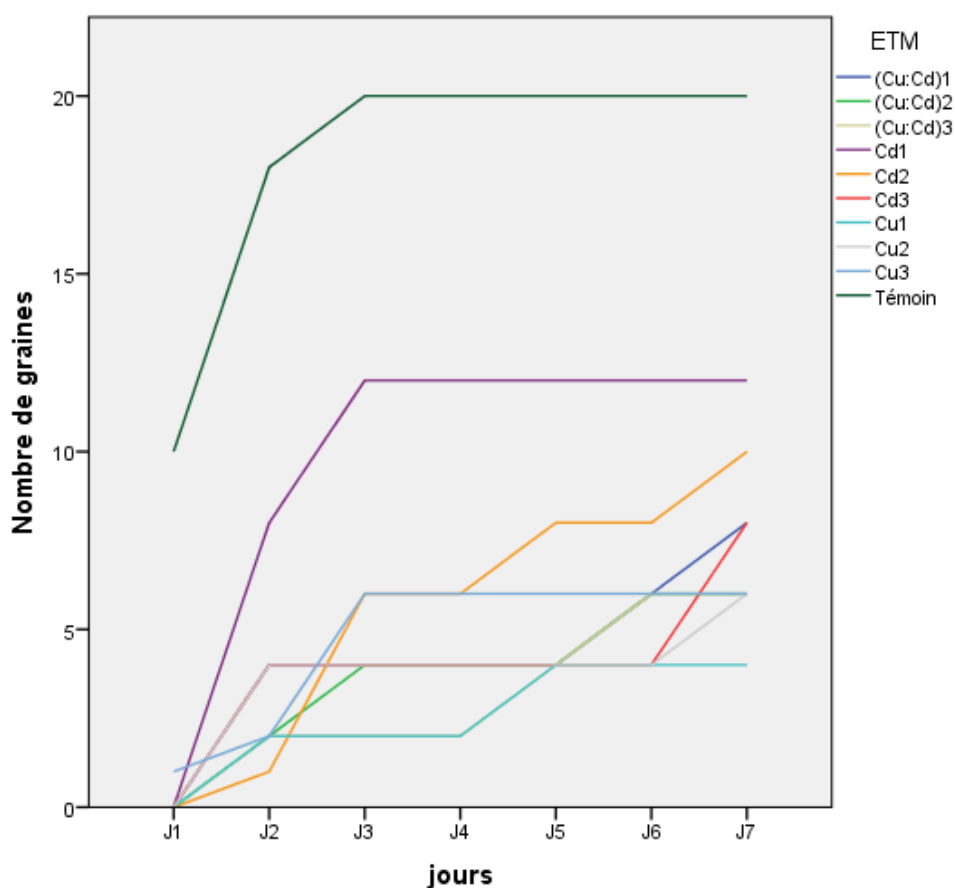


Figure 7. 8 : Effets du stress métallique sur la cinétique de germination du lotier non inoculé par *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*)



**Figure 7.9: Effet de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) sur la cinétique de germination du lotier sous stress métallique**

Après sept (07) jours de traitement métallique, les courbes de germination permettent de distinguer 03 phases:

1. **une phase de latence**, nécessaire à l'apparition des premières germinations, au cours de laquelle le taux de germination reste faible. La durée de cette phase est variable selon la concentration en ETMs et la présence de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*). Elle est courte, de l'ordre de 24 heures, pour le témoin (0  $\mu\text{g/ml}$ ) ainsi qu'en présence d'une concentration 1500  $\mu\text{g/ml}$  du milieu cuprique dont les graines sont inoculées par la dite bactérie. Cette même phase dure 48 heures chez l'ensemble des graines soumises au stress métallique en présence de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*)

En absence de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*), la phase de latence est excessivement longue, surtout pour les graines soumises au traitement par le mélange métallique aux concentrations 1500 : 2000  $\mu\text{g/ml}$  et 2000 : 3500  $\mu\text{g/ml}$

(Cu :Cd), où elle atteint respectivement 96 et 144 heures. En outre, on note également que cette phase de latence dure plus de 168 heures pour les graines soumises aux autres traitements.

2. **une phase sensiblement linéaire**, correspondant à une augmentation rapide du taux de germination et est proportionnelle au temps, pour le témoin (0 µg/ml) et les graines inoculées par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

Ces dernières présentent une augmentation initiale plus importante que celles des graines germées en absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*. Cette phase n'existe pas chez les graines soumises aux différents traitements métalliques en absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*

3. une troisième phase correspondant à un palier représentant le **pourcentage final de germination** et traduisant la capacité germinative dans les conditions de l'expérience.

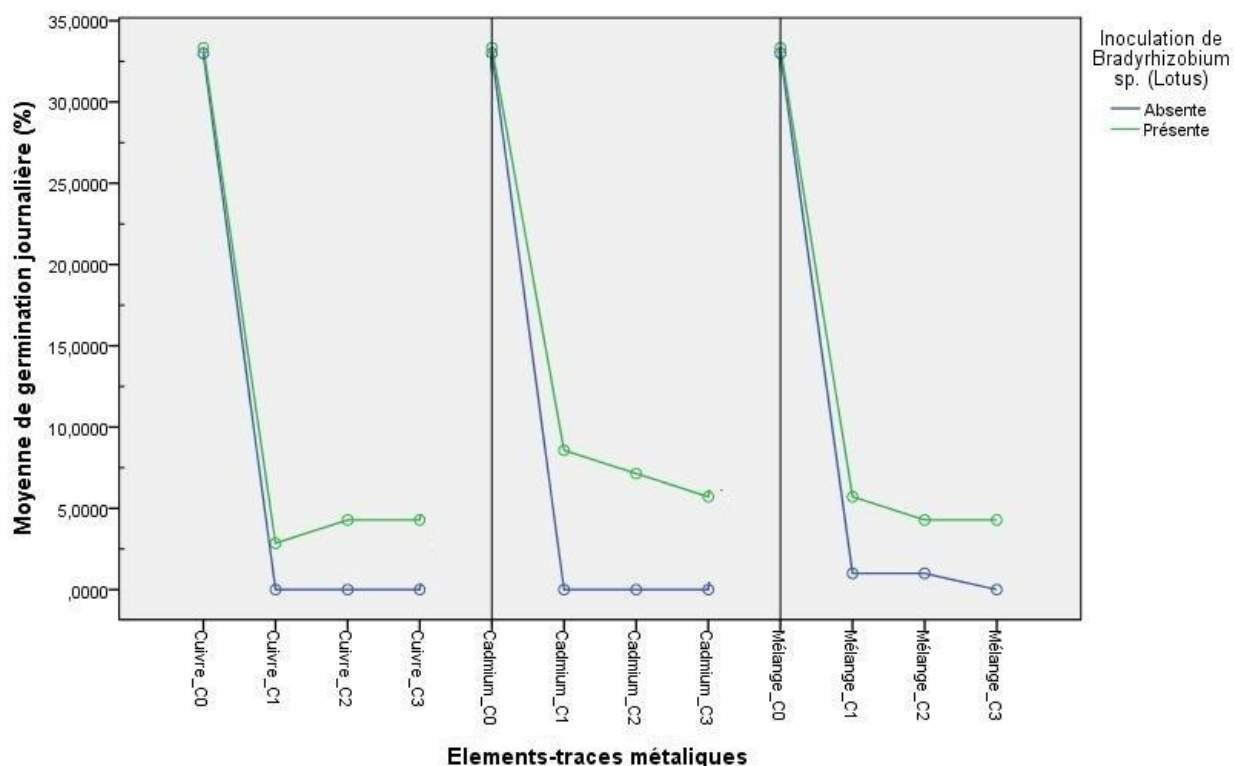
Le nombre de graines germées du lotier en fonction du temps sur milieu témoin (0µg/ml) a été plus important et a évolué plus rapidement que celui des autres. Cependant, l'évolution la plus lente (pour ne pas dire absente) du taux de germination a été observée chez les graines n'ayant pas été au préalable inoculées par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

D'autre part, dans le milieu exempt d'ETMs, le taux de germination atteint son maximum au bout de 3 à 4 jours en moyenne avec une valeur de 100% que ce soit en présence où en absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

Dans le milieu contenant le mélange métallique aux concentrations 1500 : 2000 µg/ml et 2000 : 3500 µg/ml (Cu : Cd), les graines atteignent un taux de germination final nettement inférieur à celui du témoin (respectivement 10 et 5 %). Tandis que sous stress métallique et en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*, le taux final de germination est atteint beaucoup plus rapidement que celle de son analogue dont les graines n'ont pas subies l'inoculation bactérienne.

### 7.2.3. Moyenne de germination journalière

Les valeurs des moyennes de germination journalière (MDG) du lotier soumis à différents stress métalliques en présence et en absence de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) sont représentées figure 7.10



**Figure 7.10: Effet de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) sur la variation du taux moyen de germination journalier (%) du lotier.**

Sur milieu non métallique (0  $\mu\text{g/ml}$ ), les graines manifestent une forte MDG (33,33%) en présence et en absence de la bactérie.

Les graines placées sur milieux métalliques en absence de la bactérie présentent une MDG de 0%, cette valeur est reconduite pour les concentrations en milieu cuprique à (1500, 2000, 3000  $\mu\text{g/ml}$ ) et en milieu cadmique à (2000, 3500, 6000  $\mu\text{g/ml}$ ) ainsi pour les concentrations 3000 :6000  $\mu\text{g/ml}$  (Cu : Cd) en milieu combiné cadmique-cuprique. Ce dernier présente une MDG faible pour les concentrations 1500 : 2000  $\mu\text{g/ml}$  et 2000 : 3500  $\mu\text{g/ml}$  (Cu : Cd) (respectivement 1,43% et 0,71%).



Les courbes illustrées en figure 7.8 montrent une MDG des graines inoculées plus importante que celle dont les graines n'ont pas été inoculées au préalable par la bactérie.

A des concentrations croissantes de cadmium, la valeur de la MDG devient faible. A la concentration 2000  $\mu\text{g/ml}$ , la valeur la plus élevée est enregistrée (8,75%), cette valeur est considérée comme étant moyenne par rapport au témoin (MDG.C0 = 33,33%). La MDG continue à diminuer de 1,52% proportionnellement aux concentrations (MDG.<sub>3500</sub>  $\mu\text{g/ml}$  = 7,14% ; MDG.<sub>6000</sub>  $\mu\text{g/ml}$  = 5,71%)

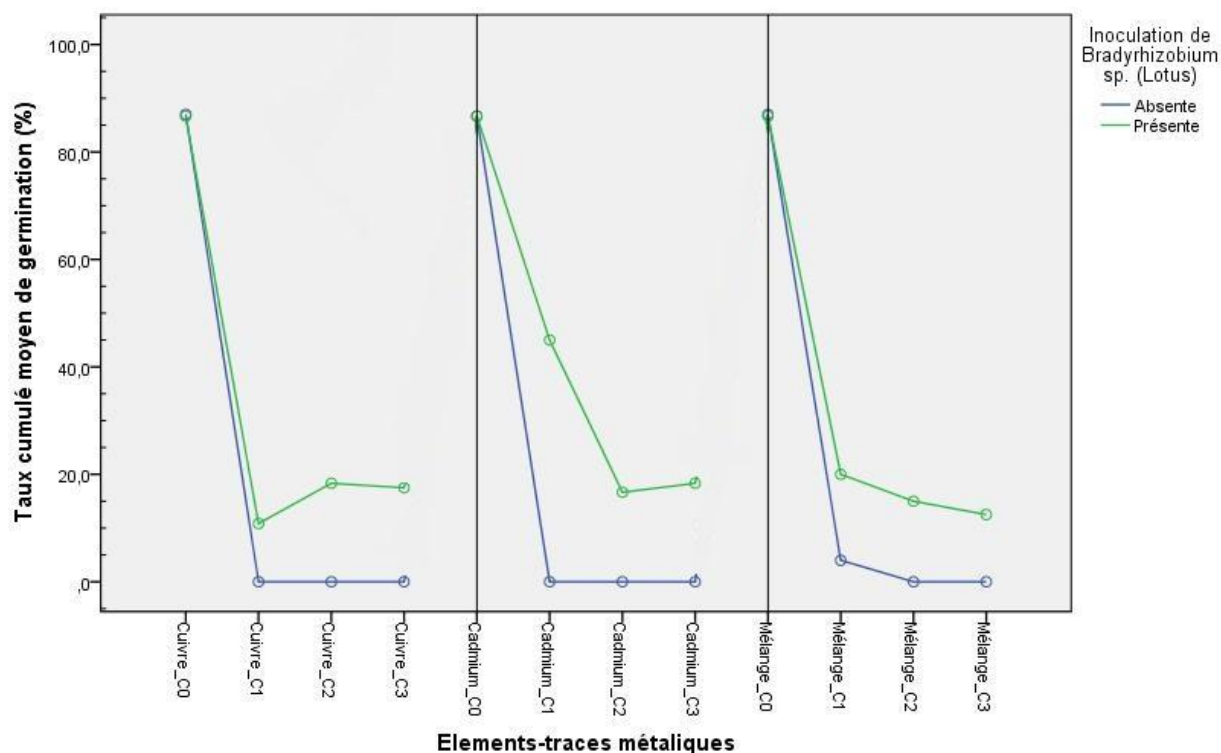
la MDG la plus faible est enregistrée chez les graines traitées par le cuivre à la concentration 1500  $\mu\text{g/ml}$  (2,86%). Cette valeur augmente de 1,43% avec l'augmentation de la concentration où on enregistre une MDG de 4,29% aux concentrations 2000 et 3000  $\mu\text{g/ml}$ .

La moyenne du taux de germination journalier des graines du lotier soumises au stress métallique sur le milieu cuprique-cadmique en présence de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) diminue avec l'augmentation de la concentration du milieu en ETM où enregistre une valeur maximale de 5,71% pour la concentration 1500 : 2000  $\mu\text{g/ml}$  (Cu : Cd), cette valeur chute pour atteindre 4,29% pour les concentrations 2000 : 3500  $\mu\text{g/ml}$  (Cu : Cd) et 3000 : 6000  $\mu\text{g/ml}$  (Cu : Cd).

L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) a révélé que *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) a un impact significatif sur le taux moyen de germination journalière ( $p=0,000 < 0,05$ ) (Appendice C).

#### 7.2.4. Taux cumulé de germination

À partir des résultats moyens des taux cumulés de germination (Figure 7.11), il est évident que ce paramètre a décliné sous l'effet du stress métallique. Ce déclin est différent selon l'inoculation bactérienne.



**Figure 7.11 : Effet de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur le taux cumulé de germination (%) du lotier.**

La figure 7.11 illustre ce déclin, où on note une valeur du TCG = 86,67% chez le témoin (0  $\mu\text{g/ml}$ ), cette valeur devient nulle une fois que le stress métallique est appliqué, ceci est vrai pour l'ensemble des traitements et leur concentration sauf pour la concentration 1500 : 2000  $\mu\text{g/ml}$  du milieu cuprique-cadmique où on note une valeur de 4,17% qui reste néanmoins très faible par rapport au témoin.

On note une amélioration du taux cumulé de germination suite à l'inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*. En effet, la valeur minimale du TCG s'observe chez les graines mises en germination sur milieu cuprique à 1500  $\mu\text{g/ml}$  (10,83%). Cette valeur augmente pour atteindre 18,33% à la concentration 2000  $\mu\text{g/ml}$  puis diminue à nouveau à 3000  $\mu\text{g/ml}$  (17,50%).

Dans le milieu cadmique, et en présence le *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*, les graines du lotier présentent un TCG dépassant la moyenne (45%) à la concentration 2000 µg/ml, ce taux diminue et enregistre une valeur de 18,33 % à la concentration 6000 µg/ml.

Nous notons que la germination du lotier dans le milieu contenant le mélange des deux ETMs (cuivre et cadmium) diminue proportionnellement avec l'augmentation des concentrations. Le taux cumulé de germination le plus élevé est enregistré aux concentrations 1500 et 2000 µg/ml (Cu:Cd) (20%), le plus bas aux concentrations 3000 et 6000 µg/ml (Cu:Cd) (12,5%).

L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) révèle que *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a un impact significatif sur le taux cumulé de germination ( $p=0,000 < 0,05$ ) (Appendice C).

### 7.2.5. La vitesse de germination

Les courbes de la figures 7.12 mettent en évidence le temps moyen de germination du lotier en conditions métalliques, ce dernier est *inversement proportionnelle* à la vitesse de germination.

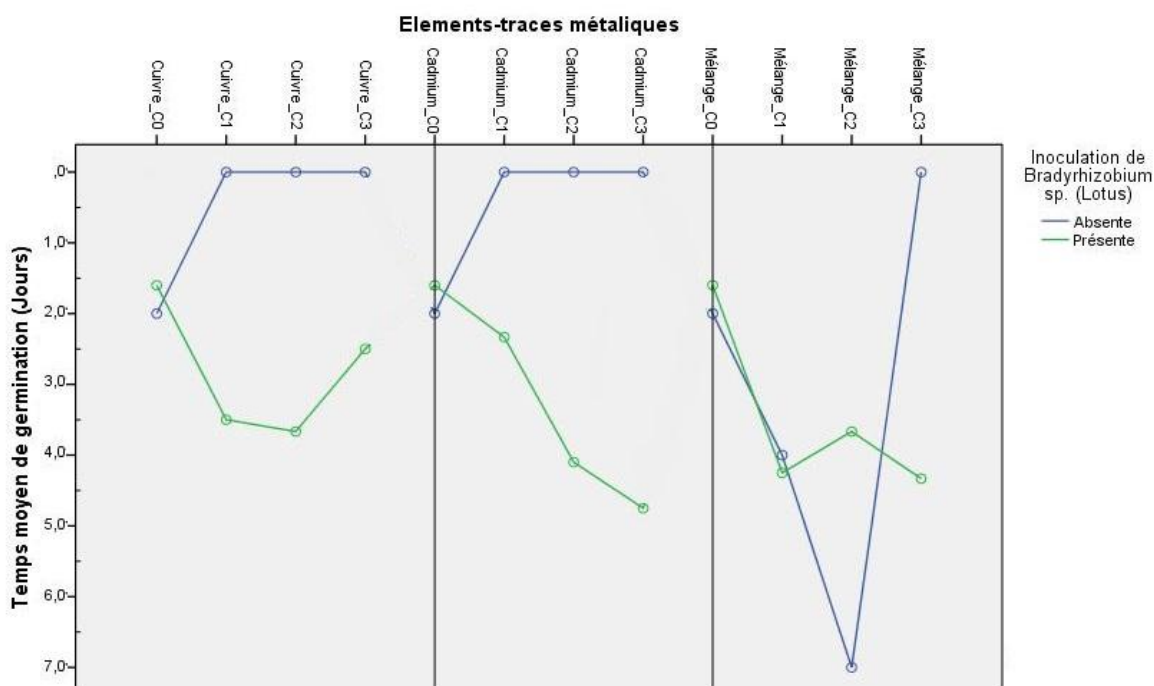


Figure 7. 12 : Effet de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur le temps moyen de germination (jours) du lotier.

L'analyse des résultats présentés dans la figure 7.12 montre que les graines ayant germées dans l'eau distillée (0 µg/ml d'ETM) ont un TMG de 1,9 jour, cependant, le TMG n'a pas pu être calculés pour les graines mises en germination dans les solutions cadmique et cuprique strict, car aucune germination n'a été observée durant l'expérimentation pour l'ensemble des concentrations appliquées.

Sous contrainte causée par les ETMs et sans inoculation bactérienne, la vitesse de germination, exprimée en temps moyen de germination (TMG), enregistre des diminutions qui varient de 50 à 90 % comparées avec le témoin lorsque la solution est un mélange des deux ETMs (cuivre et cadmium). Cette diminution est proportionnelle à la concentration, sauf pour les concentrations 3000 :6000 µg/ml (Cu:Cd) où aucune germination n'a été observée, donc le TMG n'a pas pu être calculé.

La figure 7.12 indique que le TMG du témoin (1,6 jour) en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* est inférieur à celui des graines non inoculée. Ainsi on note une augmentation de la vitesse de germination avec l'inoculation de la bactérie.

Après inoculation bactérienne, on constate, une diminution de la vitesse de germination du lotier, elle est proportionnelle à la concentration en cadmium où on enregistre un TMG = 4,75 jour pour 6000 µg/ml de CdCl<sub>2</sub>.

Pour la germination du lotier en milieu cuprique, on dénote une diminution de la vitesse le TMG=3,5 et 3,67 jours respectivement pour les concentrations 1500 et 2000 µg/ml. À 3000 µg/ml et en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* on note une augmentation de la vitesse de germination (TMG = 2,5 jours) par rapport aux concentrations précédentes (1500 et 2000 µg/ml).

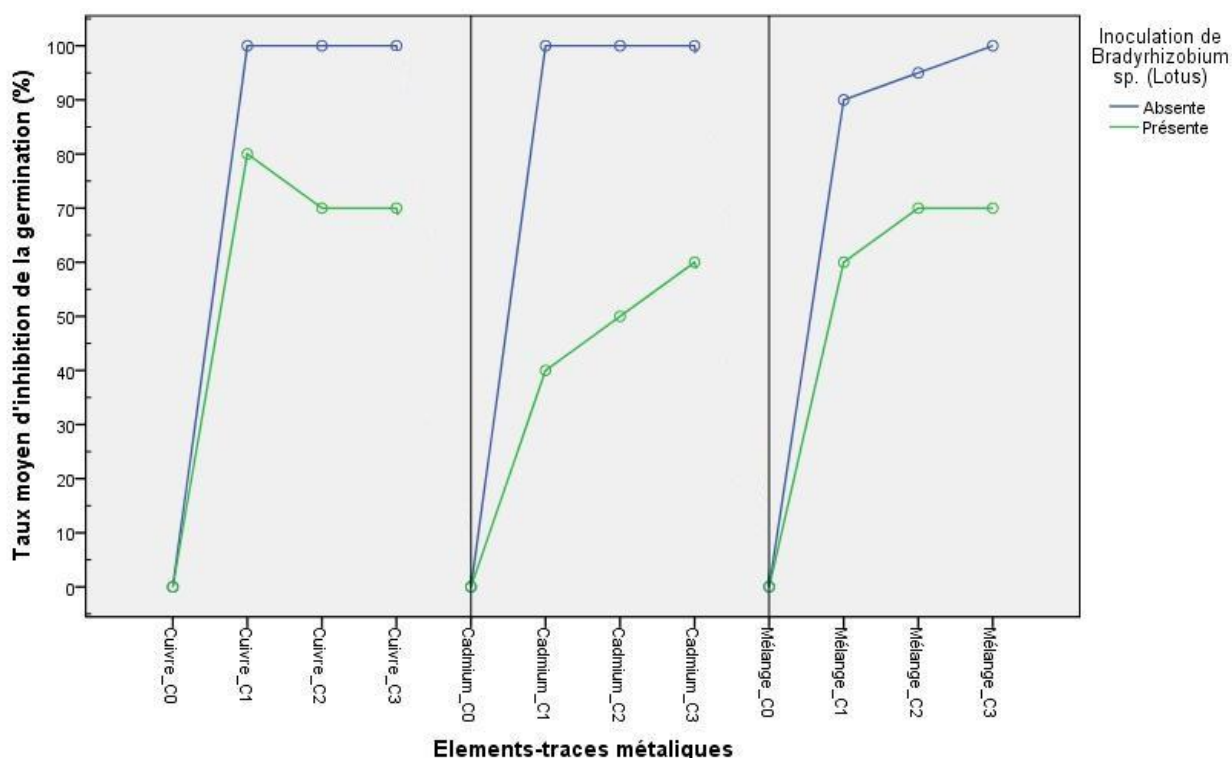
La germination du lotier dans le milieu contenant le cuivre et le cadmium révèle également une baisse de la vitesse de germination qui se traduit par un TMG de 4,25 jours pour les concentrations 1500 : 2000 µg/ml (Cu : Cd), cette même vitesse augmente aux concentrations 2000 : 3500 µg/ml (Cu :Cd) (TMG = 3,67 jours) puis ralentie(TMG =4,33 jours) aux concentrations 3000 :6000 µg/ml (Cu :Cd) (). Les résultats représentés sur les deux précédentes courbes de la figure 7.10 montrent que l'inoculation bactérienne à un effet marquant sur la vitesse de germination du

lotier.

Ainsi, l'analyse multivarié de la variance (MANOVA) a révélé que *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a un impact significatif sur la vitesse de germination ( $p=0,000 < 0,05$ ) (Appendice C).

### 7.2.6. Inhibition de la germination

L'effet de l'inoculation bactérienne par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur l'inhibition de la germination causée par le cuivre et/ou le cadmium est mentionné sur la figure 7.13



**Figure 7.13: Effet de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur le taux d'inhibition de germination (%) du lotier.**

En présence des deux contaminants seuls (cuivre ou cadmium), et en absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*, on note un taux d'inhibition de 100 % est cela en dépit de la concentration en ions comparé avec l'essai témoin (0  $\mu\text{g/ml}$ ) où ce taux est nul. Le taux d'inhibition de la germination le plus faible est enregistré à la concentration C1 du mélange des deux éléments ( $I_{\text{obs}} = 90\%$ ). On remarque un accroissement du taux de 5%, proportionnel à la concentration. (Figure 7.13).

L'inoculation de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a changé le taux d'inhibition de la germination par rapport aux essais non inoculés.

On note que ce taux atteint un maximum de 80% pour la concentration C1 du cuivre. Une baisse du taux avec l'augmentation de la croissance (70%) est constatée.

