

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTÈRE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA
FACULTÉ DES SCIENCES AGRO-VÉTÉRINAIRE
DÉPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de : **Master II**

Option : *Phytopharmacie appliquée*

THEME

Caractérisation de *Bradyrhizobium* sp. Isolé de *Lotus ornithopodioides*. Détermination du seuil de résistance maximale vis-à-vis d'éléments de traces métalliques (cas du cuivre et du cadmium) en vue d'une introduction à la phytoremédiation

Réalisé par :

M^r. DEGAÏCHIA Houssem

Soutenu le : 27 / 09 / 2012

à 09 h 00

Devant le jury composé de :

M ^{me} . HADJ KADDOUR. A	MAA	USDB	Présidente
M ^r . ALI OUSALAH. A	MAA	USDB	Promoteur
M ^{me} . BOUDJEMIA. M	MAA	USDB	Examinatrice
M ^{me} . BRIKI. F	MAA	USDB	Examinatrice

Remerciements :

Je tiens à présenter mes vifs remerciements à toute personne qui a contribué à la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Mr. Ali ousalah A. pour m'avoir supervisé directement. Tout en me laissant une grande liberté pour gérer mon projet, il a toujours été présent et disponible quand cela s'avérait nécessaire.

A Mme. Hadj kaddour A. qui a acceptée de présider le jury et qui m'a facilité l'exécution du travail.

Je remercie également mes enseignants qui ont acceptés d'examiner mon modeste travail :

Mme. Briki F. que grâce à elle ce projet à pu voir le jours, qui m'a toujours guider, aider et cru en moi même dans mes moments de doutes.

Mme. Boudjemia M. qui avec le sourire m'a toujours fait voire où sont mes erreurs, qui m'a initié à l'aspect technique du travail de laboratoire.

Je tiens a remercier également l'ensemble de mes enseignants et spécialement Mme. Belkahla H., Mme Bouhadja H. et Mme. Benrebiha F.Z. de m'avoir accepté au sein de leur laboratoires respectifs. Aussi Mme Bouchenak F. qui à était toujours à mon écoute, Mme Chaouche F.Z et Mme Chaouia C. que, de part leur gentillesse, le vouloir d'apprendre est devenu une nécessité pour moi. A Mme Gendouz qui m'a accordé ça confiance Mme. Benchabane qui depuis ces trois dernières années n'a cessé de m'encourager et de me soutenir, je lui adresse mes élogieux remerciements et mon respect profond.

Ma gratitude vas aussi à mes collègues, Mme. Sabri, Mme Mokhtari et Mr. Berdja et mon enseignant Mr. Metaï. Aussi je remercie l'ensemble des techniciennes et ingénieures de laboratoire: Samia, Ghania, Yamina, Djamilia et Nassima sans oublié le staff administratif et particulièrement: Hamida, Kahina, Nabila et Cherifa

DeGAÏCHIA H.

Dédicaces :

A celle qui m'a aimée, qui est partie sans que je n'ai pu la remercier...

Repose en paix **Grand-mère.**

R.I.P. 1918 - Juin 2012.

A **mes parents** ... l'encre sur le papier n'exprime en rien ma gratitude envers vous !

A mes **frères et sœurs** et leurs **familles**, à ma tante **Samia**, mon cousin **Chams** et ma cousine et complice **Sourour**.

A mes meilleurs amis : **Salim, Lamine & Zaim** ... merci d'être toujours là pour moi bien que je ne sois pas toujours facile à vivre.

A ceux que je n'oublierai jamais : **Emmanuel, Fadhila, Abd-el-Baki, Abd-el-Basset, Yacine, Nesrine, Chafia, Ilhém, Rabiâa, Sihem, Mouhamed, Nacer, Saïda, Djileli, Mokhtar, Sid-Ali** ... merci de faire partie de ma vie.

A ceux qui m'ont offert une deuxième maison ... ma famille **Maliene** et spécialement **Moussa, Youba & Kindié**.

Houssem

Résumé :

Ce travail a pour objet la caractérisation des bactéries symbiotiques de *Lotus ornithopodioïdes* et la détermination de leur seuil de tolérance vis-à-vis de deux éléments de trace métallique (le Cuivre et le Cadmium) en vue d'introduction à la phytoremédiation.

Les bactéries isolées à partir des nodules de cette légumineuse spontanée sont caractérisées par une étude phénotypique (testes physiologiques, biochimique). Ainsi la diversité phénotypique que présentent les isolats est liée à la diversité de leur site de prélèvement, d'où la détermination du genre *Bradyrhizobium* comme étant le genre qui regroupe les bactéries à croissance lente.

Les résultats indiquent que nos isolats de *Bradyrhizobium* sp. révèlent une grande tolérance aux éléments de trace métalliques qui se traduit par une concentration minimale inhibitrice élevée pour le chlorure de cuivre (3000µg/ml) et le chlorure de cadmium (plus de 6000µg/ml).

Mots clés : *Lotus ornithopodioïdes*, seuil de tolérance, éléments de trace métallique, *Bradyrhizobium*, chlorure de cuivre, chlorure de cadmium, concentration minimale inhibitrice

Abstract :

This work aimed to characterize the symbiotic bacteria of *Lotus ornithopodioides* and determining their tolerance threshold to two trace elements (Copper and Cadmium) for the introducing to phytoremediation.

Bacteria isolated from nodules of this spontaneous legume are characterized by a phenotypic study (physiological & biochemical testes). Phenotypic diversity that present isolates is related to the diversity of their sampling site, so the determination of *Bradyrhizobium* how being the kind which includes slow-growing bacteria.

The results indicate that our isolates of *Bradyrhizobium* sp. show a high tolerance threshold to trace elements which represented by a high minimal inhibitory concentration for copper chloride (3000 μ g/ml) and cadmium chloride (over 6000 μ g/ml).

Keywords: *Lotus ornithopodioides*, tolerance threshold, trace elements, *Bradyrhizobium*, copper chloride, cadmium chloride, minimal inhibitory concentration

ملخص

هذا المشروع موضوعه تقييم خصائص البكتيريا العقدية المتعايشة مع نبتة من عائلة الباقوليات (*Lotus ornithopodioides*) وتحديد مقدار مقاومتها الاعلى امام معدنين ثقيلين (النحاس- الكادميوم) و هذا من اجل مدخل للمعالجة النباتية (فيتوروميديا)

تم تقييم خصائص هته البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية بواسطة تجارب فيزيولوجية و بيوكيماوية. ان التنوع المظهري الذي نلاحظه على العزلات مرتبط بتنوع مواقع اخذ العينات, حيث استطعنا تعريف النوع *Bradyrhizobium* بمثابة النوع الذي يشمل البكتيريا ذات النمو البطيئ

النتائج توضح ان عزلات *Bradyrhizobium* sp. لها القدرة على تحمل تراكيز عالية من هذه المعادن الثقيلة و المبينة بقيم عليا للحد الادنى للتركيز المثبط (كلورور النحاس 3000 µg/ml - كلورور الكادميوم اكثر من 6000 µg/ml)

الكلمات المفتاحية :

Bradyrhizobium sp. , مقدار المقاومة, معادن ثقيلة , *Lotus ornithopodioides*

.كلورور النحاس , كلورور الكادميوم, الحد الادنى للتركيز المثبط

Tables des matières

Introduction	1
--------------------	---

PARTIE I : Recherches Bibliographiques

CHAPITRE I: Le sol

1. Généralités	5
2. La rhizosphère.....	6

CHAPITRE II : La symbiose rhizosphérique

1. Introduction.....	8
2. Définition générale.....	9
3. Le microsymbiant.....	9
4. La plante-hôte (Les légumineuses).....	11
5. Nodulation chez les légumineuses.....	13
5.1. Formation des bactéroïdes.....	13
5.1.1. Nodulation.....	13
5.1.1.1. Pré-infection.....	15
5.1.1.2. Mécanismes de reconnaissance et nodulines précoces.....	15
5.1.1.3. Adhésion.....	16
5.1.1.4. Infection.....	16
5.1.1.5. Recourbement des poils absorbants et formation du cordon d'infection.....	16
5.1.1.6. Développement du nodule.....	17
5.2. Formes des nodules.....	19
5.3. Structure du nodule.....	19

CHAPITRE III : Intérêts des légumineuses.

1. Intérêts agronomiques des légumineuses.....	21
2. Intérêt alimentaire des légumineuses.....	21
3. Intérêts scientifiques.....	23

CHAPITRE VI : Introduction à la phytoremédiation

1. Introduction.....	24
2. Définitions et généralités.....	24
a. Polluants élémentaires.....	25
b. Polluants organiques.....	25
3. Différentes techniques de phytoremédiation.....	26
4. Les éléments traces métalliques ou Métaux lourds.....	27
4.1. Définitions, origine et importance des éléments traces métalliques.....	27
4.2. Les éléments traces métalliques et les plantes des sites contaminés.....	31
4.3. Comportement, distribution et devenir de deux éléments de traces métalliques dans l'environnement: Cas du cadmium et du cuivre.....	31

PARTIE II : Matériels et méthodes

CHAPITRE I :Présentation du site d'échantillonnage

I. Situation géographique.....	34
II. Données pédologiques.....	34
III. Données Climatique	36
III.1. Température et pluviométrie.....	36
III.1.1. Diagramme Ombrothermique.....	36
III.1.1. Quotient pluviométrique d'Emberger.....	37

CHAPITRE II: Méthodes expérimentales

I. Matériel biologique.....	41
II. Biométrie des échantillons.....	43
III. Collecte des nodules.....	43
IV. Conservation des nodules.....	43
V. Isolement des souches à partir des nodules.....	44
V.1. Principaux milieux de culture utilisés.....	44
V.2. Stérilisation des nodules.....	45

V.3. Écrasement des nodules.....	45
VI. Identification du genre bactérien.....	45
VI.1. Isolement des souches.....	45
VI.2. Caractères cultureux des isolats.....	46
VI.2.1. Examen de la mobilité.....	46
VI.2.2. Examen microscopique après coloration (Coloration de Gram).....	46
VI.2.3. Production d'Exo-polysaccharides (EPS).....	46
VII. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des éléments de trace métallique (ETM) (Filali B.K et <i>al.</i> ,2000 modifié pour le genre <i>Bradyrhizobium</i> en se basant sur Jordan, 1982).....	47
VIII. Conservation des souches.....	49

PARTIE III : Résultats et discussions

I. Échantillonnage.....	52
I.1. Caractéristiques et biométrie des échantillons.....	52
I.2. Conservation des nodules.....	56
II. Isolement des souches	56
III. Identification du genre bactérien.....	58
III.1. Isolement des souches.....	58
III.1.1. Croissance des isolats sur les différents milieux de cultures.....	58
III.1.1.1. Croissance des isolats sur le milieu YMA.....	58
III.1.1.2. Croissance des isolats sur le milieu YMA+RC.....	59
III.1.1.3. Pureté de l' <i>inoculum</i>	59
III.1.1.4. Vitesse de croissance.....	61
III.2. Caractères cultureux des isolats.....	63
III.2.1. Examen de la mobilité.....	63
III.2.2 La coloration de Gram.....	64
III.2.3. Mise en évidence des Exo polysaccharides.....	65
IV. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des éléments de trace métallique (ETM).....	66
IV.1. Choix de la souche.....	66
IV.2. Tolérance de <i>Bradyrhizobium</i> sp. aux ETM.....	67

IV.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du Chlorure de Cuivre (CuCl ₂) vis-à-vis de <i>Bradyrhizobium</i> sp.	67
IV.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du Chlorure de Cadmium (CdCl ₂) vis-à-vis de <i>Bradyrhizobium</i> sp.	68
V. Conservation des souches	69
VI. Conclusion générale et perspectives.....	70
PARTIE IV: Références bibliographiques	73
Annexes.....	89

Liste des tableaux et des graphes :

Tableau N°01 : Composition chimique de <i>Lotus edulis</i> et <i>Lotus ornithopodioides</i> au stade floraison (Boutahraoui et al., 2006)	22
Tableau N°02 : Classification de quelques ETM selon leur densité et leur toxicité (Bliefert et al.,2001)	29
Tableau N°03 : les caractéristiques physiques du sol (Ait ouarab 2000, Amrouche 2000 et Mallou 2000).....	35
Tableau N°04 : les caractéristiques chimiques du sol (Ait ouarab (2000), Amrouche (2000) et Mallou (2000).....	35
Tableau N°05 : Variations mensuelles des températures et de la pluviométrie dans la région du Blida durant la période 1995-2010 (ANRH, 2011).....	36
Tableau N°06 : Calculs personnels du quotient pluviométrique.....	38
Tableau N°07 : Position systématique de l'échantillon selon Quezel et Santa (1962).....	42
Tableau N°08 : Caractéristiques de <i>Lotus ornithopodioides</i> des sites d'échantillonnages (Description personnelle qui rejoint celle de Quezel et Santa (1962)).....	52
Tableau N°09 : Biométrie et morphologie de l'espèce spontanée <i>Lotus ornithopodioides</i> au stade floraison.....	54
Graphe N°01: Détermination de la CMI du CuCl ₂	67
Graphe N°02: Détermination de la CMI du CdCl ₂	68

Liste des Photos

Photo N°01: Processus de la nodulation (Giles <i>et al.</i> , 2004).....	14
Photo N°02 : Localisation des sites d'échantillonnages (Photo satellite, <i>Google earth</i> TM , 2012 [©]).....	41
Photo N°03 : Conservation des nodules sous CaCl ₂ (Photographie personnelle).....	44
Photo N°04: Ensemencement par la technique des quatre cadrans sur le milieu GPA+BCP selon Vincent (1970) (Photographie personnelle).....	46
Photo N°05: Série de flacon de TY contenant différentes concentrations d'ETM (Exemple du CuCl ₂) (Photographie personnelle).	48
Photo N°06: Incubation avec Agitation (agitateur INNOVA TM 2300 à 100 rpm) (Photographie personnelle).....	48
Photo N°07: Cuve en Quartz pour la lecture de la D.O _{λ600} (Photographie personnelle)	49
Photo N°08: <i>Lotus ornithopodioïdes</i> . (Photographie personnelle).....	53
Photo N°09: Les deux types de nodules, indéterminé & déterminé (photographie personnelle).....	55
Photo N°10 :Conservation des nodules dans des tubes contenant du CaCl ₂ (Photographie personnelle).....	56
Photo N°11 : Ré-hydratation des nodules après 02 mois de conservation (photographie personnelle).....	57

Photo N°12 : Stérilisation et écrasement des nodules réhydratés (Photographie personnelle).....	57
Photo N°13 : Ensemencement du milieu GPA+BCP selon la technique des quatre cadrans à l'aide d'une anse de platine (photographie personnelle).....	58
Photo N°14 : Aspect des colonies sur le YMA+RC (Photographie personnelle).....	59
Photo N°15.A : Croissance des isolats sur le milieu GPA+BCP (Photographie personnelle)...	60
Photo N°15.B : Croissance des isolats contaminés par l'eau de robinet sur milieu GPA+BCP (Photographie personnelle).....	60
Planche N°01 : Aspect des colonies sur YMA+BTB des différentes souches (photographies personnelles)	62
Photo N°16 :Le milieu Mannitol mobilité avant ensemencement (photographie personnelle).	63
Photo N°17 : Mobilité des souches sur le milieu Mannitol mobilité (Virage de la couleur du rouge à jaune orangé) (photographie personnelle).....	63
Photo N°18 : Bâtonnets à Gram négative vus au microscope optique (G X1000) (photographie personnelle).....	64
Photo N°19 : Fluorescence des colonies sous UV à 270 nm (photographie personnelle)....	65

Liste des Figures

Figure N°01 : Cellules bactériennes et microcolonies dans les agrégats d'un sol agricole (Winogradsky, 1949).....	5
Figure N°02 : Représentation schématique de l'habitat des microorganismes dans le sol (Chenu et Stotzky, 2002).....	7
Figure N°03: Classification phylogénique des Légumineuses.....	12
Figure N°04 : Infection intracellulaire et différenciation du Symbiosome chez les Légumineuses (Patriarca et al, 2004.).....	18
Figure N°05: Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes. (Pawlowski et Bisseling, 1996).....	20
Figure N°06: les processus impliqués dans la phytoremédiation (Salt et al., 1995)	27
Figure N°07 : Diagramme Ombrothermique de Gaussen de la région de Blida établi sur une période de 15 ans (1995-2010) selon les données d'ARNH (2011).....	37
Figure N°08: Climagramme d'Emberger pour la région de Blida selon les données d'ANRH (2011).....	39

Liste des abréviations :

YMB : Yeast-extract Mannitol Broth

YMA : Yeast-extract Mannitol Agar

YMA+RC : Yeast-extract Mannitol Agar additionné de rouge Congo

YMA+BTB : Yeast-extract Mannitol Agar additionné de bleu de Bromothymol

GPA+BCP : Glucose-Peptone-Agar additionné de pourpre de Bromocrésol

CFW : Calcofluor White

TYA : Tryptone Yeast-Extracte Agar

TY : Bouillon Tryptone Yeast-Extracte

ETM : Éléments trace métallique

EPS: Exo-polysaccharide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

D.O : Densité optique

D.O_{λ600} : Densité optique à une longueur d'onde $\lambda=600$ nm

nm : Nanomètre

Glossaire

La biosorption : est un procédé de traitement d'effluents liquides par adsorption de leurs contaminants sur de la biomasse inerte de provenance végétale ou microbienne. Cette technique est particulièrement efficace lorsque les concentrations en polluants sont faibles. Elle est donc appropriée à l'élimination de micropolluants. Ces composés qui s'accumulent lentement dans la nature et tout au long de la chaîne alimentaire sont considérés comme une menace écologique majeure dont l'impact négatif est déjà clairement perceptible. De nombreux efforts sont actuellement entrepris pour réduire d'une part leur émission et d'autre part leur présence dans différents biotopes (décontamination)

Amphiphile : Terme qualifiant les molécules qui ont une partie hydrophobe et une autre partie hydrophile.

Introduction

Introduction:

Les organismes vivants dans leur environnement sont en interaction permanente les uns avec les autres. Certaines de ces interactions sont stables dans le temps et ont un impact sur le déroulement de la vie de l'un ou des deux organismes impliqués. D'un point de vue étymologique ces interactions peuvent être nommées « symbiose ».

Dans le règne végétal, parmi les symbioses les plus importantes, on distingue les endosymbioses racinaires formées entre des plantes légumineuses et certains microorganismes telluriques.

En Algérie, les légumineuses occupent une place primordiale et constituent, avec les céréales, une part importante du système alimentaire. De nombreuses espèces de légumineuses sont utilisées comme ressources pour l'alimentation humaine (fève, soja, haricot, pois chiche, lentille...) et animale (vesce, luzernes, trèfles,...) et en médecine (fenugrec...). D'autres légumineuses jouent un rôle écologique important dans la sauvegarde des sols et leur fertilisation. L'intérêt des légumineuses est directement lié à leur capacité d'établir une association symbiotique spécifique avec des bactéries les nodulant (**Moulin, 2002**). Parmi elle, les bactéries tellurique du genre *Rhizobium*, à Gram négative, ayant, selon **Somasegaran et Hoben (1994)**, une signification scientifique et agronomique profonde due à leur capacité d'établir une relation symbiotique dans la fixation d'azote avec les légumineuses, relation d'importance majeure pour l'entretien de la fertilité du sol.

Le *Rhizobium* induit sur la plante hôte la formation d'un organe spécialisé (le nodule) à l'intérieur du quel la bactérie fixe l'azote atmosphérique.

En Algérie, l'étude des légumineuses spontanées et les bactéries les nodulant, reste peu étudiée (**Sebbane, 2007**), pour cela nous avons choisi d'approfondir l'étude d'une espèce spontanées en caractérisant les bactéries nodulantes de *Lotus ornithopodioïdes* et précisément son aptitude à tolérer de fortes concentration de polluants

Face à ces pollutions massives qui dégradent l'environnement, la préservation de sa qualité est l'un des problèmes les plus préoccupants de l'époque actuelle. Le compartiment tellurique a été longtemps, et est bien souvent, le réceptacle final des rejets de pollutions d'origine anthropique. Il révèle des taux élevés en polluants supérieurs aux charges naturelles et est l'objet de programmes de surveillances qui cherchent à quantifier et à prévenir l'impact des pollutions (**Perry et al., 2002**).

Parmi ces produits polluants, les éléments trace métallique, du fait de leur stabilité et de leur persistance dans l'environnement, sont propices au transport et à l'accumulation dans certains compartiments de l'environnement.

PARTIE I :

Recherches

Bibliographiques

CHAPITRE I :

Le sol.

1. Généralités :

Le sol est un système structuré, hétérogène et discontinu, généralement pauvre en nutriment et en source d'énergie (Nannipierri, 2003). Il est composé de matières organiques et inorganiques formées par l'action combinée des processus biotiques et abiotiques (Liesack *et al.*, 1997 ; Gobat *et al.*, 2004).

La source de carbone peut venir des débris des plantes qui sont dégradées, par la macro et la microflore du sol, en matière organique via le processus d'humification (Kuzyakov & Domanski, 2000; Gobat *et al.*, 2004). La matière organique du sol (Soil Organic Matter « SOM ») est composée de litière non ou partiellement dégradée et d'une couche d'humus (Gobat *et al.*, 2004).

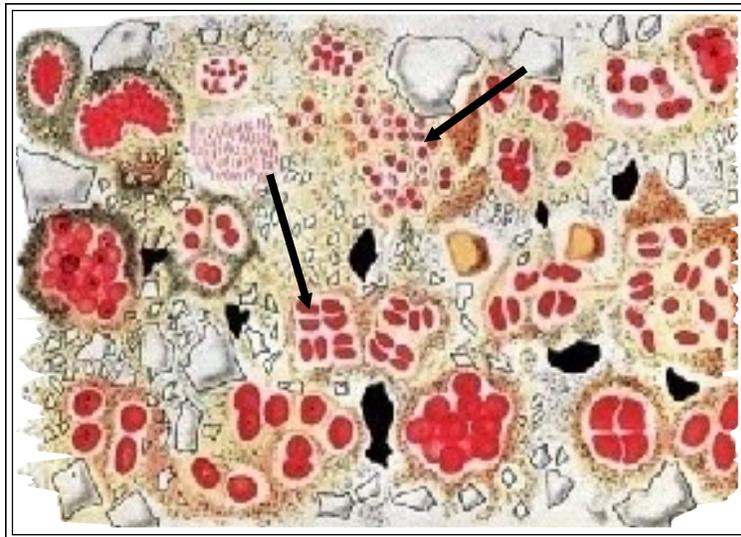


Figure N°01 : Cellules bactériennes et micro-colonies dans les agrégats d'un sol agricole (Winogradsky, 1949)

Quatre-vingts à quatre-vingt-dix pour cent des réactions dans les sols sont catalysées par des microorganismes (Coleman et Crossley, 1996).

