

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Badji Mokhtar University-Annaba  
Université Badji Mokhtar-Annaba



جامعة باجي مختار- عنابة

Faculté des sciences  
Département de biologie

### Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de magister  
en écologie végétale et environnement

**Option :** interactions plantes microorganismes et environnement

**Biodiversité et isolement des symbiotes mycorhiziens et symbiotes  
fixateurs d'azote d' *Alnus glutinosa* (L.Gaertn) et d'*Acacia  
melanoxylon* (R.) de la station du lac Tonga (Nord-Est Algérien)**

**Présenté par :**  
**SOUALMIA asma**

**Sous la direction de :**

M<sup>me</sup> Beddiar Arifa    Maître de conférence    Université Badji Mokhtar (Annaba)

**Devant le Jury :**

**Président :** M<sup>r</sup> Tahar Ali    Professeur    Université Badji Mokhtar (Annaba)

**Examineurs :**

M<sup>r</sup> Benslama Mohamed    Maître de conférence    Université Badji Mokhtar (Annaba)

M<sup>r</sup> Djemaï Rachid    Maître de conférence    Université Badji Mokhtar (Annaba)

**Soutenu le 12 / 05/ 2010**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes parents,  
A mon époux et ma petite LILOU,  
A mon frère et à ma sœur,  
A mes grands-parents,  
A toute ma belle famille,  
Ainsi qu'à tout mes amis et camarades de promotion.*

## ***REMERCIEMENTS***

Mes remerciements vont à :

A Mme. **BEDDIAR, A.** qui m'a encadrée durant ce travail. Je voudrais également lui témoigner toute ma gratitude et tout mon respect pour sa disponibilité, sa gentillesse, et de son éternel optimisme et ce malgré toutes les difficultés rencontrées. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Mr. **TAHAR ALI** qui me fait l'honneur de présider ce jury, qu'il reçoive ici le témoignage de mes sincères remerciements.

A monsieur Mr. **DJEMAAI** pour sa disponibilité et son incroyable gentillesse et qui me fait l'honneur d'examiner ce manuscrit, qu'il trouve ici mes remerciements les plus sincères.

Je remercie également monsieur Mr. **BENSLAMA** qui m'honore en acceptant d'examiner ce manuscrit, mais aussi pour son aide qui nous a été vraiment précieuse, qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

## Résumé

La présente étude avait pour objectifs d'apporter une contribution à l'étude des symbioses : mycorrhizienne , actinorhizienne et rhizobienne chez les deux espèces *Alnus glutinosa* (Gaertn) et *acacia melanoxydon* (L.) de la station du lac Tonga (Nord-Est de l'Algérie).

L'estimation de la colonisation par les champignons endomycorhiziens a révélé une fréquence de la colonisation relativement faible (entre 10 et 40%) pour *Alnus Glutinosa* (Gaertn.) et *Acacia melanoxydon* (L.) avec cependant des taux exceptionnellement élevés enregistrés pour le printemps 2008 (76.47% et 64.44% respectivement). La recherche des spores fongiques endomycorhizogènes a révélé une biodiversité considérable pour les deux espèces étudiées avec une prédominance du genre *Glomus*. Il faut aussi noter que le potentiel mycorhizogène du sol de la station d'étude était très important sous l'acacia, avec 1300 propagules/kg de sol, contre seulement 556 propagules/kg de sol pour l'aulne.

Cinq morphotypes d'ectomycorhizes de l'aulne ont également été décrits.

Cinq souches de *Frankia* ont été isolées à partir des nodules d'*Alnus glutinosa* et conservées pour des inoculations ultérieures. Par ailleurs, les tests de caractérisation des deux souches rhizobiennes (efficentes) isolées chez *Acacia melanoxydon* attestent qu'on est en présence du genre *Rhizobium* à croissance rapide.

## Summary

This study aimed to contribute to the study of mycorrhizal, rhizobial and actinorhizal symbiosis in both species *Alnus glutinosa* (Gaertn.) and *Acacia melanoxydon* (L.) in the Tonga lake station (North-East Algeria).

The estimate of colonization by endomycorrhizal fungi has revealed a frequency of colonization relatively low (between 10 and 40%) for *Alnus Glutinosa* and *Acacia melanoxydon* (L.), however, with exceptionally high rates registered for spring 2008 (76.47% and 64.44% respectively). The research of endomycorrhizogenous fungal spores showed a significant biodiversity for both species with a predominance of the genus *Glomus*. Also note that the mycorrhizogenous potential (MPN) of rhizosphere soils was very important for the acacia, with 1300 propagules / kg of soil, against only 556 propagules / kg of soil for the alder. Five morphotypes of ectomycorrhizae of alder were also described.

Five strains of *Frankia* were isolated from nodules of *Alnus glutinosa* and kept for subsequent inoculations. Moreover, the characterization tests of the two rhizobial effective strains isolated from *Acacia melanoxydon* demonstrated that we are in the presence of fast-growing *Rhizobium* genus.

## صخلملا

يف *Rhizobium*

*Alnus Glutinosa*

مويبوزيرلا

رمحالادوعلا يعون نم لك عم

ةيلاتلا شيعتلا تالاعتل اذ ان حرتقا اذ ان لم عم

ايريتكيب *Frankia* شيعتلا , ازيروكيملا

*Acacia melanoxydon* ايريتكيب و

ايسكالال و

ريازجال قرش لامش ععقاول افنوط قري حب عطحم يف

لكل 40 و 10 نيب ام تحوارتت ففيعض ام اعون ابسن فس اردلا قرتف لال خ ةيزيروكيملا قلحال ميوون نيب

و نم 64.44 و 76.47 ) ةعفترم دج ميق هب تلجس يذلا 2008 قنسل عيبرلا ل صرف ءانثتساب

نيسوردملا نيعونلل اربتعم ايجولويب اعونت نيب غاوبالال نع ثحبالا (*Glomus* . ع نيسوردملا نيعونلل

عم

عون قنميه

ن عم قنراقم ايسكالال عون يدل قرتبعم دج قبرتلا ةيزيروكيملا قردقلا ب قلعتملا قلجسملا جئاتنلا تناك