Sur le milieu cadmique, on relève les taux les plus faibles d'inhibition (40%) pour la concentration C1, ce taux augmente de 10% pour atteindre 60% pour la concentration C3. Le mélange des deux éléments a révélé un taux d'inhibition de 60% pour la concentration C1 qui augmente pour atteindre celui du cuivre (70%). Cette variation des taux d'inhibition restent néanmoins faible par rapport aux essais non inoculés par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

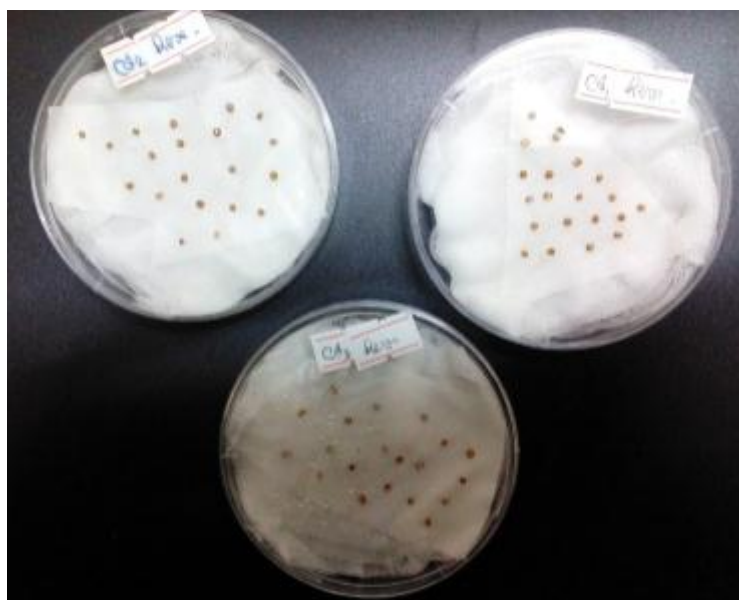
L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) a révélé que *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a un impact significatif sur le taux d'inhibition de la germination ( $p=0,000 < 0,05$ ) (Appendice C).

#### **7.2.7. Réversibilité de l'inhibition de la germination**

Il a été démontré dans les paragraphes précédents que le cuivre et le cadmium, ainsi leur combinaison, exercent, à différentes concentrations, un effet dépressif sur la germination des graines. Cette inhibition peut être osmotique et/ou toxique.

Si elle est d'origine osmotique, on devrait s'attendre à une reprise de la germination après levée de cette contrainte. Par contre, si des phénomènes de toxicité ionique interviennent, on peut s'attendre à une absence de reprise de la germination.

On a particulièrement noté une absence de reprise de germination pour le lotier quelque soit le prétraitement métallique et bactérien. Ceci confirme que l'action des ETMs est de nature toxique (Figure 7.14).



**Figure 7.14 : Absence de réversibilité de l'inhibition de la germination du lotier**

### **7.2.8. Détermination de la toxicité des ions sur la germination**

Pour mieux prouver l'effet osmotique ou toxique des ETMs sur le lotier, on a comparé le comportement germinatif sur milieu métallique et sur du mannitol.

Le potentiel osmotique calculé pour chaque solution iso-osmotique est exposé dans l'Appendice D

L'interaction LOTIER x MANNITOL a été significative (Binomial =  $0,002 < 0,05$ ). Les pourcentages de germination sur du mannitol (100%) ont été plus élevés que ceux enregistrés aux différentes concentrations d'ETM (C1, C2 et C3) et cela malgré la pression osmotique (Figure 7.15). ce qui nous indique les éventuels effets toxiques des ions métalliques aux dites concentration (Figure 7.16).

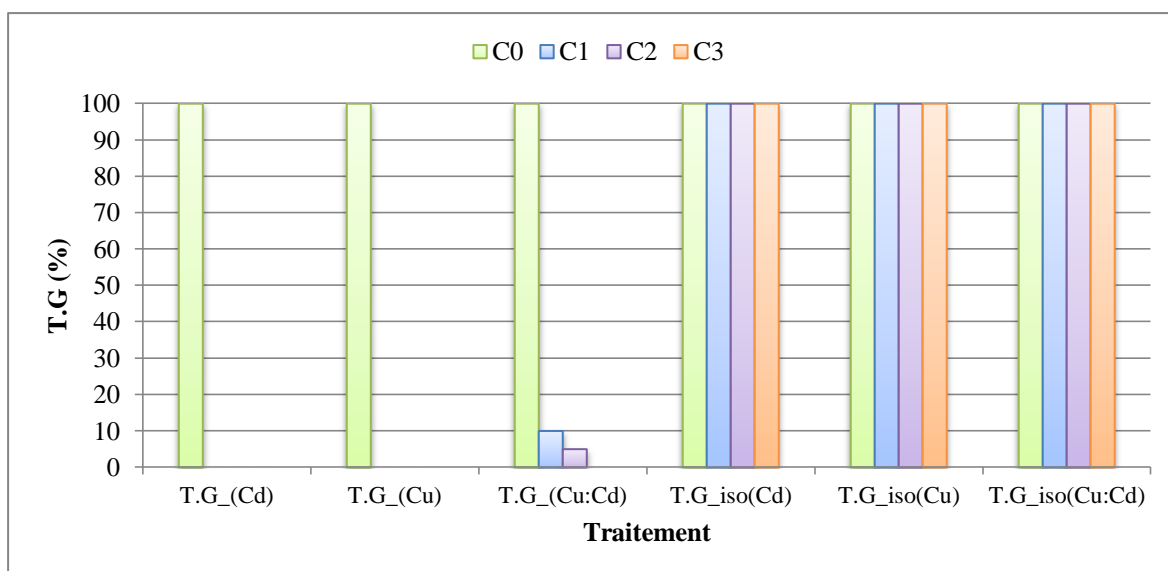


Figure 7. 15 Taux de germination final du lotier sur les solutions iso-osmotiques comparé aux différentes concentrations d'ETMs.

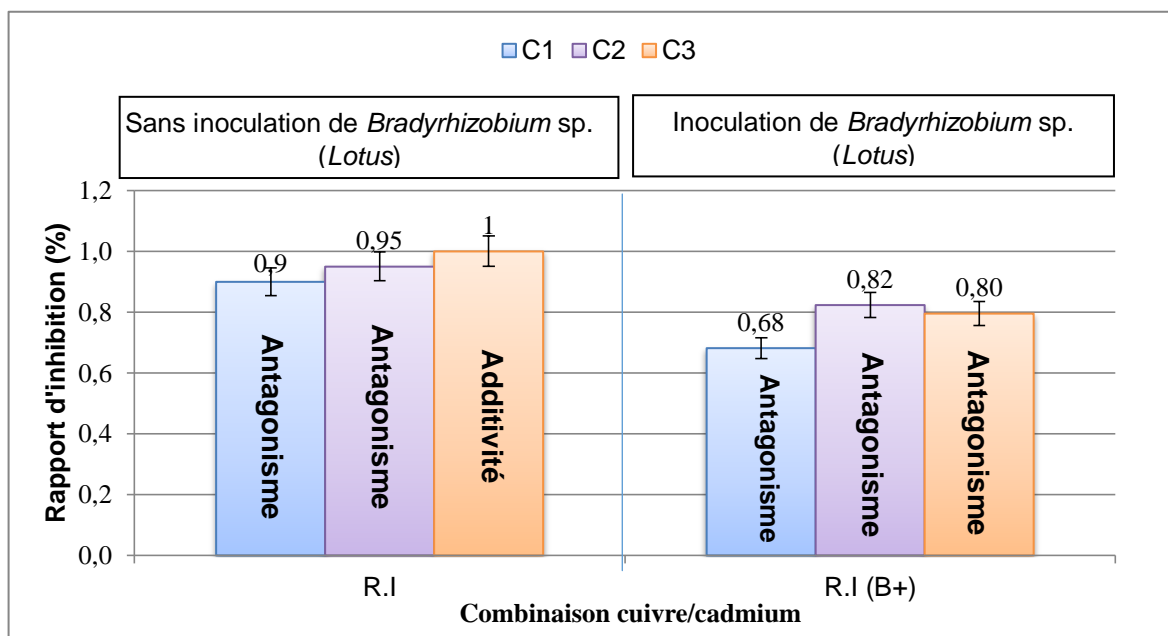


Figure 7.16 : Germination du lotier sur les solutions iso-osmotiques de mannitol.

### 7.2.9. Combinaison du cuivre et du cadmium

Dans la perspective d'appréhender l'effet de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) sur l'interaction des deux éléments (cuivre et cadmium) aux différentes doses étudiées, on a procédé au calcul du rapport d'inhibition de la germination (R.I) (Figure 7.17).





**Figure 7. 17 : Effet de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur le rapport d'inhibition de la germination (R.I)(%) et la combinaison cuivre/cadmium.**

La figure ci-dessus (Figure 7.17) montre que le R.I des combinaisons métalliques dépend de l'inhibition observée et de l'inhibition théorique qui, elle-même, est dépendante de l'inhibition des éléments pris individuellement (Appendice D).

En absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*, on note un rapport d'inhibition (R.I) variant de 0,90 à 1 (augmentation de 5%, proportionnelle à la concentration). Ces valeurs indiquent la présence d'interactions antagonistes entre le cuivre et le cadmium pour les combinaisons aux concentrations C1 et C2. Concernant la concentration C3, on remarque que le R.I est égale à 1, ceci nous indique l'existence d'une interaction de nature additive entre les deux éléments cités.

L'étude de la figure 7.17 nous a permis de constater que l'inoculation de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* fait chuter le rapport d'inhibition de 13 à 22% comparé aux essais témoin (sans inoculation bactérienne). En effet, on enregistre des valeurs de 0,68 ; 0,82 et 0,80 respectivement pour les concentrations C1, C2 et C3.

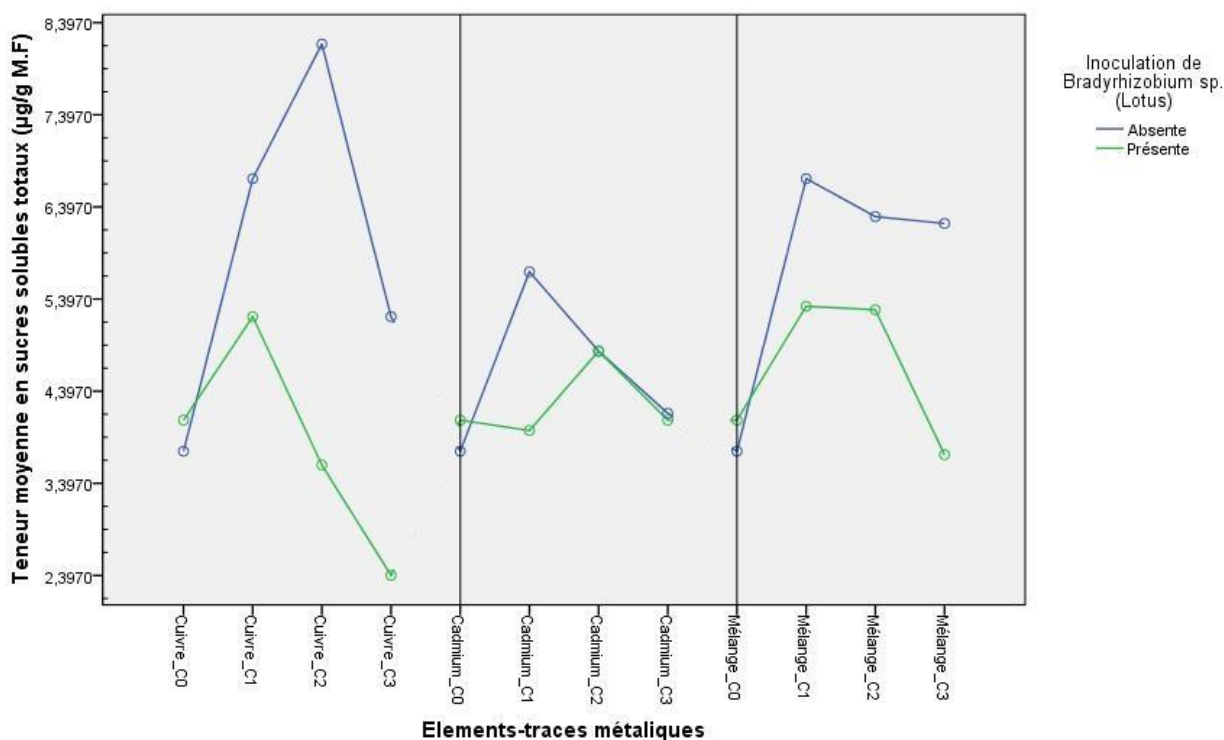
Le rapport d'inhibition diminue en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*, de ce fait, il traduit une interaction d'antagonisme pour l'ensemble des combinaisons. On souligne un changement particulier dans l'interaction des éléments (Cu et Cd) à la concentration C3 où elle bascule d'« additivité » à « antagonisme ».

Les résultats de l'analyse multivariée de la variance (MANOVA) (Appendice C) ont révélés que la pré-inoculation des graines du lotier par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* conduit à des réponses significativement différentes par rapport aux essais non-inoculés au seuil 5%. ( $p= 0,02 < 0,05$ )

### 7.3. Effets de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur les paramètres biochimiques en conditions métalliques

#### 7.3.1. Teneur en sucres solubles totaux

La teneur en sucres solubles totaux est un indicateur de résistance chez les plantes sujettes aux stress. En général, une augmentation de la teneur en ces osmolytes confère aux végétaux stressés une aptitude à équilibrer leur état. L'inoculation de certaines bactéries (*Rhizobia*, PGPR...) et l'addition de quelques hormones de croissance (ABA...) diminue le taux de sucres solubles totaux tout en notons un développement appréciable des plantes et/ou des graines. La figure 7.18 ci-dessous montre la variation de ce taux et l'effet que joue *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur ce paramètre.



**Figure 7.18 : Effet de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur la teneur en sucres solubles totaux (µg/g M.F) des graines du lotier en conditions métalliques.**

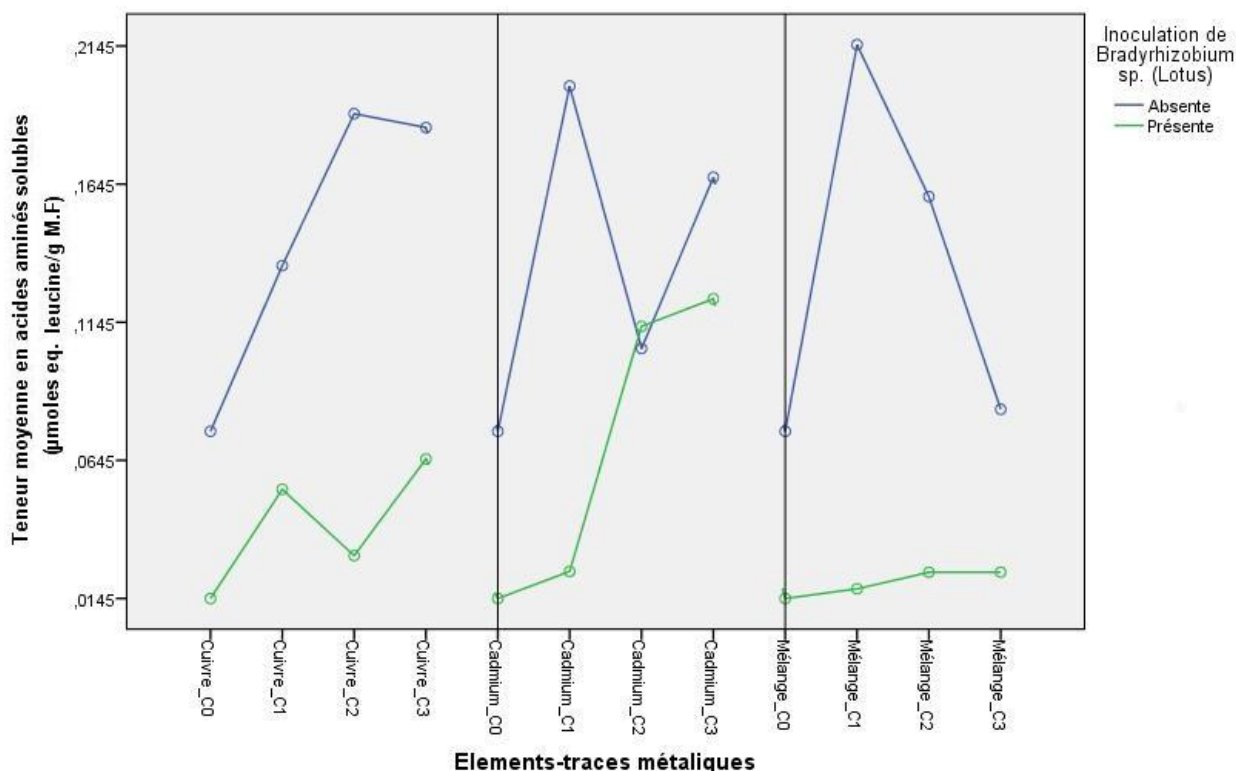
- Sans inoculation bactérienne, on note une augmentation de la teneur en sucres solubles totaux des essais traités par les différentes concentrations d'ETM (Cu, Cd, Cu : Cd) par rapport à l'essai témoin (3,74 µg/g MF) (Figure 7.18). La teneur en sucres solubles totaux augmente avec l'augmentation de la concentration en éléments métalliques, hormis le milieu cuprique où on remarque une fluctuation, dont laquelle on enregistre la valeur la plus élevée (8,16 µg/g MF). Tandis que la valeur la plus faible (4,15 µg/g MF) est enregistrée dans le lot de graines misent à germer dans le milieu cadmique à la concentration C3. Le mélange des deux éléments (cuivre et cadmium) engendre des teneurs en sucres solubles également élevés par rapport au témoin (C0).
- Les courbes dans la figure 7.18 montrent que l'inoculation de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) entraîne une baisse de la teneur en sucres solubles totaux par rapport aux essais non inoculés. On note une valeur de 5,31 µg/g MF pour les graines misent à germer dans le milieu contenant le mélange des deux éléments à la concentration C1. Tandis que la valeur la plus faible (2,39 µg/g MF) est observée à la concentration C3 du milieu cuprique. Cette valeur est moins élevée comparée avec l'essai témoin inoculé (C0) (3,33 µg/g MF).
- L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) du présent paramètre indique que *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) a un impact significatif sur cette baisse au niveau des essais inoculés. Autrement dit, *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) a un effet significatif sur la diminution de la teneur en sucres solubles totaux ( $p= 0,000 < 0,05$ ) (Appendice C).

### **7.3.2 Teneur en acides aminés solubles**

Les acides aminés (A.A) sont des osmoprotecteurs organiques. L'effet du stress métallique entraîne une augmentation importante du contenu en acides aminés chez les essais traités. (Figure 7.19).

Sans inoculation bactérienne, on note une augmentation de la teneur en A.A à la concentration C1 supérieure au double (200,66%) par rapport au témoin (C0) (lot de graines germées sur milieu cadmique). Cette augmentation fluctue et baisse pour atteindre une valeur de (0,105 µmoles eq. leucine/g M.F) à la concentration C2, elle augmente à la concentration C3 pour enregistrer une valeur de 0,167 µmoles eq. leucine/g M.F.

On remarque sur milieu cuprique une augmentation des teneurs en A.A, proportionnelle à la concentration, où on enregistre des valeurs de 0,135 ; 0,185 et 0,190  $\mu\text{moles eq. leucine/g M.F}$  respectivement pour les concentrations C1, C2, C3. Par contre, la corrélation devient inversement proportionnelle pour les graines misent à germer dans le milieu contenant le mélange des deux ETMs où on note la valeur la plus élevée (0,215  $\mu\text{moles eq. leucine/g M.F}$ ) à la concentration C1 et la concentration la plus faible (0,083  $\mu\text{moles eq. leucine/g M.F}$ ) à la concentration C3.



**Figure 7.19: Effet de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur la teneur en acides aminés solubles ( $\mu\text{moles eq. leucine/g M.F}$ ) des graines du lotier en conditions métalliques.**

L'inoculation des graines par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* réduit les teneurs en A.A (Figure 7.19). En effet on note une baisse importante de 8,37 à 18,66% des teneurs en A.A. pour l'ensemble des concentrations par rapport aux essais non inoculés. On enregistre des valeurs faibles pour le témoin C0 (0,014  $\mu\text{moles eq. leucine/g M.F}$ ). La valeur la plus élevée (0,123  $\mu\text{moles eq. leucine/g M.F}$ ) est notée à la concentration C3 du milieu cadmique, ainsi la plus faible (0,018  $\mu\text{moles eq. leucine/g M.F}$ ) est enregistrée à la concentration C1 du milieu contenant le mélange des deux ETMs.

- On constate également que les teneurs en A.A augmentent avec l'augmentation de la concentration du milieu en cadmium et en éléments associés. Ce qui n'est pas le cas pour le milieu cuprique.
- L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) indique que *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) a un impact significatif sur la diminution de la teneur en A.A où  $p = 0,000 (< 0,05)$  (Appendice C).

### 7.3.3. Teneur en Proline

Les teneurs en Proline en fonction de la nature des ETMs, de leurs doses et de l'inoculation bactérienne sont reportés sur la figure 7.20

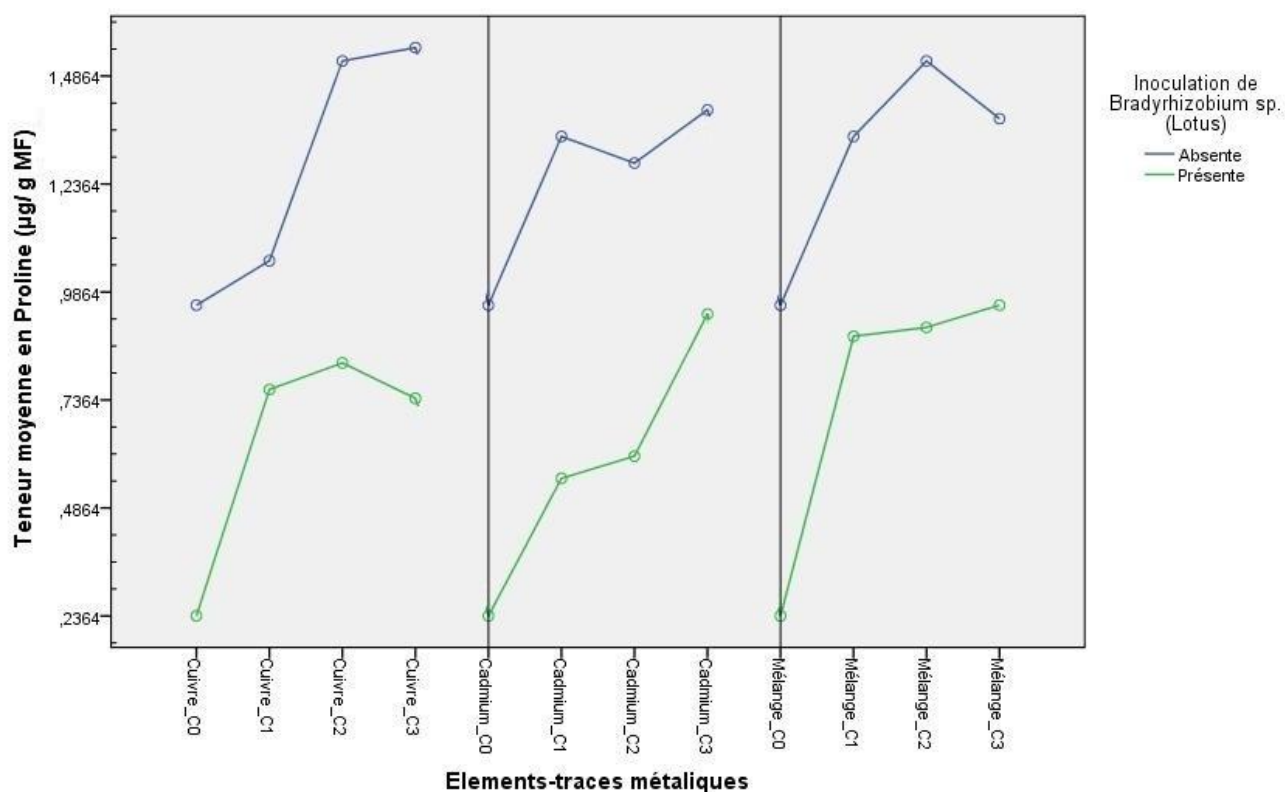


Figure 7.20 : Effet de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) sur la teneur en Proline ( $\mu\text{g/g MF}$ ) des graines du lotier en conditions métalliques.

En absence d'un traitement préalable des graines par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* on note des teneurs élevées en Proline. A la concentration C0 (témoin) on enregistre un taux de 0,95 µg/g MF, cette valeur augmente et atteint 1,28 ; 1,34 ; 1,40 µg/g MF pour, respectivement, les concentrations C1, C2 et C3 sur milieu cadmique.

En milieu cuprique, la teneur en Proline est en corrélation positive avec la concentration où on enregistre un maximum de 1,55 µg/g MF pour la concentration C3. Le mélange des deux éléments engendre également des hausses importantes par rapport au témoin.

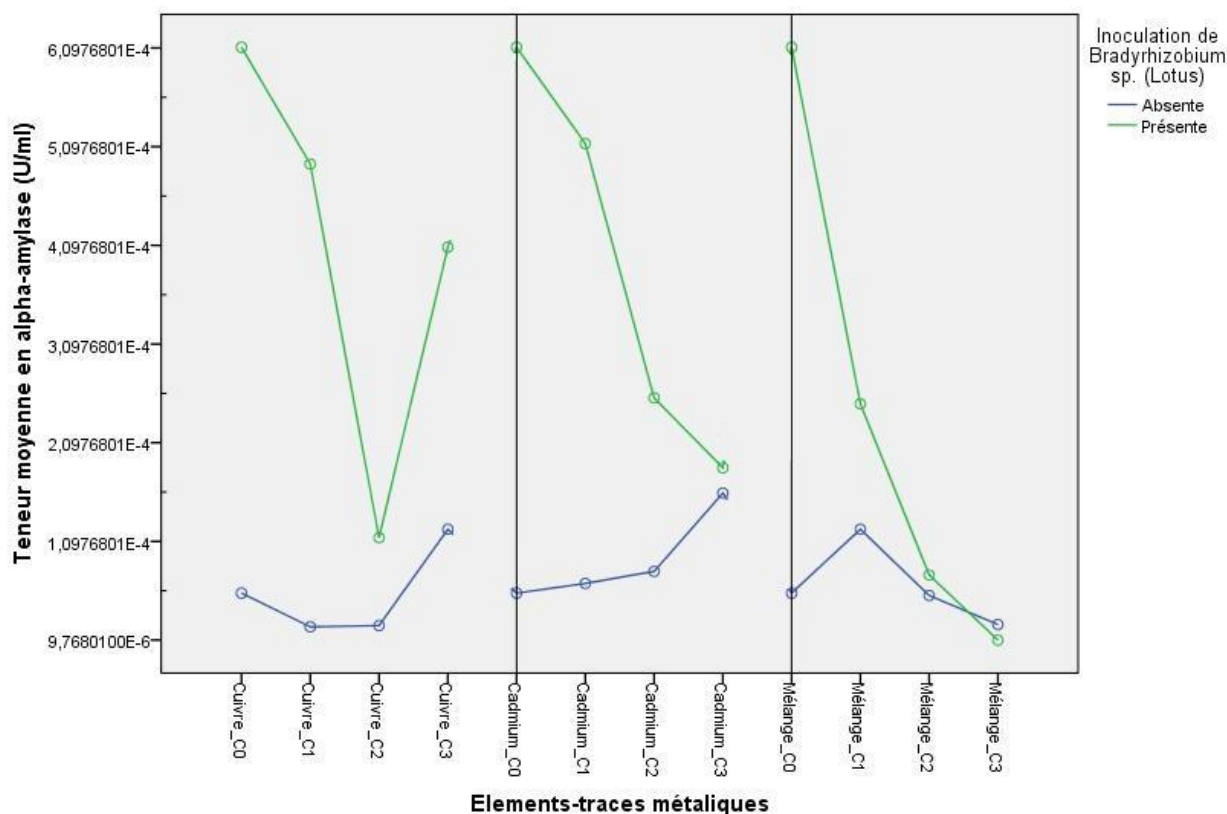
- L'inoculation bactérienne par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* fait chuter le taux de proline en le comparant avec les essais analogues non inoculés par la bactérie. En effet à la concentration C0 (témoin) on enregistre une teneur en Proline égale à 0,23 µg/g MF, cette valeur est faible par rapport à l'essai inoculé (0,95 µg/g MF). On note une augmentation du taux de proline pour les différents traitements néanmoins cette augmentation reste faible par rapport aux lots de graines non inoculées. On enregistre une valeur maximale de 0,95 µg/g MF présente chez les graines cultivées sur le milieu contenant l'association métallique à la concentration C3. La valeur la plus faible (0,55 µg/g MF), est enregistrée à la concentration C1 du milieu cadmique

- On remarque que la teneur maximale en proline chez des essais inoculés est moindre par rapport au témoin à leurs analogues non inoculés.