Dans les agro-écosystèmes, les bactéries sont responsables des fonctions métaboliques diverses qui affectent la fertilité du sol, l'état sanitaire de la plante comprenant

la formation d'un cycle de la matière organique, la décomposition des matières nutritives, la structure de sol et la promotion de croissance de plantes (Kennedy, 1999).

La présence des microorganismes dans le sol dépendra du nombre et du volume des **microhabitats** disponibles, l'activité bactérienne et aux quantités de substrats métaboliques disponibles trouvés dans ces micro habitats (Stotzky, 1997 ; Nannipieri, 2003).

La composition minérale, la salinité, le pH, la disponibilité nutritive, l'apport organique, la température et la teneur en eau déterminent les places écologiques disponibles (Liesack et al., 1997).

Les propriétés du sol dépendent, non seulement de la faune et de la végétation mais également de l'influence géographique, géologique, hydrologique, climatique, et anthropogènes (Liesack et al., 1997). Le sol contient beaucoup de différents micro habitats, augmentant de ce fait la diversité bactérienne.

En effet, plusieurs espèces bactériennes peuvent être trouvées dans un gramme de sol (Torsvik et al., 1990). La prédation bactérienne par des bactériophages, des protozoaires ou des nématodes permet de reminéraliser les nutriments immobilisés par les biomasses bactériennes (Ingham et al., 1985 ; Griffiths et Bardgett, 1997).

Dans les sols, il existe des zones où l'activité microbienne est importante, ces derniers sont définies comme étant des points chauds (Sextone et al., 1985). La rhizosphère est probablement la plus importante des points chauds, elle offre différents habitats et plus de ressources pour les micro-organismes du sol que le sol en bloc (Kuzyakov, 2002)

2. La rhizosphère :

Le terme rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner. "rhizo" vient du grec "rhiza," signifiant "racine" et "sphère" est le champ d'action ou d'influence. La rhizosphère, *sensu lato*, est la région du sol autour des racines des plantes (Hiltner, 1904).

Hiltner (1904), a décrit la rhizosphère comme étant l'étroite partie du sol, lieu d'une intense activité microbienne autour des racines des légumineuses. Cette définition a été étendue à l'ensemble des plantes, elle correspond, non seulement, à l'étroite zone (1-2 mm) à proximité immédiate de la surface racinaire, mais aussi à la région de quelques centimètres de la racine, où ont lieu les échanges d'eau et de nutriments. La rhizosphère constitue ainsi un lieu d'échange entre le végétal et le minéral ; c'est un milieu complexe aux multiples interactions (Lynch, 1990).

Les microorganismes rhizosphériques (bactéries, algues, champignons) participent à la structure du sol. La représentation schématique de leur habitat proposée par Chenu et Stotzky, est reportée dans la Figure N°02.

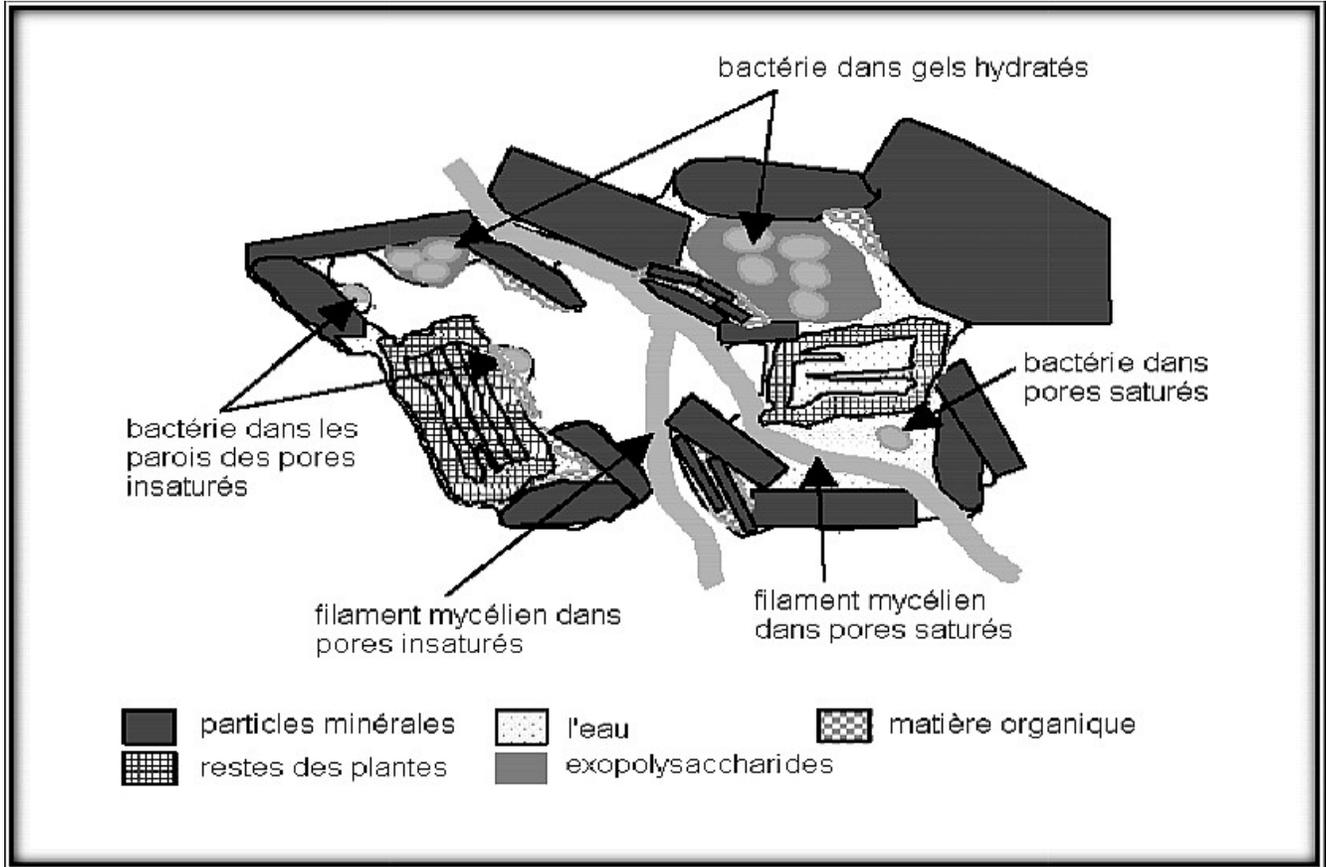


Figure N°02 : Représentation schématique de l'habitat des microorganismes dans le sol (Chenu et Stotzky, 2002)

CHAPITRE II :

La symbiose rhizosphérique.

1. Introduction :

Le sol contient de nombreuses espèces de bactéries et de cyanobactéries (appelées aussi *algues bleues*) pouvant transformer l'azote atmosphérique en ammoniac. Plusieurs de ces microorganismes vivent au niveau de la **rhizosphère** ou même dans les tissus de certains végétaux. L'ammoniac est rapidement transformé en nitrates par les bactéries du sol. La réduction de l'azote est très exigeante en énergie : il faut 16 molécules d'ATP pour réduire une molécule d'azote. C'est pourquoi les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont des symbioses associant des bactéries fixatrices à des organismes photosynthétiques (DeNarie, 2000).

La fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes d'azote, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996). Les espèces fixatrices d'azote, réellement symbiotiques sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement les *Rhizobium*, des actinomycètes (*Frankia*) et des cyanobactéries (*Anabaena azollae*) (Pelmont, 1995)

Les bactéries de ce type jouent un rôle prépondérant dans la croissance des plantes agricoles (Tortora et al., 2003). Mais la symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est celle associant les *Rhizobia* aux légumineuses (DeNarie, 2000). La forme la plus commune d'association symbiotique provoque la formation sur la racine de la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées **nodules** (Hopkins, 2003). Les plantes concernées bénéficient des produits de la fixation bactérienne. En contrepartie, la plante hôte fournit aux bactéries (bactéroïdes) des composés carbonés et de l'énergie (Richter, 1993).

La formation de ces nodosités exige une relation génétique intime entre les bactéries et la plante, il est connu de nombreuses mutations dans leurs génomes respectifs pouvant bloquer le développement d'une nodosité fonctionnelle (Hopkins, 2003)

2. Définition générale :

Le terme « symbiose » provient étymologiquement du grec “sym” (avec) et “biose” (vie) d'où sa définition générale très large: « vie avec » ou « vie en commun » (Lefevre, 2004). La symbiose est une association, de deux ou plusieurs organismes, qui leur permettent de vivre avec des avantages pour chacun (Broughton, 2000).

Ce type de relation vitale a été observé pour la première fois en 1872 par Reinke (Perry, 2004). Le terme désignant des associations biologiques ne sera utilisé pour la première fois qu'en 1877 par Franck pour caractériser des lichens. Le concept sera développé et explicité par le botaniste allemand DeBary en 1879 selon lequel la symbiose est l'association de deux organismes spécifiquement distincts, qui vivent ensemble (Lefevre, 2004).

Selon la position relative des partenaires, on parlera d'endo- ou ecto-symbiose. Si le symbiote se trouve à l'extérieur de l'hôte, on parle d'ecto-symbiose ; sinon, on parle d'endosymbiose. L'endosymbiose peut être intra- ou extra-cellulaire (Broughton, 2000).

3. Le microsymbiant :

Les bactéries des racines (*Rhizobia*) sont en particulier utiles par leurs capacités symbiotiques et à la fixation d'azote dans la symbiose avec leurs plantes-hôtes (les légumineuses).

Les *Rhizobia* sont divisés depuis une vingtaine d'année à environ 40 espèces; avec sept genres parmi les α -*Proteobacteria* : *Allorhizobium* (DeLajudie et al., 1998a) , *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) , *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982 ; Xu et al., 1995) , *Mesorhizobium* (Chen et al., 1991. Jarvis et al., 1982 et Jarvis et al, 1997. DeLajudie et al, 1998b ; Nour et al., 1994 ;Nour et al, 1995 ;Wang et al, 1999) , *Rhizobium* (Amarger et al., 1997 ; Van Berkum et al., 1998 ; Chen et al., 1997 ; Jordan, 1982 ; Lindström, 1989 ; Marinez-Romero et al, 1991; Segovia et al, 1993 ; Wang et al, 1998 ; Wei et al., 2002) , *Sinorhizobium* (Chen et al, 1988 ; DeLajudie et al, 1994 ; Rome et al, 1996 ; Wei et al, 2002) et une espèce dans le genre *Methylobacterium* (Sy et al, 2001).

Actuellement, dans la relation symbiotique, des espèces fixatrices d'azote ont été également décrites parmi les genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* dans la sous-classe des β -*Proteobacteria* (Moulin et al, 2001).

Cette classification est très loin de celle décrite dans le « Bergey's Manual » par Jordan (1984), basée sur un ensemble des caractères phénotypiques, notamment la vitesse de croissance, où :

- o les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*... regroupent les souches à croissance rapide
- o et le genre *Bradyrhizobium*, les souches à croissance lente.

Actuellement la taxonomie bactérienne moderne se base sur plusieurs techniques moléculaires, chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (surtout ADNr 16S comme marqueur taxonomique, les protéines totales, les acides gras, ...etc.), et de ce fait, prend une nouvelle approche, la taxonomie polyphasique (Vandamme et al., 1996 ; Zakhia et al., 2006).

A partir de là, la classification des *Rhizobia* évolue chaque année, regroupant les B.N.L. (ou Bactéries Nodulant les Légumineuses) préférant au terme de *Rhizobia*. La littérature actuelle décrit environ 60 espèces décrites dans 12 genres de l'ordre des *Rhizobial*, de la sous classe α -*Protéobacteria* et 3 genres de l'ordre des *Burkholderial* de la sous-classe β -*Proteobacteria* (Zahkia et DeLajudie.,2006; Moulin et al., 2001; Nogom et al.,2004) et un genre dans l'ordre *Enterobacterial* de la sous-classe des γ -*Proteobacteria*, un genre de l'ordre des *Pseudomonadal* de la même sous-classe (Benhizia et al., 2004) .

Selon le "Subcommittee on the Taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium*" publié en Août 2007, la description des genres nous donne les caractéristiques suivantes :

****Rhizobium***

Rhizobium était pendant de nombreuses d'années un genre regroupant tout les *Rhizobia*. Quelques espèces plus tard ont été déplacées à de nouveaux genres basés sur des analyses phylogénétiques. Il se compose actuellement de 17 espèces.

****Mesorhizobium***

Le genre *Mesorhizobium* a été décrit par Jarvis et al (1997), plusieurs espèces ont été déplacées de *Rhizobium* à ce genre. Il se compose actuellement de 11 espèces.

****Sinorhizobium***

Le genre de *Sinorhizobium* a été décrit par Chen et al. (1988). Toutefois quelques études montrent que *Sinorhizobium* et le genre *Ensifer* (Casida, 1982) appartient à un taxon simple. *Ensifer* est le synonyme hétérotypique plus tôt (il a été appelé d'abord) et prend ainsi la priorité (Young, 1991). Ceci signifie que toutes les espèces de *Sinorhizobium* doivent être retirées comme espèces d'*Ensifer* selon le code bactériologique que la taxonomie de ce genre a été vérifiée en 2003 par Martinez et col. qui rajoutent l'espèce *Sinorhizobium*

mexicanus (Toledo et al. 2003) à la liste des espèces étudiées. Ce genre se compose actuellement de 15 espèces.

****Bradyrhizobium***

Le genre de *Bradyrhizobium* a été décrit par la Jordan en 1982. Il se compose actuellement de 5 espèces.

****Azorhizobium***

Le genre d'*Azorhizobium* a été décrit par Dreyfus et al. (1988). Il se compose actuellement de 2 espèces.

****Burkholderia***

Le genre de *Burkholderia* contient actuellement cinq espèces rhizobial.

A partir du moment qu'un tiers seulement des légumineuses ont été étudiées, cette classification n'est plus une classification définitive. Ainsi, il a été reconnu que la classification bactérienne devait également refléter le plus fidèlement possible les relations naturelles entre les bactéries, les relations de parenté ou de phylogénie (Vandamme et al., 1996 ; Zakhia et al., 2006).

4. La plante-hôte (Les légumineuses) :

Les légumineuses constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun est de produire des ovaires ayant des carpelles libres , qui donne un fruit appelé gousse. On compte 475 genres et environ 16400 espèces se répartissant en trois famille : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae* (ou *Fabaceae*) (Come et al., 2006). Les Fabacées avec 10 000 espèces représentent d'ailleurs la plus grande famille des légumineuses (Figure 03).

On y trouve des arbres, la plupart exotiques, voire des lianes, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles. (Guignard et al., 2004). Souvent volubiles et grimpantes, soit par enroulement (*Phaseolus*, *Physostigma*), soit grâce à des vrilles foliaires (*Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia*).

Beaucoup d'espèces sont cultivées pour leurs graines riches en amidon (Fève, Haricot, Lentille, Pois, Pois chiche), en huile (Arachide, Soja) ou en protéines (Fenugrec, Lupin, Soja) les trèfles, les luzernes, le sainfoin et le lotier servent à l'alimentation du bétail (Come et al.,2006).

Les légumineuses entretiennent une relation très privilégiée avec la rhizosphère. D'après Waligora *et al.*, (2008), l'effet rhizosphérique des légumineuses est 20 à 30 fois supérieur à celui d'une betterave ou d'un colza

On entend par « effet rhizosphérique », le ratio entre la microflore rhizosphérique, à l'interface racine/sol (la terre qui reste collée aux racines lorsqu'on arrache une plante) et la microflore du sol située à distance des racines (Waligora *et al.*, 2008).

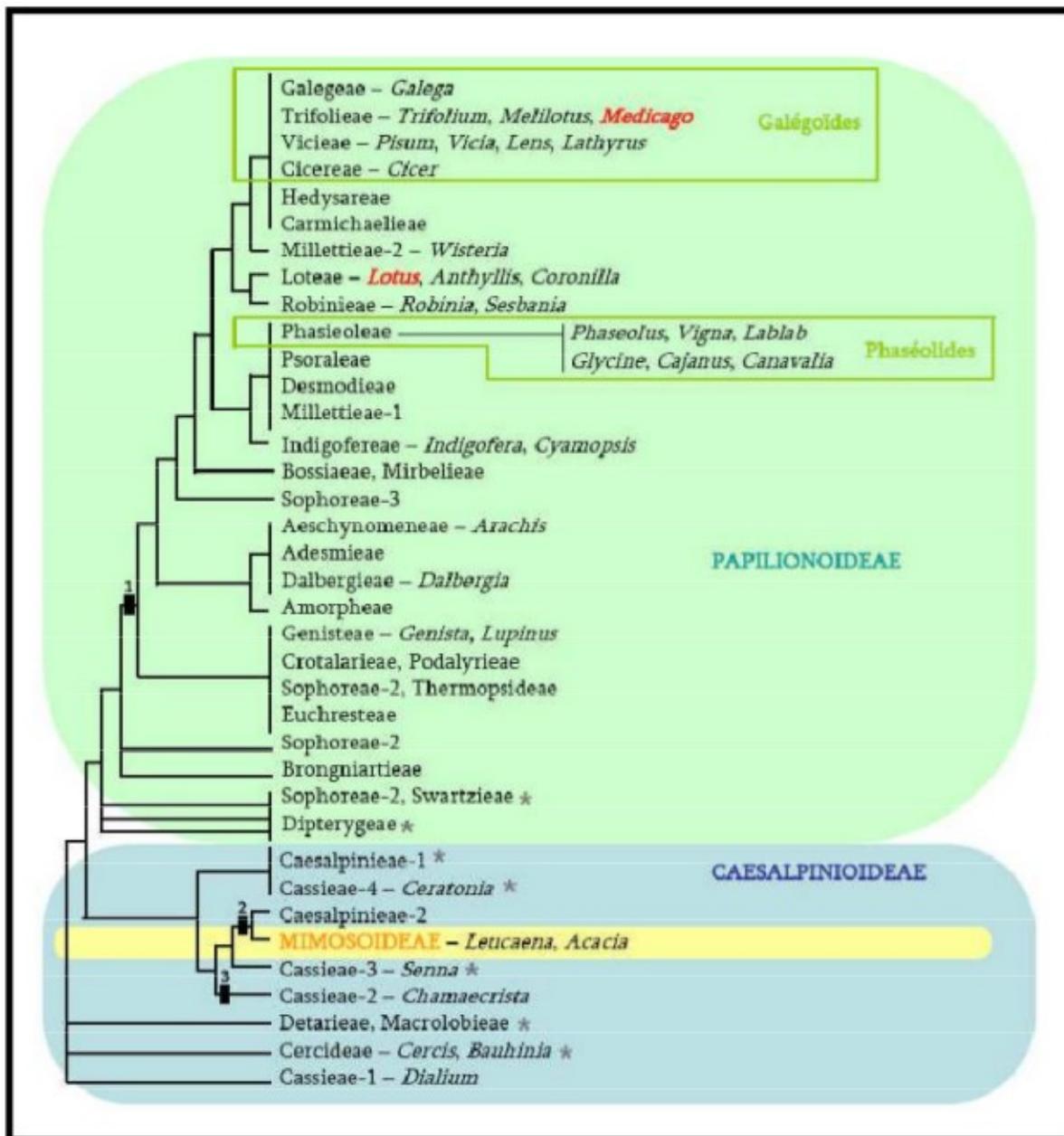


Figure N°03: Classification phylogénique des Légumineuses (Doyle *et al.*, 1998) *

*La superfamille des Légumineuses (ou Fabacées) se subdivise en trois familles, les *Papilionoideae*, et les *Mimosoideae* qui sont des familles phylogénétiquement très regroupées et les *Caesalpinioideae*, plus dispersées. Les groupes connus pour présenter des plantes non-nodulantes sont notés par un astérisque gris. Les deux groupes comprenant les principales légumineuses d'intérêt agronomique, les *Galégoïdes* et les *Phaséolides*, sont représentés par des encadrés. 1, 2, 3: Possibles origines indépendantes pour la nodulation (Doyle *et al.*, 1998)

5. Nodulation chez les légumineuses

Toutes les espèces appartenant aux Légumineuses ne sont pas nodulées. Environ 20% des *Papilionoideae* (soit 3400 espèces) ont été testées pour leur aptitude à être noduler. Le pourcentage des familles examinées capable de noduler se répartit de la façon suivante : *Papilionoideae* (97%), *Mimosoideae* (90%) et *Caesalpinioideae* (23%) (Duhoux *et al.*, 2004). Le mécanisme de la nodulation se fait comme suit :

5.1. Formation des bactéroïdes

L'invasion des bactéries dans des cellules de la plante hôte est initié par la formation d'une gouttelette d'infection. Les gouttelettes d'infection peuvent se former au bout des fils intracellulaires courts d'infection, par exemple dans l'haricot (*Phaseolus sp.*) ou, plus habituellement, la paroi des cellules deviennent abrupte et les cellules bactériennes entrent en contact direct avec la membrane du plasma de centre-cellule. Les bactéroïdes mûrs de la membrane des cellules de la plante continuent à accumuler de grandes quantités de PHB ou polyhydroxybutyrate (Juergen *et al.* 2006).

5.1.1. Nodulation :

Les conditions requises avant la mise en place de la symbiose sont : une faible teneur en azote du sol et une photosynthèse active pour assurer une source suffisante d'énergie (Kondorosi *et Kondorosi*, 2000).

Le développement du nodule (Photo 01) est un processus complexe impliquant la différenciation de plusieurs types de cellules spécialisées comme résultat d'une série d'échanges de signaux entre la plante et les partenaires microbiens (Brewin *et al.*, 1992). L'organogénèse des nodosités, depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connue (Madigan *et al.*, 2007).