(يلاولتلا يلع قبرتلا نم غك/يرثاكت وضع 566 و 1300

هـ ىلأ ؤفاضالاب انمق.رمحالادوعلا ىدل ؤىجراخلا ازىروكىملا نم لاكشا ؤسمخل افصو انلمع راطا يف كلذك انمدق  
رجت ؤارجال اهب انظفتحا و رمحالادوعلا عون عم شىاعتت ىتلا اىكنارفلا اىرىتكىب نم تانىع ؤسمخ  
(هـ) موىبوزىرلا اىرىتكىب نم نىتنىعل اهانىرجا ىتلا ىلواللا فىصوتلا برجت انل تتبثا ىرخا ؤىحان نم  
عىرسلا ومنلا تاذ موزوبىر عون ىلأ ناىمتنت امهنا

## *Liste des abréviations*

Abréviation	Définition
AM	Arbuscular Mycorrhiza
A%	Teneur arbusculaire de la racine
F%	Taux d'infection AM
a%	Teneur arbusculaire dans la partie endomycorhizée de la racine
M%	L'intensité de la colonisation du cortex racinaire
m%	L'infection dans la partie endomycorhizée de la racine
H	Hyphes
V	Vésicules
A	Arbuscules
ECM	Ectomycorhizes
Fr	Hyphes de Frankia,
Pr	Protoxylème
LN	Lobe nodulaire
%	Pourcent
µm	Micromètre
mm	Millimètre
cm	Centimètre
m	Mètre
Ha	Hectare
Km <sup>2</sup>	Kilomètre carré
mg	Milligramme
g	Gramme
ml	Millilitre
g/l	Gramme par litre
AP	Appressorium
PPA	Appareil de pré-pénétration
PAM	Membrane péri-arbusculaire
sp	Espèce
N <sub>2</sub>	Azote atmosphérique
°C	Degré Celcius
ATP	Adénosine triphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
Pi	Phosphate
e <sup>-</sup>	Electron
H <sup>+</sup>	Proton
NH <sub>3</sub>	Ammoniac
KOH	Hydroxyde de potassium
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chloridrique
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
CaCO <sub>3</sub>	Carbonate de calcium

NaCl	Chlorure de sodium
KCr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Bichromates de potassium
FAA	Formol-acide acétique-alcool
PBS	Phosphate Buffer Saline
PVP	polyvinyl pyrrolidone
YMA	Yeast Mannitol Agar
Y.M.B	Yeast Mannitol Broth
BMB	Bleu de Bromothymole
Nbre	Nombre
H <sub>2</sub>	Hydrogène
Fe	Fer
Mo	Molybdène
Zn	Zinc
Cu	Cuivre
S	Soufre
Ca	Calcium
Mg	Magnésium
K	Potassium
Na	Sodium
B	Bore
Cd	Cadmium
pH	Potentiel hydrique
MO	Matière organique
C	Carbone
R	Répétition
SN	Sol naturel
S St	Sol stérile
t	Tonne
n°	Numéro
p/v	Poids par volume
MPN	Potentiel Mycorhizogène
<	Inférieur
>	Supérieur
DO	Densité optique
RN	Route Nationale
N	Nord
E	Est
P	Prélèvement

# Table des matières

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	III
Liste des abréviations.....	IV
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Revue bibliographique.....</b>	<b>2</b>
I. La symbiose mycorhizienne :.....	2
1. Définition de la mycorhize et généralités.....	2
2. Les types de mycorhizes :.....	2
2.1. Les endomycorhizes :.....	3
2.1.1. Généralités.....	3
2.1.2. L'infection endomycorhizienne.....	3
2.2. Les Mycorhizes à pelotons d'hyphes cloisonnés :.....	6
2.2.1. Mycorhizes orchidoïdes.....	6
2.2.2. Mycorhizes éricoïdes.....	6
2.3. Les ectendomycorhizes.....	6
2.4. Les ectomycorhizes (ECM) :.....	6
2.4.1. Généralités.....	6
2.4.2. Description de l'ectomycorhize.....	6
2.4.3. La colonisation ectomycorhizienne.....	9
2.4.4. Le fonctionnement général de l'ectomycorhize.....	13
2.4.5. Les types d'ectomycorhizes :.....	13
2.4.5.1. Les ECM typique des angiospermes.....	13
2.4.5.2. Les ectomycorhizes typiques des gymnospermes.....	13
2.4.6. La spécificité chez les ectomycorhizes.....	13
3. Rôle des mycorhizes :.....	13
3.1. Effets bénéfiques pour la plante hôte.....	13
3.2. Effets bénéfiques pour le champignon mycorhizien.....	15
II. la symbioses actinorhizienne et la symbiose rhizobienne :.....	15
1. La fixation de l'azote.....	15
1.1. Généralités sur la fixation de l'azote.....	15
1.2. Comparaison de quelques aspects caractérisant les deux symbioses actinorhiziennes et rhizobienne.....	16
2. Mécanisme de la fixation de l'azote.....	22
3. Effets bénéfiques de la combinaison mycorhizes/actinorhizes/ symbiose rhizobienne.....	23
4. Rôle des symbioses fixatrices d'azote.....	23
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes :.....</b>	<b>25</b>
I. Description de la zone d'étude :.....	25

1. Situation géographique de la zone d'étude.....	25
2. Situation administrative.....	25
3. Localisation générale.....	25
3.1. Topographie.....	25
3.2. Coordonnées géographiques.....	25
4. Facteurs climatiques de la région d'El Kala.....	25
4.1. Pluviométrie et aridité.....	25
4.2. Les températures.....	25
5. Types de sols.....	27
6. Végétation de l'arboretum.....	27
II. Description du matériel végétal :.....	28
1. Description de l'espèce <i>Alnus glutinosa</i> .....	28
2. Description de l'espèce <i>Acacia melanoxylon</i> .....	29
3. Positions systématique des deux espèces.....	32
3.1. L'espèce <i>Alnus glutinosa</i> .....	32
3.2. L'espèce <i>Acacia melanoxylon</i> .....	32
III. Analyse physicochimiques du sol de la station d'étude :.....	
1. pH eau du sol.....	33
2. Carbone total (C%) et matière organique.....	33
3. Matière organique.....	33
4. Calcaire total.....	33
5. La texture.....	34
IV. Estimation de la colonisation mycorhizienne arbusculaire (AM) chez <i>Alnus glutinosa</i> et <i>Acacia melanoxylon</i> :.....	35
1. Prélèvement et traitement des échantillons racinaires.....	35
2. Observation et estimation du taux d'infection par les champignons AM.....	35
V. Diversité des ectomycorhizes rencontrées chez <i>Alnus glutinosa</i> :.....	38
1. Prélèvement des ectomycorhizes.....	38
2. Réalisation des coupes.....	39
3. Description des ectomycorhizes.....	39
VI. Etude du potentiel mycorhizogène du sol de la station d'étude:.....	41
1. Conduite de l'essai.....	41
2. Méthode de calcul de la MPN.....	43
VII. Recherche de microorganismes symbiotiques dans le sol de la station d'étude :....	43
1. Evaluation de l'abondance des spores dans le sol.....	43
2. Piégeage des microorganismes symbiotiques.....	43
3. Evaluation de la biodiversité des spores fongiques présentes dans les rhizosphères d' <i>Alnus glutinosa</i> et d' <i>Acacia melanoxylon</i> :.....	43
4. Description des spores.....	44
VIII. Isolement des symbiotes fixateurs d'azote des nodules d' <i>Alnus glutinosa</i> et d' <i>Acacia melanoxylon</i> :.....	46
1. L'endophyte <i>Frankia</i> :.....	46