L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) a indiqué que cette baisse de la teneur en proline chez les essais inoculés est statistiquement significative ( $p=0,00 < 0,05$ ) (Appendice). Donc on peut conclure que *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a un impact significatif sur la baisse de la teneur en proline chez les graines soumises au stress (Appendice C).

### 7.3.4. Teneur en $\alpha$ -amylase

La teneur en  $\alpha$ -amylase dans les graines stressées en présence ou en absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* est estimée en unité enzymatique et représentée sur la figure 7.21



**Figure 7. 21: Effet de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur la teneur en  $\alpha$ -amylase (U/ml) des graines du lotier en conditions métalliques.**

En absence d'une pré-inoculation bactérienne on note une très faible activité amylasique du témoin (C0) ( $5,74 \cdot 10^{-5}$  U/ml). La teneur en  $\alpha$ -amylase augmente légèrement avec l'augmentation de la concentration en cadmium où on enregistre une valeur maximale de l'ordre de  $1,59 \cdot 10^{-4}$  U/ml pour la concentration C3. Il est de même pour les graines misent à germer dans le milieu cuprique où la teneur en  $\alpha$ -amylase augmente de  $2,32 \cdot 10^{-5}$  U/ml (C1) à  $1,22 \cdot 10^{-4}$  U/ml (C3). L'augmentation de la concentration du mélange des deux éléments engendre une baisse de la  $\alpha$ -amylase et atteint  $2,55 \cdot 10^{-5}$  U/ml.

- La pré-inoculation des graines du lotier par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* entraîne une augmentation de la teneur en  $\alpha$ -amylase par rapport aux essais non inoculés. En effet le témoin enregistre une valeur de  $6,11 \cdot 10^{-4}$  U/ml, cette dernière diminue en

fonction de l'augmentation de la concentration du milieu en cadmium pour atteindre  $5,13 \cdot 10^{-4}$  U/ml à la concentration C1 puis elle continue à baisser pour atteindre  $1,84 \cdot 10^{-4}$  U/ml pour la concentration C3. On remarque que l'activité amylasique diminue également en fonction de la concentration en cuivre dans le milieu ( $4,92 \cdot 10^{-4}$  U/ml pour C1) et atteint  $1,14 \cdot 10^{-4}$  U/ml pour la concentration C2, la teneur en  $\alpha$ -amylase augmente brusquement à la concentration C3 ( $4,08 \cdot 10^{-4}$  U/ml). Les valeurs les plus faibles sont enregistrées dans les essais contenant le mélange cuivre/cadmium ( $9,77 \cdot 10^{-6}$  U/ml pour C3).

L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) montre que l'augmentation de la teneur en  $\alpha$ -amylase chez les essais inoculés est statistiquement significative ( $p=0,000 < 0,05$ ) (Appendice C). Donc on peut conclure que *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) a un impact significatif sur l'augmentation de la teneur en  $\alpha$ -amylase chez les graines soumises au stress.

### 7.3.5. Teneur en ADN

La figure 7.22 ci-dessous illustre l'impact de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) sur la teneur en ADN des graines du lotier stressées par le cadmium, le cuivre ainsi que leur association aux différentes concentrations.

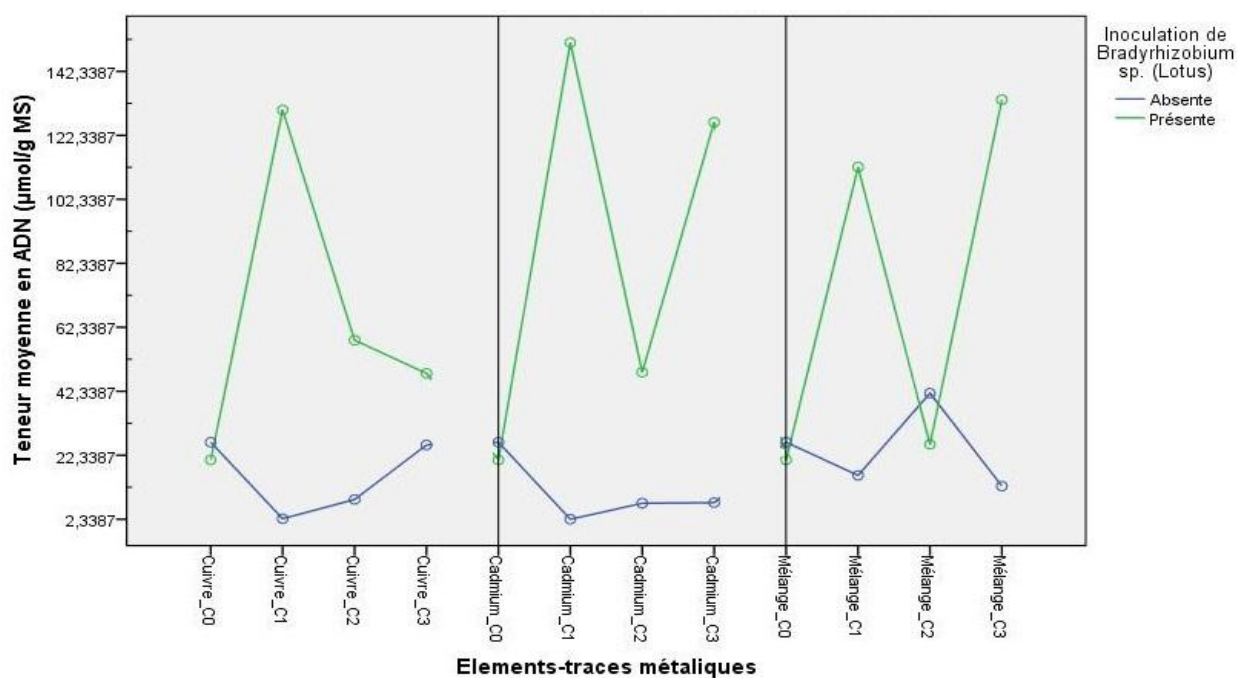


Figure 7.22 : Effet de *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) sur la teneur en ADN ( $\mu\text{mol/g MS}$ ) des graines du lotier en conditions métalliques.



Sans pré-inoculation bactérienne des graines du lotier on note de faibles teneurs en ADN dans les essais traités comparé au témoin (26,35  $\mu\text{mol/g MS}$ ) hormis pour la concentration C2 du milieu contenant le mélange cuivre/cadmium où la teneur en ADN augmente de 58,56 % (41,76  $\mu\text{mol/g MS}$ ).

En effet, en absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* on enregistre les teneur les plus faibles (2,34 et 2,50  $\mu\text{mol/g MS}$ ) pour les concentration C1 des milieu cadmique et cuprique (succesivement). Ces valeurs augmentent légèrement avec l'augmentation des concentration en ETM.

- L'innoculation de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* favorise l' augmentation des teneurs en ADN des essais traités par les différentes concentrations en ETM par rapport au témoin (29,23  $\mu\text{mol/g MS}$ ). Ce dernier voit ces valeurs augmenter par rapport au témoin des essais non inoculés par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

Pour le milieu cadmique, on note une augmentation très importante de la teneur en ADN de l'ordre de 418,06% pour la concentration C1 (151,43  $\mu\text{mol/g MS}$ ) par rapport au témoin (C0). Il est de même pour l'ensemble des traitements où on enregistre un minimum de teneur en ADN aux concentrations C3 du milieu cuprique et C2 du milieu cadmique (47, 94 et 48,2743  $\mu\text{mol/g MS}$  succesivement).

On note également que la teneur en ADN des graines du lotier baisse avec l'augmentation de la concentration en cuivre, ce qui n'est pas le cas pour les essais du milieu cadmique et le mélange des deux ETM. Les graines misent à germer sur ces derniers voient une baisse de leur teneur en ADN à la concentration C2 puis elle augmente à la concentration C3.

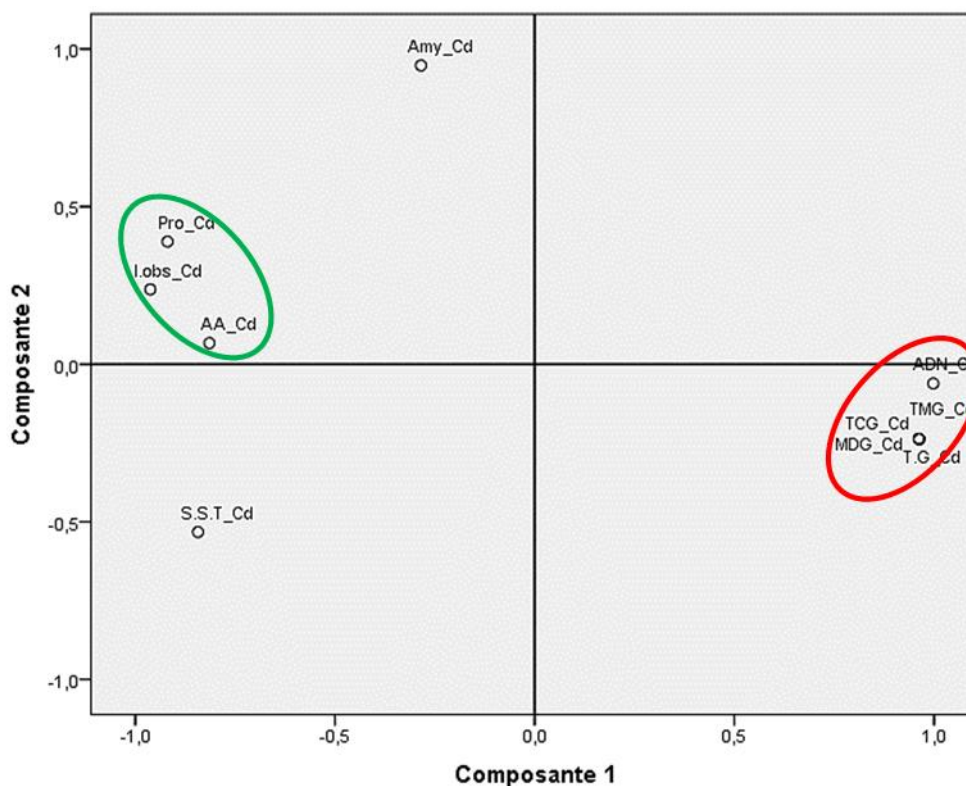
- L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) nous a indiqué que cette augmentation de la teneur en ADN chez les essais inoculés est statistiquement significative ( $p=0,000 < 0,05$ ) (Appendice C). Donc on peut conclure que *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* a un impact significatif sur l'augmentation de la teneur en ADN chez les graines du lotier soumises aux stressées

#### 7.4. Interactions inter-paramètres

La corrélation de *Pearson* entre les différents paramètres (physiologiques et biochimiques) dans les différentes conditions et l'analyse en composantes principales « ACP » (**Appendice C**) nous ont permis de souligner les points suivants :

- **En présence du cadmium sans pré-inoculation des graines**

On note une corrélation très forte ( $r = 0,97$ ) statistiquement significative ( $p=0,026$ ) proportionnelle entre la teneur en ADN, d'une part, et le taux de germination, la moyenne de germination journalière, le taux cumulé de germination ainsi que la vitesse de germination. On note une corrélation ( $p=0,026$ ) très forte ( $r = -0,036$ ) inversement proportionnelle entre la teneur en ADN et le taux d'inhibition de la germination (Figure 7.23).



**Figure 7.23: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cadmique sans inoculation)**

La même constatation est à faire pour la teneur en proline où on note une corrélation très forte ( $r = -0,97$ ) statistiquement significative ( $p = 0,032$ ) inversement proportionnelle entre la teneur en Proline, d'une part, et le taux de germination, la moyenne de germination journalière, le taux cumulé de germination et la vitesse de germination. On note une corrélation significative ( $p = 0,032$ ) très forte ( $r = 0,96$ ) est proportionnelle entre la teneur en proline et le taux d'inhibition de la germination.

Pour la majorité des paramètres physiologiques étudiés, on remarque l'existence d'une corrélation parfaite, proportionnelle ( $r = 1$ ), hautement significative ( $p = 0,00$ ). Exception faite pour le taux d'inhibition où on dénote une corrélation parfaite, inversement proportionnelle ( $r = -1$ ), hautement significative ( $p = 0,00$ ) avec l'ensemble des paramètres.

La matrice de composante nous donne une vision sur la part que représente chaque variable dans un facteur, cette démarche nous permet d'identifier les variables les plus représentées par chaque composante ou facteurs.

Dans notre cas on constate que la composante 1 représente d'une façon forte les variables : ADN, TMG, TCG, MDG et TG. Ces différentes variables sont fortement corrélées avec la première composante.

On constate également une corrélation négative, forte de la teneur en alpha-amylase qui montre que cette variable évolue en sens inverse par rapport aux autres variables déjà évoquées.

Pour la deuxième composante on peut dire qu'elle est positivement corrélée avec AA, Pro,  $I_{obs}$

- ***En présence du cadmium et pré-inoculation des graines***

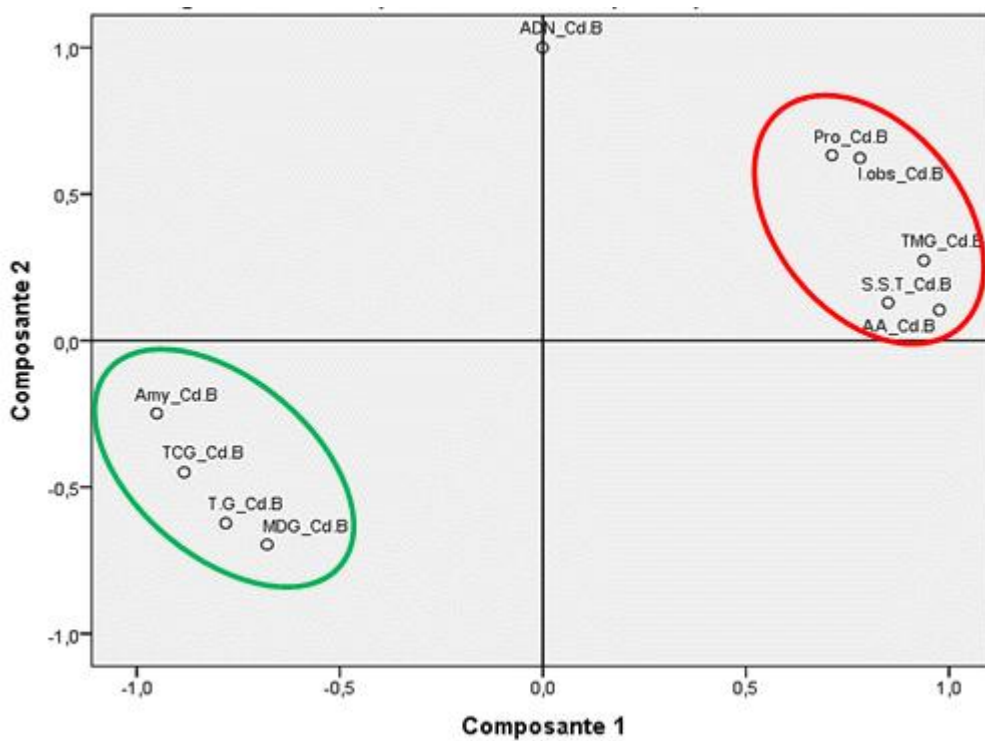
On note une corrélation très forte ( $r = -0,98$ ) statistiquement significative, inversement proportionnelle entre la teneur en acides aminée, et le taux de  $\alpha$ -amylase ( $p = 0,011$ ) ainsi que la vitesse de germination ( $p = 0,015$ ).

On note une corrélation très forte ( $r = 0,97$ ), statistiquement significative, proportionnelle, entre le taux de germination, le taux cumulé de germination ( $p = 0,024$ ) ainsi que la moyenne de germination journalière ( $p = 0,026$ ).

Cette corrélation est inversement proportionnelle, (parfaite ;  $r = -1$ ) au taux d'inhibition du cadmium ( $p=0,00$ ).

Il existe également une corrélation très forte, inversement proportionnelle ( $r = -0,97$ ), significative entre le taux d'inhibition et la moyenne de germination journalière ( $p=0,026$ ) ainsi que le taux cumulé de germination ( $p=0,024$ ) (Figure 7.24)

**Figure 7.24: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation**



**(milieu cadmique avec inoculation)**

On constate que la composante 1 représente d'une façon forte les variables : Pro, I.<sub>obs</sub>, TMG, S.S.T, AA. Ces différentes variables sont fortement corrélées avec la première composante.

On constate aussi une corrélation négative forte de la teneur en alpha-amylase qui montre que cette variable évolue dans un sens contraire aux autres variables déjà évoquées.

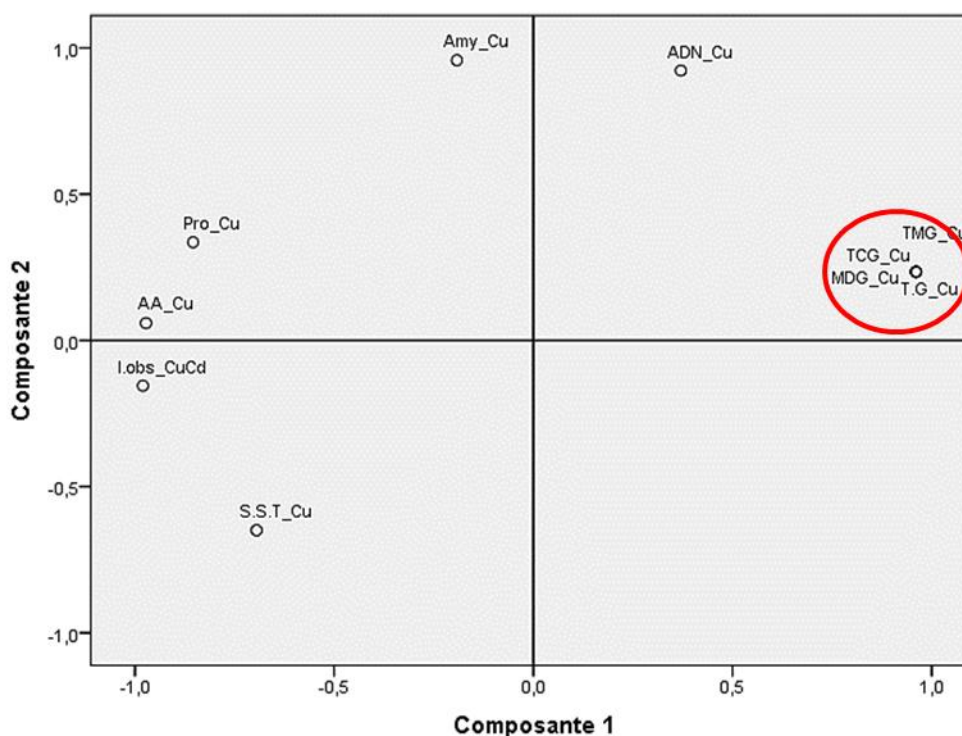
Pour la deuxième composante on peut dire qu'elle est positivement corrélée avec l' $\alpha$ -amylase, TCG, TG, MDG

- **En présence du cuivre sans pré-inoculation des graines**

On note une absence de corrélation, non seulement, entre les paramètres biochimiques eux même mais également en les croisant avec et les paramètres physiologiques.

Il existe une corrélation parfaite et proportionnelle ( $r=1$ ) entre le taux de germination, la moyenne de germination journalière, le taux cumulé de germination et la vitesse de germination ( $p=0,000$ ).

Le taux d'inhibition de la germination sous l'effet du cuivre, présente une corrélation très forte et inversement proportionnelle ( $r = -0,99$ ,  $p = 0,004$ ) avec les paramètres (TG, MDG, TCG, TMG) (Figure 7.25)



**Figure 7.25: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cuprique sans inoculation)**

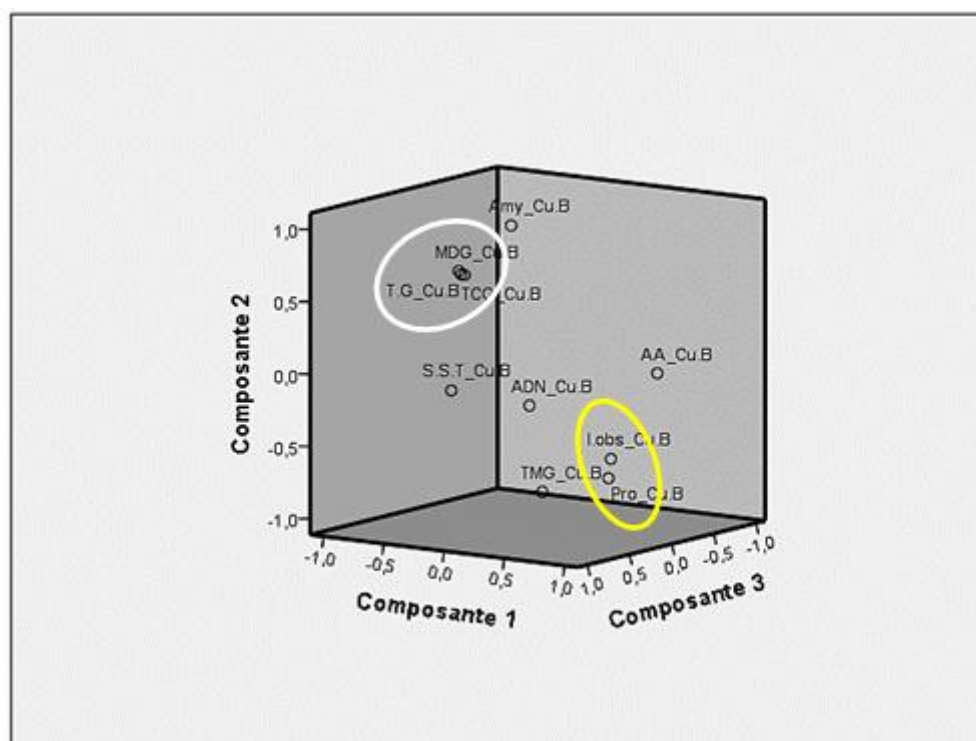
On constate que la composante 1 représente d'une façon très forte les variables : TMG, TCG, MDG et TG. Ces différentes variables sont fortement corrélées avec la première composante. On constate aussi une forte corrélation négative de la teneur en alpha-amylase qui montre que cette variable évolue dans un sens contraire aux autres variables déjà évoquées.

- **En présence du cuivre avec pré-inoculation des graines**

Une corrélation très forte et inversement proportionnelle ( $r = -0,9$ ) est à signaler entre le taux de proline, le taux de germination ( $p=0,021$ ), le taux cumulé de germination ( $p=0,017$ ) et la moyenne de germination journalière ( $p=0,011$ ).

Le taux de proline est en corrélation très forte et proportionnelle ( $r = 0,97$ ) avec le taux d'inhibition de la germination ( $p=0,021$ ). Ce dernier est en corrélation parfaite et inversement proportionnelle ( $r = -1$ ) au taux de germination ( $p=0,000$ ) tandis qu'il est d'intensité très forte avec le taux cumulé de germination ( $p=0,001$ ) et la moyenne de germination journalière ( $p=0,003$ )

Le taux de germination, le taux cumulé de germination et la moyenne de germination journalière sont en corrélation très forte et proportionnelle entre eux ( $p < 5\%$ ) (Figure 7.26).



**Figure 7.26: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cuprique avec inoculation)**

On constate que la composante 1 représente d'une façon forte les variables :  $I_{obs}$  (inhibition observée) et Proline. Ces différentes variables sont fortement corrélées avec la première composante.

Pour la deuxième composante on peut dire qu'elle est positivement corrélée avec MDG, TCG, TG.