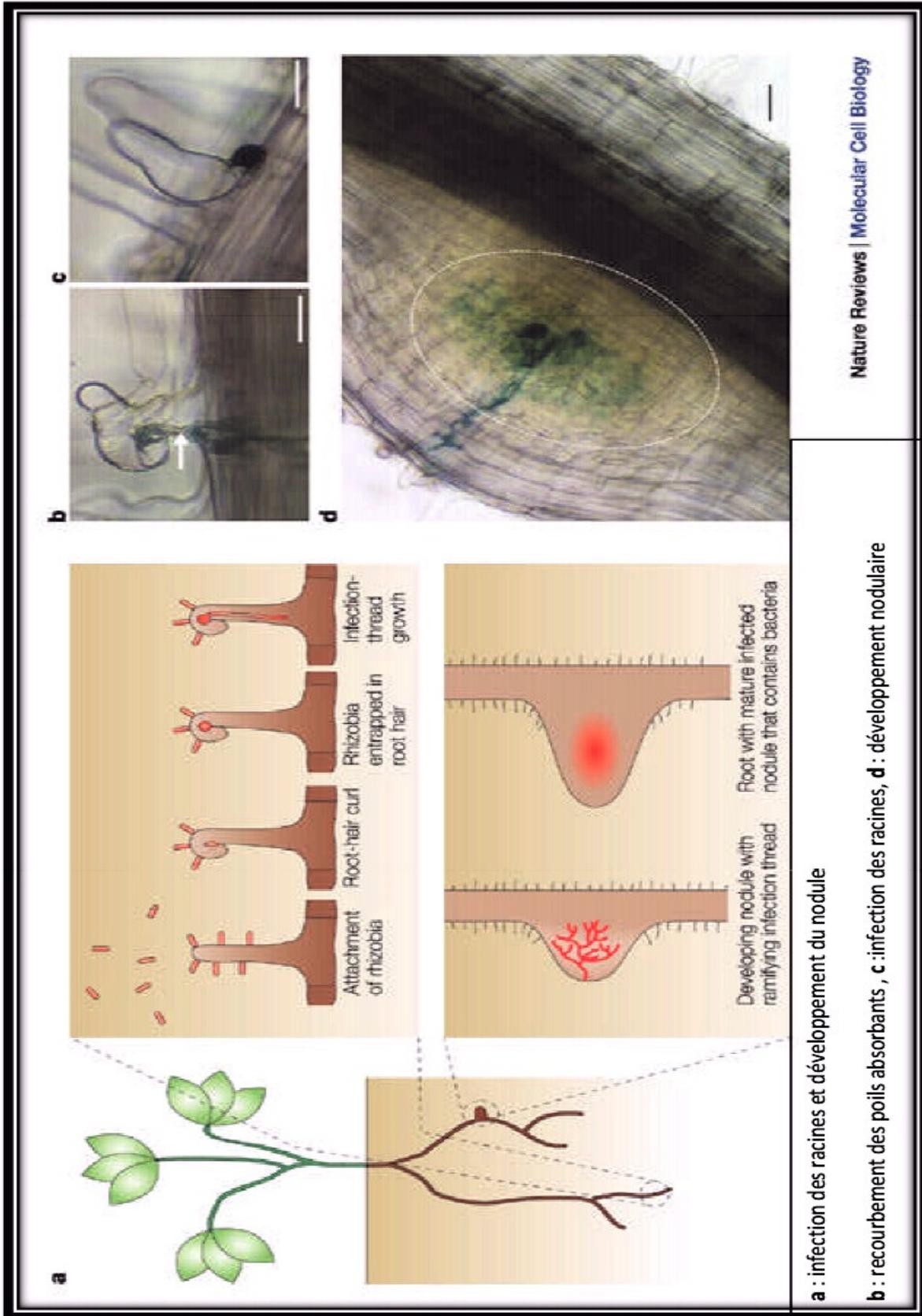


Photo 1: Processus de la nodulation (Giles et al., 2004)

5.1.1.1. Pré-infection

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

Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes *nod* bactériens qui gouvernent la production des facteurs *Nod*, des lipochitooligosaccharides (Broughton *et al.*, 2000). Les facteurs *Nod* induisent des changements morphologiques, physiologiques et moléculaires chez la plante hôte.

La déformation du poil racinaire est observée environ 12 à 24 heures ; les poils absorbants changent leur direction de croissance et forment une structure en crosse de berger, courbés, renflés, entrelacés, déformés, branchés ou joints qui enferme les Rhizobia. Elle fait intervenir des changements dans l'arrangement des microtubules ; plus précisément, les poils racinaires peuvent adopter différentes formes en fonction de leur stade de développement (Timmers *et al.*, 2007)

5.1.1.2. Mécanismes de reconnaissance et nodulines précoces

Dans des conditions limitantes en azote, les exsudats racinaires de la plante contiennent plusieurs substances, principalement des flavonoïdes qui sont capables d'activer la transcription des gènes *nod* chez les *Rhizobia*, ce dernier, qui vit libre dans le sol, est doté sur son enveloppe externe des récepteurs spécifiques aux différents composants de l'exsudat racinaire (Waligora *et al.*, 2008)

Le produit du gène *nodD*, synthétisé de façon constitutive est impliqué dans la reconnaissance de ce signal et dans l'activation de la transcription des autres gènes *nod*. La transcription des autres gènes *nod* a pour effet la synthèse des facteurs *Nod* qui sont les molécules bactériennes reconnues à leur tour par la plante (Miklashevichs *et al.*, 2001).

Les types de facteurs *Nod* produits ainsi que leur quantité, permettent une reconnaissance spécifique de chaque *Rhizobia* par son partenaire végétal. Leur structure amphiphile permet une intégration rapide dans les membranes. Cependant, ils seraient incapables de traverser la membrane végétale, un récepteur membranaire serait donc nécessaire pour permettre leur détection par la plante (Cullimore *et al.*, 2001).

5.1.1.3. Adhésion:

Une protéine d'adhésion spécifique, la **rhicadhésine**, est présente à la surface des cellules des espèces de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. La rhicadhésine est une protéine affine pour le calcium (Brewin *et al.*, 1992 ; Madigan *et al.*, 2007), elle opère en se fixant sur des complexes calcique à la surface des poils absorbants générant ainsi une oscillation en ions Ca_2^+ . D'autres substances comme les **lectines**, qui sont des glycoprotéines végétales, ainsi que des récepteurs spécifiques présents au niveau de la paroi des cellules végétales jouent également un rôle dans la reconnaissance et l'attachement des bactéries à la plante (Madigan *et al.*, 2007). D'autres facteurs physico-chimiques pourraient également jouer un rôle dans l'attachement (Hopkins, 2003)

5.1.1.4. Infection

L'infection des racines peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures, ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002). Au cours de l'infection, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire et par conséquent la bactérie est entourée par la paroi végétale dans une zone confinée. La croissance des nodosités se poursuit dans les régions infectées de l'écorce et du péricycle, jusqu'à ce que ces deux masses de cellules fusionnent et forment la nodosité.

5.1.1.5. Recourbement des poils absorbants et formation du cordon d'infection

Même sans attachement bactérien, la molécule de signalisation lipooligosaccharide (EPS) dérivée des Rhizobia infectants est suffisante pour causer le recourbement des poils absorbants (Brewin, 1992).

Lors de ce stade de la nodulation, la bactérie doit traverser la paroi de la cellule hôte de façon à entrer dans l'espace situé entre la paroi et le plasmalemme (Hopkins, 2003).

L'infection a lieu par les jeunes poils absorbants de la racine. Dès la reconnaissance du Rhizobia spécifique, des modifications structurales apparaissent dans les toutes premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologique du poil absorbant : dépolarisations membranaires, modification de concentrations du Ca^{2+} intracellulaire, augmentation de pH et fragmentation de l'actine (Duhoux *et al.*, 2004). L'activation des cellules du cortex interne conduit à des divisions, **anticlines** puis **périclines**, et à l'édification progressive d'un méristème « nodulaire » qui sera à l'origine du futur nodule (Duhoux *et al.*, 2004).

Certains des poils absorbants infectés se courbent et forment une « crosse de berger » à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient. C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former un cordon d'infection (Duhoux et al., 2004). Le cordon d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse par endocytose les rhizobiums dans les cellules du méristème nodulaire.

5.1.1.6. Développement du nodule

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkins et al., 2003). L'infection de la plante par les Rhizobia induit la dédifférenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi., 2000). Les mêmes auteurs rapportent que les nodules de type indéterminé (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*, *Vicia sativa*) sont formés à partir du cortex interne alors que les nodules de type déterminé (*Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioides*, *Phaseolus vulgaris*) sont formés à partir du cortex externe.

La persistance du méristème chez les espèces à nodules de type déterminé est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules contenant déjà des rhizobia. Ce processus de formation se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules. Dans le cas des espèces à nodules de type indéterminé, la zone méristématique est persistante ce qui se traduit par une forme allongée. Dans les deux cas, les cellules du cortex se divisent de manière anticline puis péricline (Timmers et al, 2007).

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

De manière concomitante, les cellules voisines développent des cordons de pré-infection, constitués de ponts cytoplasmiques alignés de façon radiale (Van Brussel et al, 1992). Ces structures guident la croissance des cordons d'infection en direction du primordium nodulaire en formation. L'utilisation d'inhibiteurs du transport d'efflux d'auxine entraîne la formation de « pseudo-nodules » (Fang et Hirsch, 1998) suggérant un rôle de l'auxine dans la formation du nodule. De plus, les facteurs *Nod* produits par *Rhizobium* avant l'infection entraînent une modification de la balance hormonale de la plante.

Le nombre de nodules et leur masse sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Duhoux, 2004).

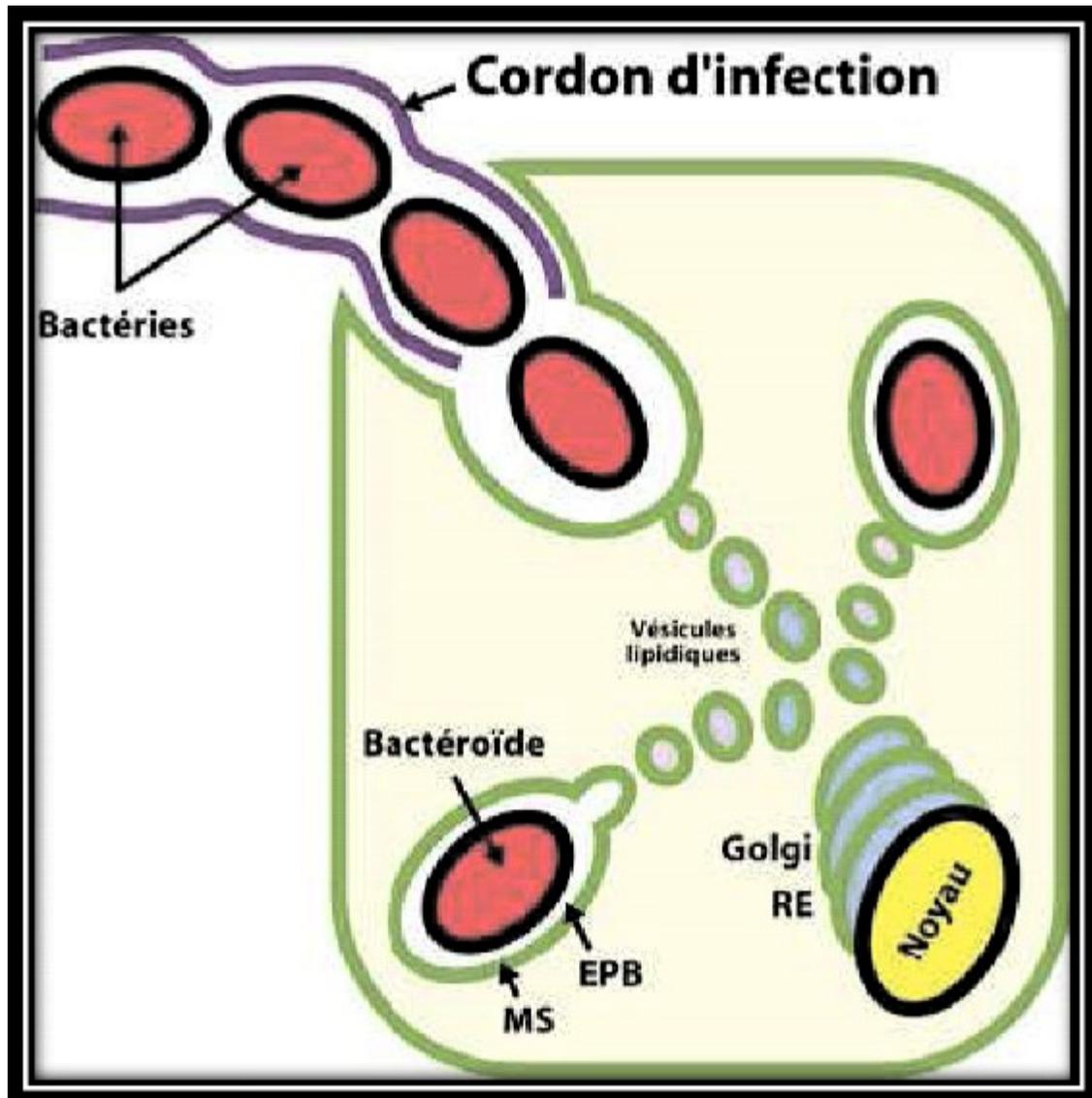


Figure N°04 : Infection intracellulaire et différenciation du Symbiosome chez les Légumineuses (Patriarca et al., 2004.)*

*EPB : espace pér bactéroïdien.

MS : membrane du symbiosome.

RE : réticulum endoplasmique.

Les bactéries sont déversées dans la cellule végétale par fusion des vésicules lipidiques avec l'extrémité du cordon d'infection. La différenciation en bactéroïdes commence alors.

5.2. Formes des nodules

Le nodule achevé peut prendre deux formes : soit cylindrique, avec un méristème apical, une croissance indéterminée et un système conducteur ramifié (*Vicia, Trifolium...*), soit sphérique, avec une croissance définie et des éléments conducteurs en forme d'arc, ayant un débouché commun dans le système conducteur de la racine (*Phaseolus, Lotus...*) (Richter, 1993)

5.3. Structure du nodule

L'infection du nodule indéterminé se fait par sa base, ce qui établit un gradient de différenciation et définit, selon Pawlowski et Bisseling (1996), plusieurs zones (Figure N°05):

-la zone méristématique (zone I) située à l'apex. Cette zone est toujours dépourvue de bactéries.

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

L'interzone II-III dans laquelle la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote commence. Cette zone se caractérise par la présence de nombreux amyloplastes.

-La **zone de fixation** (zone III) où les bactéroïdes pleinement différenciés fixent activement l'azote.

-La **zone de sénescence** (zone IV) qui est présente chez les nodules âgés. Les nodules de Légumineuses présentent une structure similaire à celle d'une tige avec les tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et une zone centrale infectée par les Rhizobia. De la périphérie vers l'intérieur du nodule, on trouve :

- a) le cortex externe constitué en majorité par des cellules parenchymateuses
- b) le cortex moyen
- c) les tissus vasculaires constitués surtout de phloème et entourés par un endoderme et un péricycle
- d) le cortex interne formé de une à trois couches de cellules
- e) le parenchyme central qui contient les cellules infectées par les rhizobia et des cellules non infectées.

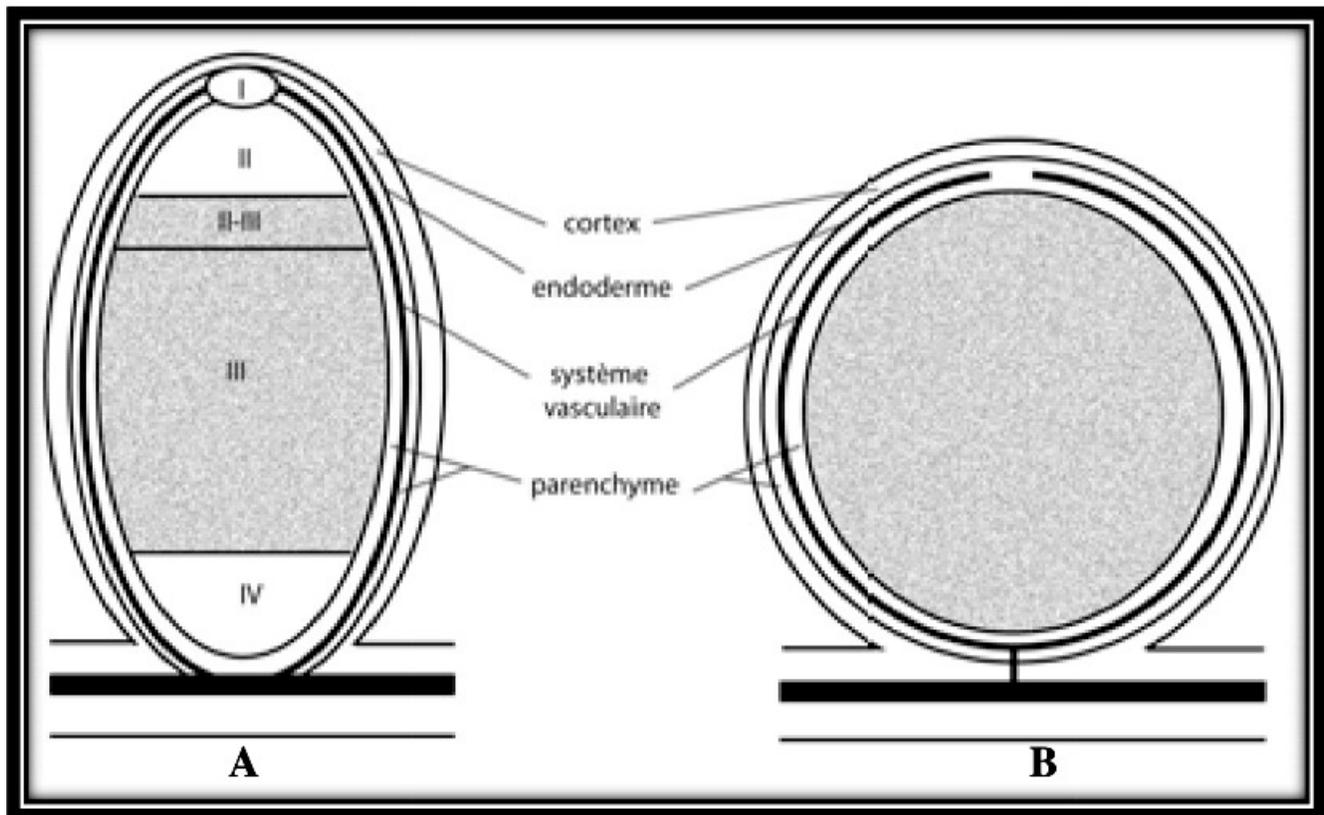


Figure N°05: Structure des nodules de légumineuses et des plantes actinorhiziennes. (Pawlowski et Bisseling, 1996).*

* A : Nodule de Légumineuse de type indéterminé. B: Nodule de Légumineuse de type déterminé.

I : zone méristématique ; II : zone d'infection ; II-III : interzone ; III : zone de fixation ; IV : zone de sénescence.

CHAPITRE III : Intérêts des légumineuses.

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) (Somasegaran et Hoben, 1994). 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 (Baudoin *et al.*, 2001).

Selon Abdelguerfi (2001), *Lotus edulis* présente un nombre important de nodosité tout au long de son cycle de développement d'où l'intérêt à le conseiller pour améliorer les sols les moins fertiles.

2. Intérêt alimentaire des légumineuses

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des Légumineuses. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale (Abdelguerfi, 2001) Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18 à 30% de la graine sèche) (Baudoin *et al.*, 2001).

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 (Hammadache *et al.*, 1998 et Houmani, 1999). De ce fait, l'utilisation d'espèces spontanée afin de remédier à ce déficit peut augmenter le taux de couverture des besoins à plus de 65% (Nacef *et al.* 2008).

En effet, *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioïdes* et *Vicia sativa* sont riche en matière azoté totale se qui leur 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% (Nacef *et al.* 2008).

Selon Nacef *et al.* (2008), la digestibilité de la matière sèche de *Lotus edulis* et *Lotus ornithopodioïdes* évolue au cours de leur cycle de développement après avoir atteint sont pique elle diminue significativement du stade végétatif au stade grenaison (Zitouni, 2004.).Cependant Nacef *et al.* (2008) rapportent que cette diminution est plus importante

chez, *Lotus ornithopodioides* que chez *Lotus edulis*.

Les résultats de **Boutahraoui et al.(2006)** concernant la composition chimique de *Vicia sativa*, *Lotus edulis* et *Lotus ornithopodioides* au stade floraison est synthétisé dans le tableau 1

Tableau 01: Composition chimique *Lotus edulis* et *Lotus ornithopodioides* au stade floraison (Boutahraoui et al.,2006)

Espèce		<i>Lotus edulis</i>	<i>Lotus ornithopodioides</i>
Composant			
MS%		27.61 ± 0.77	31.24 ± 2.29
En % de MS*	MO*	90.13 ± 0.84	89.86 ± 0.15
	CB*	24.51 ± 0.21	24.23 ± 1.54
	MAT*	14.16 ± 0.30	14.52 ± 0.35
	MM*	9.86 ± 0.84	10.13 ± 0.15
	P*	0.16 ± 0.09	0.17 ± 0.08

*MS : Matière sèche

*MAT : Matière azoté totale

*MO : Matière organique

*MM : Matière minérale

*CB : Cellulose brute

*P : Phosphore

Lotus edulis et *Lotus ornithopodioides* sont riche en CB qui est une source non négligeable d'énergie pour les ruminants, et bien pourvus en MAT, 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'augmenté en qualité et en quantité l'offre fourragère en Algérie (**Boutahraoui et al., 2006**)

3. Intérêts scientifiques

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 (Baudoin *et al.*, 2001).

Les principaux objectifs de recherche, sur 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 (Somasegaran et Hoben, 1994).

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 (Baudoin *et al.*, 2001).

Les légumineuses en générale et les *Lotus* en particulier sont, selon Akiko Ike *et col.* (2006), d'excellents dépolluant telluriques qui peuvent être préconisé en phytoremédiation.

CHAPITRE VI : Introduction à la phytoremédiation

1. Introduction :

La phytoremédiation n'est pas un concept nouveau (Walton et Anderson, 1992 ; Cunningham et Lee, 1994) : 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 (Walton et Anderson, 1992).

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

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 (Cunningham *et al.*, 1995).

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

a. Polluants élémentaires :

- Les éléments traces métalliques (communément appelés "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.

b. Polluants organiques :

- * Carbohydates linéaires halogénés : trichloréthylène (TCE)
- * Composés nitro-aromatiques : trinitrotoluène (TNT)
- * Polychlorés diphényles (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* (Bert et al., 2000) et chez *Thlaspi caerulescens* (Meerts et Van Isacker, 1997).

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 (Ernst, 1988).