1.1. Isolement de l'endophyte.....	46
1.2. Culture de <i>Frankia</i> .....	46
2.L'endohpyte <i>Rhizobium</i> :.....	46
2.1. Isolement des bactéries <i>Rhizobium</i> à partir des nodules.....	46
2.1.1. Nettoyage et conservation des nodules .....	48
2.1.2. Stérilisation des nodules.....	48
2.1.3. Isolement selon la méthode du nodule écrasé.....	48
2.1.4. Détermination des souches selon la méthode de la coloration de Gram.....	49
2.1.5. Purification des isolats.....	49
2.1.6. Conservation des isolats.....	50
2.2. Identification des isolats:.....	50
2.2.1. Test distinctif entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i> (Test de 3-cétolactose) :.....	50
2.2.2. Test de nodulation : .....	50
2.2.3. Caractérisation phénotypiques des isolats : .....	51
2.2.3.1. Test cytomorphologique: Vitesse de croissance: Test Y.M.A+BMB.....	51
2.2.3.2. Tests nutritionnels : Utilisation de la source de carbone .....	51
2.2.3.3. Tests physiologiques:.....	52
a. Tolérance au sel (Na Cl) :.....	52
b. Effet de la température :.....	52
c. Croissance à différents pH :.....	52
<b>Chapitre III : Résultats et discussion</b> .....	54
I. Paramètres physicochimiques du sol .....	54
II. Estimation de la colonisation endomycorhizienne arbusculaire (AM) chez <i>Alnus glutinosa</i> et <i>Acacia melanoxylon</i> .....	54
III Estimation de la diversité des ectomycorhizes chez <i>Alnus glutinosa</i> .....	59
VI. Etude du potentiel mycorhizogène du sol de la station d'étude.....	64
V. Evaluation de l'abondance des spores dans le sol.....	65
VI. Evaluation de la biodiversité des spores fongiques :.....	66
1. Spores retrouvées dans la rhizosphère d' <i>Alnus glutinosa</i> .....	66
2. Spores retrouvées dans la rhizosphère d' <i>Acacia melanoxylon</i> .....	72
3. Autres structures recensées.....	80
VII. Isolement des symbiotes fixateurs d'azote des nodules d' <i>Alnus glutinosa</i> et d' <i>Acacia melanoxylon</i> :.....	85
1. Isolement de L'endophyte <i>Frankia</i> .....	85
2. Isolement et identiifcation de l'endophyte <i>Rhizobium</i> :.....	85
2.1. Examen morphologique :.....	88
2.1.1. Croissance sur le milieu YMA-RC :.....	88
2.1.2. Croissance sur le milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + pourpre de bromocrésol (BCP):.....	88

2.2. Examen microscopique: Détermination des souches selon la méthode de la coloration de Gram.....	88
2.3. Identification des isolats:.....	89
2.3.1. Test distinctif <i>Agrobacterium-Rhizobium</i> (test du Cétolactose)....	89
2.3.2. Test de nodulation.....	89
2.3.3. Caractérisation phénotypiques des isolats : .....	89
2.3.3.1. Test cytomorphologique: Vitesse de croissance (Y.M.A+BMB).....	89
2.3.3.2. Tests nutritionnels : Utilisation de la source de carbone.....	89
2.3.3.3. Tests physiologiques:.....	90
a. Tolérance au sel (Na Cl) .....	90
b. Croissance à différents pH .....	91
c. Effet de la température:.....	91
Conclusion générale.....	92
Références bibliographiques.....	94
Annexes.....	101

## Liste des tableaux

N° tableau	Titre	Page
1	- Tableau synthétique représentant les champignons ectomycorhiziens et les familles des plantes concernées.	7
2	- Tableau comparatif de quelques aspects caractérisant les deux symbioses actinorhiziennes et rhizobienne.	16
3	- Tableau synthétique reprenant la quantité d'azote fixé au champ par quelques plantes actinorhiziennes et légumineuses ligneuses.	24
4	- Données climatiques de la période allant de Janvier 2007 à Avril 2008.	27
5	- Tableau synthétique décrivant l'espèce <i>Alnus glutinosa</i> .	28
6	- Tableau synthétique décrivant l'espèce <i>Acacia melanoxylon</i> .	29
7	- Echelle de la texture.	34
8	- Correspondance entre la lecture à l'objectif (nombre de graduations) et la dimension réelle de l'objet mesuré.	44
9	- Résultats obtenus pour les paramètres physicochimiques du sol de la station d'étude.	54
10	- Résultats de la MPN relatifs à <i>Alnus glutinosa</i> .	64
11	- Résultats de la MPN relatifs à <i>Acacia melnoxylon</i> .	64
12	- Dénombrement des spores au niveau de la rhizosphère de <i>Alnus glutinosa</i> .	65
13	- Dénombrement des spores au niveau de la rhizosphère de <i>Acacia melanoxylon</i> .	66
14	- Culture des isolats sur milieu YMA en présence de différents sucres.	90
15	- Culture des isolats sur milieu YMB en présence de différentes concentrations de NaCl.	91
16	- Densité optique des isolats en présence de différentes concentrations de NaCl.	91
17	- Croissance des deux isolats à différents pH.	91
18	- Effet de la température sur les deux isolats.	92