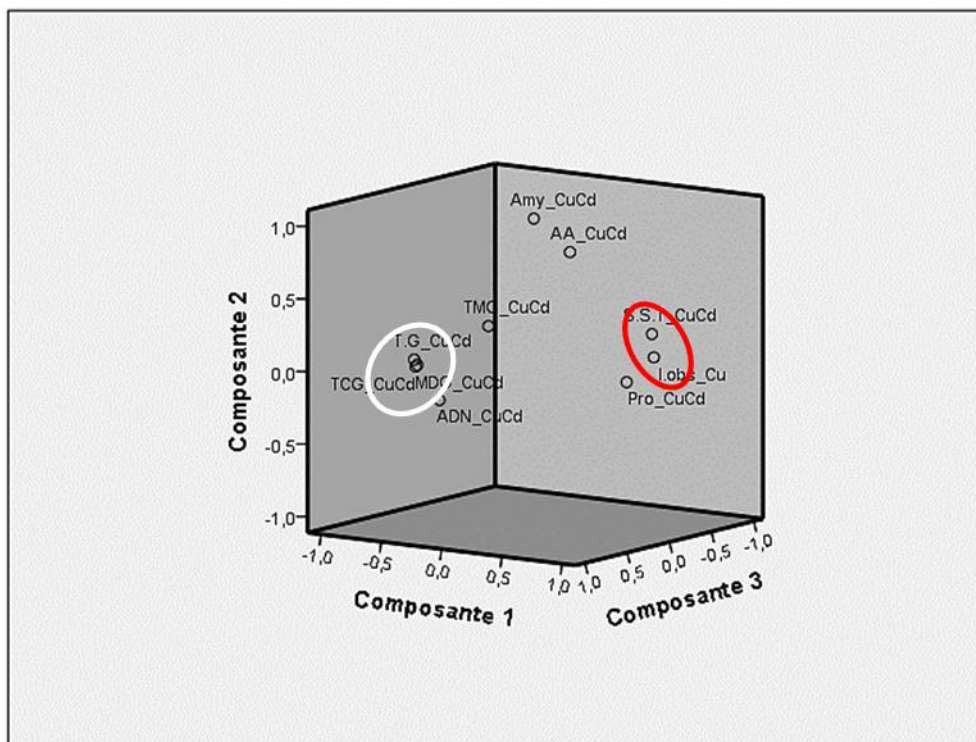
- ***En présence de la combinaison d'ETMs sans pré-inoculation des graines***

On note une corrélation très forte et inversement proportionnelle ( $r = -0,9$ ) entre le taux de sucres solubles, d'une part, et le taux de germination ( $p = 0,029$ ), le taux cumulé de germination ( $p = 0,021$ ) et la moyenne de germination journalière ( $p = 0,019$ ), d'autre part. On note également une corrélation très forte et proportionnelle ( $r = 0,98$ ) entre le taux de sucres solubles et le taux d'inhibition de la germination par le mélange des deux ETM ( $p = 0,013$ ).

Il est de même pour le taux de proline où on note une corrélation très forte et inversement proportionnelle ( $r = -0,9$ ) entre la teneur en proline, d'une part, et le taux de germination ( $p = 0,046$ ), le taux cumulé de germination ( $p = 0,040$ ) et la moyenne de germination journalière ( $p = 0,046$ ), d'autre part. On note également une corrélation très forte et proportionnelle ( $r = 0,95$ ) entre le taux de sucres solubles et le taux d'inhibition de la germination par le mélange des deux ETM ( $p = 0,048$ ).

Le taux de germination, le taux cumulé de germination et la moyenne de germination journalière sont en corrélation très forte et proportionnelle entre eux ( $r=0,99$  et  $p =0,001$ ).

Le taux d'inhibition est en corrélation très forte et inversement proportionnelle ( $r = -0,99$ ) au taux de germination ( $p=0,004$ ), au taux cumulé de germination ( $p=0,001$ ) et à la moyenne de germination journalière ( $p=0,001$ ) (Figure 7.27).



**Figure 7.27: Diagramme de composantes dans l'espace après rotation (milieu cuprique/cadmique sans inoculation)**

On constate que la composante 2 représente d'une façon forte les variables :TMG, TCG, MDG et TG. Ces différentes variables sont fortement corrélées avec la première composante.

On constate aussi une corrélation fortement négative de la teneur en alpha-amylase qui montre que cette variable évolue dans un sens contraire aux autres variables déjà évoquées.

Pour la troisième composante on peut dire qu'elle est positivement corrélée avec le taux d'inhibition et de proline.

- **En présence de la combinaison d'ETM avec pré-inoculation des graines**

On note une corrélation très forte et inversement proportionnelle ( $r = -0,9$ ) entre la teneur en proline d'une part et la  $\alpha$ -amylase ( $p = 0,047$ ), le TG ( $p = 0,004$ ), le TCG ( $p = 0,000$ ) et la MDG ( $p = 0,002$ ). Cette corrélation est d'intensité très forte et proportionnelle ( $r = 0,9$ ) avec le TMG ( $p = 0,024$ ) et le taux d'inhibition ( $p = 0,004$ ).

La teneur en acides aminés solubles est en corrélation très forte et inversement proportionnelle ( $r = -0,95$ ) avec le taux de l' $\alpha$ -amylase ( $p = 0,042$ ). Cette dernière est



en corrélation très forte est proportionnelle ( $r = 0,9$ ) avec le TG ( $p = 0,031$ ) et le TCG ( $p = 0,043$ ). En revanche elle est inversement proportionnelle et d'intensité très forte avec le taux d'inhibition ( $r = -0,96$  et  $p = 0,031$ ).

Le taux de germination, le taux cumulé de germination et la moyenne de germination journalière sont en corrélation très forte et proportionnelle entre eux ( $r = 0,99$  et  $p < 5\%$ ). Tandis que la vitesse de germination est en corrélation très forte et inversement proportionnelle ( $r = -0,9$ ) avec le T.G ( $p = 0,04$ ), TCG ( $p = 0,03$ ) et la MDG ( $p = 0,03$ )

Le taux d'inhibition de la germination causé par le mélange des ETMs en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* est en corrélation très forte à parfaite et inversement proportionnelle ( $r = -0,99$  à  $1$ ) au taux de germination ( $p=0,000$ ), au taux cumulé de germination ( $p=0,002$ ) et à la moyenne de germination journalière ( $p=0,002$ ). En Revanche, la vitesse de germination et le taux d'inhibition sont en corrélation très forte et proportionnelle ( $r = 0,95$  et  $p = 0,04$ ). Tableau 7.6

**Tableau 7. 6 : Matrice des composantes (milieu cuprique/cadmique avec inoculation)**

<b>Matrice des composantes</b>	
	Composante
	1
TCG_CuCd.B	-0,999
Pro_CuCd.B	0,999
T.G_CuCd.B	-0,998
l.obs_CuCd.B	0,998
MDG_CuCd.B	-0,997
TMG_CuCd.B	0,969
Amy_CuCd.B	-0,963
AA_CuCd.B	0,855
S.S.T_CuCd.B	0,613
ADN_CuCd.B	0,610

## 7.5. Discussion générale

### 7.5.1. Métallo-résistance de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*

- Selon la définition proposée par [149] on peut s'avancer et dire que la CMI pour  $\text{CuCl}_2$  vis-à-vis de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* est comprise entre 2000 et 3000  $\mu\text{g/ml}$  ( $2000 < \text{CMI} \leq 3000 \mu\text{g/ml}$ ). Les travaux de Gharzouli [186] montrent que les souches de *Rhizobia* testées présentent une CMI de l'ordre de 1500  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{CuCl}_2$ . Chabbi[187] pour sa part, rapporte que les souches isolées à partir du genre *Trigonella* présentent une CMI comprise entre 800 et 1600  $\mu\text{g/ml}$ .

À de faibles concentrations, le cuivre est reconnu comme micro élément indispensable à la croissance des plantes en générale et des microorganismes en particulier. En excès, il devient, au contraire, toxique et inhibiteur de croissance [188]. Ceci est confirmé par nos résultats, qui rejoignent ceux de Clijsters [189] et Kohen [190] selon lesquels le cuivre serait un promoteur de stress produisant directement des ROS. Ces derniers, générés par les ETM conduisent, à la dégradation des lipides membranaires et des chloroplastes.

- Concernant le cadmium, la CMI la plus élevée a été notée chez *Rhizobium alamii* avec une valeur de 5000  $\mu\text{g/ml}$  [191], à cette valeur *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* continue sa croissance, faible par rapport au témoin mais nettement visible.

On en déduit donc que la CMI du  $\text{CdCl}_2$  est supérieure à 6000  $\mu\text{g/ml}$ . Suite à cela, l'analyse prédictive *in-silico* révèle que la CMI du cadmium serait de l'ordre de 9426,136  $\mu\text{g/ml}$ .

Cette haute tolérance de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* s'explique par les fondements de la phytoremédiation (**Rhizodégradation**) qui stipulent que les microorganismes symbiotiques en général et quelques genres de *Rhizobia* en particulier développent plusieurs systèmes de détoxification (méthylation, chélation...) et de transformations des polluants d'origine métalliques [136]

Il existe trois mécanismes de résistance au cadmium connues chez les bactéries [192] ; [193]:

- 1- Un mécanisme qui rend les enveloppes bactériennes imperméables au  $\text{CdCl}_2$ .
- 2- Un phénomène de bio-sorption où le  $\text{CdCl}_2$  se lie et reste associé à la paroi grâce au EPS.
- 3- Des mécanismes d'efflux où le  $\text{CdCl}_2$  entre dans la cellule et ressort par le biais d'une pompe ATPasique

Au vu de la toxicité de cet ETM pour les plantes, Akiko et ses collaborateurs [147] ont transféré deux gènes de l'espèce végétale *Arabidopsis thaliana* dans l'espèce bactérienne *Mesorhizobium huakuii*. Par conséquent, et selon la relation symbiotique, l'accumulation du cadmium dans les nodules est plus importante qu'avant et ; il a été prouvé qu'après deux mois de culture 9% du Cadmium du sol a été supprimé, la bactérie dans ce cas précis sera d'une grande utilité dans la dépollution des sols.

- Les modifications dans la paroi cellulaire, la membrane, ou l'enveloppe d'une bactérie sont des exemples d'exclusion des ETM par la barrière de la perméabilité membranaire. Ce mécanisme est une tentative effectuée par la bactérie pour protéger les composants cellulaires essentiels sensibles aux ETM. Un exemple frappant est l'exclusion de  $\text{Cu}^{2+}$  résultant de l'altération de la production de la protéine *porine* au niveau du canal membranaire chez *E. coli* [194]

*Bradyrhizobium sp. (Lotus)* montre une grande tolérance aux ETM testés surtout le cadmium dont la concentration minimale inhibitrice dépasse les  $6000\mu\text{g/ml}$ . Sa résistance vis-à-vis du cuivre est faible, comparée à celle du cadmium, mais reste néanmoins élevée par rapport aux autres bactéries étudiées.

De façon générale, les effets toxiques des ETMs sur les microorganismes du sol dépendent de leur disponibilité biologique. Les microorganismes ont développés plusieurs mécanismes pour immobiliser, mobiliser ou transformer les effets des ETM [195]. Selon Giller [196], cet effet dépend de la durée de l'exposition, de la dose

et du type de polluant utilisé.

Par le processus évolutif, les *microorganismes* ont améliorés leurs mécanismes de résistance aux ETM pour s'adapter aux environnements les plus défavorables. Les produits codés par les gènes résistants de la bactérie peuvent réduire ou éliminer la toxicité de l'ETM [197]. Les microorganismes doivent développer des mécanismes de résistance, contrebalançant l'effet des hautes concentrations en ETM tout en assurant le maintien du rôle biologique des ions essentiels [198].

Étant donné la toxicité du cuivre et du cadmium pour les plantes [188] et les résultats auxquels nous sommes arrivés, mettant en avant la tolérance que présente *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* vis-à-vis des hautes concentrations de ces polluants, et surtout du  $\text{CdCl}_2$ , nous avons procédé à l'étude de l'implication de cette bactérie dans le contournement des changements biochimiques et physiologiques induits par le Cu et le Cd sur la germination de la plante hôte (*Lotus ornithopodioides*).

Suite aux différents tests statistiques réalisés, nous avons retenus trois concentrations en ETMs susceptibles d'avoir un effet inhibiteur sur la germination.

#### **7.5.2. Activité bio contrôle de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)***

Les communautés bactériennes peuvent affecter directement la croissance des plantes par la production de molécules biologiquement actives comme les auxines [199]. Environ 80% des rhizobactéries sont capables de produire de l'AIA. La production de cette hormone par les genres *Rhizobium* et *Azotobacter* est bénéfique pour la croissance végétale, elle joue un rôle important dans la division cellulaire, l'élongation racinaire, ainsi que dans la prolifération des poils absorbants [200]. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur de l'AIA, son addition au milieu favorise et augmente la synthèse de cette hormone [199]. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore rhizosphérique [201].

L'analyse des résultats de l'AIA révèle une production remarquable de cette hormone synthétisée par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*. Nos résultats rejoignent ceux de Silini [172] où l'auteur reporte que des souches de *Azotobacter* telles que AZ3, AZ4 et AZ6 produisent des quantités non négligeables d'AIA (54,40 à 118,50 $\mu\text{g/ml}$ ).

La capacité des *Rhizobia* à produire une quantité élevée d'AIA (7,3 à 32,8 µg/ml) a été rapporté par Ahmad [200].

La synthèse de ce composé est variable parmi les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture : phase de croissance et disponibilité du substrat [202]. Selon Barazani et Friedman [203], les bactéries capables de sécréter un taux supérieur à 13,5 µg/ml de composés indoliques sont considérés comme étant des PGPR. De faibles quantités d'AIA de  $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  M sont nécessaires pour la croissance primaire des racines [112], les taux obtenus dans cette étude sont donc suffisants pour stimuler la croissance végétale et contribuer à sa protection.

L'acide cyanhydrique (HCN) est un autre produit impliqué dans l'élimination de divers agents pathogènes. Bien que le cyanure soit un agent toxique capable de perturber l'activité des enzymes impliquées dans les processus métaboliques importants, son rôle comme substance biologique a été prouvé [204] ; [205]

Le HCN bloque effectivement la voie de la cytochrome oxydase et est très toxique pour tous les microorganismes. Toutefois, les microorganismes producteurs en sont protégés [206]. Une corrélation positive est observée entre la production de HCN et la protection du concombre et de la tomate contre *Phytophthora ultimum* et *Fusarium oxysporum* respectivement [207].

Dans cette étude, *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* s'est avéré incapables de produire ce composé volatile. Ceci serait la conséquence de l'inexistence de gènes (*hcn*) responsables de la synthèse de ce métabolite [208] ou bien de l'absence d'un précurseur adéquat [209], [210].

La production d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) est considéré comme moyen de biocontrôle vu ça toxicité. Le mécanisme qui explique cette toxicité réside dans l'augmentation du glutamate et de la glutamine dans le cas de forte concentration. En effet la formation excessive du glutamate entraîne un déplacement de l'équilibre de la réaction catalysée par la *glutamate déshydrogénase* dans le sens de l'assimilation de l'ammoniac [154].

Ceci se traduit par un prélèvement excessif de l' $\alpha$ -cétoglutarate, intermédiaire essentiel du cycle de Krebs. La réduction de ce composé affecte fortement le fonctionnement de ce cycle et par voie de conséquence l'ensemble du processus de production de l'énergie dont l'agent pathogène a besoins [154]

Diverses espèces de *Rhizobia* disposent de capacités inhibitrices vis-à-vis de différents champignons phytopathogènes tels qu'*Alternaria*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, etc... [211],

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'inhibition de ces champignons par les PGPR y compris la production d'agents antimicrobiens, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques telles que la chitinase, la cellulase, la protéase, la production de sidérophores, la compétition pour les nutriments ou une combinaison de ces mécanismes [212]. L'antibiose est le mécanisme le plus connu et le plus important utilisé pour limiter l'invasion de l'agent pathogène dans les tissus de la plante- hôte.

*Bradyrhizobium sp. (Lotus)* s'est avéré incapable d'inhiber la croissance mycélienne des souches fongiques choisies pour l'expérimentation. Ceci pourrait être dû à une incompatibilité du modèle biologique choisi ou, à l'exigence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* concernant le milieu de culture préconisé par le protocole expérimental.

### **7.5.3. Effets de l'inoculation par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* sur la germination du lotier sous stress métallique.**

Le taux cumulé et le pourcentage de germination final des graines de lotier diminuent avec l'augmentation de la concentration des ETM dans le milieu et atteignent une valeur nulle. En effet, nos résultats soulignent que l'excès de cuivre et/ou de cadmium dans le milieu provoque une toxicité irréversible. Il est de même pour la vitesse, la moyenne ainsi que la cinétique de germination. Ces résultats sont en concordance avec ceux rapportés par Mihoub [173] et Lamhamdi [213]. Selon ces auteurs, les ETMs (cuivre, cadmium et plomb ...) dans le milieu inhibe significativement la germination des graines de certaines *Fabaceae* et *Poaceae*.

L'inoculation des graines de lotier par *Bradyrhizobium* sp.(*Lotus*) améliore significativement la germination sous stress métallique. En effet, une variation significative dans la tolérance aux ETMs est observée pour les essais non inoculés et inoculés. Ces derniers, présentent une tolérance plus élevée qui se traduit par une augmentation des valeurs des paramètres physiologiques étudiés.

Des augmentations significatives dans la croissance et le rendement des cultures en réponse à l'inoculation avec les *Rhizobia* ont été signalées [214],[215], [216]. Selon Nelson [217], les *Rhizobia* sont capables d'exercer un effet bénéfique sur la croissance de la plante par augmentation du taux cumulé de la germination et de leur vitesse.

De même les travaux de Bouchenak [218] indiquent que *Azotobacter vinelandii* (AZv) et *Azotobacter chroococcum* (AZc) ont un effet positif sur la germination en condition saline, où le taux cumulé et le taux de germination sont maintenues à 80 et 75% pour les souches AZv et AZc, respectivement, à une concentration de 150 mM de NaCl

L'effet positif des *Rhizobia* sur la germination des graines en milieux défavorables et l'émergence du coléoptile serait attribué à la capacité bactérienne de produire ou de modifier des hormones végétales y compris les gibbérellines qui jouent un rôle clé dans la germination [219].

Le Cadmium et le Cuivre occasionnent une importante diminution du pouvoir germinatif dès le premier jour après le début de l'imbibition. La simulation des effets de la pollution métallique sur les plantes cultivées a été le plus souvent réalisée avec des expériences utilisant des concentrations faibles [220]. Cependant, lorsqu'il s'agit de la germination, ces doses ont été le plus souvent revues à la hausse [162].

En analysant l'impact des ETM sur une multitude de fonctions physiologiques vitales de la plante, Ernst [220] admet que la germination est un processus certes vulnérable au stress métallique, mais qui serait des plus résistants parmi les autres phases du développement de la plante. L'auteur a suggéré que les barrières tégumentaires des graines y empêcheraient une forte accumulation des éléments-traces métalliques. Par ailleurs, pour tout processus physiologique ou métabolique, ce sont les seuils critiques de phytotoxicité, définis en termes d'accumulation

tissulaire qui déterminent la sensibilité aux ETM [221], [222].

Mihoub[162] rapporte une augmentation graduelle des charges endogènes en cuivre et en cadmium pendant les quatre premiers jours de germination du petit pois, mais une forte proportion du cuivre et du cadmium s'accumule dès le premier jour après le début de l'imbibition. Le même auteur explique que ceci est la cause de la diminution du pouvoir germinatif.

Selon Shaukat [223], l'inoculation par des PGPR (dont les *rhizobia*) augmente le pourcentage de germination de graines de blé d'environ 58,6 %. Ceci est en concordance avec nos résultats où on note une augmentation significative de l'ensemble des paramètres étudiés (TG, TCM, MDG, TMG) sur les essais inoculés par *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*.

L'inhibition de la germination est extrêmement prononcée chez les essais non inoculé. Ceci est dû, comme expliqué plus haut, à l'effet toxique des ETMs. *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* induit une diminution significative de cette inhibition.

Il est important de préciser que les *Bradyrhizobium* des sols algériens, à l'instar de ceux d'autres régions du monde, sont plus compétents vis-à-vis d'*Acacia saligna* que les autres composantes de la microflore rhizobienne [224].

En effet, les *Bradyrhizobium* semblent prédominants ou plus compétitifs au niveau des pépinières d'*Acacia* du nord algérien, ils nodulent mieux les plants d'*Acacia saligna* et leur confèrent un pouvoir fixateur d'azote plus élevé [224].

*Bradyrhizobium sp. (Lotus)* joue un rôle dans le comportement du cuivre et du cadmium en combinaison. En effet, nos résultats démontrent une relation d'additivité entre les deux ETMs en présence de la bactérie.

L'accumulation des osmoprotecteurs comme la proline pour lutter contre le stress abiotique est un phénomène bien connu chez de nombreuses bactéries [225]. Ces résultats sont en concordance avec ceux rapportés par de nombreux auteurs où la Proline favorise une augmentation significative du rendement et des paramètres morphologiques de la croissance et la germination du blé et du petit pois [162]



Ainsi, l'accumulation de la proline devrait éviter les effets néfastes de faible potentiel osmotique des cellules sans interférer avec la synthèse des protéines [226];[227]

Parmi les acides aminés, la proline ne constitue que moins de 5% de la totalité des acides aminés libres [228]; [229] ; [230], est probablement l'un des métabolites de stress le plus répandu. La proline est considérée comme faisant partie d'un syndrome adaptatif général aux conditions environnementales défavorables.

Différentes fonctions sont attribuées à l'accumulation de ce soluté compatible : osmo-régulation, chélation et détoxification des ETM, protection des enzymes, régulation de l'acidité cytosolique, stabilisation de la machinerie de la synthèse protéique et piégeage des espèces réactives de l'oxygène ROS (anion superoxyde et radicaux hydroxyles) [231].

Biteur[232] rapporte que la teneur en proline augmente dans les cotylédons du radis (*Raphanus sativus*), en présence du plomb à différentes concentrations (0 - 1000 mg/l) par rapport aux témoins, ainsi il explique que le plomb provoque une forte synthèse de ce métabolite

Nos résultats montrent la même tendance que les observation établis avec le plomb dans le radis [233]. Où d'autre ETM comme le cadmium dans le radis et l'arachide [234] ; [235], le cuivre dans le riz et les carottes [236] ; [237], et le mercure dans *Pfaffia glomerata* [238], ou le stress salin dans la tomate [239] et le blé [172]; cet effet étant fonction de la concentration et de la durée du stress.

Ceci est de même pour les acides aminés solubles où nos résultats rejoignent ceux de Mihoub [162]. On note ainsi une augmentation très importante de la teneur en acides aminés dans les cotylédons après exposition aux ETM.

La stimulation de l'activité protéasique étant l'événement amorce de la libération des acides aminés, il serait probable que les effets de Cd et Cu soient la conséquence d'une action inhibitrice, directe et/ou indirecte sur la protéolyse. Ayaz et Kadioglu[240]ont montré aussi que Cd et Cu peuvent perturber le métabolisme des protéines au cours de la germination des graines de lentille.

Comme rapporté ci-dessus, l'exposition aux métaux lourds se traduit souvent par une synthèse de métabolites divers qui s'accumulent dans la plante, parmi lesquels figurent les sucres solubles [241]. Cette accumulation de sucres solubles sous l'effet des ETM résulte d'une altération des activités enzymatiques notamment l'acide invertase, le saccharose synthétase, l'amidon phosphorylase et l'activation de différentes enzymes impliquées dans l'élimination des ROS.

Nos résultats montrent que l'exposition aux les ETM à différentes concentrations et sans inoculation bactérienne, produit une augmentation de la teneur en sucres solubles, dans les graines du lotier par rapport aux témoins, ce qui indique que les ETMs induisent une importante synthèse de ce métabolite.

Ceci s'accorde avec de nombreux travaux qui rapportent une augmentation de la teneur en sucres solubles sous l'effet du plomb dans *Chlorella vulgaris* [242], et des ETMs comme l'aluminium [243], l'arsénite [244] ;[245], le cadmium dans le riz [246] ; cet effet étant fonction de la concentration et de la durée du traitement avec le cuivre, le cadmium ou les divers ETMs.

L'activité de l' $\alpha$ -amylase, quant à elle, est nettement ralentie par Cd et/ou Cu. Cependant, l'imbibition avec la concentration C2 du mélange cuivre/cadmium stimule l'activité  $\alpha$ -amylasique. Nos résultats sont en concordance avec ceux de Mihoub [162]. L'auteur relève une diminution importante de l'activité amylolytique en présence du cuivre et du cadmium et suggère que le Cd et le Cu n'affectent pas de la même manière les activités hydrolytiques des réserves nutritionnelles du petit pois.

Nos résultats comparés à ceux de Mihoub [162] suggèrent que l'effet des ions cadmium et cuivre sur l'inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -amylase se fait, au moins en partie, directement sur les protéines enzymatiques déjà synthétisées. Ainsi les travaux de Lamhamdi [213] sur l'effet du plomb sur la germination du blé appuient cette suggestion.

Les ETM réduisent la vitesse du développement cellulaire et la synthèse des protéines [247]. Chez la moutarde et le haricot cultivés en milieu salin, les auteurs rapportent une dépression significative de la teneur en ADN [248] ce qui est en concordance avec nos résultats obtenus quant à la diminution du taux d'ADN des graines de lotier sous l'effet du stress métallique.

La teneur en ADN est indicatrice de tolérance aux stress abiotiques [249]. En effet nos résultats indiquent une diminution de la teneur en ADN dans les cotylédons, ce qui se traduit par une sensibilité du lotier au ETM testés.

Les travaux de Bouzid [249] indiquent qu'en présence des ions de sel, le haricot (variété *Djadida*) montre une diminution de la teneur en ADN comparé avec la variété *Tema* sous les mêmes conditions. Ce qui confère à cette dernière, selon le même auteur, un caractère de tolérance.

L'inoculation de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) entraîne une diminution significative des teneurs en acides aminés totaux, proline et sucres solubles totaux en présence des ions de cuivre et/ou de cadmium. Dans le même contexte, les travaux de Silini[172] indique une augmentation de ces osmoprotecteurs dans les graines du blé après inoculation avec *Azotobacter* sous stress salin. Le même auteur suggère que cette bactérie stimule la production de proline, sucres solubles et acides aminés afin que la plante puisse surmonter ce stress abiotique.

Nos résultats, par contre, révèlent **une diminution** des teneurs en ces solutés compatibles avec une augmentation significative du taux et de la vitesse de germination. Dans la même optique, on note une augmentation significative de la teneur en ADN et en  $\alpha$ -amylase ce qui confère au lotier un caractère de tolérance envers le cuivre et le cadmium. Ceci suggère que *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) agit directement sur les ETM en réduisant leur toxicité. L'inoculation bactérienne joue un rôle dans la corrélation entre les différents paramètres étudiés où elle augmente significativement l'intensité des relations entre ces derniers.