Elle comprend alors trois aspects (Figure 05 selon Salt et al., 1995) :

1. **Phyostabilisation** : 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 (Salt et al., 1995) 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 al. (1995) précisent que les microorganismes de la rhizosphère augmentent les transformations biochimiques des polluants.

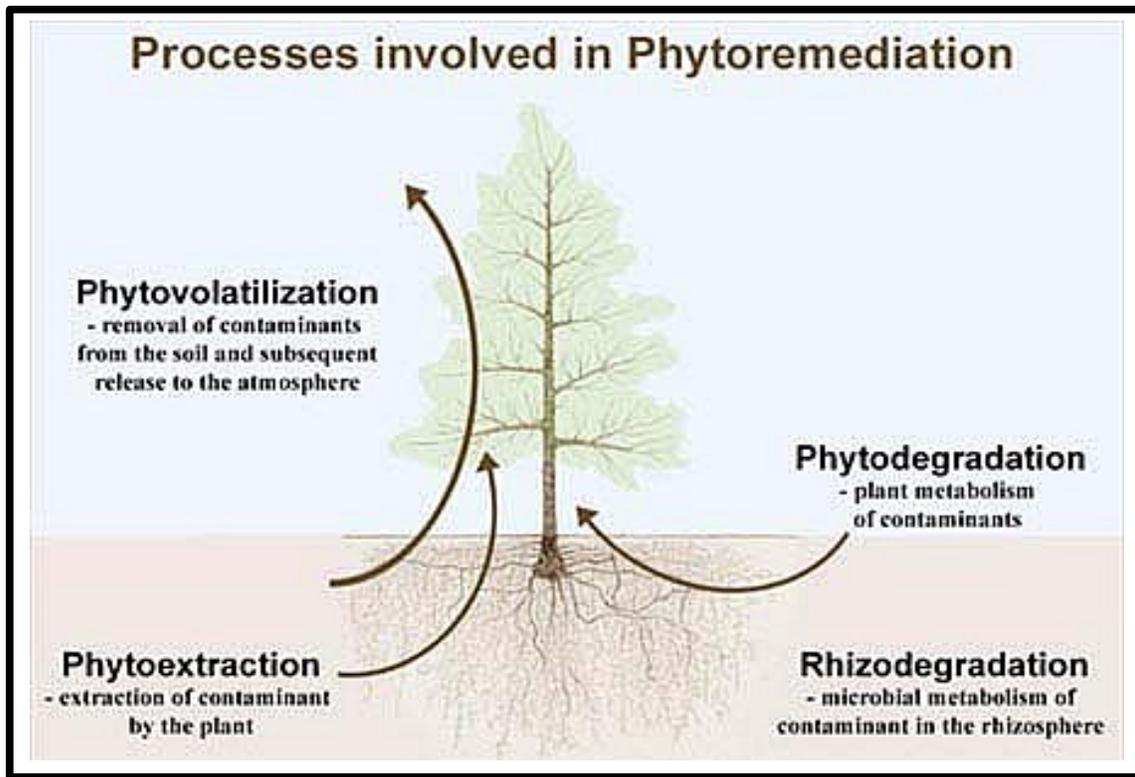


Figure N°06: les processus impliqués dans la phytoremédiation (Salt et al., 1995)

4. Les éléments traces métalliques ou Métaux lourds :

Les polluants sont les rejets de composés toxiques que l'Homme libère dans l'écosystème, mais aussi les substances qui, sans être vraiment dangereuses pour les organismes, exercent une influence perturbatrice sur l'environnement (Ramade, 1992).

Les effets des polluants sur les populations végétales (effets démo-écologiques des polluants) résultent de leur toxicité aiguë ou à long terme. Les concentrations des polluants sont, dans la plupart des cas, sublétales : leurs effets ne se manifestent pas au travers de la mortalité, mais de façon indirecte en modifiant la croissance et/ou la reproduction des espèces les plus affectées, ou encore la photosynthèse chez les végétaux (Ramade, 1992).

4.1. Définitions, origine et importance des éléments traces métalliques :

Les éléments traces métalliques (ETM), sont des éléments dont la concentration dans la croûte terrestre est inférieure à 1 g/kg. Cette définition est aujourd'hui utilisée à la place du terme « métaux lourds » (métaux qui possèdent des masses volumiques supérieures ou égales à 5 g/cm³), celle-ci étant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique (Miquel, 2001).

À ces éléments métalliques sont associés souvent les métalloïdes comme l'arsenic ou le sélénium.

Une classification chimique de l'ensemble des métaux a été proposée (Tessier *et al.*, 1995 ; Stumm *et al.*, 1996). Les métaux sont répartis en trois classes : la **classe A**, la **classe B** et la **classe intermédiaire** ou **éléments de transition**.

Les exploitations des métaux sont très diversifiées, depuis les additifs de plomb dans les carburants jusqu'aux sels d'argent de l'industrie photographique, au nickel ou au cadmium des batteries d'accumulateurs, au zinc des gouttières ou au chrome des aciers inoxydables, au cuivre de l'industrie électrique ou à l'arsenic ou le cadmium des produits phytosanitaires.

Les sources de contamination sont par conséquent aussi multiples. Durant toutes les phases d'élaboration, d'utilisation et/ou de recyclage de ces produits, des métaux sont rejetés dans l'environnement, soit directement dans les eaux continentales ou marines, soit dans l'atmosphère transportés par les vents, associés aux aérosols avant de se déposer par voie sèche ou humide à la surface de la terre ou des océans (Chiffolleau *et al.*, 2001). Le flux des éléments traces métalliques (ETM) dans l'environnement peut également provenir des sources naturelles (de l'érosion des roches, des sols et les émissions volcaniques) ou des activités anthropogéniques (industries, transport, agriculture) (Nicholson *et al.*, 2003 ; Drost *et al.*, 2007).

Les rejets des ETM toxiques dans l'environnement représentent un sérieux problème de pollution affectant la qualité des eaux et des sols, d'où le danger direct pour la santé humaine. Du fait de leur stabilité et de leur persistance dans l'environnement, les ETM sont propices au transport et à l'accumulation dans certains compartiments de l'environnement et peuvent engendrer des effets sur les organismes vivants. En outre, certains éléments, comme le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn) et le fer (Fe), sont indispensables aux organismes vivants mais peuvent devenir toxique à des doses importantes. D'autres ETM tels que, le plomb (Pb), le mercure (Hg) et le cadmium (Cd), ne sont pas indispensables aux processus métaboliques mais ils perturbent souvent le cours normal de ceux-ci, même à l'état de trace (*Tableau N°02*). À l'exception de faibles doses tolérables, de tels métaux ont souvent un effet toxique (Bliefert *et al.*, 2001).

Tableau N°02 : Classification de quelques ETM selon leur densité et leur toxicité (Bliefert et al., 2001)

Métaux	Effet sur les plantes	Effet sur les animaux	Densité
Platine (Pt)	Toxique	ND*	21,4
Mercure (Hg)	Toxique	Toxique	13,59
Plomb (Pb)	Toxique	Toxique	11,34
Molybdène (Mo)	Essentiel	Essentiel / Toxique	10,2
Cuivre (Cu)	Essentiel / Toxique	Essentiel / Toxique	8,92
Nickel (Ni)	Toxique	Essentiel	8,9
Cobalt (Co)	ND*	Essentiel	8,9
Cadmium (Cd)	Toxique	Toxique	8,65
Fer (Fe)	Essentiel / Toxique	Essentiel / Toxique	7,86
Étain (Sn)	ND*	Essentiel	7,28
Chrome (Cr)	ND*	Essentiel	7,2
Manganèse (Mn)	ND*	Essentiel	7,2
Zinc (Zn)	Essentiel / Toxique	ND*	7,14
Vanadium (V)	Essentiel	Essentiel	5,96

*ND : Non-determiné

Certains éléments essentiels, de transition, comme le fer, le manganèse, le molybdène, le cuivre, le zinc et le nickel sont considérés comme des micro éléments par rapport à la faible quantité demandée par les plantes (Arnon et al., 1939).

Autres éléments de transition comme l'argent, l'or et le cobalt et les éléments de non transition tels que l'aluminium ont montré des effets similaires sur la croissance des plantes mais ne sont pas considérés comme éléments essentiels (Gomez et al., 1938 ; Ghanati et al., 2005). En outre, les plantes absorbent également des éléments qui n'ont pas de rôle biologique connu et sont même connus pour être toxiques à de faibles concentrations. Parmi ceux-ci, l'arsenic, le cadmium, le chrome, le mercure et le plomb. Toutefois, même les micronutriments peuvent être toxiques au-dessus de certains seuils.

Plusieurs ETM, connus par leurs rôles biologiques et comme éléments indispensables ; en excès, ils deviennent toxiques en facilitant la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Clijsters et al., 1999). Les ETM promoteurs de stress tels que le *cuivre* et autres éléments de transition produisent directement les ROS en participant dans les conversions des oxydants relativement stables en radicaux (Clijsters et al., 1999 ; Kohen et al., 2002). Les ROS générées par les métaux conduisent à la dégradation des lipides membranaires et des chloroplastes (Quariti et al., 1997 ; Eleftheriou et al., 1989).

D'autre part, le *cadmium*, métal fortement toxique et qui n'est pas redox actif, induit une augmentation de la production des ROS : indirectement, en remplaçant un métal essentiel en tant que cofacteur au niveau d'un site actif d'une enzyme, ou par dégradation de glutathion (Dietz et al., 1999 ; Cobbett et al., 2000). Les plantes, exposées à des concentrations élevées en ETM, manifestent généralement des symptômes observables (chlorose, atrophie, forme recroquevillée, non séparation des frondes) qui reflètent l'intensité et la diversité des perturbations engendrées par ces contaminants sur le fonctionnement cellulaire.

L'apparition de la chlorose après une contamination par le *cuivre* et/ou le *cadmium* a été reportée chez différentes espèces aquatiques comme par exemple les plantes vasculaires à racines (*Eichhornia crassipes* et *Hydrilla verticillata*) (Lewis , 1995), les algues (*Chlorella pyrenoidosa* et *Scenedesmus acutus*) (Vavilin et al., 1995). Ce phénomène de chlorose est un symptôme qui traduit la dégradation des pigments et des membranes consécutives à un stress oxydant (Heiser et al., 1998). En plus des chloroses, d'autres effets et symptômes, comme l'inhibition de la croissance et la formation d'individus atrophiés avec des formes recroquevillées, suggèrent des problèmes de division et/ou d'élongation cellulaire (Heiser et al., 1998).

L'inhibition de la croissance a souvent été observée en présence d'ETM tels que le *cuivre*, le *cadmium*, le *plomb* (Weckx et al., 1996). Le *cuivre* est le métal modèle dans le blocage de l'élongation dû au stress oxydant généré par ce dernier. Les dommages oxydatifs subis au niveau du plasmalemme peuvent également perturber les processus de croissance. Ainsi la dégradation des membranes plasmiques peut entraîner une perturbation des canaux ioniques potassiques, des transporteurs plasmalemmeux et ATP-ases avec pour conséquence des changements importants de l'homéostasie cellulaire (Demidchik et al., 1997).

4.2. Les éléments traces métalliques et les plantes des sites contaminés

Les plantes absorbent les éléments essentiels et non essentiels à partir des sols ou des eaux. La quantité d'éléments absorbée varie entre et au sein des espèces (Huang *et al.*, 1996 ; McGrath *et al.*, 2002). Des recherches ont montré que certaines plantes peuvent accumuler des métaux toxiques à fortes concentrations (Rahman *et al.*, 2007). Ces plantes caractérisées par leur pouvoir d'ajuster les effets toxiques d'un polluant sont capables de vivre dans des sites contaminés par des ETM/métalloïdes et constituent, ainsi, un bon candidat pour la phytoremédiation.

En effet, les plantes accumulatrices de fortes concentrations en métaux dans leurs tissus sont dites hyper-accumulatrices. Ce terme a été utilisé pour définir les plantes contenant dans leurs feuilles sèches des quantités supérieures à 1000 µg de Nickel/g (Baker *et al.*, 1989). Les plantes qui accumulent, dans leurs tissus, des quantités supérieures à 100 mg de Cadmium/kg (0.01%) ou supérieures à 500 mg de Chrome/kg (0.05%) peuvent être considérées comme des hyper-accumulatrices (Baker *et al.*, 1989).

4.3. Comportement, distribution et devenir de deux éléments de traces métalliques dans l'environnement : Cas du cadmium et du cuivre

Le cadmium (Cd) est accumulé dans les sols, par l'emploi des engrais super phosphatés qui favorise son passage dans les végétaux et dans les eaux. Les rapports indiquent que les concentrations de cadmium dans les sols non contaminés varient de 0,01 à 5 mg/kg de sol (Kabata-Pendias , 2004); toutefois, les engrais produits à partir de minerais de phosphate constituent une source importante de pollution par ce métal (Chen *et al.*, 2007). En outre, l'élimination inadéquate de déchets contenant du cadmium a augmenté ses émissions dans des zones peuplées dans le monde (Jarup , 2003).

À travers les dépôts atmosphériques (secs ou humides), les applications en agriculture, les déchets solides ou encore les boues provenant des stations d'épuration, le cuivre (Cu) arrive en majeure partie dans le sol. Dans ce compartiment, la plus grande partie du cuivre est fortement adsorbée et demeure dans les centimètres supérieurs du sol (Adriano, 2001). La nature du sol (pH, composition chimique et granulométrie) conditionne de façon importante son transfert vers le milieu aquatique. Le lessivage et l'érosion des sols, mais aussi les rejets ponctuels et diffus sont à l'origine de la présence du cuivre dans l'eau.

Le cuivre présente, comme d'autres métaux (Fe, Al, Zn), la particularité d'être à la fois essentiel et toxique au-dessus d'une certaine concentration. Son caractère essentiel est lié à son implication dans au moins 12 protéines importantes. Il joue en particulier un rôle important dans l'utilisation du fer pour la formation de l'hémoglobine. À titre d'exemple, la plupart des crustacés et des mollusques possèdent une protéine, l'hémocyanine, qui contient du cuivre et représente leur principal transporteur d'oxygène. Dans le cas des végétaux, le cuivre entre dans la composition de plusieurs enzymes qui interviennent dans le métabolisme des sucres, de l'azote et de la paroi cellulaire (Küpper *et al.*, 1996).

PARTIE II :

Matériels et méthodes

CHAPITRE I :

Présentation du site d'échantillonnage

I. Situation géographique :

La zone d'étude de nos échantillonnages se situe au niveau de la station expérimentale de l'université de BLIDA. Elle est située en contrebas du piedmont de l'Atlas Blidéen à 4,4 Km au Nord-est de la ville de Blida. Limitée à l'Ouest par la commune de Soumâa, à l'Est par la commune de Ouled Yaich, au Nord par la commune de Guerrouaou et au Sud par le mont de Chréa.

La station expérimentale est localisée dans la partie sud de la plaine de la Mitidja, c'est la plus vaste plaine sublittoral d'Algérie. Elle s'étend sur une largeur de 05 à 20 Km et une longueur de 100 Km et couvre une superficie de 140 000 ha (**Mutin, 1977**). Elle est limitée au nord par la ride du Sahel (qui l'isole de la mer), à l'Ouest par les montagnes du mont Chenoua, à l'Est par un ensemble de montagne et de collines de la Kabylie et au Sud par l'Atlas Blidéen. Elle est entre les latitudes $36^{\circ}29$ et $36^{\circ}30$ et les longitudes $3^{\circ}35$ et $3^{\circ}45$.

II. Données pédologiques :

Selon **Ait ouarab (2000)**, **Amrouche (2000)** et **Mallou (2000)**, 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, entre 6,5 et 7,5
7. Le complexe absorbant est saturé au niveau de tous les horizons
8. Les sols renferment de bonnes réserves minérales notamment en phosphore assimilable et en potassium
9. La teneur en azote est faible

En générale les caractéristiques physiques et chimiques du sol sont représentées dans les tableaux 03 et 04.

Tableau N°03 : les caractéristiques physiques du sol :

Composition granulométrique (%)					% de MO	% de Calcaire	% de cailloux et de graviers	Perméabilité K/m/h
<i>Argile</i>	<i>Limon fin</i>	<i>Limon grossier</i>	<i>Sable fin</i>	<i>Sable grossier</i>				
16.36	24.12	16.26	14.28	28.98	1.89	00	30	0.242

Source : Ait ouarab (2000), Amrouche (2000) et Mallou (2000)

D'après ces données on constate 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 N°04 : les caractéristiques chimiques du sol :

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

Source : Ait ouarab (2000), Amrouche (2000) et Mallou (2000)

D'après les paramètres chimiques dans le **tableau 02**, on note que le pH du sol est neutre, non salé, très riche en phosphore, un complexe absorbant à C.E.C moyenne et saturée en base Ca^{2+} et Mg^{2+} .

III. Données Climatique :

III.1. Température et pluviométrie :

Ces deux paramètres sont parmi les principaux facteurs influant sur le développement des plantes. L'étude de ces paramètres, objet de notre étude, est plus que nécessaire. La température et la pluviométrie sont des paramètres climatiques essentiels pour définir la période sèche ainsi que la période humide dans l'année.

Nous utilisons les variations mensuelles des températures ainsi que de la pluviométrie dans la région de Blida 1995 à 2010 (**Tableau N°05**), afin de réaliser le diagramme Ombrothermique de Gaussen et de Bagnouls et le climagramme d'Emberger.

Tableau N°05: Variations mensuelles des températures et de la pluviométrie dans la région du Blida durant la période 1995-2010

Mois	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.	Mai.	Jun.	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	$\Sigma = 670,82$

Source : ANRH, 2011.

III.1.1. Diagramme Ombrothermique

Le diagramme Ombrothermique de **Gaussen** permet de représenter les précipitations des saisons humides et sèches au cours de l'année. Une période est considérée sèche lorsque les précipitations sont égales ou inférieures au double de la température exprimé en degrés Celsius ($P \leq 2T$).

A partir de cette hypothèse, nous traçons le diagramme Ombrothermique sur lequel sont portés en abscisse les mois et en ordonnées les températures mensuelles moyennes et la pluviométrie (Figure N°07) où $1^{\circ}\text{C} = 2\text{mm}$.

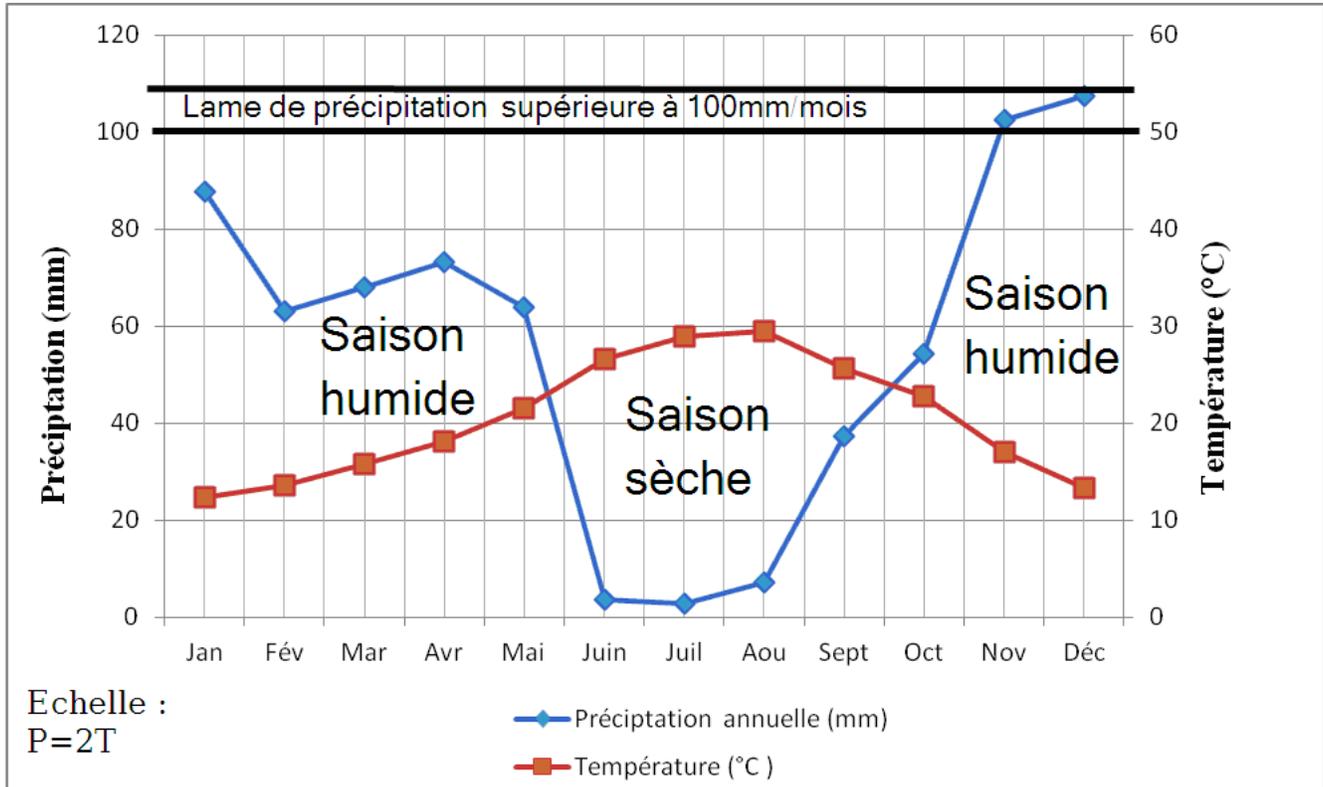


Figure N°07: Diagramme Ombrothermique pour la région du Blida (1995-2010) d'ARNH (2011)

Nous remarquons nettement sur le diagramme Ombrothermique, de la station expérimentale, 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,

III.1.2. Quotient pluviométrique d'Emberger :

Notre climat est de type méditerranéen, il se caractérise par un été chaud et sec ($T^{\circ} : 37.00$ et $P : 2.69$), et un hiver frais et pluvieux ($T^{\circ} : 4.49$ et $P : 107.4$).

Emberger in Mutin (1977), définit un quotient pluviométrique permettant de distinguer les différentes nuances du climat méditerranéen. Nous avons utilisé la formule de Stewart (1969) adapté pour l'Algérie, qui se présente comme suit:

$$Q3 = \frac{3,43 \cdot P}{M-m}$$

Q3 : Quotient pluviométrique d'Emberger.

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.