## Liste des figures

N° figure	Titres	Pages
1	- Illustration schématique des principaux types de mycorhizes.	2
2	- Classification des champignons endomycorhizogènes.	4
3	- Structures caractéristiques des endomycorhizes.	5
4	- Schéma représentatif du mécanisme de formation de l'endomycorhize.	5
5	- Illustration schématique d'une ectomycorhize en vue éclatée.	8
6	- Schéma résumant les types d'ectomycorhizes répertoriées.	8
7	- Types de manteaux.	10
8	- Types de manteaux.	11
9	- Types de rhizomorphes.	12
10	- Représentation schématique de l'acquisition des principaux éléments minéraux par les deux types de mycorhizes.	14
11	- Culture de <i>Frankia</i> isolée à partir de <i>Alnus glutinosa</i> .	19
12	- Représentation schématique des deux modes d'infection des plantes actinorhiziennes par <i>Frankia</i> .	19
13	- Processus d'infection intracellulaire et organogénèse d'un lobe nodulaire chez les plantes actinorhiziennes.	20
14	- Structure du nodule des plantes actinorhiziennes.	21
15	- Etapes de l'ontogénèse d'un nodule indéterminé.	21
16	- Structure des nodules de légumineuses.	22
17	- Mécanisme d'action de la nitrogénase : Représentation schématique des étapes de la réduction de l'azote.	23
18	- Localisation géographique de la station d'étude.	26
19	- Vue générale d'une partie de l'aulnaie du lac Tonga.	26
20	- Clichés représentant <i>Alnus glutinosa</i> .	30
21	- Clichés représentant <i>Acacia melanoxylon</i> .	31
22	- Schéma récapitulatif des différentes étapes à suivre pour la coloration et l'observation des racines endomycorhizées.	36
23	- Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire.	37
24	- Echelle d'évaluation de la présence arbusculaire.	37
25	- Schématisation du prélèvement des racines pour l'observation des ectomycorhizes.	38
26	- Les formes de ramifications.	40
27	- Les formes des pointes.	40
28	- Différentes textures du manteau.	41
29	- Schématisation de la méthode de réalisation du test du Nombre le Plus Probable (Most Probable Number) testé sur du poireau ( <i>Allium porrum</i> ).	42
30	- Schéma représentatif des étapes à suivre pour évaluer la biodiversité des spores fongiques.	45
31	- Schématisation des différentes étapes à suivre afin d'isoler <i>Frankia</i> .	47
32	- Conservation des nodules.	48
33	- Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide YMA.	49
34	- Germination des graines sur milieu gélosé.	51
35	- Résultats relatifs aux paramètres de l'infection endomycorhizienne pour <i>Alnus glutinosa</i> .	56
36	- Résultats relatifs aux paramètres de l'infection endomycorhizienne pour <i>Acacia melanoxylon</i> .	57
37	- Quelques aspects de la colonisation par les champignons endomycorhiziens chez <i>Alnus</i>	58

38	<i>glutinosa</i> et <i>Acacia melanoxydon</i> .	
	- Clichés représentatifs des différents morphotypes d'ectomycorhizes recensés chez <i>Alnus glutinosa</i> .	60
39	- Clichés représentatifs des différents morphotypes d'ectomycorhizes recensés chez <i>Alnus glutinosa</i> .	62
40	- Cliché représentant le dispositif de la MPN après six semaines de culture.	64
41	- Différents aspects de la colonisation des racines de poireau ( <i>Allium porum</i> ) par les champignons endomycorhiziens.	67
42	- Fiche représentative du morphotype ALNUS 1.	69
43	- Fiche représentative du morphotype ALNUS 2.	70
44	- Fiche représentative du morphotype ALNUS 3.	71
45	- Fiche représentative du morphotype ALNUS 4.	73
46	- Fiche représentative du morphotype ALNUS 5.	74
47	- Fiche représentative du morphotype ACACIA 1.	75
48	- fiche représentative du morphotype ACACIA 2.	77
49	- Fiche représentative du morphotype ACACIA 3.	78
50	- Fiche représentative du morphotype ACACIA 4.	79
51	- Fiche représentative du morphotype ACACIA 5.	81
52	- Aspect des cellules auxiliaires au grossissements (×100) et (× 400).	82
53	- Aspect de sporocarpe retrouvé dans la rhizosphère de <i>Alnus glutinosa</i> .	83
54	- Photos illustrant une cellule auxiliaire de <i>Gigaspora sp.</i> retrouvé dans la rhizosphère de <i>Acacia melanoxydon</i> .	84
55	- Aspect des colonies de <i>Frankia</i> .	86
56	- Aspect des colonies de <i>Frankia</i> .	87
57	- Croissance des deux isolats sur le milieu YMA-RC.	88
58	- Coloration de Gram des deux isolats Is <sub>1</sub> et Is <sub>2</sub> .	89
59	- Croissance des deux isolats (Is <sub>1</sub> et Is <sub>2</sub> ) en présence de mannitol.	90

## INTRODUCTION GENERALE

Il est bien établi que la plupart des espèces forestières vivent en symbiose avec des microorganismes du sol (**DOMMERGUES *et al.*, 1999**). On pourrait en citer:

Les endomycorhizes et les ectomycorhizes : qui résultent de l'association entre un hôte végétale et un champignon.

Les symbioses actinorhizienne et rhizobienne : sont le résultat de l'association d'un phytosymbiote et d'une bactérie (*Frankia* et *Rhizobium* respectivement).

La symbiose mycorhizienne joue un rôle très important dans la nutrition minérale du végétal, notamment en améliorant l'assimilation des éléments peu mobiles (tels que : Zn, Cu, S, Ca, Mg, K, Na, B, Fe) et plus particulièrement le phosphore en le stockant dans les structures fongiques (**KOTHARI *et al.* 1991 in DAVET, 1996 ; GIANINAZZI – PEARSON, 1982**).

De plus, la mycorhize constitue une « barrière mécanique » qui protège la plante de diverses formes d'agressions biotiques et abiotiques (parasites, macro- et microscopique, sécheresse, salinité ou acidité excessives, toxicité aluminique ou manganique, etc.) (**DOMMERGUES *et al.*, 1999 ; DUPONNOIS *et al.*, 2000**).