Dell'Amico [250] rapporte que malgré la présence de cadmium, la croissance du colza (*Brassicanapus*) est améliorée suite à l'inoculation des souches de *Pseudomonas* (*tolasii* ou *fluorescens*) résistantes au cadmium. Le même auteur ajoute que la production de sidérophores, de l'AIA et l'expression de l'ACC-désaminase par ces dernières permet de diminuer la toxicité de ce métal.

Ainsi, divers rhizobactéries, ont une capacité à promouvoir la croissance de leur plante hôte par des effets sur : la nutrition, l'architecture racinaire ou la santé de leur partenaire végétal [251]. Ils peuvent aussi déclencher l'expression des mécanismes

de la résistance systémique induite (ISR) vis-à-vis de différents facteurs de stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité et les ETM [252].

Il existe différents types d'interactions entre bactéries et ETM. Sous le terme de biotransformation, on retrouvera des mécanismes de modification de la forme chimique du métal (ou spéciation du métal), soit par oxydation ou réduction, soit par substitution des ligands de l'ETM (agent complexant), soit, comme dans le cas du mercure, par changement de phase (volatilisation)[253].

La chélation est un phénomène de fixation à la surface des bactéries indépendant de l'activité biologique. Pour certaines bactéries à Gram négative, la chélation des ETM (exp : cuivre) implique les lipopolysaccharides de la paroi, comme cela a été décrit chez *Pseudomonas aeruginosa* ou *Rhizobium* [254]. Ce phénomène de biosorption, présente un intérêt particulier pour la rhizodégradation et le contournement du stress métallique chez les plantes.

Pollman [254], rapporte que les protéines de surface d'une souche de *Bacillus sphaericus* JG-A12, isolée d'un sol contaminé par l'uranium, fixent jusqu'à 20 mg d'uranium par gramme de protéine et fixent également d'autres ETMs (Cuivre, palladium, platine, or).

Le même auteur [254] rapporte qu'à la surface des cellules, la protéine s'auto-organise en un réseau pseudo cristallin qui délimite des pores de 2 à 8 nm de diamètre. Les ETMs sont fixés au niveau de ces pores. Une approche pour inclure ces protéines ou les bactéries dans des biocéramiques a été développée à l'institut de radiochimie du centre de recherche de Rossendorf, en Allemagne, et pourrait être utilisée pour traiter des eaux contaminées et des sols par un large spectre d'ETMs, et cela pour avoir un double résultat bénéfique (amélioration de la production végétale et dépollution) [253]

Dans la même optique, les travaux de Clemens [255] et Barańkiewicz [256] soulignent l'implication de certaines rhizobactéries dans la stimulation de la production des phytochélatines (PCs), qui sont des chélateurs intracellulaires, rencontrés uniquement chez les végétaux, et qui ont un rôle reconnu dans la détoxification et l'homéostasie des ETM.

Les travaux de Grill [257] sur des cultures cellulaires de *Rauvolfia serpentina*, ont montrés que la synthèse des phytochélatines est stimulée à 50  $\mu\text{M}$  de cuivre, à 100  $\mu\text{M}$  de cadmium, ou de nickel et à 1 mM de plomb ou de zinc. La présence de plomb stimule la phytochélatine synthase ainsi que les gènes « gsh1 » et « gsh2 » responsables de la synthèse du glutathion, précurseurs des phytochélatines [258]. Ces derniers semblent jouer un rôle important dans la tolérance des plantes aux ETMs et participent à sa détoxification [259].

La complexation des ETMs (cuivre, plomb, cadmium...) se fait par interaction entre les ions et le groupement thiol de la cystéine (un composé de la structure des phytochélatines) [256]. Les phytochélatines (PCs) séquestrent l'ETM soluble présent dans le cytoplasme avant de le transporter dans les vacuoles [260]; [261].

En outre, un groupe de protéines de parenté éloignée aux phytochélatines (PCs) et sans homologie significative avec une autre famille de protéines est apparemment présent dans de nombreuses bactéries dont *Bradyrhizobium japonicum*. Ces protéines, qui ont environ 23-35 kDa de taille, montrent une similitude au domaine PCS Pfam 05023 et sont dans certains cas annotées comme « PC-synthase-like » [262].

## CONCLUSION

Ce projet avait été initialement élaboré dans le but d'enrichir un débat et de proposer des solutions innovantes afin de reconquérir des sites agricoles dégradés par la présence de différentes contraintes ayant induit un arrêt définitivement de leurs activités. Pour ce faire, il était nécessaire de démarrer par une base permettant d'appréhender les paramètres physiologiques et biochimiques qui caractérisent l'adaptation et la résistance, induite par des rhizobactéries, de certains végétaux aux milieux contaminés (stress biotiques et abiotiques).

Compte tenu des compétences scientifiques et de l'expertise technique mises à notre disposition, il a semblé opportun d'orienter cette étude vers l'exploration et la caractérisation du rôle d'une rhizobactérie dans les processus d'acclimatation (tolérance et/ou résistance) de la germination d'une plante fourragère aux polluants métalliques (cuivre et/ou cadmium). Et dans le même sillage l'implication de cette rhizobactérie dans le processus de bio contrôle de certains agents phytopathogènes

Le modèle biologique choisi pour cette étude fut les graines de lotier (*Lotus ornhopodioides*, L.) et une des rhizobactéries la nodulant, *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*). Le choix de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) a été édicté par nos travaux sur sa haute résistance au cuivre et au cadmium qui se sont traduits par des CMI élevées.

Ce modèle a présenté comme principal avantage le fait de bien s'adapter (conditions contrôlées, interaction compatible entre les matériels biologiques) à une telle étude physio-biochimique, la germination.

La réactivité du matériel végétal vis-à-vis des ETMs (cuivre et/ou cadmium) a été confirmée par divers témoignages physiologiques et biochimiques comme, l'arrêt de la germination, les variations du taux de solutés compatibles (Acides aminés solubles, Proline, Sucres solubles totaux), des modifications de l'activité enzymatique ( $\alpha$ -amylase) et moléculaire (ADN), témoins du stress provoqué par les ETMs.

La comparaison des réactions de l'état physio-biochimique des graines en conditions métalliques, en fonction de l'inoculation par *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*), a montré que le lotier, à ce stade, est capable de tolérer de grandes quantités de

cuire et de cadmium, et qu'il présente beaucoup moins de sensibilité à ces ETMs comparé à celle manifestée par les essais non-inoculés.

La production accrue de solutés compatible liée à leur capacité élevée de rétention des ETMs est apparue comme une réaction de défense évidente des graines du lotier pour contrecarrer les effets néfastes du cuivre et/ou cadmium en fonction de la quantité apportée. Ceci se traduit, en revanche, par une baisse importante des différents facteurs physiologiques propres à la germination (Taux, vitesse et taux cumulé de germination...), et également une baisse de l'activité  $\alpha$ -amylase ainsi que la teneur en ADN.

La baisse de production de ces solutés compatibles après inoculation des graines du lotier par *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) et le maintien de l'activité physiologique, enzymatique et moléculaire, ayant permis, en conditions de stress, une germination meilleur de la plante suggère que cette rhizobactérie joue un rôle prépondérant dans la détoxification du milieu, par séquestration ou modification des ligands des ions métalliques (chélation, oxydation...) ou encore par stimulation de la production de phytochélatines.

Ces constatations fournissent les réponses attendues à l'hypothèse initiale, à savoir es-ce que l'inoculation de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*), a effectivement la vocation de protéger les graines du lotier contre les agressions extérieures, comme dans notre cas le stress métallique.

Cette étude n'a put être menée à terme pour la post-germination. Mais cela constitue néanmoins une piste majeure pour la poursuite imminente de ce travail. La démarche suivie pourrait ainsi être complétée par des approches microscopiques du type EDXMA (*Energy Dispersive X-ray Micro-Analysis*) permettant d'étudier qualitativement la fixation des ETMs au niveau cellulaire ou pariétal, par spectrométrie d'absorption atomique permettant d'étudier quantitativement l'accumulation des ETMs dans les tissus végétaux et leurs résidus dans le milieu ; ou encore par des techniques d'immuno-cytochimie (utilisation d'anticorps reconnaissant des domaines spécifiques des polysaccharides pariétaux) afin de confirmer nos assertions.

Toutefois il est peut-être utile de relever le fait que ce travail fut une occasion idoine pour expertiser des protocoles adaptés à notre matériel végétal, tout en évitant le sacrifice d'emblée de végétaux en place sur des sites contaminés. Une telle démarche peut être mise en place rapidement pour appréhender l'effet d'autres types de stress « autres que ETMs », (salin, hydrique, biotique...) ou encore utilisée sur des matériels plus complexes (plantes entières) en optimisant éventuellement, le cas échéant, certains points du protocole.

Nous espérons qu'au terme de ce modeste travail, les résultats auxquels nous avons aboutis puissent nous ouvrir des perspectives afin de mieux explorer les mécanismes très complexes de tolérance et/ou résistance de l'association plantes-microorganismes capable de se développer sur des sols contaminés par les ETMs, afin de s'intégrer dans la conception et le développement de nouveaux moyens de préservation biologique de notre environnement.



## APPENDICE A

### PRÉPARATION DES MILIEUX ET RÉACTIFS

#### 1- Préparation du milieu Tryptone Yeast-extract Broth (TYB) (g/l)

Tryptone.....	05
Extrait de levure.....	03
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O .....	0,87
Eau distillée.....	1000 ml

#### Préparation

- 1- Dissoudre le Tryptone et l'extrait de levure dans 990 ml
- 2- Ajuster le pH à 6,8 - 7,2.
- 3- Autoclaver 20 minutes à 120°C, Laisser refroidir
- 4- Ajouter aseptiquement le CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O dissous dans 10ml d'eau distillée stérilisé par filtration.

#### 2- Composition du Milieu de Winogradsky exempte d'azote (g/l)

##### Solution stock (g /l)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	50,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	25,0g
NaCl.....	25,0 g
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O.....	1,0g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	1,0g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	1,0 g
Eau distillée .....	1000ml
pH.....	7,2 ajusté avec du NaOH

### **Préparation du Milieu Winogradsky exempt de d'azote**

Solution stock .....	5ml
D-Glucose.....	0,5g
CaCO <sub>3</sub> .....	0,1g
Eau distillée qsp.....	1000ml
pH.....	6,2 ajusté avec du H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### **3- Préparation du réactif à la diphénylamine**

Dissoudre 500mg de Diphénylamine dans 49 ml d'acide acétique et 1 ml d'HCl concentré.

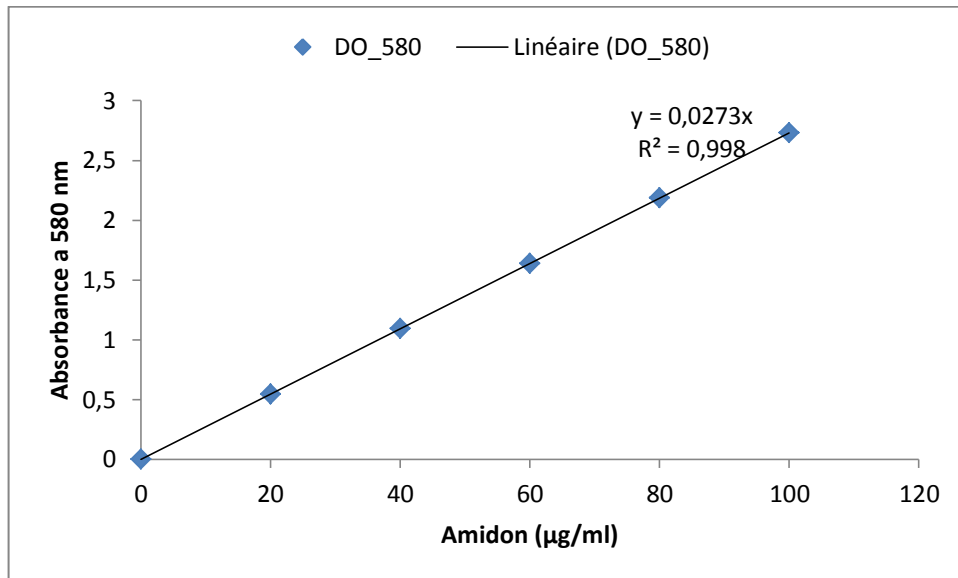
### **4- Préparation du milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (g/l)**

Agar .....	20
Dextrose (Saccarose ) .....	20
Pomme de terre .....	200g
Eau distillée .....	1000 ml
pH.....	7

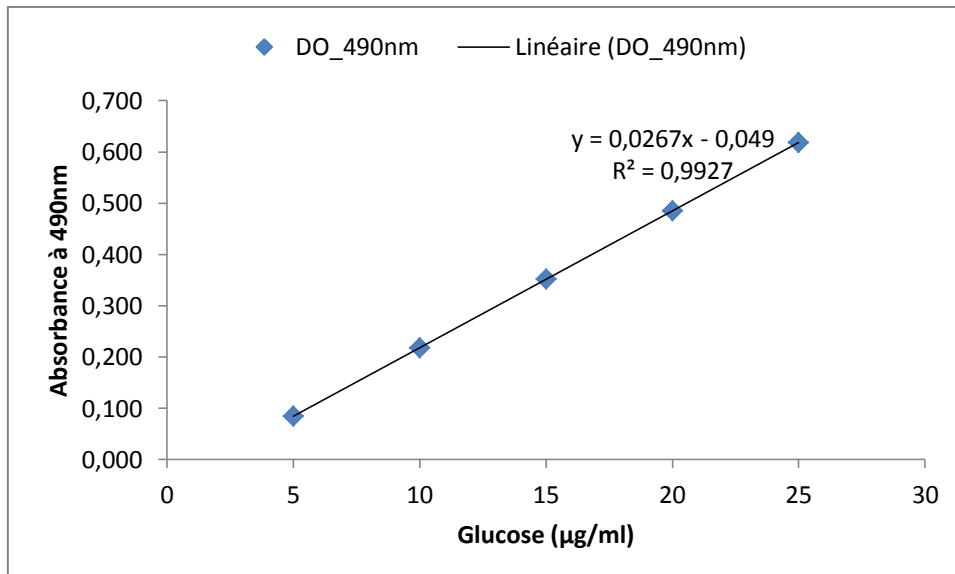
## APPENDICE B

### COURBES ÉTALONS

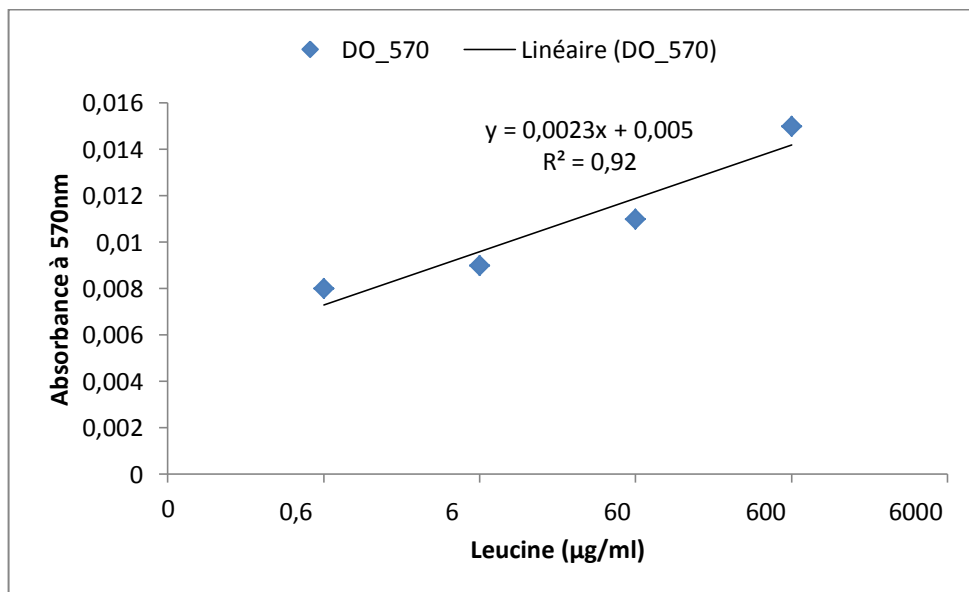
#### 1- Courbe étalon de l'amidon soluble



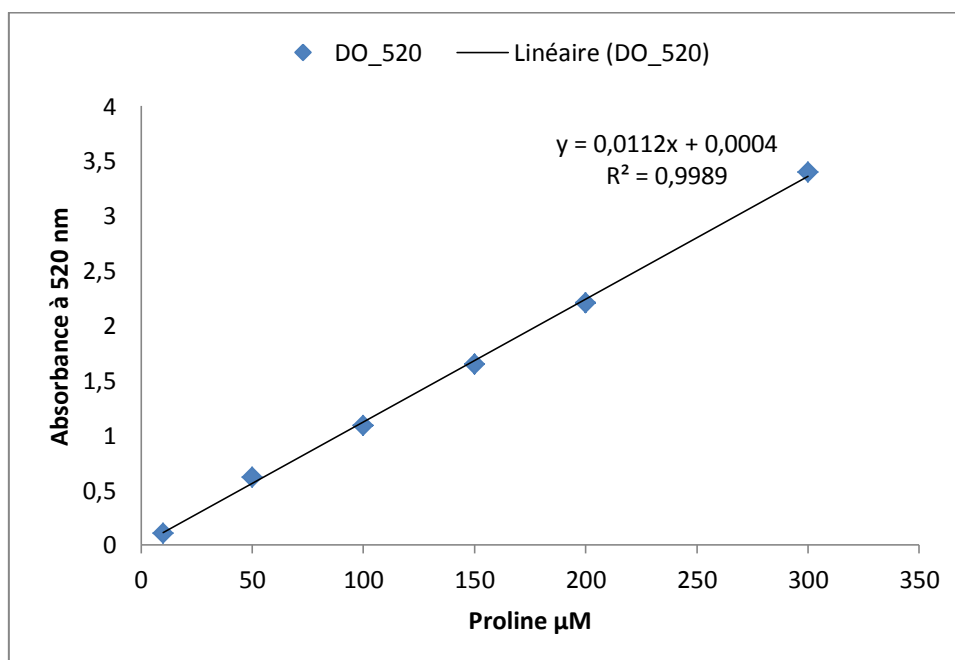
#### 2- Courbe étalon du D-glucose



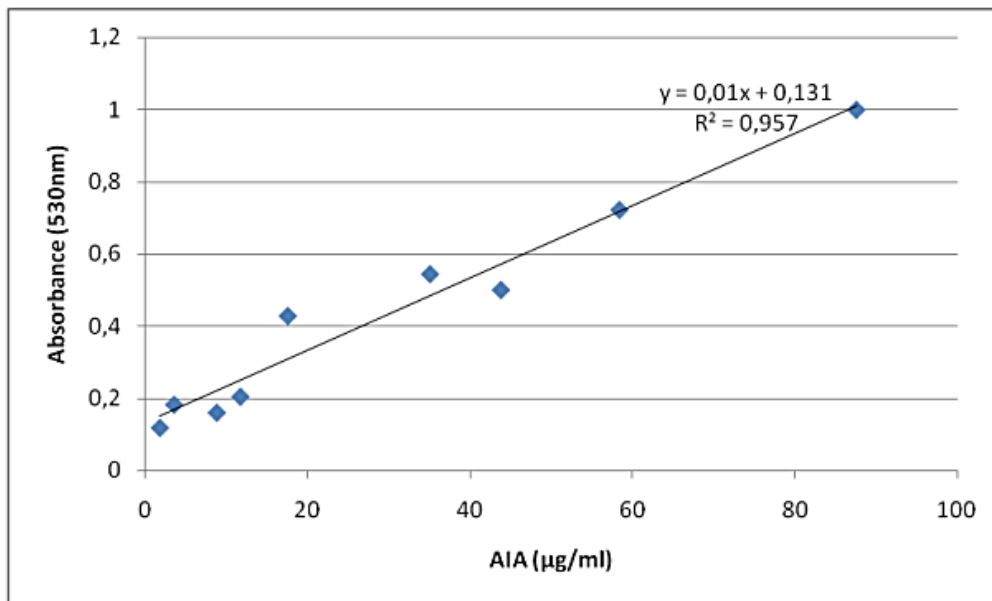
### 3- Courbe étalon de la L-leucine



### 4- Courbe étalon de la L- Proline



## 5- Courbe étalon de l'Acide Indole Acétique (AIA)



## APPENDICE C

### ANALYSES STATISTIQUES

#### 1- Analyse de la variance (ANOVA) de l'effet du chlorure de cuivre sur la croissance de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)

##### a- ANOVA à 1 facteur

UFC/ml

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	5,0606E+19	9	5,6228E+18	72,47	0,000
Intra-groupes	6,1295E+18	79	7,7589E+16		
Total	5,6735E+19	88			

##### b- Sous-ensembles homogènes

UFC/ml

Test de Tukey

Concentration en chlorure de cuivre (µg/ml)	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
3000	9	0	
3500	9	0	
4000	9	0	
4500	9	0	
5000	9	0	
6000	9	0	
2000	9	6,61E+07	
1500	9	8,05E+07	
1000	9	3,92E+08	
0	8		2,67E+09
Signification		0,104	1

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 8,889.

b. Les effectifs des groupes ne sont pas égaux. La moyenne harmonique des effectifs des groupes est utilisée. Les niveaux des erreurs de type I ne sont pas garantis.

## 2- Analyse de la variance (ANOVA) de l'effet du chlorure de cadmium sur la croissance de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)

### a- ANOVA à 1 facteur

UFC/ml

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2,5428E+19	10	2,5428E+18	478,009	0
Intra-groupes	4,5217E+17	85	5,3197E+15		
Total	2,5881E+19	95			

### b- Sous-ensembles homogènes

UFC/ml

Test de Tukey

Concentration en chlorure de cadmium ( $\mu\text{g/l}$ )	N	Sous-ensemble pour $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
3500	9,00	7,20E+08				
1500	9,00	8,22E+08	8,22E+08			
4000	9,00		8,86E+08			
5000	9,00		8,93E+08			
6000	9,00		9,08E+08			
1000	6,00			1,03E+09		
3000	9,00			1,03E+09		
4500	9,00			1,09E+09	1,09E+09	
2000	9,00				1,17E+09	
1800	9,00				1,18E+09	
0	9,00					2,67E+09
Signification		0,13	0,35	0,80	0,25	1,00

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 8,609.

b. Les effectifs des groupes ne sont pas égaux. La moyenne harmonique des effectifs des groupes est utilisée. Les niveaux des erreurs de type I ne sont pas garantis.

### 3- Analyse multivarié de la variance (MANOVA) de l'effet de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sur l'ensemble des paramètres

Comparaisons par paire								
Variable dépendante	Critères		Différence des moyennes (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance de la différence à 95%		
	ETMs	Bactérisation				Borne inférieure	Limite supérieure	
<b>Pro</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	0,72	0,05	0,00	0,62	0,82
		Présente	Absente	-0,72	0,05	0,00	-0,82	-0,62
	Cuivre_C1	Absente	Présente	0,30	0,05	0,00	0,20	0,40
		Présente	Absente	-0,30	0,05	0,00	-0,40	-0,20
	Cuivre_C2	Absente	Présente	0,70	0,05	0,00	0,60	0,80
		Présente	Absente	-0,70	0,05	0,00	-0,80	-0,60
	Cuivre_C3	Absente	Présente	0,81	0,05	0,00	0,71	0,91
		Présente	Absente	-0,81	0,05	0,00	-0,91	-0,71
	Cadmium_C0	Absente	Présente	0,72	0,05	0,00	0,62	0,82
		Présente	Absente	-0,72	0,05	0,00	-0,82	-0,62
	Cadmium_C1	Absente	Présente	0,79	0,05	0,00	0,69	0,89
		Présente	Absente	-0,79	0,05	0,00	-0,89	-0,69
	Cadmium_C2	Absente	Présente	0,68	0,05	0,00	0,58	0,78
		Présente	Absente	-0,68	0,05	0,00	-0,78	-0,58
	Cadmium_C3	Absente	Présente	0,47	0,05	0,00	0,37	0,58
		Présente	Absente	-0,47	0,05	0,00	-0,58	-0,37
	Mélange_C0	Absente	Présente	0,72	0,05	0,00	0,62	0,82
		Présente	Absente	-0,72	0,05	0,00	-0,82	-0,62
	Mélange_C1	Absente	Présente	0,46	0,05	0,00	0,36	0,56
		Présente	Absente	-0,46	0,05	0,00	-0,56	-0,36
	Mélange_C2	Absente	Présente	0,62	0,05	0,00	0,51	0,72
		Présente	Absente	-0,62	0,05	0,00	-0,72	-0,51
	Mélange_C3	Absente	Présente	0,43	0,05	0,00	0,33	0,53
		Présente	Absente	-0,43	0,05	0,00	-0,53	-0,33
<b>ADN</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	5,51	0,05	0,00	5,41	5,61
		Présente	Absente	-5,51	0,05	0,00	-5,61	-5,41
	Cuivre_C1	Absente	Présente	-127,79	0,05	0,00	-127,90	-127,69
		Présente	Absente	127,79	0,05	0,00	127,69	127,90
	Cuivre_C2	Absente	Présente	-49,78	0,05	0,00	-49,88	-49,68
		Présente	Absente	49,78	0,05	0,00	49,68	49,88
	Cuivre_C3	Absente	Présente	-22,38	0,05	0,00	-22,49	-22,28
		Présente	Absente	22,38	0,05	0,00	22,28	22,49
	Cadmium_C0	Absente	Présente	5,51	0,05	0,00	5,41	5,61
		Présente	Absente	-5,51	0,05	0,00	-5,61	-5,41
	Cadmium_C1	Absente	Présente	-149,01	0,05	0,00	-149,11	-148,91
		Présente	Absente	149,01	0,05	0,00	148,91	149,11
Cadmium_C2	Absente	Présente	-40,93	0,05	0,00	-41,03	-40,83	