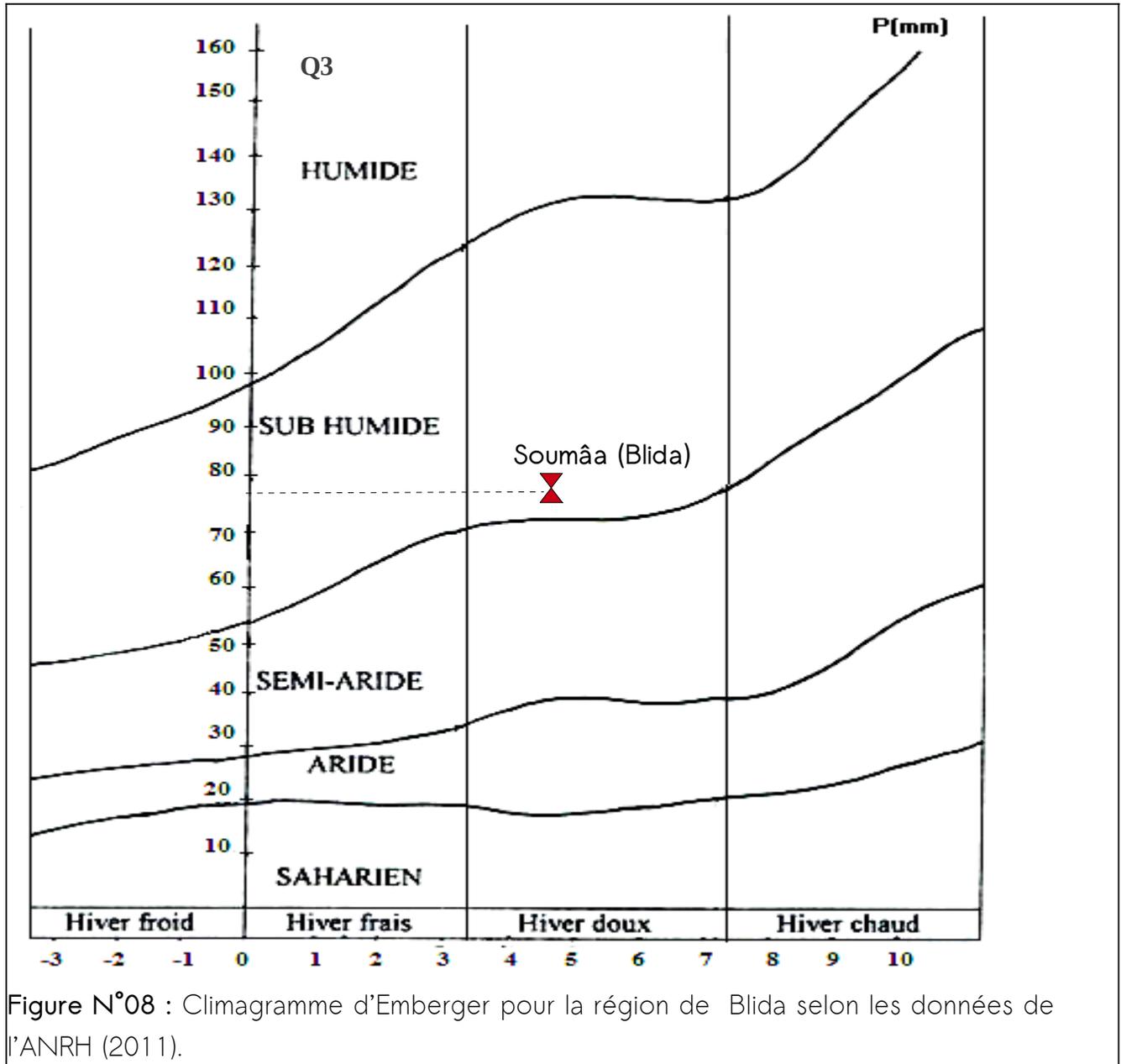
Ce quotient nous permet de classer les stations de la zone méditerranéenne au sein d'étages bioclimatiques où nous introduisons des divisions on se basant sur la température minimale selon les valeurs de « m ». Selon Mutin (1977), nous distinguons pour différents étages : un hiver froid, frais, tempéré ou chaud. Sur cette base nous dressons un graphique pluviométrique de la zone méditerranéenne en portant la valeur de « Q3 » en ordonnées, et « m » en abscisse.

Les calculs du quotient pluviométrique de notre station sont représentés dans le tableau N°06

Tableau N°06 : Calculs personnels du quotient pluviométrique.

Données	
Précipitation annuelle. P (mm)	670,82
Température moyenne maximale du mois le plus chaud (<i>Août</i>). M (°C)	37
Température moyenne minimal du mois le plus froid (<i>Janvier</i>). m (°C)	4,48
Amplitude Thermique. M-m (°C)	32,51
Quotidien pluviométrique d'Emberger pour l'Afrique du nord. Q3	70,36

Le climagramme pluviométrique d'Emberger, nous permet de situer la station expérimentale de l'université de Blida dans l'étage bioclimatique subhumide supérieure, variant à hiver doux (Figure N°08)



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 à été sec (4.51mm).

CHAPITRE II : Méthodes expérimentales

I. Matériel biologique :

L'échantillonnage de *Lotus ornithopodioïdes* a été effectué au niveau de deux stations. La première, dans la parcelle jouxtant les serres de cultures maraichère (A), la seconde attenante à L'ARENE de la station expérimentale de l'université de Blida (B). (Photo N°02).

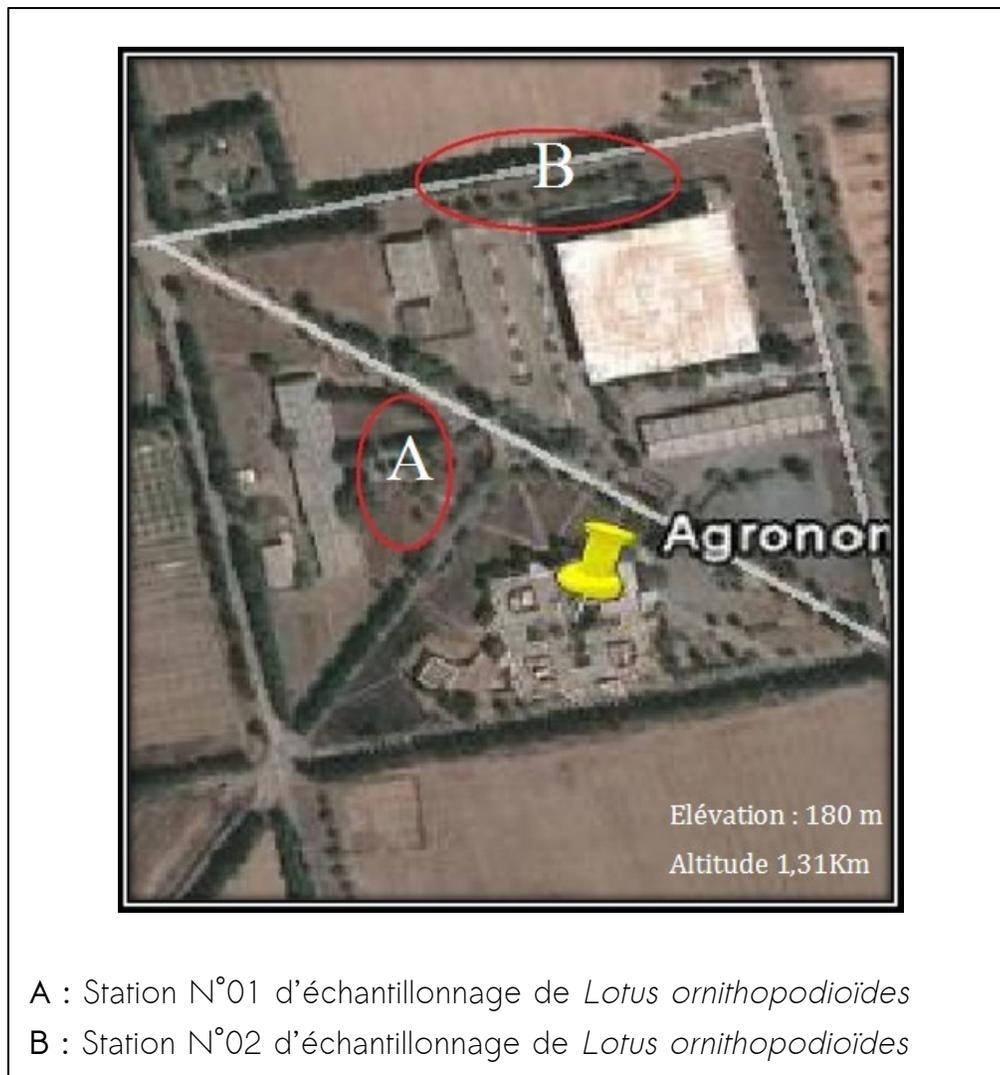


Photo N°02 : Localisation des sites d'échantillonnages (Photo satellite, Google™earth, 2012©)

*Position systématique :

La systématique de l'échantillon est résumée dans le Tableau N°07 qui suit.

Tableau N°07 : Position systématique de l'échantillon selon Quezel et Santa (1962).

Taxon	Échantillon
Règne	<i>Planta</i>
Embranchement	<i>Spermaphyta</i>
Sous- embranchement	Magnoliophyta
Classe	Dicotylédones
Série	Caliciflorres
Ordre	<i>Rosal</i>
Famille	<i>Faboideae</i>
Sous-famille	<i>Papilionaceae</i>
Genre	<i>Lotus</i>
Espèce	<i>ornithopodioïdes</i>

II. Biométrie des échantillons

Se fait par la méthode classique où on mesure en centimètre, la longueur des tiges, des racines et leurs nombres, ainsi que le dénombrement des nodosités sur le système racinaire. (l'échantillonnage c'est fait durant l'année 2011)

III. Collecte des nodules

La sélection et l'échantillonnage des nodules doit être réalisée durant la période où la plante est en pleine activité. La récolte est effectuée au printemps entre le mois de Mars et Avril quand le sol est relativement sec. À cette période de l'année les nodules sont bien développés et visibles au niveau des racines, de couleur rougeâtre attestant de la présence de lég-hémoglobine (**LegHb**) et la fixation active de l'azote.

La collecte est réalisée suivant la méthode de **Vincent (1970) et Beck et al ., (1993)**. On effectue une creusée d'environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur afin de récupérer tout l'appareil racinaire. On retire ensuite délicatement la **rhizosphère** à la main ; les échantillons sont placés dans des sacs en papier et transportés immédiatement au laboratoire.

Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau puis, à l'aide d'un bistouri, les nodules sont détachés à 1-2mm du site d'attache, puis séchés avec du papier filtre avant leur conservation.

IV. Conservation des nodules

La méthode utilisée est celle décrit par **Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994)**. La dessiccation consiste à remplir à moitié des flacons stériles de CaCl_2 (pour une absorption maximale de l'humidité), Ensuite on place une couche suffisante de coton sur laquelle seront déposés les nodules (Photo N°03).

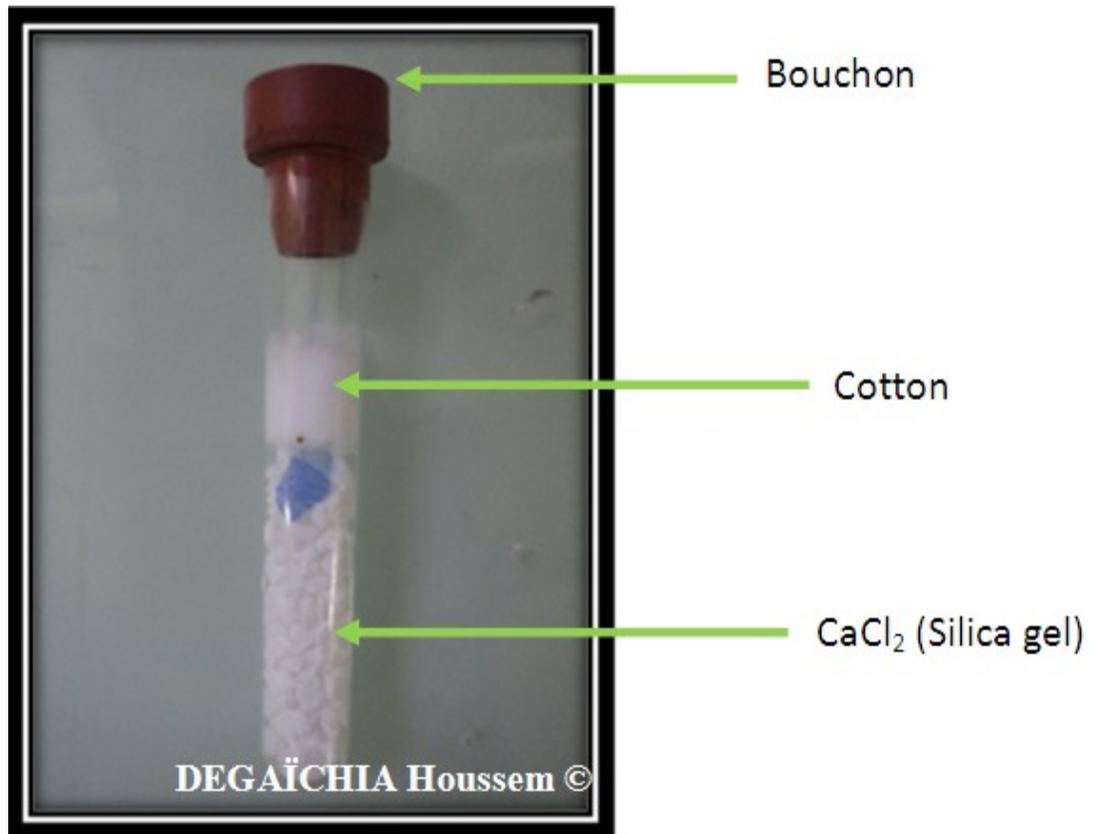


Photo N°03: Conservation des nodules sous CaCl₂ (Photographie personnelle)

V. Isolement des souches à partir des nodules :

La technique d'isolement des bactéries est celle décrite par Vincent(1970) et Somasegaran et Hoben (1994).

Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que ceux qui sont conservés par dessiccation sont réhydratés en les plaçant dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur à 4°C, puis pendant 1 heure à la température ambiante.

V.1. Principaux milieux de culture utilisés :

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, (composition **Annexe 1**)

V.2. Stérilisation des nodules :

Les nodules intacts sont transférés dans une boîte de Petri stérile, immergé dans l'éthanol à 95° pendant 05 à 10 secondes, puis transférés rapidement dans le Chlorure de mercure (acidifié à 0.1%) pendant 03 minutes. Nous effectuons ensuite un rinçage des nodules 10 fois à l'eau distillée stérile puis on les laisse gonfler.

V.3. Écrasement des nodules

Dans une boîte de Petri stérile ayant reçue au préalable deux (02) gouttes d'eau distillée stérile, sont déposés des nodules stériles, un nodule au niveau de chaque par goutte. Les nodules sont ensuite écrasés à l'aide d'une pince stérile (stérilisée par immersion dans l'éthanol puis flambée au bec Bunsen).

VI. Identification du genre bactérien :

VI.1. Isolement des souches :

Après écrasement et obtention d'un jus trouble, à l'aide d'une anse àensemencer, la suspension est prélevée et étaler selon la technique des quatre cadrans (**Vincent, 1970**) (**Photo N°04**) sur gélose coulée en boîte [YMA+RC pour l'isolement, sur YMA+BTB pour la vitesse de croissance et sur GPA+BCP pour l'absence de contaminant (**Annexe 01**)]. L'incubation est réalisé à 30°C pendant 72 heures (un suivit par *observation est effectué chaque jours*).

Avant l'écrasement, pour confirmer la pureté des nodules, nous étalons le nodule tel quel immédiatement sur des boîtes. *Cette manipulation doit être effectuée dans des conditions d'asepsie contrôlée, sur des milieux stériles à proximité du bec Bunsen, sous hotte à flux laminaire.*

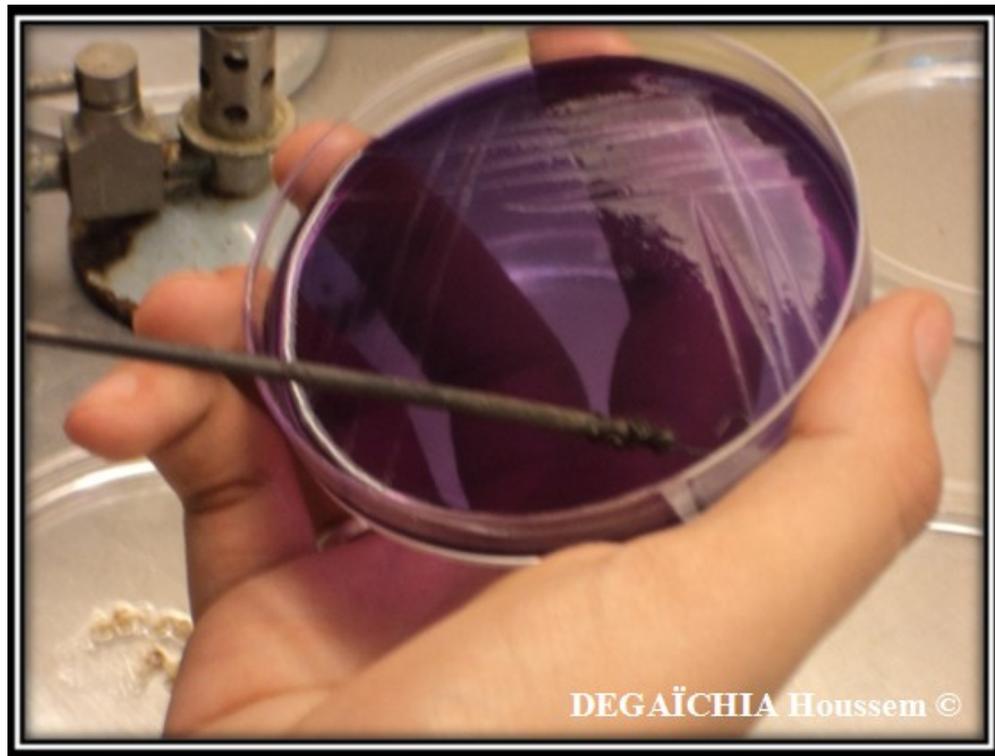


Photo N°04 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans sur le milieu GPA+BCP selon Vincent (1970) (Photographie personnelle).

VI.2. Caractères cultureux des isolats :

VI.2.1. Examen de la mobilité :

A l'aide d'une anse à ensemencer, on ensemence par piqûre centrale un tube contenant du milieu Mannitol mobilité (**Annexe 1**) d'un *inoculum* bactérien âgé de 24 heures, puis incubé pendant 24 heures à 30°C, l'observation se fera immédiatement après.

VI.2.2. Examen microscopique après coloration (Coloration de Gram) :

Prélevé à partir des cultures sur YMA+RC, un frottis est réalisé sur lames, bien étalé en couche mince, séché et fixé à la chaleur (**Annexe 2**).

VI.2.3. Production d'Exo-polysaccharides (EPS) :

La capacité des isolats à produire les Exo-polysaccharides, est réalisée selon le protocole proposé par **Jordan (1984)**. Des boîtes de Petri contenant le milieu YMA+CFW

(Annexe 1) sontensemencées et incubées à 28°C durant 24 heures, nous procédons à l'observation immédiatement après sous lampe à U.V à une longueur d'onde de 270 nm

VII. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des éléments de trace métallique (ETM) (Filali B.K et *al.*,2000 modifié pour le genre *Bradyrhizobium* en se basant sur Jordan, 1982)

Pour l'expérimentation on utilise le Chlorure de cuivre (CuCl_2) et le Chlorure de cadmium (CdCl_2). ces deux composés sont très présents dans les écosystèmes et dans l'industrie phytosanitaire, comme reporté dans la bibliographie.

Après identification du genre bactérien, et afin d'évaluer sa résistance vis-à-vis des ETM, 2ml d'une pré-culture diluée à 1% sont prélevés puisensemencés dans deux séries de flacons contenant du milieu TY (Annexe 1) ayant reçus différentes concertations de CuCl_2 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à 6000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ,(Série n°1) et de CdCl_2 (Série n°2) (Photo N°05) et incubés à une température ambiante (de 28-30°C) durant 07 jours en agitation de 100 rpm (Photo N°06). La densité optique à $\lambda=600\text{nm}$ ($\text{D.O}_{\lambda 600}$) et ainsi mesurée (Photo N°07) afin d'évaluer la concentration inhibitrice minimale des ETM. La CMI est définit comme étant la plus basse concentration qui n'occasionne aucun développement visible (Filali B.K et *al.*,2000)



Photo N°05: Série de flacon de TY contenant différentes concentrations d'ETM (Exemple du CuCl_2) (Photographie personnelle).



Photo N°06: Incubation avec Agitation (agitateur INNOVA™ 2300 à 100 rpm) (Photographie personnelle)

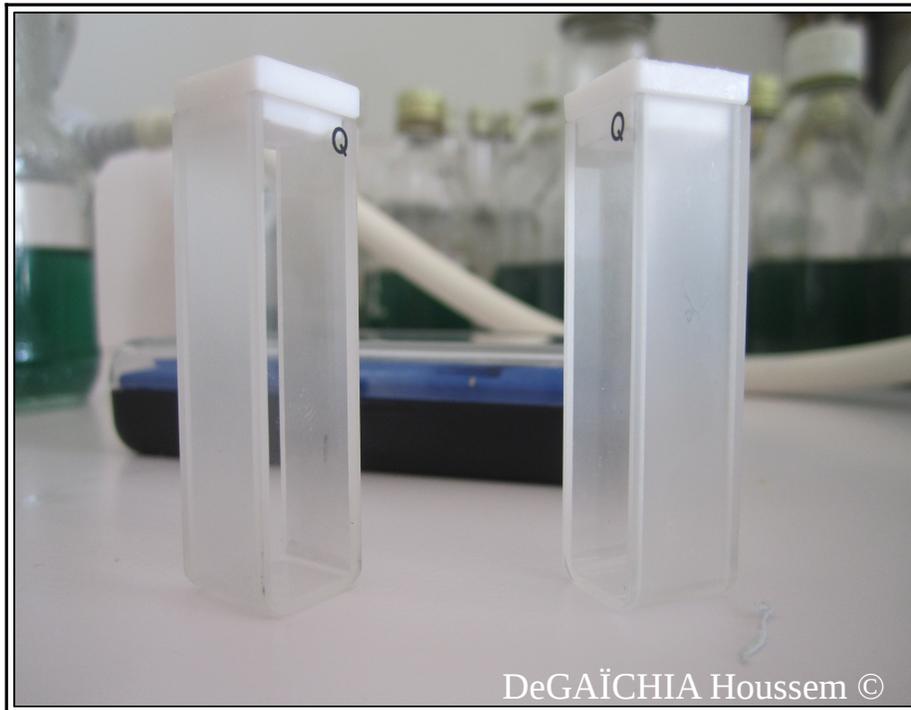


Photo N°07: Cuve en Quartz pour la lecture de la $D.O_{\lambda 600}$ (Photographie personnelle)

VIII. Conservation des souches

Les souches pour leur conservation, sont d'abordensemencées dans des tubes à essai contenant 09ml de bouillon YMB (**Annexe 1**) afin d'enrichir la culture puis incubés pendant 24 heures dans un bain-marie avec agitation à une température de 30°C.