Il faut également mentionner que cette forme de symbiose est bénéfique pour le partenaire fongique, car il reçoit de la plante hôte le carbone qu'il est incapable de synthétiser par lui-même.

Les symbioses actinorhizienne et rhizobienne quant- à elles, permettent aux phytosymbiotes de fixer l'azote atmosphérique par le biais des bactéries (*Frankia* et *Rhizobium*) et donc de croître sur des sols déficients en cet élément, d'autant plus en région méditerranéenne l'azote constitue après l'eau le facteur limitant majeur de la production végétale (**BEDDIAR, 2002**). La protection et la valorisation de ces plantes devient par conséquent une nécessité, car leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique en fait des plantes de choix pour le reboisement des sols pauvres (**GAUTHIER, 1984**).

Dans notre travail nous allons tenter d'étudier quelques aspects des symbioses sus-citées chez deux espèces forestières au niveau de l'arboretum du lac Tonga (Nord-Est Algérien) à savoir : *Alnus glutinosa*, (Gaertn.) (espèce spontanée) et *Acacia melanoxylon* (L.) (Espèce introduite).

Nous évaluerons, à cet effet, la colonisation de ces essences par les champignons endomycorhiziens. Nous étudierons ensuite, la biodiversité des spores fongiques au niveau de la rhizosphère des deux espèces étudiées.

Nous tenterons également d'isoler (à partir des modules racinaires *Alnus glutinosa*, et *Acacia melanoxylon* ) et de caractériser les deux partenaires bactériens à savoir *Frankia* et *Rhizobium*.

Nous terminerons enfin par la description de quelques morphotypes ectomycorhiziens de l'aulne glutineux.

## I. la symbiose mycorhizienne :

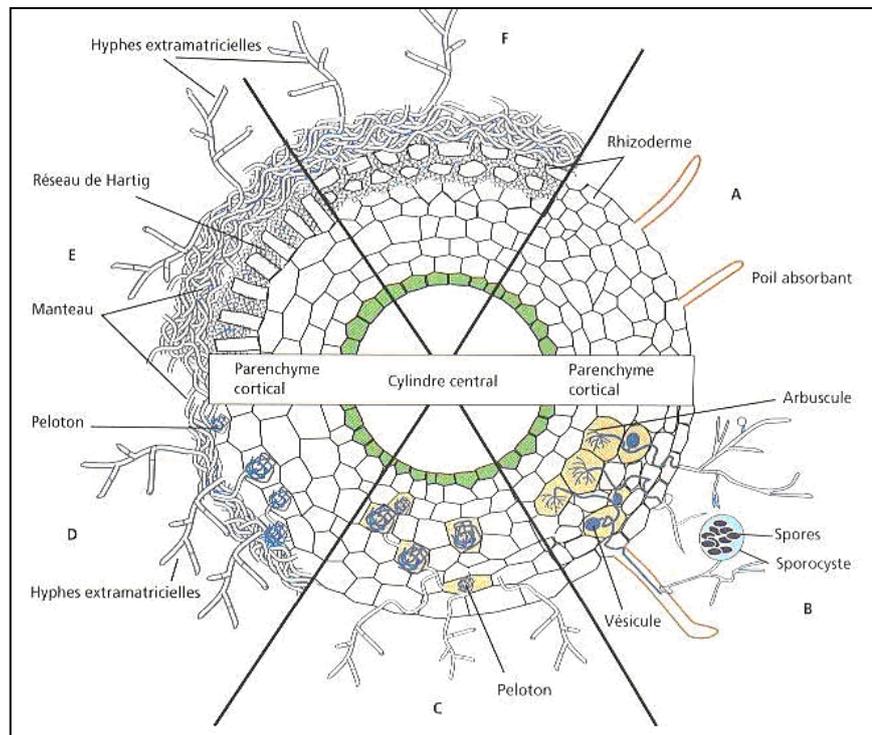
### 1. Définition de la mycorhize et généralités :

La mycorhize est un organe complexe qui résulte de l'association symbiotique d'un champignon avec la racine d'une espèce végétale. Franck le désigna, en 1885, sous le terme de mycorhize (du grec *mykès* : champignon et *rhiza* : racine) (DOMMERGUES *et al.*, 1999). Le champignon puise dans le sol l'eau et les éléments minéraux et les restitue à la plante hôte et ce en échange des carbohydrates fournies par cette dernière (DAVET, 1996).

Il est fort probable que l'évolution des plantes terrestres qui étaient sur terre il y a 400 millions d'années était possible grâce à une forme de symbiose qui se rapprocherait des mycorhizes actuelles (WILKINSON, 2001 *in* MENKIS, 2005).

Dans le cas de la symbiose mycorhizienne, la symbiose est obligatoire pour les deux partenaires car sans elle, la plante est incapable d'extraire efficacement l'eau et les éléments minéraux du sol et le champignon est incapable de fructifier et surtout de se procurer du carbone (NULTSCH et MIESCH, 1998). Les champignons mycorhiziens sont en effet des symbiotes stricts et n'ont pas d'activité saprophytique dans le sol; ils obtiennent tout leur carbone de la plante hôte. Environ 20% du carbone assimilé par la plante par voie photosynthétique sert à nourrir les symbiotes racinaires (SMITH et READ, 1996 *in* DOMMERGUES *et al.*, 1996).

**2. Les types de mycorhizes :** On distingue plusieurs types de mycorhizes (figure 1): les endomycorhizes à arbuscules, les ectomycorhizes et les ectendomycorhizes, ainsi que des mycorhizes éricoïdes et orchidoïdes.



**Figure 1 :** Illustration schématique des principaux types de mycorhizes : A: racine sans symbiote, B: endomycorhizes AM, C: endomycorhizes à pelotons, D : ectendomycorhizes, E: ectomycorhizes chez les angiospermes, F : ectomycorhizes chez les gymnospermes (d'après DUHOUX NICOLE, 2004).