		Présente	Absente	40,93	0,05	0,00	40,83	41,03	
	Cadmium_C3	Absente	Présente	-118,94	0,05	0,00	-119,04	-118,84	
		Présente	Absente	118,94	0,05	0,00	118,84	119,04	
	Mélange_C0	Absente	Présente	5,51	0,05	0,00	5,41	5,61	
		Présente	Absente	-5,51	0,05	0,00	-5,61	-5,41	
	Mélange_C1	Absente	Présente	-96,39	0,05	0,00	-96,49	-96,29	
		Présente	Absente	96,39	0,05	0,00	96,29	96,49	
	Mélange_C2	Absente	Présente	16,04	0,05	0,00	15,93	16,14	
		Présente	Absente	-16,04	0,05	0,00	-16,14	-15,93	
	Mélange_C3	Absente	Présente	-120,78	0,05	0,00	-120,88	-120,68	
		Présente	Absente	120,78	0,05	0,00	120,68	120,88	
<b>SST</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	-0,34	0,05	0,00	-0,44	-0,23	
		Présente	Absente	0,34	0,05	0,00	0,23	0,44	
	Cuivre_C1	Absente	Présente	1,50	0,05	0,00	1,40	1,60	
		Présente	Absente	-1,50	0,05	0,00	-1,60	-1,40	
	Cuivre_C2	Absente	Présente	4,57	0,05	0,00	4,47	4,67	
		Présente	Absente	-4,57	0,05	0,00	-4,67	-4,47	
	Cuivre_C3	Absente	Présente	2,81	0,05	0,00	2,71	2,91	
		Présente	Absente	-2,81	0,05	0,00	-2,91	-2,71	
	Cadmium_C0	Absente	Présente	-0,34	0,05	0,00	-0,44	-0,23	
		Présente	Absente	0,34	0,05	0,00	0,23	0,44	
	Cadmium_C1	Absente	Présente	1,72	0,05	0,00	1,62	1,83	
		Présente	Absente	-1,72	0,05	0,00	-1,83	-1,62	
	Cadmium_C2	Absente	Présente	0,00	0,05	1,00	-0,10	0,10	
		Présente	Absente	0,00	0,05	1,00	-0,10	0,10	
	Cadmium_C3	Absente	Présente	0,07	0,05	0,15	-0,03	0,18	
		Présente	Absente	-0,07	0,05	0,15	-0,18	0,03	
	Mélange_C0	Absente	Présente	-0,34	0,05	0,00	-0,44	-0,23	
		Présente	Absente	0,34	0,05	0,00	0,23	0,44	
	Mélange_C1	Absente	Présente	1,39	0,05	0,00	1,28	1,49	
		Présente	Absente	-1,39	0,05	0,00	-1,49	-1,28	
	Mélange_C2	Absente	Présente	1,01	0,05	0,00	0,91	1,11	
		Présente	Absente	-1,01	0,05	0,00	-1,11	-0,91	
	Mélange_C3	Absente	Présente	2,51	0,05	0,00	2,41	2,61	
		Présente	Absente	-2,51	0,05	0,00	-2,61	-2,41	
	<b>A.A</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	0,06	0,00	0,00	0,06	0,06
			Présente	Absente	-0,06	0,00	0,00	-0,06	-0,06
		Cuivre_C1	Absente	Présente	0,08	0,00	0,00	0,08	0,08
			Présente	Absente	-0,08	0,00	0,00	-0,08	-0,08
Cuivre_C2		Absente	Présente	0,16	0,00	0,00	0,16	0,16	
		Présente	Absente	-0,16	0,00	0,00	-0,16	-0,16	
Cuivre_C3		Absente	Présente	0,12	0,00	0,00	0,12	0,12	
		Présente	Absente	-0,12	0,00	0,00	-0,12	-0,12	
Cadmium_C0		Absente	Présente	0,06	0,00	0,00	0,06	0,06	
		Présente	Absente	-0,06	0,00	0,00	-0,06	-0,06	
Cadmium_C1		Absente	Présente	0,18	0,00	0,00	0,17	0,18	

		Présente	Absente	-0,18	0,00	0,00	-0,18	-0,17	
	Cadmium_C2	Absente	Présente	-0,01	0,00	0,00	-0,01	-0,01	
		Présente	Absente	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	
	Cadmium_C3	Absente	Présente	0,04	0,00	0,00	0,04	0,05	
		Présente	Absente	-0,04	0,00	0,00	-0,05	-0,04	
	Mélange_C0	Absente	Présente	0,06	0,00	0,00	0,06	0,06	
		Présente	Absente	-0,06	0,00	0,00	-0,06	-0,06	
	Mélange_C1	Absente	Présente	0,20	0,00	0,00	0,20	0,20	
		Présente	Absente	-0,20	0,00	0,00	-0,20	-0,20	
	Mélange_C2	Absente	Présente	0,14	0,00	0,00	0,13	0,14	
		Présente	Absente	-0,14	0,00	0,00	-0,14	-0,13	
	Mélange_C3	Absente	Présente	0,06	0,00	0,00	0,06	0,06	
		Présente	Absente	-0,06	0,00	0,00	-0,06	-0,06	
<b>Amy</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Cuivre_C1	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Cuivre_C2	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Cuivre_C3	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Cadmium_C0	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Cadmium_C1	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Cadmium_C2	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Cadmium_C3	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Mélange_C0	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Mélange_C1	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Mélange_C2	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Mélange_C3	Absente	Présente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	<b>T.G</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	0,00	0,02	1,00	-0,03	0,03
			Présente	Absente	0,00	0,02	1,00	-0,03	0,03
		Cuivre_C1	Absente	Présente	-60,00	0,02	0,00	-60,03	-59,97
			Présente	Absente	60,00	0,02	0,00	59,97	60,03
Cuivre_C2		Absente	Présente	-50,00	0,02	0,00	-50,03	-49,97	
		Présente	Absente	50,00	0,02	0,00	49,97	50,03	
Cuivre_C3		Absente	Présente	-40,00	0,02	0,00	-40,03	-39,97	
		Présente	Absente	40,00	0,02	0,00	39,97	40,03	
Cadmium_C0		Absente	Présente	0,00	0,02	1,00	-0,03	0,03	

		Présente	Absente	0,00	0,02	1,00	-0,03	0,03
	Cadmium_C1	Absente	Présente	-20,00	0,02	0,00	-20,03	-19,97
		Présente	Absente	20,00	0,02	0,00	19,97	20,03
	Cadmium_C2	Absente	Présente	-30,00	0,02	0,00	-30,03	-29,97
		Présente	Absente	30,00	0,02	0,00	29,97	30,03
	Cadmium_C3	Absente	Présente	-30,00	0,02	0,00	-30,03	-29,97
		Présente	Absente	30,00	0,02	0,00	29,97	30,03
	Mélange_C0	Absente	Présente	0,00	0,02	1,00	-0,03	0,03
		Présente	Absente	0,00	0,02	1,00	-0,03	0,03
	Mélange_C1	Absente	Présente	-30,00	0,02	0,00	-30,03	-29,97
		Présente	Absente	30,00	0,02	0,00	29,97	30,03
	Mélange_C2	Absente	Présente	-25,00	0,02	0,00	-25,03	-24,97
		Présente	Absente	25,00	0,02	0,00	24,97	25,03
	Mélange_C3	Absente	Présente	-30,00	0,02	0,00	-30,03	-29,97
		Présente	Absente	30,00	0,02	0,00	29,97	30,03
<b>TMG</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	0,40	0,00	0,00	0,39	0,41
		Présente	Absente	-0,40	0,00	0,00	-0,41	-0,39
	Cuivre_C1	Absente	Présente	-3,50	0,00	0,00	-3,51	-3,49
		Présente	Absente	3,50	0,00	0,00	3,49	3,51
	Cuivre_C2	Absente	Présente	-3,67	0,00	0,00	-3,68	-3,66
		Présente	Absente	3,67	0,00	0,00	3,66	3,68
	Cuivre_C3	Absente	Présente	-2,50	0,00	0,00	-2,51	-2,49
		Présente	Absente	2,50	0,00	0,00	2,49	2,51
	Cadmium_C0	Absente	Présente	0,40	0,00	0,00	0,39	0,41
		Présente	Absente	-0,40	0,00	0,00	-0,41	-0,39
	Cadmium_C1	Absente	Présente	-2,33	0,00	0,00	-2,34	-2,32
		Présente	Absente	2,33	0,00	0,00	2,32	2,34
	Cadmium_C2	Absente	Présente	-4,10	0,00	0,00	-4,11	-4,09
		Présente	Absente	4,10	0,00	0,00	4,09	4,11
	Cadmium_C3	Absente	Présente	-4,75	0,00	0,00	-4,76	-4,74
		Présente	Absente	4,75	0,00	0,00	4,74	4,76
	Mélange_C0	Absente	Présente	0,40	0,00	0,00	0,39	0,41
		Présente	Absente	-0,40	0,00	0,00	-0,41	-0,39
	Mélange_C1	Absente	Présente	-0,25	0,00	0,00	-0,26	-0,24
		Présente	Absente	0,25	0,00	0,00	0,24	0,26
	Mélange_C2	Absente	Présente	3,33	0,00	0,00	3,32	3,34
		Présente	Absente	-3,33	0,00	0,00	-3,34	-3,32
	Mélange_C3	Absente	Présente	-4,33	0,00	0,00	-4,34	-4,32
		Présente	Absente	4,33	0,00	0,00	4,32	4,34
<b>TCG</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	0,33	0,00	0,00	0,32	0,34
		Présente	Absente	-0,33	0,00	0,00	-0,34	-0,32
	Cuivre_C1	Absente	Présente	-10,83	0,00	0,00	-10,84	-10,82
		Présente	Absente	10,83	0,00	0,00	10,82	10,84
	Cuivre_C2	Absente	Présente	-18,33	0,00	0,00	-18,34	-18,32
		Présente	Absente	18,33	0,00	0,00	18,32	18,34
	Cuivre_C3	Absente	Présente	-17,50	0,00	0,00	-17,51	-17,49

		Présente	Absente	17,50	0,00	0,00	17,49	17,51	
	Cadmium_C0	Absente	Présente	0,00	0,00	0,44	-0,01	0,01	
		Présente	Absente	0,00	0,00	0,44	-0,01	0,01	
	Cadmium_C1	Absente	Présente	-45,00	0,00	0,00	-45,01	-44,99	
		Présente	Absente	45,00	0,00	0,00	44,99	45,01	
	Cadmium_C2	Absente	Présente	-16,67	0,00	0,00	-16,68	-16,66	
		Présente	Absente	16,67	0,00	0,00	16,66	16,68	
	Cadmium_C3	Absente	Présente	-18,33	0,00	0,00	-18,34	-18,32	
		Présente	Absente	18,33	0,00	0,00	18,32	18,34	
	Mélange_C0	Absente	Présente	0,33	0,00	0,00	0,32	0,34	
		Présente	Absente	-0,33	0,00	0,00	-0,34	-0,32	
	Mélange_C1	Absente	Présente	-16,00	0,00	0,00	-16,01	-15,99	
		Présente	Absente	16,00	0,00	0,00	15,99	16,01	
	Mélange_C2	Absente	Présente	-15,00	0,00	0,00	-15,01	-14,99	
		Présente	Absente	15,00	0,00	0,00	14,99	15,01	
	Mélange_C3	Absente	Présente	-12,50	0,00	0,00	-12,51	-12,49	
		Présente	Absente	12,50	0,00	0,00	12,49	12,51	
<b>MDG</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	-0,33	0,00	0,00	-0,34	-0,32	
		Présente	Absente	0,33	0,00	0,00	0,32	0,34	
	Cuivre_C1	Absente	Présente	-2,86	0,00	0,00	-2,87	-2,85	
		Présente	Absente	2,86	0,00	0,00	2,85	2,87	
	Cuivre_C2	Absente	Présente	-4,29	0,00	0,00	-4,29	-4,28	
		Présente	Absente	4,29	0,00	0,00	4,28	4,29	
	Cuivre_C3	Absente	Présente	-4,29	0,00	0,00	-4,29	-4,28	
		Présente	Absente	4,29	0,00	0,00	4,28	4,29	
	Cadmium_C0	Absente	Présente	-0,33	0,00	0,00	-0,34	-0,32	
		Présente	Absente	0,33	0,00	0,00	0,32	0,34	
	Cadmium_C1	Absente	Présente	-8,57	0,00	0,00	-8,58	-8,56	
		Présente	Absente	8,57	0,00	0,00	8,56	8,58	
	Cadmium_C2	Absente	Présente	-7,14	0,00	0,00	-7,15	-7,13	
		Présente	Absente	7,14	0,00	0,00	7,13	7,15	
	Cadmium_C3	Absente	Présente	-5,71	0,00	0,00	-5,72	-5,71	
		Présente	Absente	5,71	0,00	0,00	5,71	5,72	
	Mélange_C0	Absente	Présente	-0,33	0,00	0,00	-0,34	-0,32	
		Présente	Absente	0,33	0,00	0,00	0,32	0,34	
	Mélange_C1	Absente	Présente	-4,71	0,00	0,00	-4,72	-4,71	
		Présente	Absente	4,71	0,00	0,00	4,71	4,72	
	Mélange_C2	Absente	Présente	-3,29	0,00	0,00	-3,29	-3,28	
		Présente	Absente	3,29	0,00	0,00	3,28	3,29	
	Mélange_C3	Absente	Présente	-4,29	0,00	0,00	-4,29	-4,28	
		Présente	Absente	4,29	0,00	0,00	4,28	4,29	
	<b>Inh</b>	Cuivre_C0	Absente	Présente	0,00	0,00	1,00	-0,01	0,01
			Présente	Absente	0,00	0,00	1,00	-0,01	0,01
		Cuivre_C1	Absente	Présente	20,00	0,00	0,00	19,99	20,01
			Présente	Absente	-20,00	0,00	0,00	-20,01	-19,99
Cuivre_C2		Absente	Présente	30,00	0,00	0,00	29,99	30,01	

	Présente	Absente	-30,00	0,00	0,00	-30,01	-29,99
Cuivre_C3	Absente	Présente	30,00	0,00	0,00	29,99	30,01
	Présente	Absente	-30,00	0,00	0,00	-30,01	-29,99
Cadmium_C0	Absente	Présente	0,00	0,00	1,00	-0,01	0,01
	Présente	Absente	0,00	0,00	1,00	-0,01	0,01
Cadmium_C1	Absente	Présente	60,00	0,00	0,00	59,99	60,01
	Présente	Absente	-60,00	0,00	0,00	-60,01	-59,99
Cadmium_C2	Absente	Présente	50,00	0,00	0,00	49,99	50,01
	Présente	Absente	-50,00	0,00	0,00	-50,01	-49,99
Cadmium_C3	Absente	Présente	40,00	0,00	0,00	39,99	40,01
	Présente	Absente	-40,00	0,00	0,00	-40,01	-39,99
Mélange_C0	Absente	Présente	0,00	0,00	1,00	-0,01	0,01
	Présente	Absente	0,00	0,00	1,00	-0,01	0,01
Mélange_C1	Absente	Présente	30,00	0,00	0,00	29,99	30,01
	Présente	Absente	-30,00	0,00	0,00	-30,01	-29,99
Mélange_C2	Absente	Présente	25,00	0,00	0,00	24,99	25,01
	Présente	Absente	-25,00	0,00	0,00	-25,01	-24,99
Mélange_C3	Absente	Présente	30,00	0,00	0,00	29,99	30,01
	Présente	Absente	-30,00	0,00	0,00	-30,01	-29,99

\*En gris les différences significatives au seuil 5%

#### 4- Test binomial pour le taux de germination

		Modalité	N	Proportion observée.	Test de proportion	Signification exacte (bilatérale)
Témoin	Groupe 1	Germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
Cd1	Groupe 1	Non germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
Cd2	Groupe 1	Non germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
Cd3	Groupe 1	Non germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
Cu1	Groupe 1	Non germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
Cu2	Groupe 1	Non germé	19	0,95	0,50	0,000
	Groupe 2	Germé	1	0,05		
	Total		20	1,00		
Cu3	Groupe 1	Non germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
CuCd1	Groupe 1	Non germé	18	0,90	0,50	0,000
	Groupe 2	Germé	2	0,10		
	Total		20	1,00		
CuCd2	Groupe 1	Non germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
CuCd3	Groupe 1	Non germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
Témoin.B	Groupe 1	Germé	20	1,00	0,50	0,000
	Total		20	1,00		
Cd1.B	Groupe 1	Non germé	8	0,40	0,50	0,503
	Groupe 2	Germé	12	0,60		
	Total		20	1,00		
Cd2.B	Groupe 1	Non germé	10	0,50	0,50	1,000
	Groupe 2	Germé	10	0,50		
	Total		20	1,00		
Cd3.B	Groupe 1	Germé	8	0,40	0,50	0,503
	Groupe 2	Non germé	12	0,60		
	Total		20	1,00		
Cu1.B	Groupe 1	Germé	4	0,20	0,50	0,012
	Groupe 2	Non germé	16	0,80		
	Total		20	1,00		
Cu2.B	Groupe 1	Germé	6	0,30	0,50	0,115
	Groupe 2	Non germé	14	0,70		
	Total		20	1,00		
Cu3.B	Groupe 1	Germé	6	0,30	0,50	0,115
	Groupe 2	Non germé	14	0,70		
	Total		20	1,00		
CuCd1.B	Groupe 1	Germé	8	0,40	0,50	0,503
	Groupe 2	Non germé	12	0,60		
	Total		20	1,00		
CuCd2.B	Groupe 1	Germé	6	0,30	0,50	0,115
	Groupe 2	Non germé	14	0,70		
	Total		20	1,00		
CuCd3.B	Groupe 1	Germé	6	0,30	0,50	0,115

	Groupe 2	Non germé	14	0,70		
	Total		20	1,00		

\*En gris les différences significatives au seuil 5%

## APPENDICE D

### TABLEAUX DES CALCULS

#### 1- Calcul du potentiel osmotique des différents éléments utilisés

Elément	Potentiel osmotique (Pa)
Cd_C1	6912,43
Cd_C2	13824,85
Cd_C3	20737,28
Cu_C1	69124,26
Cu_C2	138248,52
Cu_C3	207372,78
[Cu : Cd]_C1	76036,69
[Cu : Cd]_C2	152073,37
[Cu : Cd]_C3	228110,05

#### 2- Tableau de calcul du rapport d'inhibition de la germination en absence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*

	I_Cd	I_Cu	I_Cu+Cd	I.th	R.I	Interaction
<b>C1</b>	100	100	90	100	0,9	Antagonisme
<b>C2</b>	100	100	95	100	0,95	Antagonisme
<b>C3</b>	100	100	100	100	1	Additivité

#### 3- Tableau de calcul du rapport d'inhibition de la germination en présence de *Bradyrhizobium sp. (Lotus)*

	I_Cd	I_Cu	I_Cu+Cd	I.th	R.I	Interaction
<b>C1</b>	40	80	60	88	0,68181818	Antagonisme
<b>C2</b>	50	70	70	85	0,82352941	Antagonisme
<b>C3</b>	60	70	70	88	0,79545455	Antagonisme



## APPENDICE E

### LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATION

ETMs : Éléments-traces métalliques.

Cd : Cadmium

Cu : Cuivre

CMI : Concentration minimale inhibitrice

TG : Taux de germination

TCG : Taux cumulé de germination

MDG : *Mean daily germination* (Moyenne de germination journalière)

A.A : Acides aminés.

Pro : Proline.

S.S.T : sucres solubles totaux.

Amy :  $\alpha$ -amylase.

M.S. : Matière sèche

M.F. : Matière fraîche

## RÉFÉRENCES

- 1 De Forest, D.K., K.V. Brix And W.J. Adams. Assessing Metal Bioaccumulation In Aquatic Environments: The Inverse Relationship Between Bioaccumulation Factors, Trophic Transfer Factors And Exposure Concentration. *Aquat. Toxicol.*( 2007). 84: 236-246.
- 2 Croteau. M.N.. S.N. Luoma And A.R. Stewart. Trophic Transfer Of Metals Along Freshwater Food Webs: Evidence Of Cadmium Biomagnification In Nature. *Limnol. Oceanogr.*,( 2005). 50: 1511-1319.
- 3 Mills. A.L. And R.R. Colwell, Microbiological Effects Of Metal Ions In Chesapeake Bay And Sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*. 18: 99-103.
- 4 Giller. K.E., E. Witter And S.P. Mcgrath, 1998. Toxicity Of Heavy Metals To Microorganisms And Microbial Processes In Agricultural Soils: A Review. *Soil Biol. Biochem.*, (1977) 30: 1389-1414.
- 5 Morozzi, G., G. Cienci And G. Caldini. The Tolerance Of An Environmental Strain Of Escherichia Coli To Some Heavy Metals. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* (1982) 189: 55-62.
- 6 Nweke. Co.. Cs. Alisi. J.C Okolo And Ce. Nwanyanwu. 2007. Toxicity Of Zinc To Heterotrophic Bacteria From A Tropical River Sediment. *Applied Environ. Res.*. 5: 123-132.
- 7 Bruins. M.R.. S. Kapil And F.W. Oehme. 2000. Microbial Resistance To Metals In The Environment. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 45: 198-207.
- 8 Rathnayake V. N., M. Megharaj, N. Bolan, And R. Naidu. 2009. Tolerance Of Heavy Metals By Gram Positive Soil Bacteria. *W. Acad. Sc., Engin. Techn.* 53:1185-1189.
- 9 Kozdrój J. And J. D. Van Elsas, 2001. Structural Diversity Of Microorganisms In Chemically Perturbed Soil Assessed By Molecular And Cytochemical Approaches. *Journal Of Microbiological Methods*, 43:197-212.
- 10 Satchanska G., E. N. Pentcheva, R. Atanasova., V. Groudeva, R Trifonova, And E. Golovinsky, 2005. Microbial Diversity In Heavy-Metal Polluted Waters.

Biotechnol.&Biotechnol.Eq.,19:61-67.

- 11 Sandaa R. A. , Ø. Enger And V. Torsvik, 1999. Abundance And Diversity Of Archaea In Heavy-Metal-Contaminated Soils. Appl. Environ. Microbiol., 65:3293–3297.
- 12 Silver S.. Bacterial Resistances To Toxic Metal Ions - A Review. Gene (1996) 179:9-19.
- 13 Ashraf, M. Et M.R. Foolad (2007). Roles Of Glycine Betaine And Proline In Improving Plant Abiotic Stress Resistance. Environ. Exp. Bot., 59: 206-216.
- 14 Poljakoff-Mayber, A., G.F. Somers, E. Werker Et J.L. Gallagher (1994). Seeds Of *Kosteletzkya Virginica* (Malvaceae): Their Structure, Germination And Salt Tolerance. Am. J. Bot., 81: 54-59.
- 15 Kokelis-Burelle, N., J.W. Kloepper Et M.S. Reddy (2006). Plant Growth Promoting Rhizobacteria As Transplant Amendments And Their Effects On Indigenous Rhizosphere Microorganisms. Appl. Soil Ecol., 31: 91-100.
- 16 Bolarin, M.C, A. Santa-Cruz, E. Cayuela Et F. Perez-Alfocea (1995). Short-Term Solute Changes In Leaves And Root Of Cultivated And Wild Tomato Seedlings Under Salinity. J. Plant, Physiol. , 147: 463-468.
- 17 Turan, M.A., K. Vahap Et T. Suleyman (2007). Salinity-Induced Stomatal Resistance, Proline, Chlorophyll And Ion Concentrations Of Bean. Int. J. Agric. Res., 2: 483-488.
- 18 Normander, B., N. B. Hendriksen Et O. Nybroe (1999). Green Fluorescent Protein-Marked *Pseudomonas Fluorescens*: Localization, Viability, And Activity In The Natural Barley Rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol., 65:4646-4651.
- 19 Richardson A. E. (2001). Prospects For Using Soil Microorganism To Improve The Acquisition Of Phosphorus By Plants. Aust. J. Plant Physiol. 28: 897-906.
- 20 Kloepper, J.W., C.M. Ryn Et S. Zhang (2004). Induced Systemic Resistance And Promotion Of Plant Growth By *Bacillus* Sp. Phytopathol. , 94: 1259-1266.
- 21 Rangarajan S., L.M. Saleena Et S. Nair (2002). Diversity Of *Azospirillum* Strains Isolated From Rice Plants In Coastal Agri-Ecosystems. Microb. Ecol.,

44: 271-277.