Le choix d'un procédé assurant la parfaite stabilité des microorganismes et leur survie prolongée dépend :

- De la nature du microorganisme à conserver.
- Des besoins du laboratoire et de ses moyens.

Il existe plusieurs techniques de conservation. Deux méthodes sont utilisées :

- La première est la conservation sur YMA additionné de 01 à 03g/l de $CaCO_3$ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes puis inclinés que l'on ensemence avec des inoculum bactérien en phase exponentielle. Les souches sont

incubées à 30°C pendant 72 heures, puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de **6 à 12 mois** (Vincent ,1970).

- La deuxième méthode, adoptée dans notre expérimentation, est la conservation sur YMA additionné de 30% (v/v) de glycérol. Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes Eppendorf inoculés par piqûre centrale, incubées pendant 24 à 48 heures à 30°C, ensuite, mises en conservation pour une longue durée dans un congélateur à -20°C (Krasova-Wade, 2003).

PARTIE III :

Résultats et discussions

I. Echantillonnage:

I.1. Caractéristiques et biométrie des échantillons :

Lotus ornithopodioides présente un nombre suffisants de caractères permettant d'identifier le genre grâce à l'appareil végétatif , feuilles, tige et surtout fleurs. A maturité, les fruits (gousses) nous ont permis de caractérisés l'espèce. Les caractères distinctifs sont notés dans le **tableau N°08** ci dessous

Tableau N°08 : Caractéristiques de *Lotus ornithopodioides* des sites d'échantillonnages (Quezel et Santa (1962)

Nom scientifique	Nom commun	Tiges et racines	Feuilles et folioles	Fleurs	Gousses et graines
<i>Lotus ornithopodioides</i> (Photo N°08)	Lotier à pied d'oiseau	Plante annuelle, suffrutescente, rameuse, pubescente. Racine pivotante pourvue de nodosité.	Feuilles trifoliées à folioles entières, stipules ovales, 03 feuilles florales	Fleurs jaunes regroupées en 03 à 05	Arquées, stipitées à graine saillantes, rapprochées en faisceaux



Photo N°08: *Lotus ornithopodioides*. (Photographie personnelle)

Les examens morphologiques ont été réalisés lorsque la plante était en pleine phase de croissance, l'activité de la lèg-hémoglobine est à son optimum. Les résultats biométriques de l'espèce spontanée *Lotus ornithopodioides* au stade floraison sont consignés dans le **tableau N°09**

Tableau N° 09 : Biométrie* et morphologie de l'espèce spontanée *Lotus ornithopodioïdes* au stade floraison :

Mesures		Espèce	
		<i>Lotus ornithopodioïdes</i>	
		Station 1	Station 2
Longueur de tiges (cm)		40,05	28,74
Nombre de tiges		9,17	5,80
Longueur du pivot (cm)		8,32	7,76
Nombre de racines secondaires		10,33	12,00
Nombre de nodules sur le pivot		3,50	3,60
Nombre de nodules sur les racines secondaires		15,17	15,80
Nombre totale de nodules sur le système racinaire		18,67	19,40
Morphologie des nodules	Type de nodules	Déterminé	Déterminé
	Lenticelles	Pas de lenticelles	
	Couleur	Brunâtre	
	Aspect	Homogène et sans granulations.	

*Les chiffres sont exprimés en moyenne.

La caractérisation morphologique a montré que les nodules de *Lotus ornithopodioïdes* sont de type **déterminé**, brunâtres, non lenticellés et ne présentent pas de granulations à leur surface (Photo N°09). Une coupe transversale nous montre une homogénéité entre le cortex et le centre du nodule

Cette différenciation pourrait être un caractère supplémentaire pour la détermination taxonomique des espèces

Cette même caractérisation a montré que les nodosités sont réparties sur les racines secondaires et principales, ces dernières, les présentes seulement au niveau de leur partie supérieure et en nombre très réduit.



Nodules de type **indéterminé** sur la racine principale de *Vicia sativa ssp. consobrina* observé sous loupe binoculaire. Grossissement X 25 (photographie personnelle)



Nodule de type **déterminé** sur la racine principale de *Lotus ornithopodioides* observé sous loupe binoculaire. Grossissement X 25 (photographie personnelle)

Photo N°09: Les deux types de nodules, indéterminé & déterminé (photographies personnelles)

Les travaux de Kape et al. (1991) montrent que les *Rhizobia* sont attirés dans leur phase de pré-infection vers les poils absorbants racinaire par des exsudats de type flavonoïdes et isoflavonoïdes (phénylpropanoïdes) secrétés par le système racinaire. Les racines secondaires chez *Lotus ornithopodioides* sont pourvues d'un nombre plus important de poils absorbants, donc disposent de plus de nodules que la racine principale.

I.2. Conservation des nodules :

Les nodules intacts sont conservés dans des tubes à essai, contenant du CaCl_2 (Photo N°10).



Photo N°10: Conservation des nodules dans des tubes contenant du CaCl_2 (Photographie personnelle)

II. Isolement des souches :

Après stérilisation et écrasement des nodules réhydratés (Photo N°11 et 12), l'ensemencement se fait sur les différents milieux de cultures (Annexe 01) pour caractérisation (Photo N°13).



Photo N°11: Réhydratation des nodules après 02 mois de conservation (photographie personnelle)



Photo N°12: Stérilisation et écrasement des nodules réhydratés (Photographie personnelle)



Photo N°13 : Ensemencement du milieu GPA+BCP selon la technique des quatre cadrans à l'aide d'une anse à ensemencer en platine (photographie personnelle).

III. Identification du genre bactérien :

III.1. Isolement des souches :

III.1.1. Croissance des isolats sur les différents milieux de cultures :

Pour chaque milieu de culture, six répétitions ont été réalisées. Une bonne croissance a été remarquée au niveau de tous les flacons, nous pouvant attester que les conditions d'asepsie ont été bien respectées.

III.1.1.1. Croissance des isolats sur le milieu YMA :

La totalité des nodules prélevés de *Lotus ornithopodioides* ont donnés des bactéries qui se sont bien développées sur le milieu YMA. En effet, nos deux (02) isolats ont présentés des colonies translucide et opaque, de forme circulaire, convexe, de 5 à 10 mm de diamètre

III.1.1.2. Croissance des isolats sur le milieu YMA+RC :

Les bactéries des différents isolats misent en culture n'utilisent pas le rouge Congo. Les colonies observées sont totalement blanchâtres, c'est également le cas des témoins, le nodule a été étalé tel quel afin de confirmer sa stérilité (Photo N° 14).

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Vincent (1970) ; Jordan (1984) ; Somasegaran et Hoben (1994), les colonies typiques aux *Rhizobia* absorbent très rarement, ou pas du tout, le rouge Congo par rapport aux formes contaminantes et phytopathogènes, ou encore les souches occupant le nodule sans fixer l'azote atmosphérique.

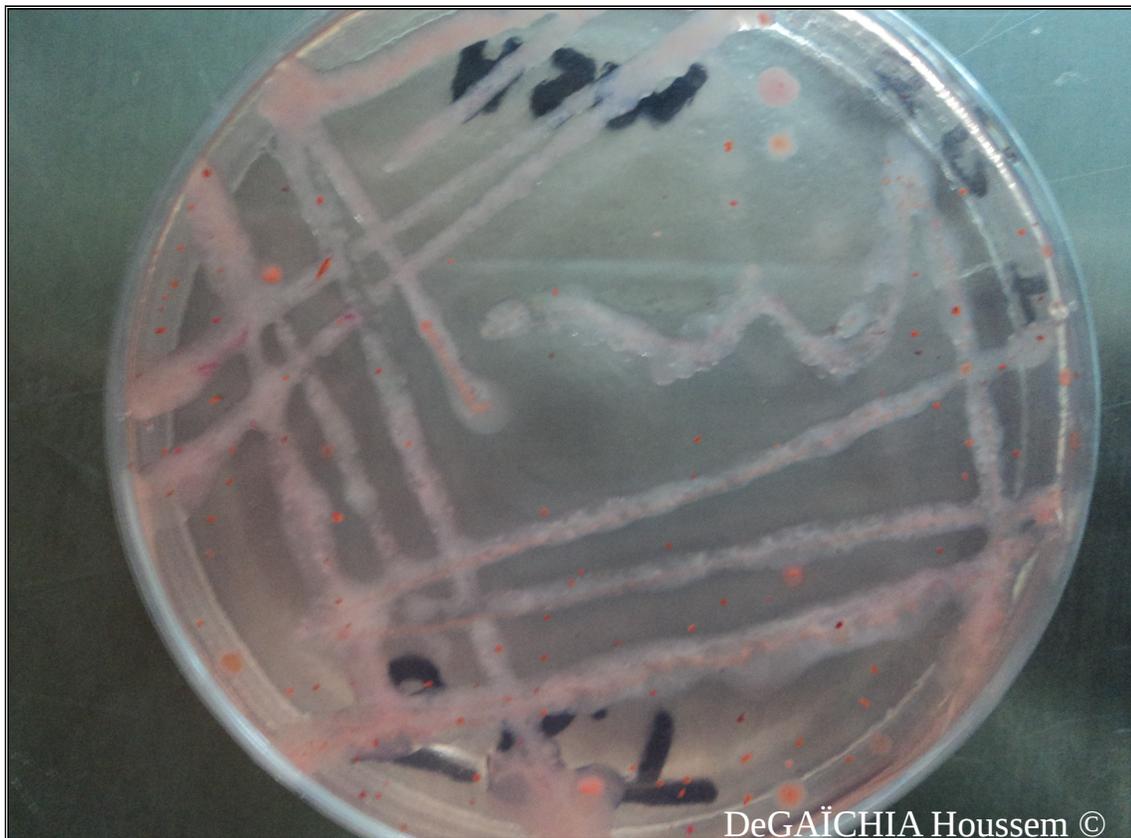


Photo N°14: Aspect des colonies sur le milieu YMA+RC (Photographie personnelle)

III.1.1.3. Pureté de l'inoculum :

Pour s'assurer de la pureté des microorganismes présents dans le nodule, le résultat du test de croissance sur le GPA+BCP est indispensable, car les *Rhizobia* ont une réaction négative sur ce même milieu.

En effet, après 24 heures d'incubation, une croissance des isolats sans changement de la couleur du milieu est notée (Photo N°15.A).

Partie III : Résultats et discussions

En ajoutant une goutte d'eau de robinet aux inocula, nous constatons un virage de la couleur du milieu du pourpre franc au jaune (Photos N°15.B).

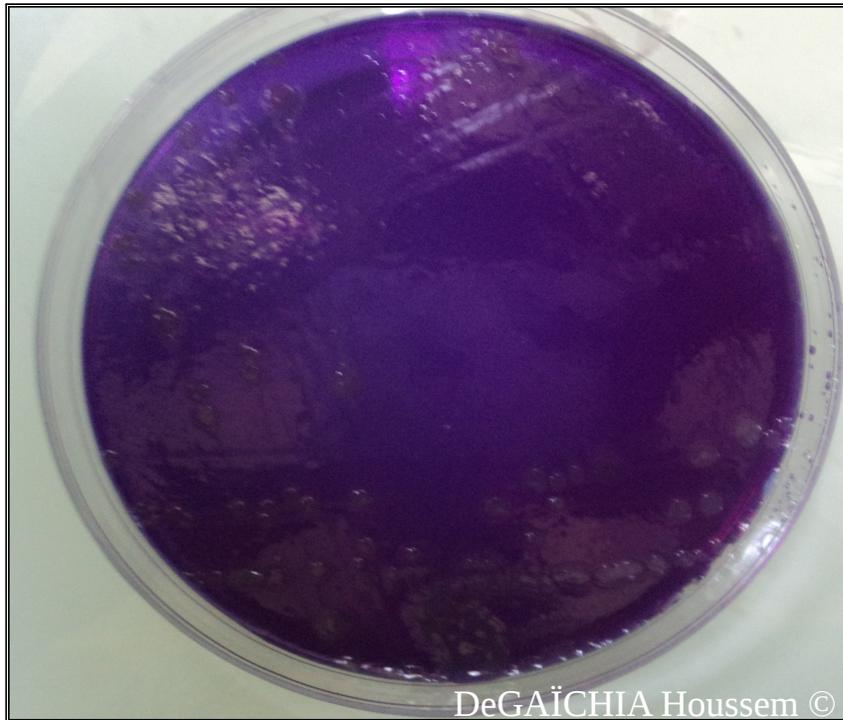


Photo 15.A : Croissance des isolats sur le milieu GPA+BCP (Photographie personnelle)

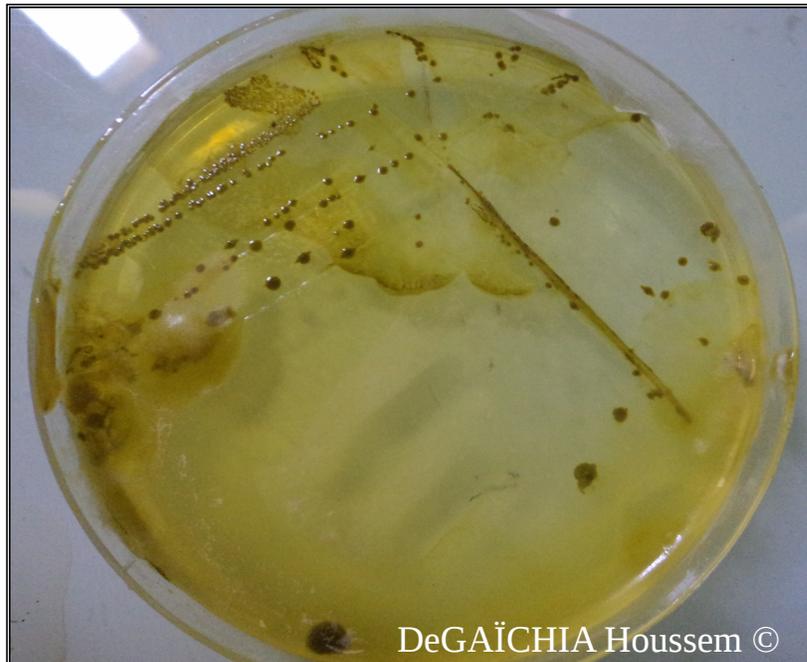


Photo 15.B : Croissance des isolats contaminés par l'eau de robinet sur milieu GPA+BCP (Photographie personnelle)

III.1.1.4. Vitesse de croissance :

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les *Rhizobia*, ont deux types de croissance : celles lente (genre *Bradyrhizobium*) et celles rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*...) (Jordan, 1982).

La couleur du milieu de culture (contenant du bleu de bromothymol) vire du vert au jaune en cas d'acidification du milieu. Ainsi, l'aptitude à modifier le pH en 24 heures nous permettra de distinguer les bactéries à croissance rapide de celles à croissance lente, dont l'acidification du milieu ne surviendra que tardivement (après plus de 72 heures de croissance) (El Hilali, 2006).

Nos résultats ont montrés une variation dans la vitesse de croissance. L'acidification du milieu s'observe entre 24 et 36 heures *Lotus ornithopodioïdes* de la Station N°02 ; tandis qu'elle est de plus de 72 heures pour son analogue de Station N°01, la structure du sol est poreuse contrairement à la seconde, caillouteuse (Planche N°01)

Au vu de ces résultats, et en se référant à Jordan (1982) on peut avancer que les bactéries nodulant *Lotus ornithopodioïdes* des deux stations appartiennent à deux genres distincts. Celui nodulant l'espèce de la Station N°01 appartient au genre *Bradyrhizobium*.

Le facteur écologique est probablement la cause qui a influencé la reconnaissance entre la bactérie et sa plante hôte, d'où la différence des taxons impliqués dans l'infection. Cependant, ceci ne peut être confirmé ou infirmé que par une identification approfondie, et une étude écologique poussée.

Les mêmes résultats, concernant la diversité phénotypique des isolats impliqués dans la nodulation d'autres plantes légumineuses spontanées (*Medicago hispida* & *Onobrychis caput-galli*), ont été obtenus par Idris et khelifi (2012) où la même espèce est nodulée par deux genres différents, au minimum, dans les deux stations.

Selon El Akhal (2008), cette diversité phénotypique que présentent les isolats est liée à la diversité de leur site de prélèvement.

PlancheN° 01 : Aspect des colonies sur YMA+BTB des deux souches (photographies personnelles)

Vitesse de croissance des bactéries nodulant *Lotus ornithopodioïdes* dans les deux stations.



Station 01 : Vitesse de croissance lente
(Acidification *partielle* du milieu en **+72h**)



Station 02 : Vitesse de croissance rapide
(Acidification *totale* du milieu en **-36h**)

III.2. Caractères cultureux des isolats :

III.2.1. Examen de la mobilité :

L'ensemencement sur milieu Mannitol mobilité montre que les bactéries de l'espèce spontanée des deux stations sont mobiles (l'observation par exposition à la lumière montre que les colonies bactériennes ont quittées le centre de la pique), acidifient le milieu (virage de la couleur du rouge au jaune orangé) et produisent des gaz en abondance (Photo N°16, 17). L'observation des isolats à l'état frais confirme leur mobilité.

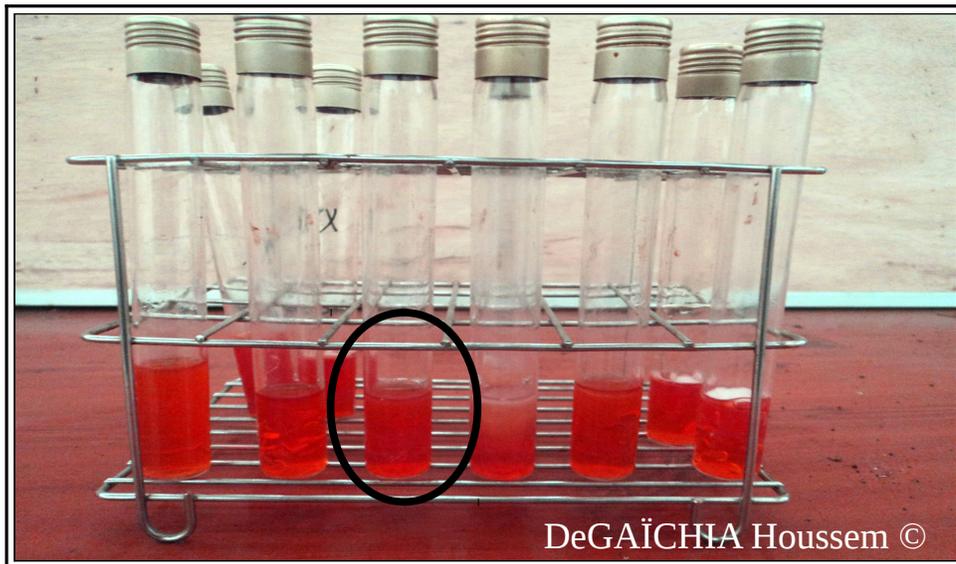


Photo N°16: Le milieu Mannitol mobilité avant ensemencement (photographie personnelle).



Photo N°17: Mobilité des souches sur le milieu Mannitol mobilité (Virage de la couleur du rouge à jaune orangé) (photographie personnelle).

III.2.2 La coloration de Gram :

La coloration de Gram à été réalisée dans le but de confirmer la pureté de nos cultures.

L'observation sous microscope optique a révélée des bâtonnets roses à Gram négative (Photo N°18) conforme aux résultats de Vincent (1970) ; de Bloem et al (2002).

La différenciation pariétale peut expliquer la sensibilité des *Rhizobia* à certains éléments de trace métallique, notamment au plomb Pb (II) (Monchy, 2007). Selon le même auteur, ces bactéries supportent des concentrations élevées de Cadmium, Zinc et Cuivre

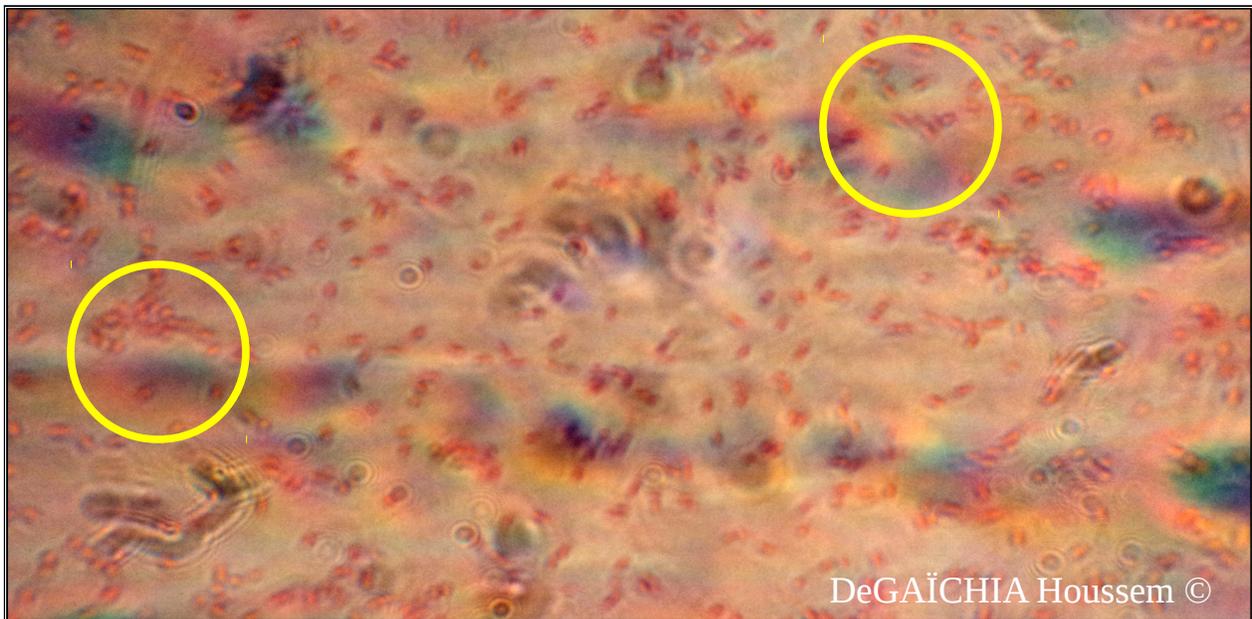


Photo N°18 : Bâtonnets à Gram négative vus au microscope optique (G X1000)
(photographie personnelle)

Diriba, (2007) confirme que la différenciation pariétale confère au *Rhizobia* une résistance aux antibiotiques et cela par imperméabilité, notamment par diminution du diamètre des porines (pores au niveau de la membrane externe).