## **2.1. Les endomycorhizes :**

### **2.1.1. Généralités :**

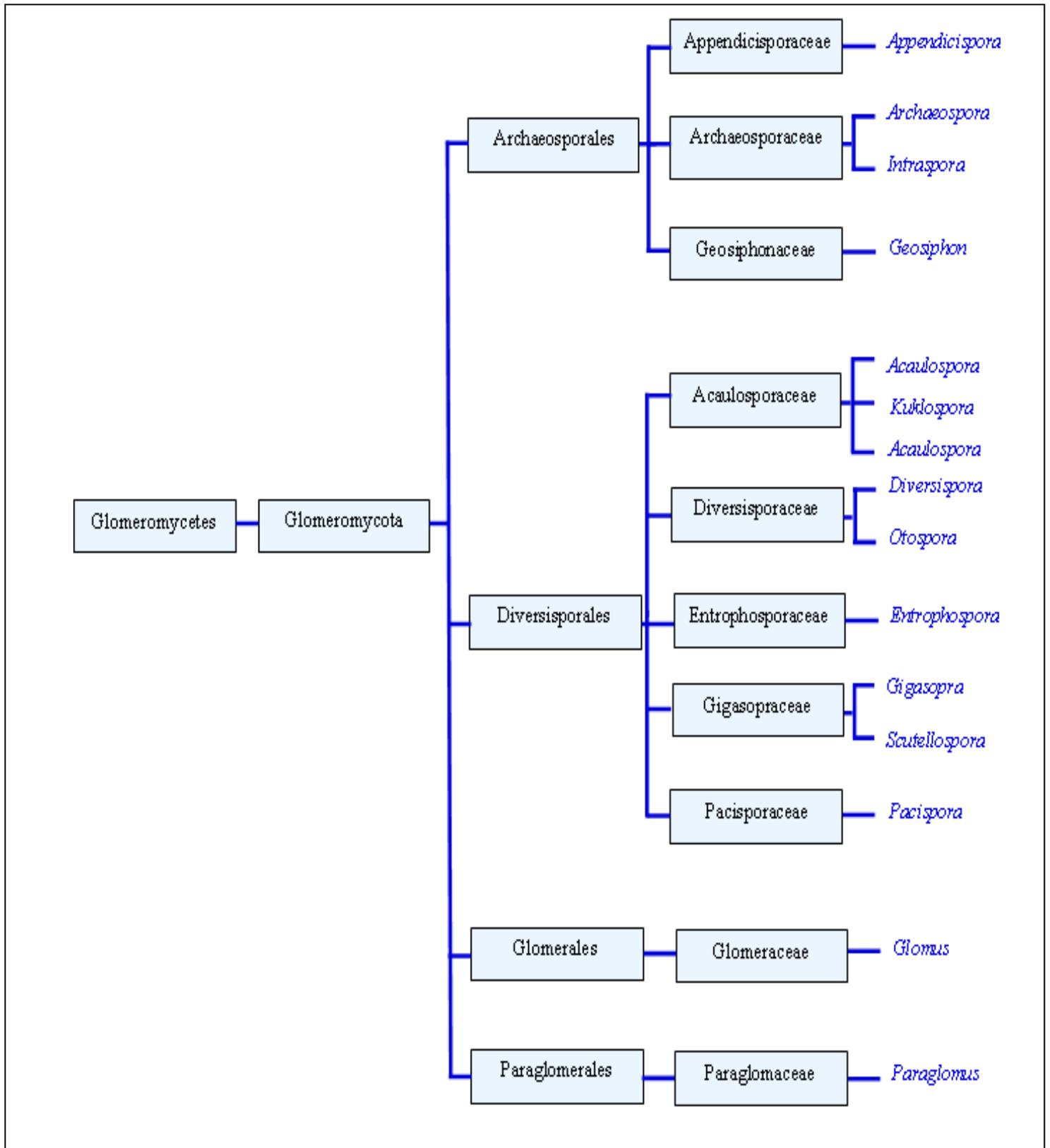
Les endomycorhizes sont provoquées par des champignons appartenant au phylum Glomeromycota (figure 2) (VESTBERG *et al.*, 2004) et sont caractérisés entre autre, par la présence d'hyphes intraracinaires, de vésicules (figure 3-2) et/ou d'arbuscules endocellulaires (figure3-1). Les endomycorhizes sont très peu spécifiques et ne modifient pas la structure de la racine. Elles ne sont observables qu'en microscopie après coloration.

Le type endomycorhizien domine très largement dans les forêts tropicales. Cependant, les espèces fongiques responsables de l'endomycorhization sont peu diversifiées et à répartition mondiale (MALLOCH *et al.*, 1980 *in* DUCOUSSO et THOEN, 1991). Elles sont fréquentes et très répandues et concernent environ 80% des espèces végétales excepté Chénopodiacées et Cruciféracées (DAVET, 1996).

### **2.1.2. L'infection endomycorhizienne :**

Le mécanisme de formation de l'endomycorhize se déroule comme suit:

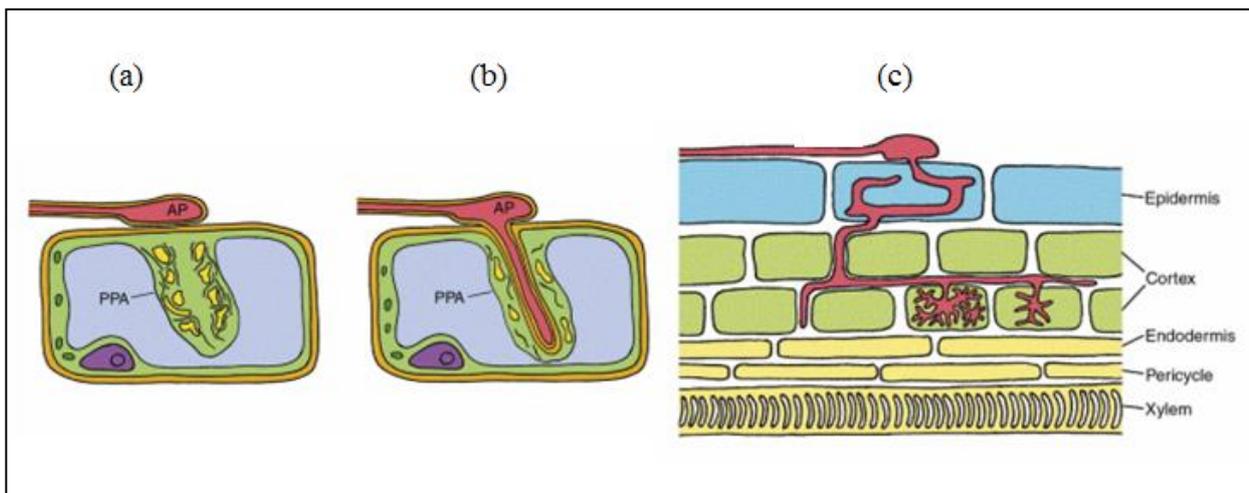
- Echange de signaux moléculaires entre le champignon et la plante hôte: libération de molécules de reconnaissance par les racines flavonoïdes, strigolactones qui induisent la ramification des hyphes fongiques (AKYIAMA, 2007).
- Approche d'un hyphe de la racine et formation d'un *appressorium* (AP)
- préparation de l'appareil de pré-pénétration, suivie de la pénétration du champignon à l'intérieur de la cellule (de ROUGEMONT, 2007) par invagination de la membrane plasmique (site 1).
- Formation d'une boucle dans la première cellule épithéliale (de ROUGEMONT, 2007), progression du champignon entre les cellules pour coloniser le cortex et pénétration dans les cellules internes du cortex en y formant des arbuscules (siège des échanges actifs) et des vésicules (SEDDAS *et al.*, 2008) . Il est à noter que le champignon ne passe jamais la barrière de l'endoderme.
- Développement de l'arbuscule à l'intérieur de la cellule hôte. La membrane épéiarbusculaire (PAM) qui se forme est le lieu de l'échange symbiotique. L'arbuscule occupe un volume important de la cellule.