- 22 Biari, A., A. Gholami Et H.A. Rahmani (2008). Growth Promotion And Enhanced Nutrient Uptake Of Maize (*Zea Mays L.*) By Application Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria In Arid Region Of Iran. *J. Biol. Sci.*, 8: 1015-1020.
- 23 Tripathi, A.K., T. Nagarajan, S.C. Verma Et D.L. Rudulier (2002). Inhibition Of Biosynthesis And Activity Of Nitrogenase In *A. Brasilense Sp7* Under Salinity Stress. *Curr. Microbiol.* , 44: 363-367.
- 24 Bourrelier P.H., Berthelin J. (Coordinateurs), 1998. Contamination Des Sols Par Les Éléments-Traces : Les Risques Et Leur Gestion. Rapport N° 42 De L'académie Des Sciences, Tec & Doc, Lavoisier
- 25 Morel J.L., 1997. Bioavailability Of Trace Elements To Terrestrial Plants. In : Tarradellas J., Bitton G., Rossel D. (Eds.). *Soil Ecotoxicology*. Crc, Lewis Publishers, Boca Raton, États-Unis, 6, 141-175.
- 26 Barber S.A., 1995. *Soil Nutrient Bioavailability, A Mechanistic Approach*. John Wiley And Sons, New York, États-Unis.
- 27 Juste C., 1983. Problèmes Posés Par L'évaluation De La Disponibilité Pour La Plante Des Éléments-Traces Du Sol Et De Certains Amendements Organiques. *Science Du Sol*, 2, 109-122.
- 28 Paulin V., 1995. *Caractérisation D'éléments-Traces Dans Le Sol : Étude Du Transfert Dans Une Culture De Maïs En Champs*. Mémoire De Fin D'études, Enesad, Dijon.
- 29 Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (Eds.), 1999. *Heavy Metal Stress In Plants. From Molecules To Ecosystems*. Springer. 401 P.
- 30 Farago M.E., 1994. *Plants And The Chemical Elements, Biochemistry, Uptake, Tolerance And Toxicity*. Vch, Weinheim, Allemagne.
- 31 Bargagli R., 1998. *Trace Elements In Terrestrial Plants. An Ecophysiological Approach To Biomonitoring And Biorecovery*. Springer. 324 P.
- 32 Baker A.J.M., Mc Grath S.P., Reeves R.D., Smith J.A.C., 1998. *Metal*

- Hyperaccumulator Plants : A Review Of The Ecology And Physiology Of A Biological Resource For Phytoremediation Of Metal-Polluted Soils. In : Terry N., Banuelos G.S. (Eds.) ; Phytoremediation ; Ann Arbor Press ; M.I.
- 33 Reeves R.D., Baker A.J.M., 1998. Metal Accumulating Plants. In : Ensley B.D., Raskin I. (Eds.). Phytoremediation Of Toxic Metal : Using Plants To Clean The Environment ; Wiley ; New York.
- 34 Markert B., 1994. Plants As Biomonitors -- Potential Advantages And Problems. In : Adriano D.C., Chen Z.C., Yang S.S. (Eds.). Biogeochemistry Of Trace Elements ; Science And Technology Letters ; Northwood 11, New York, 601-613.
- 35 Li X.L., Marschner H., George F., 1991. Acquisition Of Phosphorus And Copper By Va-Mycorrhizal Hyphae And Root To Shoot Transport In White Clover. *Plant And Soil*, 136, 49-57.
- 36 Lamand M., 1991a. Les Oligoéléments Dans La Biosphère. In : Chappuis P. (Ed.). Les Oligoéléments En Médecine Et Biologie. Sferete, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 25-39.
- 37 Loué A., 1986. Les Oligo-Éléments En Agriculture. Scpa, Agri-Nathan International, Paris.
- 38 Soltner D., 1999. Les Bases De La Production Végétale. Tome Iii – La Plante Et Son Alimentation. 2e Édition. Collection Sciences Et Techniques Agricoles. 304 P.
- 39 Cataldo D.A., Wildung R.E., Garland T.R., 1987. Speciation Of Trace Inorganic Contaminants And Bioavailability To Animals : An Overview. *J. Environ. Qual.*, 16, 4, 289-295.
- 40 Haan De F.A.M., Visser-Reyneveld M.I., 1996. Soil Pollution And Soil Protection. International Training Centre (Phlo), Wageningen Agricultural University, Wageningen, Pays-Bas.
- 41 Anzala F. J, 2006 - Contrôle De La Vitesse De Germination Chez Le Maïs (*Zea Mays*) : Étude De La Voie De Biosynthèse Des Acides Aminés Issus De L'aspartate Et Recherche De Qtls. Thèse De Doctorat ; Université D'angers ;

148 P.

- 42 Bewley D.J. , Seed Germination And Dormancy, *Plant Cell* 9 (1997) 1055–1066
- 43 Nivot N., 2005 - Essais De Germination Et De Bouturage De Six Espèces Indigènes Sciaphytes Du Canada. Thèse De Doctorat; Université De Saint Yacinthe (Québec). 116 P.
- 44 Delgado M.J. Et Ligeró F. (1994). Effect Of Salt Stress On Growth And Nitrogen Fixation By Pea. Faba-Bean. Common Bean And Soybean Plants. *Soil Biol. Biochem.* 26: 371 - 376.
- 45 Bray E.A., Bailey-Serres J. And Weretilyk E., 2000 - Molecular Mechanisms Of Potassium And Sodium Uptake In Plants. *Plant Soil* 247: 43-54.
- 46 Gimeno-Gilles C., 2009 - Étude Cellulaire Et Moléculaire De La Germination Chez *Medicago Truncatula*. Thèse De Doctorat. Université D'angers. 174p.
- 47 Nouar S., 2007 - Réponse Physiologique De La Fève (Vicia Faba L.) Au Stress Thermique. Thèse De Magister ; Ina. El-Harrach; 86 P.
- 48 Young J.A. Et Young C.G., 1986 - Collecting, Processing And Germinating Seeds Of Wild Land Plants. Ed. Timber Press, Portland (Or); 236 P.
- 49 Srivastava L.M., 2002 - Plant Growth And Development. Hormones And Environment. Ed. Academic Press. San Diego (Ca). 772 P.
- 50 Heller Et Al 2004 manque
- 51 Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G., 2006 - Seed Dormancy And The Control Of Germination. *New Phytol.* 171: 501-523
- 52 Bewley J.D Et Black M., 1994 - Seeds: Physiology Of Development And Germination. Péplum Press. New York (Ny). 445 P.
- 53 Vallee C., Bilodeau G. Et Joliette-D-L C., 1999 Les Techniques De Culture En Multicellules. Ed. Presses Université Laval; 394 P.
- 54 Flesh V., 1991 - Etude Du Développement Végétatif Et De L'accumulation En Métabolites Terpeniques De *Ginkgo Biloba* L. En Conditions Contrôlées Et Naturelles. Thèse De Doctorat ; Université De Paris ; 262 P.

- 55 Chaussat R., 1999 - Productions Végétales : Croissance Et Développement Des Plantes. Ed. Paris ; P. 5-16.
- 56 Come D., 1970 - Les Obstacles À La Germination. Ed. Masson Et Cie. 162 P.
- 57 Thot J., 2005 - Plant Cellular And Molecular Responses To High Salinity. Plant Cell Rep. 20: 463-468.
- 58 Seo M., Nam B Ara E., Choi G. Et Yamagushi S., 2009 - Interaction Of Light And Hormone Signals In Germinating Seeds. Plant Mol Biol. 69: 463-472.
- 59 Hopkins W. G., 2003 - Physiologie Végétale. Traduction De La 2<sup>ème</sup> Édition Américaine Par Serge R. Ed. De Bocck ; P. 66-81 ; 309-362.
- 60 Malki M., Hamadache A.. 1999 - Les Légumineuses Alimentaires En Algérie : Situation Actuelle Et Perspectives. Collectif, 1999. 150 P. Ed. Itgc.
- 61 Zaghouane O., 1991 - The Situation Of Faba Bean (*Vicia Faba L.*) In Algeria. Options Méditerranéennes: Série Séminaires 10: 123-125.
- 62 Heller R., Robert E., Claude L.. 1998 - Physiologie Végétale. Vol. (1) Nutrition; Edit. Dunod. Paris. 322 P.
- 63 Lugan R.. 2008 - Phénotypage Métabolique Des Réponses Aux Stress Abiotiques Chez *Arabidopsis Thaliana*. Analyse Fonctionnelle Et Intégrative Du Métabolome Et Phénotypage Métabolique Des Réponses Aux Stress Abiotiques Chez *Arabidopsis Thaliana*. Thèse De Doctorat; Université De Rennes. 139 P.
- 64 Prnovost M., 2010 - Isolation And Characterization Of A Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> Antiporter Gene From The Halophyte *Atriplexgmelini*. Plant Molecular Biology. 46: 35-42.
- 65 Horner-Devine, M. C., M. A. Leibold, V. H. Smithe Et B. J. M. Bohannan (2003). Bacterial Diversity Patterns Along A Gradient Of Primary Productivity. Ecol. Lett., 6: 613-622.
- 66 Curtis, T.P., W. T. Sloan, Et J. W. Scannell (2002). Estimating Prokaryotic Diversity And Its Limits. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 99: 10494–10499
- 67 Leake, J.R., S.L. Mckendrick, M. Bidartondo Et D.J. Read (2004). Symbiotic Germination And Development Of The Myco-Heterotroph *Monotropa Hypopitys*

- In Nature And Its Requirement For Locally Distributed Trichoderma Spp. *New Phytologist*, 163: 405–423.
- 68 Sprent, J.I. (2001). *Nodulation In Legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew, Uk.
- 69 Smith, S.E. Et D.J. Read (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition, Academic Press, Newyork, Usa.
- 70 Kowalchuk, G.A. Et J.R. Stephen (2001). Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model For Molecular Microbial Ecology. *Ann. Rev. Microbiol.*, 55: 485-529.
- 71 Högberg, P., A. Nordgren, , N. Buchmann , A.F.S. Taylor, A. Ekblad, M.N. Hogberg, G.
- 72 Rillig, M.C. Et D.L. Mummey (2006). *Mycorrhizas And Soil Structure*. *New Phytologist*, 171: 41-53.
- 73 Van Loon, L.C. (2007). Plant Responses To Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Euro. J. Plant Pathol.*, 119: 243-254
- 74 Cardon, Z., Et D. J. Gage (2006). Resource Exchange In The Rhizosphere - Molecular Tools And The Microbial Perspective. *Ann. Rev. Ecol.*, 37: 459-488.
- 75 Garbeva, P., J.D. Van Elsas, Et J.A. Van Veen (2008). Rhizosphere Microbial Community And Its Response To Plant Species And Soil History. *Plant Soil*, 302: 19-32.
- 76 Pinton, R., Z.Varanini Et P. Nannipieri (2001). The Rhizosphere As A Site Of Biochemical Interactions Among Soil Components, Plants And Microorganisms. Pp: 1-17. In: *The Rhizosphere*. Pinton, R., Varanini, Z. Et Nannipieri, P. (Eds). Marcel Dekker, Inc., Usa.
- 77 Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini , L. Landi, G. Pietramellara, G.Renella, Et F.
- 78 Bais, H.P., T.L. Weir, L.G.Perry, S.Gilroy, Et J.M. Vivanco (2006). The Role Of Root Exudates In Rhizosphere Interactions With Plants And Other Organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 57: 233-266.
- 79 Kent, A.D. Et E.W. Triplett, (2002). Microbial Communities And Their Interactions In Soil Land Rhizosphere Ecosystems. *Ann.Rev. Microbiol.*, 56:



211-236.

- 80 Whipps , J.M. (2001). Microbial Interactions And Biocontrol In The Rhizosphere. *J. Experimen. Bot.*, 52: 487-511.
- 81 Hirsch, A.M., W.D. Bauer, D.M. Bird, J. Cullimore, B. Tyler Et J.I. Yoder (2003). Molecular Signals And Receptors: Controlling Rhizosphere Interactions Between Plants And Other Organisms. *Ecology*, 84: 858-868.
- 82 Lynch, J.M. (1990). *The Rhizosphere*. Lynch Jm, (Ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- 83 Cook, R.J., L.S. Thomashow, D.M. Weller, D. Fujimoto, M. Mazzola, , G. Bangera Et D.S. Kim (1995). Molecular Mechanisms Of Defense By Rhizobacteria Against Root Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 92: 4197-4201.
- 84 Elhassan, G.A., M.E. Abdelgani, A.G. Osman, S.S. Mohamed, Et B.S. Abdelgadir (2010). Potential Production And Application Of Biofertilizers In Sudan Pakistan. *J. Nutr.*, 9: 926-934.
- 85 Gianinazzi, S., A. Gollotte, M.N. Binet, D. Van Tuinen, D. Redecker, Et D. Wipf, (2010). Agroecology: The Key Role Of Arbuscular Mycorrhizas In Ecosystem Services. *Mycorrhiza*.
- 86 Bhattacharjee S., L.Y. Lee, H. Oltmanns, H. Cao, Veena, J. Cuperus Et S.B. Gelvin (2008). Atimpa-4, An Arabidopsis Importin A Isoform, Is Preferentially Involved In Agrobacterium mediated Plant Transformation. *Plant Cell.*, 20: 2661-2680.
- 87 Van Der Heijden, M.G.A., R.D. Bardgett, Et N.M. Van Straalen (2008). The Unseen Majority: Soil Microbes As Drivers Of Plant Diversity And Productivity In Terrestrial Ecosystems. *Ecol. Lett.*, 11: 296-310.
- 88 Bloemberg, G.V. Et B.J.J. Lugtenberg (2001). Molecular Basis Of Plant Growth Promotion And Biocontrol By Rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:343-350
- 89 Dénarié, J., F. Debellé, Et C. Rosenberg (1992). Signaling And Host Range Variation In Nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.*, 46: 497-531.

- 90 Franssen, H.J., I.Vijn, W.C. Yang, Et T. Bisseling (1992). Developmental Aspects Of The Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Mol. Biol.*, 19: 89-107.
- 91 Perret, X., C. Staehelin Et W.J. Broughton (2000). Molecular Basis Of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 180-201.
- 92 Steenhoudt, O. Et J. Vanderleyden (2000). Azospirillum, A Free-Living Nitrogen-Fixing Bacterium Closely Associated With Grasses: Genetic, Biochemical And Ecological Aspects, *Fems Microb.Rev.*,24: 487-506.
- 93 Vessey, J.K (2003). Plant Growth Promoting Rhizobacteria As Biofertilizers. *Plant Soil*, 255 : 571– 586.
- 94 Barea, J.M., M.J. Pozo, R. Azcón Et C. Azcón-Aguilar (2005). Microbial Co-Operation In The Rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 56: 1761-1778.
- 95 Remans, R., A. Croonenborghs, R.D. Gutierrez, J. Michiels Et J. Vanderleyden (2007). Effects Of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria On Nodulation Of *Phaseolus Vulgaris* Ar Dependent On Plant P Nutrition. Pp: 341-351. In : *New Perspectives And Approaches In Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*. Lemanceau, P., Bakker, P., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M. Et Cooke, B.M. (Eds). Springer, Pays-Bas.
- 96 Garbaye, J. (1994). Helper Bacteria: A New Dimension To The Mycorrhizal Symbiosis (Tansley Review,76). *New Phytologist*, 128: 197-210.
- 97 Frey-Klett, P., J.Garbaye, Et M. Tarkka (2007). The Mycorrhiza Helper Bacteria Revisited. *New Phytologist*, 176: 22-36.
- 98 Pivato, B., P. Offre, S. Marchelli, B. Barbonaglia, C. Mougel, P. Lemanceau, Et G. Berta (2009). Bacterial Effects On Arbuscular Mycorrhizal Fungi And Mycorrhiza Development As Influenced By The Bacteria, Fungi, And Host Plant. *Mycorrhiza*, 19: 81-90
- 99 Van Loon, L.C. (2007). Plant Responses To Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Euro. J. Plant Pathol.*, 119: 243-254.
- 100 Lemanceau, P., C. Alabouvette, Et Y. Couteaudier (1988). Recherches Sur La Résistance Des Sols Aux Maladies, Xiv : Modification Du Niveau De

- Réceptivité D'un Sol Résistant Et D'un Sol Sensible Aux Fusarioses Vasculaires En Réponse À Des Apports De Fer Ou De Glucose. *Agronomie*, 8: 155-162.
- 101 Lemanceau, P., D. Expert, F. Gaymard, P.A.H.M. Bakker Et J.F. Briat (2009). Role Of Iron In Plant–Microbe Interactions. *Adv. Bot. Res.*, 51: 491-549.
- 102 Mazurier, S., T. Corberand, P. Lemanceau Et J.M. Raaijmakers (2009). Phenazine Antibiotics Produced By Fluorescent Pseudomonads Contribute To Natural Soil Suppressiveness To Fusarium Wilt. *Isme J.*, 3: 977-991.
- 103 Lemanceau, P. (1992). Effets Bénéfiques De Rhizobactéries Sur Les Plantes: Exemple Des Pseudomonas Spp. Fluorescents. *Agronomie* ,12 :413-437.
- 104 Kloepper, J. W., Et M. N. Schroth (1978). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria On Radishes. Pp. 879-882. In: Proceedings Of The 4th International Conference On Plant Pathogenic Bacteria ,2. Station De Pathologie Végétale Et De Phytobactériologie, Inra, Angers, France.
- 105 Spaepen, S., J. Vanderleyden Et R. Remans (2007). Indole-3-Acetic Acid In Microbial And Microorganism-Plant Signalling. *Fems Microbiol. Rev.* , 31 (4): 425-448
- 106 Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen, M.R. Ismail, M.A. Hoque, M.Z. Islam, S.M. Shahidullah Et S. Meon (2009). Efficiency Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgpr) For The Enhancement Of Rice Growth. *Afri. J. Biotech.*, 8: 1247-1252.
- 107 Khalid, A., M. Arshad Et Z.A. Zahir (2004). Screening Plant Growth-Promoting Rhizobacteria For Improving Growth And Yield Of Wheat. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 473-480
- 108 Khan, M. S ., A. Zaidi., Et M. Javed (2009). Microbial Strategies For Crop Improvement. Pp: 1 - 371. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 109 Whipps J.M. (1990). Carbon Utilization. Pp: 59-97. *In: The Rhizosphere*. Lynch J.M. (Ed.). Wiley Interscience, Chichester, Uk.
- 110 Fallik, E., S. Sarig Et Y. Okon (1994). Morphology And Physiology Of Plant

- Roots Associated With *Azospirillum*. Pp: 77–85. In: *Azospirillum–Plant Associations*. Okon Y. (Ed.). Crc Press, Boca Raton.
- 111 Ryan, R.P., K. Germaine, A. Franks, D.J. Ryane Et D.N. Dowling (2008). Bacterial Endophytes: Recent Developments And Applications. *Fems. Microbiol. Lett.* , 278: 19.
- 112 Patten, C.L. Et B. R. Glick (2002). Role Of *Pseudomonas Putida* Indole Acetic Acid In Development Of Host Plant Root System. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 3795-3801.
- 113 Mayak, S., T. Tirosh Et B.R. Glick (2004). Plant Growth-Promoting Bacteria Confer Resistance In Tomato Plants To Salt Stress. *Plant Physiol. Biochem.* , 42: 565-572.
- 114 Wani, P.A., M.S. Khan Et A. Zaidi (2007). Synergistic Effects Of The Inoculation With Nitrogen Fixing And Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria On The Performance Of Field Grown Chickpea. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170: 283-287
- 115 Schippers, B., A.W. Bakker, R. Bakker Et R. Van Peer (1990). Beneficial And Deleterious Effects Of Hcn-Producing Pseudomonads On Rhizosphere Interactions. *Plant Soil*, 129: 75- 83.
- 116 Heydari, S., P.R. Moghadam Et S.M. Arab (2008). Hydrogen Cyanide Production Ability By Pseudomonas Fluorescence Bacteria And Their Inhibition Potential On Weed. “Competition For Resources In A Changing World: New Drive For Rural Development”, Tropentag, Hohenheim.Proceedings
- 117 Zeller, S.L., H. Brandt Et B. Schmid (2007). Host-Plant Selectivity Of Rhizobacteria In A Crop/Weed Model System. *Plos One*, 2(9): 1-7.
- 118 Charest, M.H., C.J. Beauchamp Et H. Antoun (2005). Effects Of The Humic Substances Of Deinking Paper Sludge On The Antagonism Between Two Compost Bacteria And *Pythium* *Fems Microbiol. Ecol.* , 52: 219–227.Ultimum.
- 119 Ahmed, O.H., H. Aminuddin Et M.H.A. Husni (2008). Ammonia Volatilization And Ammonium Accumulation From Urea Mixed With Zeolite And Triple Superphosphate. *Acta Agric. Scand.*, 58: 182-186.

- 120 Ryu, C.M., M.A. Farag, C.H. Hu, M.S. Reddy, H.X. Wei, P.W. Paré., Et J.W. Kloepper. (2003). Bacterial Volatiles Promote Growth In Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 100: 4927-4932.
- 121 Howell, C. R., R. C. Beier Et R. D. Stipanovic (1988). Production Of Ammonia By *Enterobacter Cloacae* And Its Possible Role In The Biological Control Of *Pythium Preemergence Darnping-Off* By The Bacterium. *Phytopathologia*, 78:1075- 1078.
- 122 Ohara T., Inoue I., Namiki F., Kunoh H. And Tsuge T. 2004. Reni Is Required For Development Of Microconidia And Macroconidia, But Not Of Chlamydo spores, In The Plant Pathogenic Fungus *Fusarium Oxysporum*. Genetics Society Of America, 166, Pp 113-124.
- 123 Rheinberg, F. 1998. Motivation And Learning Activities: How Research Could Proceed. *International Journal of Education Research*, 12, 299-306
- 124 Lecomte P, Blancard D, Darrieutort G, Limiñana JM, Louvet G, Guérin L, Tandonnet J-P, Goutouly J-P, Gaudillère J-P, (2008). Esca de la vigne - Vers une gestion raisonnée des maladies de dépérissement. *Phytoma - La Défense des Végétaux* 615 : 43-48 et 616 : 37-41
- 125 Sasseville J. L. 1980. La Problématique Des Substances Toxiques Dans L'environnement, Tome 1 : L'agression Toxique. Bureau Sur Les Substances Toxiques, Ministère De Gouvernement Du Québec, P 46. L'environnement,
- 126 Wright D. A., And P. Welbourn. 2002. *Environmental Toxicology*. Cambridge University Press. Pp. 274-280.
- 127 Hobman J. L, K. Yamamoto, T. Oshima. 2007. Transcriptomic Responses Of Bacterial Cells To Sublethal Metal Ion Stress. In: *Molecular Microbiology Of Heavy Metals*. D.H. Nies, S. Silver: Editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- 128 Bruins M. R., S. Kapil, And F. W. Oehme, 2000. Microbial Resistance To Metals In The Environment. *Ecotoxicol And Environ Safety*, 45:198-207.
- 129 Walton B.T Et Anderson T.A. 1992 .Plant- Microbe Treatment Systems For Toxic Waste. *Current Opinion In Biotechnology*, Vol. 3, Pp. 267-270.

- 130 Cunningham S.D. Et Lee C.R. 1994. Phytoremediation : Plant-Based Remediation Of Contaminated Soil And Sediments, Soil, Sc. Soc. Of Amer. Pp
- 131 Cunningham S.D., Berti W. R. And Huang J. W. 1995. Phytoremediation Of Contaminated Soils, Trends In Biotechnology, Vol. 13, Pp. 393-398.
- 132 Bert And V., Macnair M.R., Delaguerie P., Saumitou-Laprade P. Et Petit D. 2000. Zinc Tolerance And Accumulation In Metallicolous And Nonmetallicolous Arabidopsis Halleri Populations Of (Brassicaceae), New Phytol., 146, Pp. 225-233
- 133 Meerts P., Van Isacker N. 1997. Heavy Metal Tolerance And Accumulation In Metallicolous And Non-Metallicolous Populations Of Thlaspi Caerulescens From Continental Europe, Plant Ecology, 133, Pp. 221-231.
- 134 Ernst W.H.O. 1988. Decontamination Of Mine Sites By Plants : An Analysis Of The Efficiency. Proceedings Of International Conference On Environmental Contamination Cep Consultants Ltd Edinburg Uk, Pp. 305-310.
- 135 Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I. Et Raskin I. 1995. Phytoremediation : A Novel Strategy For The Removal Of Toxic Metals From The Environment Using Plants. Biotechnology, 13, Pp. 468-474.
- 136 Anderson T.A., Kruger E.L. Et Coats J.R. 1995. Rhizosphere Microbial Communities Of Herbicide -Tolerant Plants As Potential Bioremediants Of Soils Contaminated With Agrochemicals, Bioremediation Of Pollutants In Soil And Water Astm Stp, 1235 P.
- 137 Somasegaran P., Hoben H.J., 1994: Handbook For Rhizobia. Springer Verlage New York. Inc .Pp 450.
- 138 Baudoin J.P., 2001. Contribution Des Ressources Phytogénétiques À La Sélection Variétale De Légumineuses Alimentaires Tropicales. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2001 N°5, Pp : 221-230.
- 139 Abdelguerfi A., 2001. Sources Génétiques D'intérêt Pastorale Et/Ou Fourragère ; Distribution Et Variabilité Chez Les Légumineuses Spontanées (Medicago, Trifolium, Scorpiurus, Hedysarium Et Onabrachis ) En Algérie,

These De Doctorat, Ina, El-Harrach, P325

- 140 Hamadach A., 1998. Les Fourrages Verts : Un Imperatif Au Développement De La Production Laitière ; Résultats De Recherche Sur Le Trèfle D'alexandrie (Bersim). Céréaliculture. Itgc. N°39, Pp 113
- 141 Houmani M. 1999. Situation Alimentaire Du Bétail En Algérie. Recherche Agronomique , N°4, P35-41
- 142 Nacef M., Ait Lounis Y., 2009. Etude De Quelques Espèces Légumineuses Spontanées : Evaluation De L'enherbement Et Biométrie, Évaluation De La Digestibilité. Département D'agronomie. Blida. P103.
- 143 Grerifa A., 2002. Détermination De La Composition Chimique En Fonction Des Stades Phénologiques De Quelques Légumineuses Et Malvacées Fourragères Spontanées Dans La Région De Mitidja. Mémoire D'ingénieur D'état. Département D'agronomie, Blida. P 72.
- 144 Cheikh S., 2003. Détermination De La Composition Chimique En Fonction Des Stades Phénologiques De Quelques Légumineuses Fourragères Spontanées De La Région De La Mitidja. Mémoire D'ingénieur D'état. Département D'agronomie. Blida. P 69
- 145 Zitouni E. 2004. Détermination De La Composition Chimique De Quelques Légumineuses Fourragères Spontanées Durant Les Différents Stades Phénologiques (Région De La Mitidja). Mémoire D'ingénieur D'état. Département D'agronomie. Blida. Pp :60
- 146 Boutahraoui B., Djaidja H., 2006. Etude De La Composition Chimique Et Effet Du Climat Sur Quelques Espèces Fourragères Spontanées Et Cultivées Dans La Région De La Mitidja. Mémoire D'ingénieur D'état. Département D'agronomie. Blida. P108.
- 147 Akiko Ike, Rutchadaporn S.,2006. Bioremediation Of Cadmium Contaminated Soil Using Symbiosis Between Leguminous Plant And Recombinant Rhizobia With The Mtl4 And The Pcs Genes
- 148 Degaïchia H. 2010. Contribution À L'identification Des Nodosités Et Caractérisation Des Bactéries Nodulantes De Trois Espèces Spontanées

(*Lotus Edulis*, *Lotus Ornithopodioïdes* Et De *Vicia Sativa* Ssp. *Consobrina*).  
Mémoire D'ingénieur D'état En Sciences Agronomiques. Université De Blida.  
Algérie. Pp

- 149 Filali B.K. Taoufik J. Zaroual Y. Dzaizi F.Z. Talbi M Blaghen M. 2000. Waste Water Bacterial Isolates Resistant To Heavy Metals And Antibiotics. *Current Microbiology* Vol. 41 Pp. 151-156
- 150 Scott Sutton, *Determination of Inoculum for Microbiological Testing*, (2011). *Microbiology Topics*. Vol. 15. Num 3 : 49-53
- 151 Kumar, Nr., V.T. Arasu Et P. Gunasekaran (2002). Genotyping Of Antifungal Compounds Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas Fluorescens*. *Curr. Sci.*, 82: 1463- 1466.
- 152 Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley Et S.T. Williams (1994). *Bergey`S Manual Of Determinative Bacteriology*. Pp: 518-537. 9th Edn., Williams And Wilkins, Baltimore.
- 153 Loper, J.E Et M.N. Scroth (1986). Influence Of Bacterial Sources On Indole-3 Acetic Acid On Root Elongation Of Sugarbeet. *Phytopathology*, 76: 386-389.
- 154 Cappuccino, J. C. Et N. Sherman (1992). *Microbiology: A Laboratory Manuel*, Third Ed. Benjamin/Cummings Pub. Co., New York, Pp. 125-179.
- 155 Lorck, H. (1948). Production Of Hydrocyanic Acid By Bacteria. *Physiol. Plant*: 142-146.
- 156 Bradford K.J. , *Water Relations In Seed Germination*, In : J. Kigel, G. Galili (Eds.), *Seed Development And Germination*, Marcel Dekker, New York, 1995, Pp. 351–395.
- 157 Kashem M.A. , Sultana N. , Ikeda T. , Hori H. , Loboda T., Mitsui T., Alteration Of Strach-Sucrose Transition In Germinating Wheat Seed Under Sodium Chloride Salinity, *J. Plant Biol.* 43 (2000) 121–127.99+B134
- 158 G.E. Welbaum, K.J. Bradford, Y. Kyu-Ock, M.O. Oluoch, *Biophysical, Physiological And Biochemical Processes Regulating Seed Germination*, *Seed Sci. Res.* 8 (1998) 161–172