Selon le même auteur, cette résistance aux antibiotiques est due au fait que les *Rhizobia* coexistent avec des microorganismes (producteurs d'antibiotiques) pourvus de plasmides porteurs, portant des gènes (facilement transférables aux bactéries à Gram négative) codants pour la résistance aux antibiotiques.

III.2.3. Mise en évidence des Exo polysaccharides :

Nos isolats absorbent le Calcofluor White (CFW) et révèlent une fluorescence sous lumière ultraviolette (Photo N°19).

Ceci est en accord avec Jordan (1984), Struffi et al.(1998), où la majorité des *Rhizobia* produisent des polysaccharides exo-cellulaires hydrosolubles, le principal constituant est un hétéro polysaccharide acide (80-90%), présentant des liaisons β 1-3 et/ou β 1-4 entre ces constituants pariétaux.

La fluorescence est due à la liaison entre CFW et le succinoglycane (EPS I) qui est un type d'exo polysaccharides produit par les *Rhizobia* et indispensable à la formation du cordon infectieux au niveau des poils racinaires. Les légumineuses spontanées formant des nodules de types indéterminés révèlent, selon Gallego (2006), des exigences structurales pour les EPS des *Rhizobia*.

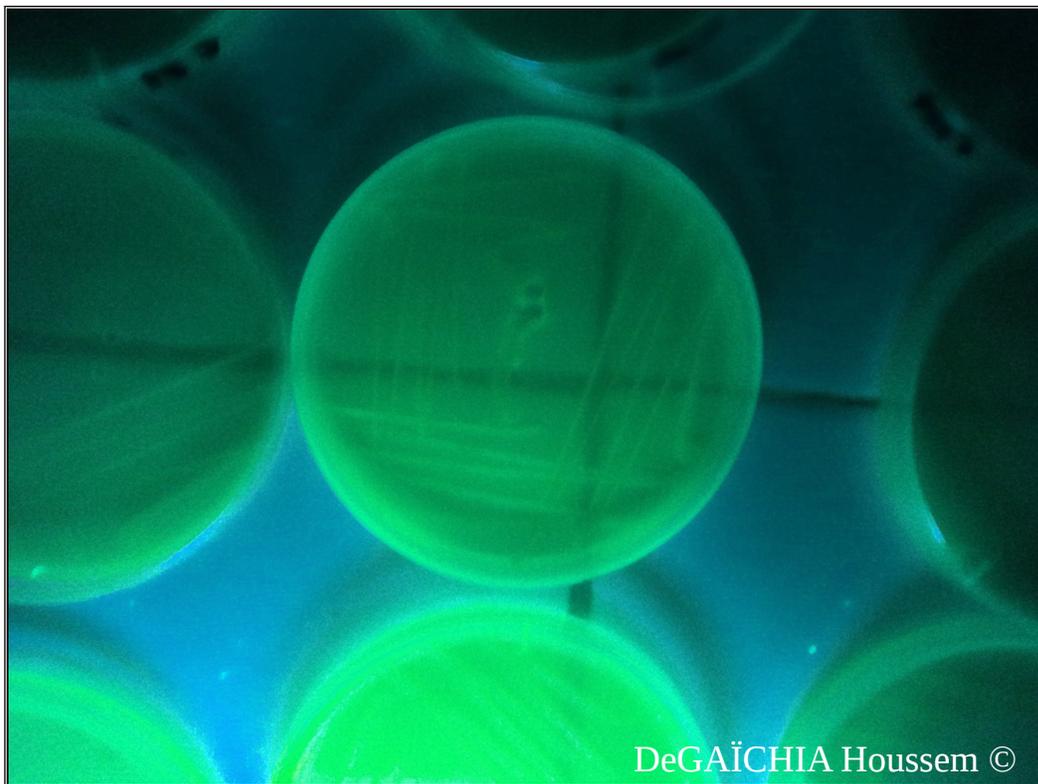


Photo N°19: Fluorescence des colonies sous UV à 270 nm (photographie personnelle)

Chuang-Yien Lee (2000), rapporte que l'absence des exo-polysaccharides bactériens, se notifie par la non- fluorescence sous U.V, et induit chez la plante la production excessive de composés phénoliques, notamment l'acide salicylique et l'acide jasmonique. Ces derniers colorent en brun les racines et provoquent une apoptose des cellules infectées, ainsi que la mort des bactéries. De plus, le cordon infectieux ne progresse pas et des aberrations (poches) apparaissent. Ainsi leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote se situe dans l'inhibition des réactions de défenses des plantes et dans la progression du cordon infectieux

Les travaux de Chataigné (2007) révèlent que, lorsque les EPS ne sont plus synthétisés, des lipopolysaccharides (LPS) inhibent les réactions de défenses de la plante dans les étapes les plus tardives de l'infection en empêchant la mise en place du choc oxydant.

Les EPS des *Rhizobia* forment un biofilm autour des racines de la plante hôte, ainsi, ils lient le cadmium avec le calcium (Mathieu et al.,2011).

IV. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des éléments de trace métallique (ETM) :

IV.1. Choix de la souche :

Contrairement aux autres genres de *Rhizobia*, *Bradyrhizobium* comprend cinq (05) espèces de bactéries symbiotiques seulement, pouvant vivre durant une longue période selon deux modes, hétérotrophe (saprophyte) ou en symbiose avec un végétal (Dowling & Broughton, 1986; Brunel et al., 1988)

Les souches de *Rhizobia* supportent une large gamme de pH. chacune des souches s'est adaptée à l'environnement d'où elle a été prélevée (Vargas & Graham, 1988; Caetano-Anollés, 1989; Graham et al., 1994). Néanmoins, leur abondance serait réduite à un pH inférieur à 6 et peu de souches existeraient à des pH inférieurs à 4,5. Il est aussi généralement averé que les souches de *Bradyrhizobium* sont plus tolérantes aux faibles pH que celles de *Rhizobium* (Hungria & Vargas, 2000).

Bradyrhizobium sp. sont également capable de stimuler la croissance des plantes, ils sont ainsi classé dans les organismes PGPB (*Plant Growth-Promoting Bacteria*) (Bashan et al.,1998.)

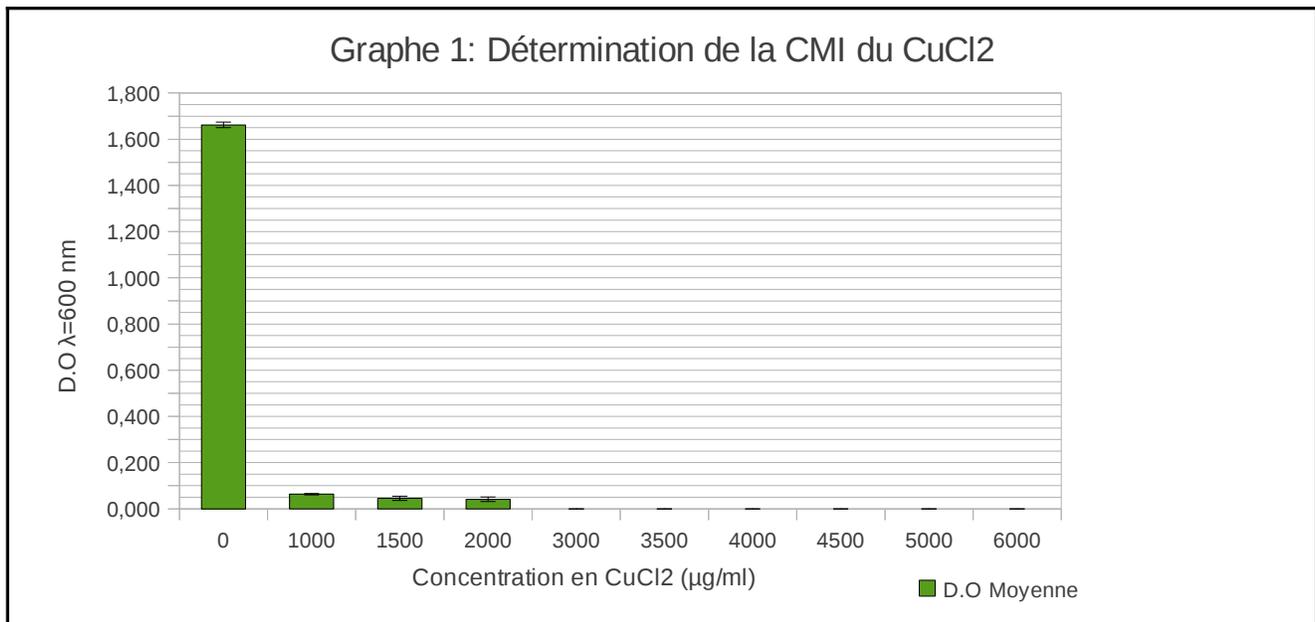
Ces bactéries à Gram négative sont tolérantes à des concentrations élevées de Cadmium, Zinc et Cuivre (Monchy, 2007).

A la lumière de nos résultats et en se basant sur les travaux de moult auteurs, notre choix s'est porté sur *Bradyrhizobium* sp. pour la déterminer du seuil de tolérance vis-à-vis du chlorure de cuivre ainsi que de cadmium.

IV.2. Tolérance de *Bradyrhizobium* sp. aux ETM :

Les résultats obtenus par la mesure de la densité optique ($D.O_{\lambda 600}$) nous ont permis de constater que *Bradyrhizobium* sp. n'a pas les mêmes valeurs de croissance en présence du chlorure de cuivre (Graphe 1) et du chlorure de cadmium (Graphe 2)

IV.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du Chlorure de Cuivre ($CuCl_2$) vis-à-vis de *Bradyrhizobium* sp. :



A une concentration de $1000\mu g/ml$ de $CuCl_2$, on observe une baisse importante de la croissance ($D.O = 0.064$) de *Bradyrhizobium* sp. par rapport au témoin ($D.O = 1.662$). On remarque que cette baisse est en corrélation avec l'augmentation de la concentration de l'ETM, qui continue pour atteindre son minimum à $2000\mu g/ml$.

Ainsi, on note un arrêt net du développement bactérien, (une $D.O = 0$), pour une concentration de $3000\mu g/ml$.

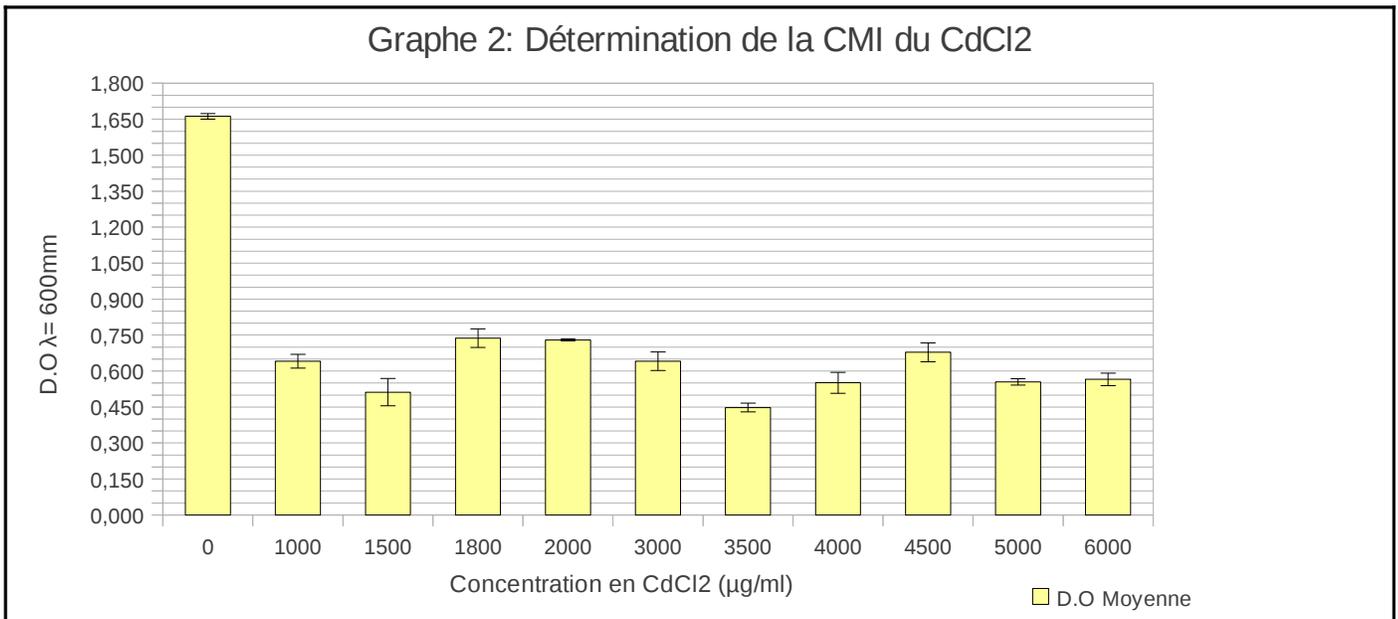
Selon la définition proposée par **Filali et al. (2001)** on peut avancer que la CMI pour CuCl_2 vis-à-vis de notre souche de *Bradyrhizobium* sp. est comprise entre 2000 et 3000 $\mu\text{g/ml}$ (2000 $\mu\text{g/ml}$ non incluse). Les travaux de **Gharzouli (2006)** montrent que les souches de *Rhizobia* testées présentent une CMI de l'ordre de 1500 $\mu\text{g/ml}$ de CuCl_2 .

Chabbi (2009) pour sa part rapporte que les souches isolées à partir du genre *Trigonella* présentent une CMI comprise entre 800 et 1600 $\mu\text{g/ml}$.

A 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 (**Bliefert et al., 2001**).

Ceci est confirmé par nos résultats, qui rejoignent ceux de **Clijsters et al. (1999)** & **Kohen et al., (2002)** selon les quels le **cuivre** serait un promoteur de stress produisant directement des ROS. Ces derniers, générées par les ETM conduisent, à la dégradation des lipides membranaires et des chloroplastes.

IV.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du Chlorure de Cadmium (CdCl_2) vis-à-vis de *Bradyrhizobium* sp. :



Le témoin (0 µg/ml) présente une D.O moyenne de «1,662» qui chute pour atteindre la valeur de «0,641» pour une concentration de 1000µg/ml.

A l'augmentation de la concentration du CdCl₂ on remarque une fluctuation de la croissance bactérienne sans noter d'arrêt visible, mais un minimum de croissance pour une concentration de 3500 µg/ml.

La CMI du CdCl₂ la plus élevée est notée chez *Rhizobium alarii* avec une valeur de 5000 µg/ml (Mathieu et al.,2011) , à cette valeur notre souche de *Bradyrhizobium sp.* continue ça croissance, faible par rapport au témoin mais largement visible.

On en déduit donc que la CMI du CdCl₂ est supérieure à 6000 µg/ml. Cette haute tolérance de *Bradyrhizobium sp.* s'explique par les fondements de la phytoremédiation (Rhizodégradation) qui stipulent que les microorganismes symbiotiques en général et quelques genres de *Rhizobia* développent plusieurs systèmes de détoxification et de transformations des polluants d'origine métalliques (Anderson et al. 1995).

Il existe trois mécanismes de résistance au cadmium connues chez les bactéries (Ron et al., 1992 ; Minzetal.,1996) :

- 1-Un mécanisme qui rend les enveloppes bactérienne imperméable au CdCl₂.
- 2-Un phénomène de bio-sorption où le CdCl₂ se lie et reste associé à la paroi grâce au EPS
- 3-Des mécanismes d'efflux où le CdCl₂ 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 col, (2006) 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 09% du Cadmium du sol a été supprimé, la bactérie dans ce cas précis sera d'une grande utilité dans la dépollution des sols.

V. Conservation des souches :

Les souches, objet de notre étude, sont conservées par la méthode de congélation en vu d'une poursuite des travaux dans ce domaine, ainsi que pour une identification des souches plus approfondie et d'une étude éco-toxicologique des Rhizobia.

VI. Conclusion générale et perspectives:

Les objectifs de notre étude se situent dans un cadre éco-toxicologique, par la caractérisation des bactéries symbiotiques et la détermination de leur seuil de tolérance vis-à-vis de deux éléments de trace métallique (le Cuivre et le Cadmium) en vue d'introduction à la *phytoremédiation*.

Le choix de ces deux éléments est basé, principalement, sur leur comportement toxicologique. Le premier ETM est un 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 n'a pratiquement aucun rôle physiologique mais fortement toxique qui entre dans l'industrie phytopharmaceutique.

Les tests de caractérisation ont montrés que les bactéries isolées de *Lotus ornithopodioides*, des deux sites d'échantillonnages, appartiennent au moins à deux genres distincts de la famille des *Rhizobiaceae*. Notre choix s'est porté sur le genre *Bradyrhizobium* pour sa résistance aux ETM, sa haute tolérance aux pH acide ainsi que son aptitude à promouvoir la croissance de la plante associée (un critère obligatoire en phytoremédiation pour que la plante utilisée ait un développement rapide).

A la lumière de nos résultats, *Bradyrhizobium* sp. est une *Rhizobiaceae* flagellée (mobile) à Gram négative se développe bien sur milieu sélectif YMA+RC, a une lente vitesse de croissance et donne un résultat négatif sur milieu GPA en présence de Pourpre de bromocrésol. Tous nos isolats, *Bradyrhizobium* y compris, produisent des exopolysaccharides, indispensables au système permettant d'éviter le choc oxydatif. Ils ont ainsi les mêmes caractères culturels que notre souche de choix, sauf qu'ils ont une vitesse de croissance plus rapide.

Bradyrhizobium sp. Montre une grande tolérance aux ETM testés particulièrement le cadmium dont la concentration minimale inhibitrice dépasse les 6000µg/ml. Sa résistance vis-à-vis du cuivre est faible, comparé à celle du cadmium, mais reste néanmoins élevée par rapport aux valeurs obtenues avec d'autres bactéries étudiées.

De façon générale les effets toxiques des ETM 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 (Gremion, 2003).

Selon **Giller et al., (1998)**, cet effet dépend de la durée de l'exposition, de la dose et du type de polluant utilisé.

En évoluant, les *microorganismes* ont améliorés leurs mécanismes de résistance aux ETM afin de 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 (**Wei et al. , 2009**). 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 (**Monchy, 2007**).

Au vu de la toxicité du cuivre et du cadmium pour les plantes (**Briefert et al. , 2001**) et les résultats que nous avons obtenus, mettant en avant la tolérance que présente *Bradyrhizobium sp.* vis-à-vis des hautes concentrations de ces polluants, et surtout du CdCl₂, notre souhait serait une étude beaucoup plus approfondie dans le domaine de la phytoremédiation et spécialement dans la Rhizodégradation afin d'approfondir les connaissances déjà acquise sur les mécanismes contrôlant la mobilité des ETM dans les sols ainsi que leur transfert, accumulation et dégradation par *Bradyrhizobium sp.*

De cela, quelques approches à développer en perspective, se dégagent :

- La première consiste à valider, à l'échelle du laboratoire toujours, les expériences réalisées avec un milieu artificiel sur un sol naturel.
- La deuxième grande orientation consiste en la validation des résultats du laboratoire concernant l'usage des réponses de *Bradyrhizobium sp.* associé à *Lotus ornithopodioides* sur le plan éco-toxicologique ou de son utilisation comme agent dépolluant dans le cadre de la Rhizodégradation.

Ces recherches vont permettre d'associer l'ensemble des paramètres environnementaux et représentent une situation environnementale réelle.

PARTIE IV:

Références

bibliographiques

- Abdelguerfi A., 2001.** Sources génétiques d'intérêt pastorale et/ou fourragère ; distribution et variabilité chez les légumineuses spontanées (*Medicago*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Hedysarum* et *Onobrachis*) en Algérie, these de doctorat, INA, El-Harrach, p325
- Adriano, D.C., 2001.** "Trace elements in the terrestrial environment; Biochemistry, bioavailability and risks of metals". Springer Verlag, New York.
- 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.
- 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
- Amarger N., Mecheret, V., Laguerre, G., 1997.** *Rhizobium gallicum* sp. Nov. And *Rhizobium giardinii* sp. Nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bacterial. N° :47,pp. :996-1006.
- Amrouche 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
- 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.
- Arnon, D.I., Stout, P.R., 1939.** "The essentially of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper". Plant Physiol., 14, pp :371- 375.
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R. 1989.** "Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution"., Ecology and Phytochemistry. Biorecovery, 1,pp :81-126.
- Bashan, Y., 1998,** Inoculants of plant growth promoting rhizobacteria for use in agriculture. Biotechnol. Adv. 16 pp : 729 - 770.

- Bashan, Y., and G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30 pp:1225-1228
- Baudoin J.P., 2001. Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001 N°5, pp : 221-230.
- Beck D.P ; Materon L.A ; Afandi F ; 1993. Pratical Rhizobium-legume technology manual. *Thechnicalmanual* N°19.
- Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., et Squartini A.,2004. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(4), 462- 468. Université de constantine. Algérie.
- 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
- Bliefert, C., Perraud, R., 2001. "Chimie de l'environnement : air, eau, sols, déchets". De Boeck université, Paris, 477p.
- Bloem J.F., Botha W.J., Law I.J., Steyn P.L.2002. Colony variation in *Sinorhizobium meliloti* inoculant strain U45 , *Microbial.Res.* 157: 1-10.
- 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 ma Mitidja. Mémoire d'ingénieur d'état. Département d'agronomie. Blida. p108.
- Brewin N J., Downie J.A., Young J.P.W., 1992. Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology.* M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York 3 pp 239-248.
- Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X., 2000. Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of Bacteriology* N°182 (20) pp 5641-56525.
- Brunel B; Cleyet-Marel JC; Normand P & Bardin R.1988. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* Inoculants after Introduction into Soil. *Applied and environmental microbiology* 54(11): 2636-2642.
- Caetano-Anollés G, Lagares A & Favelukes G.1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: Dependence on divalent cations and pH. *Plant and Soil* 117: 67-74.