**Figure 2 :** Classification des champignons endomycorhizogènes (selon SCHÜBLER *et al.* (2001), OEHL et SIEVERDING (2004), WALKER et SCHÜBLER (2004), SIEVERDING et OEHL (2006), SPAIN *et al.* (2006), WALKER *et al.* (2007a, b), et PALENZUELA *et al.* 2008 *in site 2*).



**Figure 3:** Structures caractéristiques des endomycorhizes: (3-1) : Arbuscule induit par *Glomus sp.* (BRUNDRETT, 1984 in BRUNDRETT *et al.*, 1996), (3-2) :Vésicules induites par *Glomus intraradices* (site 3).



**Figure 4:** Schéma représentatif du mécanisme de formation de l'endomycorhize (4-a et b): Formation d'*appressorium* et pénétration, (4-c): colonisation du cortex (de ROUGEMONT, 2007).

## **2.2. Les Mycorhizes à pelotons d'hyphes cloisonnés:**

Ce sont les mycorhizes orchidoïdes et les mycorhizes éricoïdes:

### **2.2.1. Mycorhizes orchidoïdes:**

Caractéristiques de la famille des Orchidacées (**MENKIS, 2005**), elles présentent des hyphes en forme de pelotons cloisonnés à l'intérieur des cellules corticales.

**2.2.2. Mycorhizes éricoïdes :** les Familles concernées sont: les Ericacées et quelques espèces appartenant aux Epacridacées (**BRUNDRETT et al., 1996**).

### **2.3. Les ectendomycorhizes:**

Ce type de mycorhizes possède les caractéristiques communes aux ecto- et aux endomycorhizes : le champignon ectendomycorhizien forme un monchon mycélien ainsi qu'un réseau de Harting (**FUSCONI et BONFANTE-FASOLO, 1984 in BONFANTE-FASOLO et al., 1986**), il pénètre également et se développe à l'intérieur des cellules corticales.

### **2.4. Les ectomycorhizes (ECM):**

#### **2.4.1. Généralités :**

Les ectomycorhizes se caractérisent par la présence de mycélium à l'extérieur de la racine formant le manteau fongique, et entre les cellules du cortex racinaires formant le réseau de Hartig. Le tableau 1 retrace les champignons ectomycorhiziens ainsi que les familles des plantes hôtes concernées par cette symbiose.

#### **2.4.2. Description de l'ectomycorhize :**

D'un point de vue anatomique une ectomycorhize est constituée :

##### a. du manteau fongique :

Cette structure est formée par l'enroulement du mycélium du champignon autour de la racine de la plante (figure 6). L'épaisseur de ce dernier varie selon les espèces ECM.

Plusieurs structures de manteaux ont été décrites dans la bibliographie ; elles sont représentées par des lettres capitales allant de A-Q. La série (A-I) concerne le type plectenchymateux qui se caractérise par un ensemble d'hyphes individuels, contrairement au pseudomarenchymateux qui se distingue lui par des cellules courtes gonflées et des hyphes collés les uns aux autres (K-Q) (figures 7 et 8) (**AGERER, 2006**).

##### b des hyphes extramatriciels :

Ils peuvent être simples ou rassemblés en cordons linéaires appelés « rhizomorphes » (**DOMMERGUES et al., 1999**) Ces hyphes vont explorer et exploiter les différentes ressources du sol à plus d'une dizaine de centimètres de la racine (**MENKIS, 2005**).

Sept types de rhizomorphes ont été décrits : (**AGERER 1999; AGERER et IOSIFIDOU 2004 in AGERER, 2006**). Cette description est basée sur : le mode d'agencement des hyphes fongiques (entremêlés, serrés, etc.), la structure et le diamètre des hyphes, l'aspect des *septa* (figure 9).

**Remarque :** Toutes les ectomycorhizes ne forment pas de rhizomorphes. En général les rhizomorphes se rattachent à la base du carpophore et relient celui-ci à l'ectomycorhize.

c. du réseau de Hartig:

Le réseau de Hartig résulte de la pénétration plus ou moins profonde d'hyphes mycéliens issus du manteau entre les cellules de la première assise épidermique des racines courtes de la plante hôte (figures 5 et 6).

Ces hyphes constituent un vaste réseau mycélien, qui se nourrit exclusivement de matières organiques des horizons supérieurs du sol. Ils fructifient à ce niveau pour former des carpophores (**DOMMERGUES et al., 1999**).

Le réseau de Hartig peut être d'épaisseur variable, il va être le siège des échanges bidirectionnels entre les deux partenaires (**GAGNÉ, 2005**).

Les cellules de l'épiderme et du parenchyme cortical de l'hôte ne montrent pas de modification ultrastructurales par rapport aux cellules des racines non mycorhizées.