- 159 Bailly C, A. Benamar, F. Corbineau, D. Côme, Changes In Malondialdehyde Content And In Superoxide Dismutase, Catalase And Glutathione Reductase Activities In Sunflower Seed As Related To Deterioration During Accelerated Aging, *Physiol. Plant.* 97(1996) 104–110.
- 160 Ravikumar R., G. Ananthkrishnan, S. Girija, A. Gamapathi, Seed Viability And Biochemical Changes Associated With Accelerated Ageing In *Dendro Calamus Strictus* Seeds, *Biol. Plant.* 45 (2002) 153–156.
- 161 Carlson C.L. , D.C. Adriano, K.S. Sajwan, S.L. Abels, D.P. Thoma, J.T. Driver, Effects Of Selected Trace Metals On Germinating Seeds Of Six Plant Species, *Water, Air Soil Pollut.* 59 (1991) 231–240
- 162 Munzuroglu O., H. Geckil, Effects Of Metals On Seed Germination, Root Elongation, And Coleoptile And Hypocotyl Growth In *Triticum Aestivum* And *Cucumis Sativus*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43 (2002) 203–213.
- 163 Mark W. Chase And James L. Reveal. An Update Of The Angiosperm Phylogeny Group Classification For The Orders And Families Of Flowering Plants: Apg iii. 2009. *Botanical Journal Of The Linnean Society*, 2009, 161, 122–127.
- 164 Ait Ourab, 2000., Détermination Des Aptitudes Des Sols De La Station Expérimental (Section N°1) À La Culture De La Tomate Et De L'abricotier. Mémoire D'ingénieur Agronome. Département D'agronomie, Blida.
- 165 Amerouche W., 2000., Détermination Des Aptitudes Des Sols De La Station Expérimental (Section N°2) Aux Cultures Des Agrumes Et Au Pommier. Mémoire D'ingénieur Agronome. Département D'agronomie, Blida
- 166 Mallou S., 2000. Détermination Des Aptitudes Des Sols De La Station Expérimentale (Section N°3) À La Luzerne Et L'olivier. Mémoire D'ingénieur Agronome. Département D'agronomie, Blida
- 167 Agence Nationale Des Ressources Hydrauliques, Alger ,2011
- 168 Mutin G., 1977. La Mitidja, Décolonisation Et Espèces Géographique. Edition Opu. Alger

- 169 Stewart P., 1969. Quotient Pluviométrique Et Dégradation Biométrique :Quelques Réflexions. Bull. Soc. Nat. Afr. Du Nord. T 59. Pp 23-36.
- 170 Vincent, J.M., 1970. A Manual For The Practical Study Of The Root-Nodule Bacteria. Ibp Handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- 171 Beringer Je. 1974. R Factor Transfer In Rhizobium Leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 84:188-198.
- 172 Silini H. Effets Des Molecules Osmoprotectrices Sur La Survie Et L'activite De Azotobacter Et Sur La Croissance Du Ble Dur En Milieu Salin (2013). Doctorat D'état. Université De Sétif Algerie
- 173 Mihoub Asma, Abdelilah Chaoui, Ezzedine El Ferjani , Changements Biochimiques Induits Par Le Cadmium Et Le Cuivre Au Cours De La Germination Des Graines De Petit Pois (Pisum Sativum L.) C. R. Biologies 328 (2005).
- 174 Osborne J.M., Fox J.E.D. Et Mercer S. (1993). Germination Response Under Elevated Salinities Of Six Semi-Arid Blue Bush Species (Western Australia). In: Towards The Rational Use Of High Salinity Plants (Eds. H. Lieth Et A. Al Masoom). 1, 323-338. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 521 P.
- 175 Bouton, J.H., A.E. Dudeck Et R.L. Smith (1976). Germination In Freshly Harvested Seed Of Centipede Grass. Agron. J., 68: 991-992.
- 176 Kotowski F. 1926. Temperature Relations To Germination Of Vegetable Seed. Proceedings Of The American Society For Horticultural Science 23:176-184.
- 177 El Hadji Djibo H. Et J. Effet De L'irradiation Gamma Des Semences De Tomate (Lycopersicon Esculentum Mill) Sur La Résistance Au NaCl Et L'accumulation De La Proline Dans Les Feuille/ Int. J. Biol. Chem. Sci. 8(4): 1517-1523, 2014
- 178 Benani K. Analyse De La Diversité Agro-Physiologique D'écotypes Locaux De Certaines Légumineuses Fourragères Annuelles Et Recherche De Potentialités Liées Au Stress Salin (2013) These De Doctorat; Maroc
- 179 Gisi, U., "Synergistic Interaction Of Fungicides In Mixtures" Phytopathology.86, (1996), 1273-1279.

- 180 Zhizhuang Xiao, Reginald Storms, Adrian Tsang. A Quantitative Starch–Iodine Method For Measuring Alpha-Amylase And Glucoamylase Activities, *Anal. Biochem* 351. (2006) 146-148
- 181 Babu Praveen, Joshua D. Bryan, Heather R. Panek , Solomon L. Jordan, Brynn M. Forbrich, Shannon C. Kelley, Richard T. Colvin And Lucy C. Robinson. Plasma Membrane Localization Of The Yck2p Yeast Casein Kinase 1 Isoform Requires The C-Terminal Extension And Secretory Pathway Function (2002)..*J Cell Sci* 115, 4957-4968.
- 182 Dubois M-K-A, Gilles Y-K Et Hamilton P-A., 1956. Colometric Method For Determination Of Sugars And Related Substance. *Anal And Chem. Jour*: 28. P: 350-356.
- 183 Naidu, B.P., D.F. Cameron Et S.V. Konduri (1998). Improving Drought Tolerance Of Cotton By Glycine Betaine Application And Selection. *Proceedings Of The Australian Agronomy Conference, July 20-23, 1998, The Australian Society Of Agronomy, Australia.*
- 184 Singh, T.N., D. Aspinall, L.G. Paleg Et S.F. Bogges (1973). Stress Metabolism. li. Changes In Proline Concentration In Excised Plant Tissues. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26: 57-63.
- 185 Burton K . A Study Of The Conditions And Mechanism Of The Diphenylamine Reaction For The Colorimetric Estimation Of Deoxyribonucleicacid (1956). *Biochem. J* 62, 315- 322.
- 186 Gharzouli, R., A, Benguedouar., 2006. Influence D'agent Mutagènes, Les Rayons Ultra-Violet, Sur La Nodulation Et Les Caractères Phénotypiques De Quelques Espèces De Rhizobium Sp.
- 187 Chabbi Rabah. 2009, "Caractérisation Des Bactéries Isolées À Partir Du Genre Trigonella L. (Légumineuses) Poussant Dans Différents Écosystèmes De L'est Algériens" Mémoire De Magister (École Doctorale) Constantine, Pp 81-85
- 188 Bliefert, C., Perraud, R., 2001. "Chimie De L'environnement : Air, Eau, Sols, Déchets". De Boeck Université, Paris, 477p.

- 189 Clijsters, H., Cuypers, A., Vangronsveld, J., 1999 . "Physiological Responses To Heavy Metals In Higher Plants; Defence Against Oxidative Stress". Verlag Der Zeitschrift Für Naturforschung. 54, Pp : 730-734.
- 190 Kohen, R., Nyska, A., 2002. "Oxidation Of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, And Methods For Their Quantification". Toxicologi Pathology, 30, Pp : 620-650.
- 191 Mathieu Schue, Agnes Fekete, Philippe Ortet, Catherine Brutesco, Thierry Heulin, Philippe Schmitt-Kopplin, Wafa Achouak, Catherine Santaella. 2011. "Modulation Of Metabolism And Switching To Biofilm Prevail Over Exopolysaccharide Production In The Response Of Rhizobium Alamii To Cadmium " Plos One . Volume 6. Issue 11. E26771 . 10 P
- 192 Ron E. Z., Minz D., Finkelstein N. P. & E. Rosenberg. 1992. Interactions Of Bacteria With Cadmium. *Biodégradation*. 3, 487-491
- 193 Minz D., Rozenberg E. & E .Z. Ron. 1996. Cadmium Binding Bacteria: Screening And Characterization Of New Isolates Mutants. *Fems Microbiol.Lett.* 135, 191-194.
- 194 Rouch D. A., Lee, B. T. D., And Morby, A. P. 1995. Understanding Cellular Responses To Toxic Agents: A Model For Mechanism Choice In Bacterial Metal Resistance. *J. Ind.Microbiol.* 14:32-141.
- 195 Gremion F., 2003: Analysis Of Microbial Community Structures And Functions In Heavy Metal-Contaminated Soils Using Molecular Methods. These De Doctorat En Sciences De L'université De Neuchâtel, Lausanne, Epfl
- 196 Giller K. E., E. Witter And S. P. Mcgrath, 1998. Toxicity Of Heavy Metals To Microorganisms And Microbial Processes In Agricultural Soils: A Review. *Soil Biol. Biochem.*, 30:1389–1414.
- 197 Wei G., Fan L., Zhu W., Fu Y., Yu J., Tang M., 2009 : Isolation And Characterization Of The Heavy Metal Resistant Bacteria Ccnwrs33-2 Isolated From Root Nodule Of Lespedeza Cuneata In Gold Mine Tailings In China. *Journal Of Hazardous Materials* 162 Pp 50– 56.

- 198 Monchy S., 2007 : Organisation Et Expression Des Gènes De Résistance Aux Métaux Lourds Chez *Cupriavidus Metallidurans* Ch34.Thèse De Doctorat De L'université Libre De Bruxelles
- 199 Glick, B.R. (1995). The Enhancement Of Plant Growth By Free-Living Bacteria. *Can. J. Microbiol.*,41: 109-117
- 200 Ahmad, F., I. Ahmad Et M.S. Khan (2005). Indole Acetic Acid Production By The Indigenous Isolates Of *Azotobacter* And Fluorescent *Pseudomonas* In The Presence And Absence Of Tryptophan.*Turk. J. Biol.*, 29: 29-34.
- 201 Dastager, S.G., C.K. Deepa Et A. Pandey (2010) .Potential Plant Growth Promoting Activity Of *Serratia Nematophila* Nii-0.928 On Black Papper (*Piper Nigrum* L.). *World J.Microbiol.Biotechnol.* , 27: 259-265.
- 202 Mirza, M.S, W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, K.A. Malik (2001). Isolation, Partial Characterization And The Effect Of Plant Growth-Promoting Bacteria (Pgp) On Micro-Propagated Sugarcane In Vitro. *Plant Soil*, 237: 47-54.
- 203 Barazani, O. Et J. Friedman (1999). Is Iaa The Major Root Growth Factor Secreted From Plantgrowth-Mediating Bacteria. *J. Chem. Ecol.*, 25: 2397-2406.
- 204 Voisard, C, C. Keel, D Haas, Et G. Defago (1989). Cyanide Production By *Pseudomonas Fluorescens* Helps Suppress Black Root Rot Of Tobacco Under Gnotobiotic Conditions. *The Embo J.*,8: 351-358.
- 205 Devi, K.K., N. Seth, S. Kothamasi Et D. Kothamasi (2007). Hydrogen Cyanide Producing Rhizobacteria Kill Subterranean Termite *Odontotermes Obesus* (Rambur) By Cyanide Poisoning Under In Vitro Conditions. *Curr. Microbiol.*, 54: 74–78.
- 206 Bashan, Y. Et L.E. De-Bashan (2005). Bacteria. Pp: 103-115. In: *Encyclopedia Of Soils In The Environment*. Hillel D.(Ed.). Elsevier, Oxford, U.K.
- 207 Ramette, A., M. Frapolli, G. Defago Et Y. Moenne-Loccoz (2003). Phylogeny Of Hcn Synthase-Encoding Hcn Bc Genes In Biocontrol Fluorescent *Pseudomonads* And Its Relationship With Host Plant Species And Hcn

- Synthesis Ability. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16: 525-535.
- 208 Laville, J., C. Blumer, C. Von Schroetter, V. Gaia, G. Delfago, C. Keel Et D. Haas (1998). Characterization Of The Hcnabc Gene Cluster Encoding Hydrogen Cyanide Synthase And Anaerobic Regulation By Anr In The Strictly Aerobic Biocontrol Agent *Pseudomonas Fluorescens* Cha0. *J. Bacteriol.*, 180 : 3187- 3196.
- 209 Castric, P. (1977). Glycine Metabolism By *Pseudomonas Aeruginosa*: Hydrogen Cyanides Biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 130: 826-831.
- 210 Curl E. A. Et B. Truelove (1986). *The Rhizosphere*, Pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.
- 211 Joshi, K.K., V.Kumar, R.C. Dubey, D.K. Maheshwari, V.K .Bajpai Et S.C. Kang (2006). Effect Of Chemical Fertilizer-Adaptive Variants, *Pseudomonas Aeruginosa* Grc2 And *Azotobacter Chroococcum* Ac1, On *Macrophomina Phaseolina* Causing Charcoal Rot Of *Brassica Juncea*. *Korean J. Environ. Agri.*, 25(3): 228-235.
- 212 Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, Et E. Ait Barka. 2005. Use Of Plant Growthpromoting Bacteria For Biocontrol Of Plant Diseases: Principles, Mechanisms Of Action, And Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959
- 213 Lamhamdi Mostafa, Ahmed Bakrim , Ahmed Aarab , René Lafont , Fouad Sayah. Lead Phytotoxicity On Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Seed Germination And Seedlings Growth . *C. R. Biologies* 334 (2011) 118–126
- 214 Biswas, J.C., L.K. Ladha Et F.B. Dazzo (2000). Rhizobia Inoculation Improves Nutrient Uptake And Growth Of Lowland Rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64: 1644-1650.
- 215 Asghar, H., Z. Zahir, M. Arshad Et A. Khaliq (2002). Relationship Between In Vitro Production Of Auxins By Rhizobacteria And Their Growth Promoting Activities In *Brassica Juncea* L. *Biol. Fertil. Soils*, 35: 231-237
- 216 Bashan, Y., G. Holguin Et Le. De-Bashan (2004). *Azospirillum*-Plant Relationships: Physiological, Molecular, Agricultural And Environmental

Advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 50: 521-577.

- 217 Nelson, L.M. (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgpr): Prospects For New Inoculants. *Online Crop Management* , 10.1094/Cm-2004-0301-05-Rv.
- 218 Bouchenak Fatima, Degaïchia Housseem ,Benrebiha Fatma-Zohra Et Chaouia Chérifa, Effets De Bactéries Stimulatrices De Croissance (Pgpr) Sur La Germination Chez *Atriplex Halimus* En Condition Saline (2014). *Les Journées Internationales De Biotechnologie Tunisie*
- 219 Barassi, C.A., G. Ayrault, C.M. Creus, R.J. Sueldo Et M.T. Sobrero (2006). Seed Inoculation With *Azospirillum Mitigates NaCl* Effects On Lettuce. *Scientia Hort.*, 109: 8-14.
- 220 Ernst W.H.O., Effects Of Heavy Metals In Plants At The Cellular And Organismic Level Ecotoxicology, In : S. Gerrit, M. Bernd (Eds.), lii. *Bioaccumulation And Biological Effects Of Chemicals*, John Wiley & Sons And Spektrum Akademischer Verlag, 1998, Pp. 587–620
- 221 Woolhouse H.W., Toxicity And Tolerance In The Responses Of Plants To Metals, In : O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (Eds.), *Encyclopaedia Of Plant Physiology*, New Series 12c, Springer-Verlag, Berlin, 1983, Pp. 245–300.
- 222 Fernandes J.C., Henriques F.S., Biochemical, Physiological And Structural Effects Of Excess Copper In Plants, *Bot. Rev.* 57 (1991) 246–273
- 223 Shaukat, K., S. Affrasayab Et S. Hasnain (2006). Growth Responses Of *Triticum Aestivum* To Plant Growth Promoting Rhizobacteria Used As A Biofertilizer. *Res. J. Microbiol.*, 1: 330-338.
- 224 Amrani Saïd. Nazhat-Ezzaman Noureddine, Bhatnagar Tej . , (2009) Caractéristiques Symbiotiques Et Génotypiques Des Rhizobia Associés À *Acacia Saligna* (Labili.) Wendl. Dans Quelques Pépinières En Algérie. *Acta Bot. Gallica*, 156 (3), 501-513.
- 225 Kempf, B., Et E. Bremer (1998). Uptake And Synthesis Of Compatible Solutes As Microbial Stressresponses To High-Osmolality Environments. *Arch.*

- Microbiol. 170: 319-330.
- 226 Raggi, V. (1994). Changes In Free Amino Acids And Osmotic Adjustment In Leaves Of Waterstressed Bean. *Physiol. Plant*, 91: 427-434.
- 227 Wyn Jones, R.G. (1981). Salt Tolerance. Pp: 271 -291. In: *Physiological Processes Limiting Plant Productivity*, Johnson, C.B (Ed.). Butterworth Press, London, Uk.
- 228 Matysik J., Alia, Bhalu B. Et Mohanty P., 2002 : Molecular Mechanisms Of Quenching Of Reactive Oxygen Species By Proline Under Stress In Plants. *Current Science* 82 : 525-532.
- 229 Sharma S.S. Et Dietz K.J., 2006 : The Significance Of Amino Acids And Amino-Derived Molecules In Plant Responses And Adaptation To Heavy Metal Stress. *J. Exp. Bot.* 57 : 711-726.
- 230 Lei Y.B., Korpelainen H., Li C.Y., 2007 : Physiological And Biochemical Responses To High Mn Concentrations In Two Contrasting *Populus Cathayana* Populations. *Chemosphere* 68 : 686- 694.
- 231 Sharmila P. Et Pardha Saradhi P., 2002 : Proline Accumulation In Heavy Metal Stressed Plants : An Adaptative Strategy. In : *Physiology And Biochemistry Of Metal Toxicity And Tolerance In Plants*. Prasad M.N.V. Et Strzalka K. (Eds), Pp. 179-199.
- 232 Biteur Nadjet, Essais D'utilisation Du Radis (*Raphanus Sativus*) Dans La Phytoremédiation (Biodépollution) Au Niveau Du Sol Contaminé Par Les Métaux Lourds (Plomb) : Etude Du Stress Oxydatif Et Quelques Paramètres Enzymatiques. 2012. These De Doctorat. Oran. Alger
- 233 Teklic T, Hancock Jt. Engter M, Paradlkovié N, Cesar V, Lepcdus H. Stolfa I Et Beilo D (2008). Antioxidative Responses In Radish (*Raphaniis Sa Thus L.*) Plants Stressed By Copper And Lead In Nutrient Solution And Soil. *Act Bio Cracoviensia Ser Bot.* 50: 79-86.
- 234 Anuradha S Et Rao Ssr (2007). The Effect Of Brassinosteroids On Radish (*Raphanux L.*) Seedlings Growing Under Cadmium Stress. *Plant Soil Environ.*



53: 465-472.

- 235 Dinakar N, Nagajyothi Pc, Suresh S, Dantodharam T Et Suresh C (2009). Cadmium Induced Changes On Proline, Antioxidant Enzymes, Nitrate And Nitrite Reductases In *Arachis Hypogaea* L. *J Environ Bio.* 30 (2): 289-294.
- 236 Chen Ct, Chen Th, Lo Kf Et Chu Cy (2004). Effects Of Proline On Copper Transport In Rice Seedlings Under Excess Copper Stress. *Plant Sci.* 166: 103-111.
- 237 Szafrariska K. Cvikrovsk M, Kowalska U, (Iorecka K. Gdrecki R. Martincova () Et Janas Km (2011). Influence Of Copper Ions On Growth, Lipid Peroxidation, Proline And Polyamines Content In Carrot Rosettes Obtained From Another Culture. *Acta Physio Plant.* 33:851-859.
- 238 Calgaroto Ns, Castro Gy, Cargneluttl D. Pereira Lb, Gonsalves Jf. Rossato Lv, Antes Fg, Dressier Vi Flores Emm. Schetinger Mrc Et Nicoloso Ft (2010).Antioxidant System Activation By Mercury In *Pfaffia Glomerata* Plantlets. *Biometals.* 23: 295-305.
- 239 He L.Y., Chen Z.J., Ren G.D., Zhang Y.F., Qian M., Sheng X.F., 2009. Increased Cadmium And Lead Uptake Of A Cadmium Hyperaccumulator Tomato By Cadmium-Resistant Bacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72: 1343-1348
- 240 [40] F.A. Ayaz, A. Kadioglu, Effects Of Metals (Zn, Cd, Cu, Hg)On The Soluble Protein Bands Of Germinating *Lens Esculenta* L.Seeds, *Doga Turk. J. Bot.* 21 (1997) 85–88.
- 241 Jha Ab El Dubey Rs (2004). Carbohydrate Metabolism In Growing Rice Seedlings Under Arsenic Toxicity. *Plant Physio.* 123: 1029-1036.
- 242 Bajguz A (2011). Suppression Of *Chlorella Vulgaris* Growth By Cadmium, Lead, And Copper Stress And Its Restoration By Endogenous Brassinolide. *Arch Environ Contain Toxico.* 60: 406-416.
- 243 Mishra P El Dubey Rs (2008). Effect Of Aluminium On Metabolism Of Starch And Sugars In Growing Rice Seedlings. *Acta Physio Plant.* 30: 265-275.

- 244 Jha Ab Et Dubey Rs (2005). Effect Of Arsenic On Behaviour Of Enzymes Of Sugar Metabolism In Germinating Rice Seeds. *Acta Physio Plant.* 27 (3): 341-347.
- 245 Choudhury B, Mitra S Et Biswas Ak (2010). Regulation Of Sugar Metabolism In Rice (*Oryza .Sain'd L.*) Seedlings Under Arsenate Toxicity And Its Improvement By Phosphate. *Physio Mol Bio Plants.* 16(1): 59-68.
- 246 Verma S Et Dubey Rs (2001). Effect Of Cadmium On Soluble Sugars And Enzymes Of Their Metabolism In Rice. *Bio Plant.* 44 (1 ): 117-123.
- 247 Neiman (1965) In Katterman F. (1990): *Environmental Injury To Plants.* Ed. Academic Press Inc. P.264
- 248 Chatterjee C., Nautiyal N., Agarwala S.C (1985): Metabolic Changes In Mustard Plant Associated With Molybdenum Deficiency. *New Physiologist.* Vol.100, N°4, Pp. 511-518.
- 249 Bouzid S., 2009. Étude De L'effet De La Salinité Et De La Présence Du Molybdène Sur Le Comportement Écophysiologique De Deux Variétés De Plantes De L'espèce *Phaseolus Vulgaris L.* Thèse De Magister.
- 250 Dell'amico, E., L. Cavalca, Et V. Andreoni. 2008. Improvement Of Brassica Napus Growth Under Cadmium Stress By Cadmium Resistant Rhizobacteria. *Soil Biol. Biochem.* 40: 74–84
- 251 Grover, M.S.K.Z. Ali, V. Sandhya, A. Rasul, Et B. Venkateswarlu. 2010. Role Of Microorganisms In Adaptation Of Agriculture Crops To Abiotic Stresses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Doi: 10.1007/S11274-010-0572-7
- 252 Yang. J, J.W. Kloepper, Et C.M. Ryu. 2009. Rhizosphere Bacteria Help Plants Tolerate Abiotic Stress. *Trends Plant Sci.*4:1-4
- 253 Catherine Berthomieu, Virginie Chapon, Rodolphe Gilbin. 2008 Utiliser Des Bactéries Pour Dépolluer Les Environnements Contaminés Par Des Radionucléides (2009). *Biofutur* 295: 33-36
- 254 Pollmann K, Raff J., Merroun M. , Fahmy K. ,Selenska-Pobell S. Metal Binding By Bacteria From Uranium Mining Waste Piles And Its Technological

Applications (2006) *Biotechnology Advances* 24,58-68

- 255 Clemens S., 2006 : Toxic Metal Accumulation, Responses To Exposure And Mechanisms Of Tolerance In Plants. *Biochimie* 88 : 1707-1719.
- 256 Baralkiewicz D, Kozka M, Kachlicki P, Picchalak A Et Tomaszewska B (2008). Analysis Of Oxidized And Reduced Phytochelatin Synthases In Pea And Lupin Plants Using Hplc/Ms N. *Int J Environ Anal Chem.* 88: 979-988.
- 257 Grill E, Winnacker EI Ct Zcnk Mn (1987). Phytochelatin, A Class Of Heavy Metals Binding Peptides From Plants Are Functionally Analogous To Metallothioneins. *Proceedings National Academy Of Sciences Usa.* 84: 439-443.
- 258 Clemens S,2006;. Evolution And Function Of Phytochelatin Synthases. *J Plant Physio.* 163 (3): 319-332.
- 259 Picchalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D Ct Malccka A (2002). Accumulation And Detoxification Of Lead Ions In Legumes. *Phytochem.* 60 (2): 153-162.
- 260 Seregin Iv, Pekhov Vm Et Ivanov Vb (2002). Plasmolysis As A Tool To Reveal Lead Localization In The Apoplast Of Root Cells. *Rus J Plant Physio.* 49 (2): 283-285.
- 261 Malecka A, Picchalak A Et Tomaszewska B (2009). Reactive Oxygen Species Production And Antioxidative Defense System In Pea Root Tissues Treated With Lead Ions : The Whole Roots Level. *Acta Physio Plant.* 31: 1053-1063.
- 262 Harada E, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S. (2004).A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to gamma-glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry*; 65:3179 85.