- 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
- Chataigné G., 2007 : Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de Doctorat de L'Université de Toulouse III. France.
- Cheikh S., 2003. Détermination de la composition chimique en fonction des stades phenologiques de quelque legumineuse fourragere spontanées de la region de la Mitidja. Mémoire d'ingenieur d'état. Département d'agronomie. Blida. P 69
- Chen, W.X., Yan, G.H., and Li, J.L., 1988. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol.N° 38,pp : 392-397.
- Chen W. X .; Qi G. S.; Wang E.T.; H.L. Huan et Li J.L. 1991. *Rhizobium huakii* sp. nov.isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol.N° 41, pp: 275-280
- Chen W.X., Tan Z.Y., Gao J.L., Li Y., Wang E.T., 1997. *Rhizobium hainanense* sp. Nov., isolated from tropical legumes. Int. J. Syst. Bacteriol. N°47(3),pp : 870-873.
- Chen, W., Chang, A.C., Wu, L., 2007. "Assessing long term environmental risks of trace elements in phosphate fertilizers". *Ecotoxicol Environ Safety*, 6, pp : 48-58.
- Chenu C, Stotzky G., 2002. Interactions between microorganisms and soil particles: an overview, vol. 8;
- Chiffolleau, J.F., Auger, D., Chartier, E., Michel, P., Truquet, I., Ficht, A., Gonzalez, J.L., Romaña, L.A. 2001. "Spatiotemporal changes in cadmium contamination in the Seine Estuary (France)". *Estuaries*, 24(6B), pp :1029-1040.
- Chuang-Yien Lee J., 2000. Expression Studies on the exo-Y-Promoter Region in *Rhizobium meliloti*. *BUG journal* vol. 3.
- 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.

- Cobbett, S.C., 2000. "Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification". *Plant Physiology*. 123, pp : 825-832.
- Coleman, D.C., Crossley, D.A., 1996. *Fundamentals of Soil Ecology*. London: Academic Press.
- Come D., Françoise C., 2006. *Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes*, Edition Tec et Doc. Lavoisier.
- Coronado C, Zuanazzi J, Sallaud C, Quirion JC, Esnault R, Husson HP, Kondorosi A et Rater P., 1995. Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. *Plant Physiol*. N°108, pp 533-542.
- Cullimore, J. V., Ranjeva R., Bono J. J., 2001. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* N°6, pp:24- 30.
- Cunningham S.D., Berti W. R. and Huang J. W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils, *Trends in Biotechnology*, Vol. 13, pp. 393-398.
- Cunningham S.D. et Lee C.R. 1994. Phytoremediation : plant-based remediation of contaminated soil and sediments, *Soil, Sc. Soc. of Amer.* pp
- Davet P., 1996. *Vie microbienne du sol et production végétale*. Editions INRA, Paris. France. pp 145-161.
- DeLajudie P., Laurent-Fulel E., Willems A., Toreck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B., Gillis M., 1998a. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. Nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. N°48, pp :1277-1290.
- DeLajudie, P., Willems A., Nick G., 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mezorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. N°48, pp : 369-382.
- DeLajudie, P., Willems, A., Pot, B., 1994. polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. j. Syst. Bacteriol*. N°44, pp : 715-733.
- Demidchik, V., Sokolik, A. Yurin., V., 1997. "The effect of Cu²⁺ on ion transport systems of the plant cell plasma lemma". *Plant Physiol.*, 114, pp : 1313 - 1325.

- DeNarie J., 2000. Dialogue moléculaire des symbioses. Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U., 1999. "Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants". In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.), "Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems". Springer, Berlin, pp. 73-97.
- Diriba T., 2007. Nodulation Pattern and Biodiversity of Endosymbionts of Some Woody Legumes of Ethiopia. Thèse de Master en science de biologie de l'université d'Addis Ababa.
- Dowling DN & Broughton WJ. 1986. Competition for nodulation of legumes. Annual Review of Microbiology 40 pp: 131-57.
- Doyle J.J., 1998. Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. Trends in Plant Science, N°3 (12), pp: 473-478.
- Dreyfus B. ; Garcia J.L., Gillis M. 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. N° 38 , pp:89-98
- Duhoux E., Nicole M., 2004. Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes, pp : 1-20 Edition DUNOD. Paris. France.
- El Akhal M.R. 2008, "Diversité des rhizobium nodulant l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) au Maroc et l'effet de la salinité sur le couple symbiotique ", Thèse de doctorat, Maroc
- Eleftheriou, E.P., Karataglis, S. 1989. "Ultrastructural and morphological characteristics of cultivated wheat growing on copper - polluted field". Bot. Acta., 102, pp :134-140.
- El-Hilali I., 2006. La symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.
- 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.
- Fang, Y., Hirsch AM., 1998. Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic *alfalfa*. Plant Physiol. N°116, pp: 53-68.

- 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
- Gallego, M., 2006. Les α -Protéobactéries : mécanismes communs d'interaction avec la cellule hôte. Master Recherche, Université PAUL SABATIER. Toulouse III.
- Gaussen H., 1982. Précis de botanique -végétaux supérieur. 2^e Edition , Paris, Tome II, pp. 329-335
- Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H., 2005. "Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system". *Plant Soil*, 276, pp : 133 - 41.
- 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.
- Giles E.D., Oldroyd., Dawnin J.A., 2004. "Calcium, Kinas and nodulation signalling in legume". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 pp : 566-576.
- Giller K, Witter E, McGrath S P, 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review[J]. *Soil Biology and Biochemistry* 30 pp: 1389 - 1414.
- Gobat, J.M., Aragno, M., and Matthey, W., 2004. *The Living Soil. Fundamentals of Soil Science and Soil Biology*. Lausanne, Suisse: Science Publishers, Inc., USA.
- Gomez, A., 2002. "The nano-particle formation and uptake of precious metals by living alfalfa plants". Master Thesis, University of Texas at El Paso.
- Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martinez E, Aarons SR & Quinto C.1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizohium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhyzobium Topici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology* 40 pp: 198-207.
- 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
- Grerifa A., 2002. Détermination de la composition chimique en fonction des stades

- phrénologiques de quelques légumineuses et malvacées fourragères spontanées dans la région de Mitidja. Mémoire d'ingénieur d'état. Département d'agronomie, Blida. p 72.
- Griffiths, B.S., et Bardgett, R.D., 1997.** Interactions between microbe-feeding invertebrates and soil microorganisms. In *Modern Soil Microbiology*. van Elsas, J.D., Trevors, J.T., and Wellington, E.M.H. (eds). New York: Marcel Dekker, pp. 165-182
- Guignard J.L, Dupont F., 2004.** Botanique : systématique moléculaire. 13eme Edition, Masson. Paris. France pp 164-179.
- Hamadach A., 1998.** Les fourrages verts : un impératif au développement de la production laitière ; résultats de recherche sur le trèfle d'Alexandrie (bersim). Céréaliculture. ITGC. N°39, pp 113
- Heiser, I. Obwald, W. Elstner E.F. 1998.** "The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins". *Plant Physiol.Biochem.*, 36, pp :703- 713.
- Hiltner, L., 1904.** Uber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brachte. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* N°98,pp: 59-78
- Hopkins W.G., 2003:** *Physiologie végétale*. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck ,pp 99-119
- Houmani M. 1999.** Situation alimentaire du bétail en Algérie. *Recherche agronomique* , N°4, p35-41
- Huang, J.W., Cunningham, S.D.** "Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation". *New Phytol.*, 134, pp : 73-84.
- Hungria M & Vargas MAT .2000.** Environmental factors affecting N°2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* 65 pp: 151-164.
- Idris I. et khelifi H. 2012.** "Contribution à l'identification des nodosités et caractérisation des bactéries nodulantes de deux espèces spontanées *Medicago hispida* & *Onobrychis caput-galli*" Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie. Université de Blida. pp:57 - 58
- Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R., and Coleman, D.C., 1985.** Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs* N°55,pp :119-140

- Jarup, L., 2003. "Hazards of heavy metal contamination". Br. Med. Bull., 68, pp : 167- 82.
- Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J., 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. N°32, pp :378-380.
- Jarvis, B.D.W., van Berkum, P., Chen, W.X., 1997. *Transfer of Rhizobium loti mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mezorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. N°47, pp :895-898.
- Jordan, D.C. 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. pp. 234-254. In : N.R. Kreig and J.H. Holt (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. vol.1 The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- Jordan, D.C., 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slowgrowing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. N°32, pp : 136 139.
- Juergen P. ; Philip P., 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. School of Biological Sciences, University of Reading, UK, RG6 6AJ.
- Kabata-Pendias, A., 2004. "Soil-plants transfer of trace elements- an environmental issue". Geoderma, 122, pp : 143-149.
- Kape R., Parniske M., Werner D., 1991. Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. Appl Environ Microbiol. N°57, pp : 316-319.
- Kennedy, A.C., 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture Ecosystems & Environment N°74, pp : 65-76.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002 "Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification". Toxicologic Pathology, 30, 620-650.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. "Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification". Toxicologic Pathology, 30, pp : 620-650.
- Kondorosi E., Kondorosi A., 2000. Control of root nodule organogenesis. In Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK
- Krasova-Wade.T, Ndoeye I.; Braconnier S.; Sarr B.; DeLajudie P.; Neyra M., 2003. Diversity of indigeneous baradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata*

(L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa) .African Journal of Biotechnology Vol. 2 (1)

- Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M., 1996, "Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants". J of Experim. Botany, 47, pp :259-266.
- Kuzyakov, Y., 2002. Review: factors affecting rhizosphere priming effects. Journal of Plant Nutrition and Soil Science N°165, pp : 382-396
- Kuzyakov, Y., and Domanski, G., 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. Journal of Plant Nutrition & Soil Science N°163, pp: 421-431.
- Lefevre C., 2004. Caractérisation et phylogénie des bactéries symbiotiques intracellulaires des charançons de la famille des Dryophthoridae. Thèse de Doctorat de l'Institut national des sciences appliquées de Lyon. France.
- Lewis, M.A. 1995. "Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review". Environ. Pollu., 87, pp :319-336.
- Liesack, W., Janssen, P.H., Rainey, F.A., Ward-Rainey, B.I., and Stackerbrandt, E., 1997 .Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In Modern Soil Microbiology. van Elsas, J.D., Trevors, J.T., and Wellington, E.M.H. Edition, New York : Marcel Dekker, pp. 375-439.
- Lindström, K., 1989 .*Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. N°39(3), pp :365-367.
- Lynch JM., 1990. The rhizosphere. New York: John Wiley & Sons
- Madigan M., Martink J., 2007 : Brock Biologie des microorganismes. 11e edition. Edition Person Education. France. pp 599-601, 676-681.
- 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
- Martinez-Romero, E., Segovia, L., Meercante, F.M., Franco, Graham, P., Pardo, M.A., 1991. *Rhizobium tropicia* novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int J. Syst. Bacteriol. N°41, pp: 417-426.
- Mathesius U., Charon C., Rolfe BG., Kondorosi A., Crespi M. ,2000. Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white.
- 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
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E., 2002. "Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides". Adv Agric., 75, pp : 1-56.
- 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.
- Miklashevichs, E., Rohrig H., Schell J., Schmidt J., 2001. Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. Crit. Rev. Plant Sci. N°20, pp : 373-394
- Minz D., Rozenberg E. & E .Z. Ron. 1996. Cadmium binding bacteria: screening and characterization of new isolates mutants. FEMS Microbiol.Lett. 135, 191-194.
- Miquel, G. 2001. "Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé". Rapport parlementaire, N°2979/N°261, Assemblée Nationale/Sénat, office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Paris, .
- 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
- Moulin L., 2002 : Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène *nod A* à l'identification de rhizobia au sein des béta-Protéobactéries. Thèse de Doctorat en Sciences Biologie. Université Claude Bernard Lyon I. France. p 289.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C., 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. Nature N° 411, pp 948-950.
- Mutin G., 1977. La Mitidja, décolonisation et espèces géographique. Edition OPU. Alger
- 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.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., and Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science N°54, pp:655-670.

- Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. "An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales.", *Sci. Total Environ.*, 311, pp :205-219.
- Nogom A., Nakagawa Y., Sawada H., Tsukahara J., Wakabayashi S., Uchiumi T., Nuntagij A., Kotepong S., Suzuki A., Higashi S., et Abe M., 2004. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobacterium* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. gen. Appl. Microbiol.* N°50, pp : 17- 27.
- Nour S.M., Cleyet-Marel, J.C., Normand, P., Fernandez, M.P., 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas(*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* N°45, pp : 640-648.
- Nour S.M., Fernandez, M.P., Normand, P., Cleyet-Marel, J.C., 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas(*Cicer arietinum* L.).*Int. J. Syst. Bacteriol.* N°44, pp : 511-522.
- Patriarca EJ, Tatér, Ferraili S et Laccarino M., 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* N°234, pp:201-262
- Pawlowski K., et Bisseling T., 1996. Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell.* N°8, pp : 1899-1913.
- Pelmont J., 1995. Bactérie et environnement adaptation physiologique. Edition Office des Publications Universitaires. Vol 2.
- Perry J.J., Stalex J.T., Lory S., 2004: Microbiologie cours et questions de révision. Edition DUNOD. Paris. France
- Perry, A.R.R., Flammarion, P., Vollat, B., Bedaux, J.J.M., Kooijman, S.A.L.M., Garric, J., 2002 "Using a biology based model (Debtox) to analyse bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendation". *Environ. Toxicol., Chem.* 21, pp :459-465.
- Quariti, O., Boussama, N., Zarrouk, M., Cherrif, A., Habib, Ghorbal, M., 1997. "Cadmium and copper induced changes in tomato membranes lipids". *Phytochem.*, 45 (7), pp :1343-1350.
- Quezel P., Santa S., 1962 : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. France.
- Rahman, M.A., Hasegawa, H., Ueda, K., Maki, C.O., Rahman, M., 2007. "Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): A good option for phytoremediation. *Chemosphere*, 69, pp : 439-499.

- Ramade F. 1992. Précis d'Ecotoxicologie : Masson 295 p., Coll. Ecologie, ISBN : 2-225-82578-5.
- Rasanen L. 2002. Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis* thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlande
- Richter G., 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp : 341-352.
- Rome S. Fernandez M.P., Brunel B., Norman P., Cleyet-Marel J.C., 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. N°46,pp : 972-980.
- Ron E. Z., Minz D., Finkelstein N. P. & E. Rosenberg. 1992. Interactions of bacteria with cadmium. Biodégradation. 3, 487-491
- 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.
- Savka M.A., Dessaux Y., Oger P., Rossbach S., 2002. Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. Mol Plant Microbe Interact. N°15, pp: 866-874.
- Segovia, L., Young, P.W., et Martinez-Romero, E., 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. N°43(2),pp : 374-377
- Sexstone, A.J., Revsbech, N.P., Parkin, T.B., and Tiedje, J.M., 1985. Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. Soil Science Society of America Journal N°49,pp: 645-651.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994: Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc .pp 450.
- Stewart P., 1969. Quotient pluviométrique et dégradation biométrique :Quelques réflexions. Bull. Soc. Nat. Afr. Du Nord. T 59. pp 23-36.
- Stotzky, G., 1997. Soil as environment for microbial life. In Modern Soil Microbiology. Van Elsas, J.D., Trevors, J.T., and Wellington, E.M.H. (eds). New York: Marcel Dekker, pp. : 1-20.
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S., Nuti M.P.,

1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. Journal of Applied Microbiology. 84(1) supporting bacteria Current Science, Vol. 89, N°1. pp 81-89.
- Stumm, W., Morgan, J., 1996. "Aquatic Chemistry :Chemical Equilibria and Rates in Natural waters". Third Ed. New York, John Wiley and Sons. 1022p.
- Sy A., Girau E., Jordan P., Garcia N., Willems A., DeLajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C., et Dreyfus B., 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J.Bacteriol. N°183, pp : 214-220.
- Tessier, A., Turner, D., 1995. "Metal speciation and bioavailability in aquatic systems". Chisters, John Winely and Sons.696p
- Timmers AC., Auriac MC., Truchet G., 2007. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium- Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development. N°126, pp: 3617-3628,1617-1629.
- Toledo, I., Lloret, L., and Martinez-Romero, E., 2003. *Sinorhizobium americanum* sp. nov. a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. In Mexico. Syst. Appl. Microbiol. N°26,pp : 54-64.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology N°56,pp: 782-787
- Tortora G.J., Funk B.R., Case C.L., 2003. Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. pp : 826-830.
- Van Berkum, P., Beyene, D., bao, G.P., Campbell, T.A., and Eardly, B.D., 1988. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and from nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. Int. J. Syst. Bacteriol. N°48(1),pp : 13-22.
- Van Brussel AA., Bakhuizen R., Van Sprosen PC., Spaink HP., Tak T. Lugtenberg BJJ., 1992. Induction of preinfection thread structures in the leguminous.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., deVos P., Keresters K., Swing J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Concensus Approach to Bacteriol Systematic. Microbiological. Rev. N°60(2),pp : 407-438.
- Vargas AAT & Graham PH. 1988. Phaseolus vulgaris cultivar and Rhizobium strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. Field Crops Research 19: 91-101.

- Vargas AAT & Graham PH.1988. Phaseolus vulgaris cultivar and Rhizobium strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. Field Crops Research 19: 91-101.
- Vavilin, D.V., Polynov, V.A., Matorin, D.N., Venediktov, J., 1995. "Sublethal concentration of copper stimulate photosystem II photoinhibition in Chlorella pyrenoidosa", J. Plant Physiol. 146, pp : 609-614.
- Vincent, J.M., 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Volesky B. and Z.R. Holan,1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol Prog.* 11 : 235-250
- Waligora Cecile., Tetu T., 2008. Légumineuses, il est urgent de les réhabiliter. Edition Techniques culturelles simplifiées. N° 48 Juin/Juillet/Août 2008.
- Walton B.T et Anderson T.A. 1992 .Plant- microbe treatment systems for toxic waste. Current opinion in Biotechnology, Vol. 3, pp. 267-270.
- Wang E.T., Rogel M.A., Garcia De Los Santos A., Martinez-Romero J., Cevallos M.A., et Martinez-Romero E., 1999. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. Int. J. Syst. Bacteriol. N°49, pp:1479-1491.
- Wang E.T., van Berkum P., Beyene D., Sui X.H., Chen W.X., Martinez-romero E., 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. Int. J. Syst. Bacteriol. N°48,pp : 687-699.
- Weckx, J.E.J., Clijsters, H.M.M. 1996. "Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of Phaseolus vulgaris as a result of root assimilation of toxic amounts of copper". Physiol. Plant. 96, pp : 506-512.
- Wei G., Fan L., Zhu W., Fu Y., Yu J., Tang M., 2009 : Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from root nodule of Lespedeza cuneata in gold mine tailings in China. Journal of Hazardous Materials 162 pp 50- 56.
- Wei G.H., Wang E.T., Tan Z.Y., Zhu M.E., et Chen W.X., 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. Nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from lidigofera spp. and kummerowia stipulacae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. N°52,pp : 2231-2239.

- Winogradsky, S., 1949. Microbiologie de sol - Problèmes et méthodes - Cinquante ans de recherches. Paris
- Xu, L.M. Ge C., Cui Z., Li et Fan H., 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. N° 45(4), pp : 706-711
- Young, J.P.W., Downer, H.L., and Eardly, B.D., 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi by PCR-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. J. Bacteriol. N°173,pp : 2271-2277.
- Zakhia F., DeLajudie P., 2006. La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques d'application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). Can. J. Microbiol. N° 52, pp : 169-181.
- Zitouni E. 2004. Détermination de la composition chimique de quelques légumineuses fourragère spontanées durant les différents stades phénologiques (région de la Mitidja). Mémoire d'ingénieur d'état. Département d'agronomie. Blida. Pp :60

Annexes

Annexe 01 :

1. Composition du milieu Yeast-extract Mannitol Broth (YMB) (en mM/l) (Vincent, 1970)

Composants :	Quantité (mol)
Mannitol	54mM
KH ₂ PO ₄	3.6mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.81mM
NaCl	1.71mM
Extrait de levure	0.50 g
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

2. Composition du milieu Yeast-extract Mannitol Agar (YMA) (en g/l) (Vincent, 1970)

Composants	Quantité
YMB	1000 ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

3. Composition du milieu Yeast-extract Mannitol Agar additionné de rouge Congo (YMA+ RC) (en g/l) (Vincent, 1970)

Composants	Quantité
YMA	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10 ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

4. Composition du milieu Yeast-extract Mannitol Agar additionné de bleu de Bromothymol (YMA+ BTB) (en g/l) (Vincent, 1970)

Composants	Quantité
YMA	1000 ml
Solution stock de bleu de Bromothymol	05 ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

5. Composition du milieu Glucose Peptone Agar additionné de pourpre de Bromocrésol (GPA+BCP) (en g/l)(Vincent, 1970) :

Composants	Quantité (mol)
Glucose $C_6H_{12}O_6$	55.5mM
Peptone	5 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	18 g
Solution stock de pourpre de Bromocrésol	10 ml
pH	6.8
Autoclave	120°C pendant 20 minutes

6. Composition du milieu Yeast-extract Mannitol Agar additionné de Calcofluor White (YMA+CFW) (en g/l)(Struffi, 1998)

Composants	Quantité
YMA	1000 ml
Calcofluor White	0.02%
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

7. Composition du milieu Mannitol mobilité (g/l) :

Composants	Quantité
Peptone	15 g
Mannitol	10 g
Extrait de Viande	3 g
Rouge de Phénol	0.05 g
Nitrate de potassium	1 g
Agar	4 g
pH	7.8
Eau distillée	1000 ml
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

8. Composition du milieu Tryptone Yeast Agar (TYA) (en g/l) (Beringer, 1974) :

Composants	Quantité
Tryptone	05
Extrait de levure	03
CaCl ₂ .H ₂ O	0,87
Agar	12
Eau distillée	1000 ml
pH	6,8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Annexe 02 :

La coloration de Gram

1. Couvrir la lame de **violet de Gentiane** pendant 01 minute.
2. Chasser le violet avec du **Lugol** et ensuite couvrir la lame avec le Lugol pendant 30 secondes.
3. Décolorer au mélange **alcool-acétone (v/v)** jusqu'à la décoloration totale du frottis.
4. Laver à **l'eau de robinet** courante.
5. Couvrir la lame d'une solution de **Fushine** pendant 01 minute.
6. Laver à l'eau, séché la lame et **observer a immersion (Objectif X100)**.