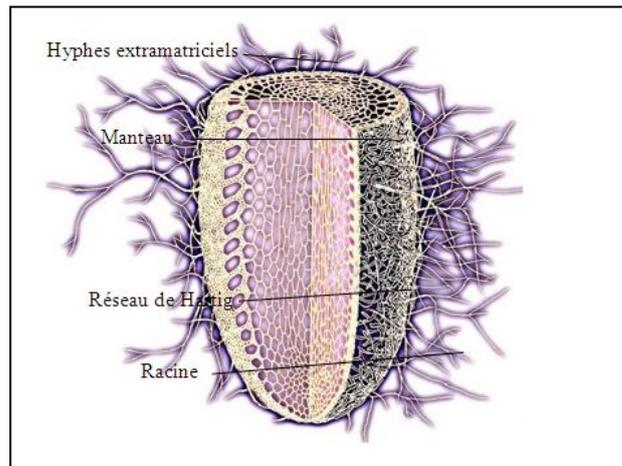
Néanmoins, les amyloplastés peuvent être parfois modifiés ; ils deviennent plus petits ou disparaissent. On relève également un dépôt de tannins dans le cytoplasme périphérique ou dans la vacuole (**BONFANTE-FASOLO et al., 1986**).

*Remarque : Toutes les ectomycorhizes ne forment pas de rhizomorphes. En général les rhizomorphes se rattachent à la base du carpophore. Ceci dit, on a pu relever quelques exceptions.*

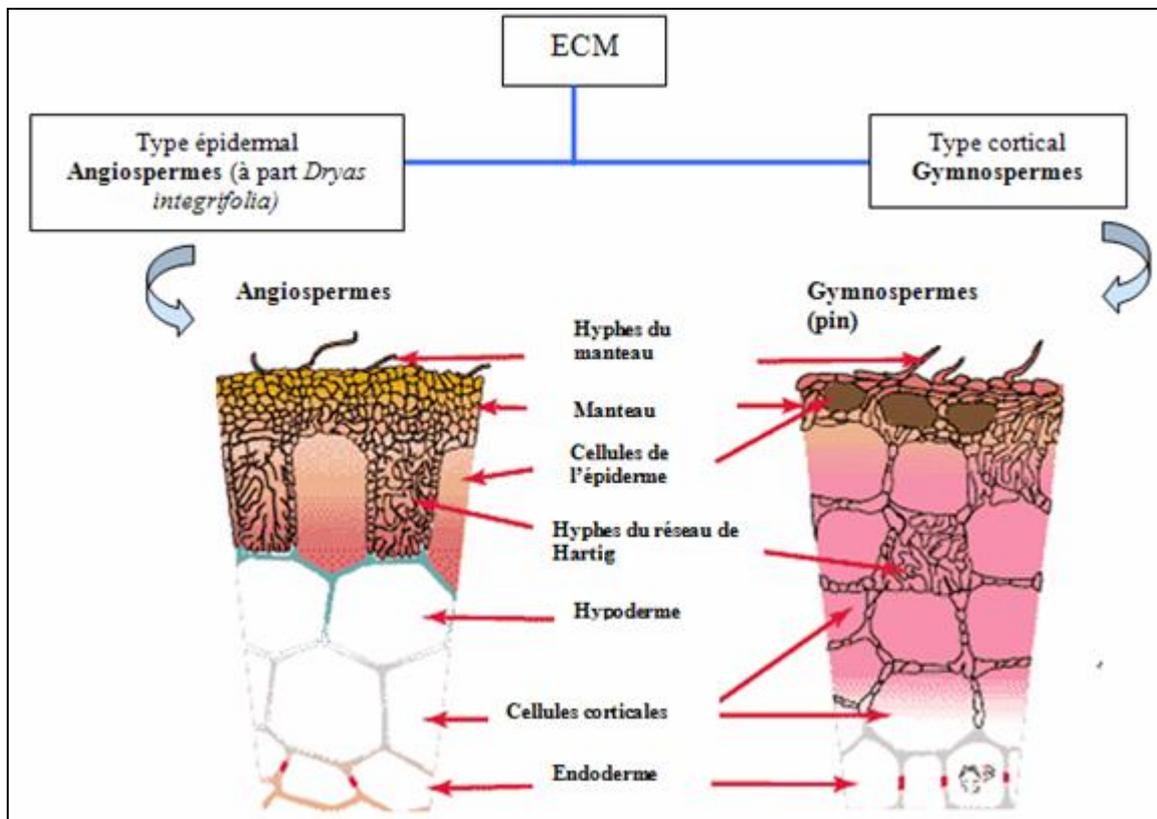
Chez certaines espèces, les rhizomorphes peuvent être dimorphiques : selon qu'ils croissent dans le sol ou tout au long des racines ou bien alors en reliant les ECM aux carpophores.

**Tableau 1 :** Tableau synthétique représentant les champignons ectomycorhiziens et les familles des plantes concernées.

<p>Les champignons ectomycorhiziens</p>	<p>-5000 et 6000 espèces (<b>MASSICOTTE et TRAPPE, 1992 in MENKIS, 2005</b>)</p> <p>- La plupart sont des basidiomycètes (agaricales) (<b>LE TACON, 1988</b>) + quelques ascomycètes et zygomycètes (<b>MASSICOTTE et TRAPPE, 1992 in MENKIS, 2005</b>).</p>
<p>Familles des plantes</p>	<p>- Essentiellement des espèces ligneuses: Myrtacées, les Pinacées, les Abiétacées, les Fagacées, les Tiliacées, les Ulmacées les Salicacées, Césalpinacées + Diptérocarpacées et les Euphorbiacées (<b>GARBAYE, 1988</b>).</p> <p>-Egalement des plantes herbacées : Polygonacées, Cypéracées (<b>DAVET, 1996</b>).</p> <p>- Toutes ces plantes forment les forêts des régions boréales (<b>Le TACON, 1988</b>) tempérées et montagneuses + quelques unes au niveau arctique (<b>site 4</b>).</p>



**Figure 5 :** Illustration schématique d'une ectomycorhize en vue éclatée (d'après La GRANGE, 2001 in GAGNE, 2005).



**Figure 6 :** Schéma résumant les types d'ectomycorhizes répertoriées (BRUNDRETT *et al.*, 1996 et BRUNDRETT, 2004).

### 2.4.3. La colonisation ectomycorhizienne :

La morphogenèse de l'ectomycorhize se déroule selon les étapes suivantes :

- Echange de signaux moléculaires entre le champignon et la plante hôte :

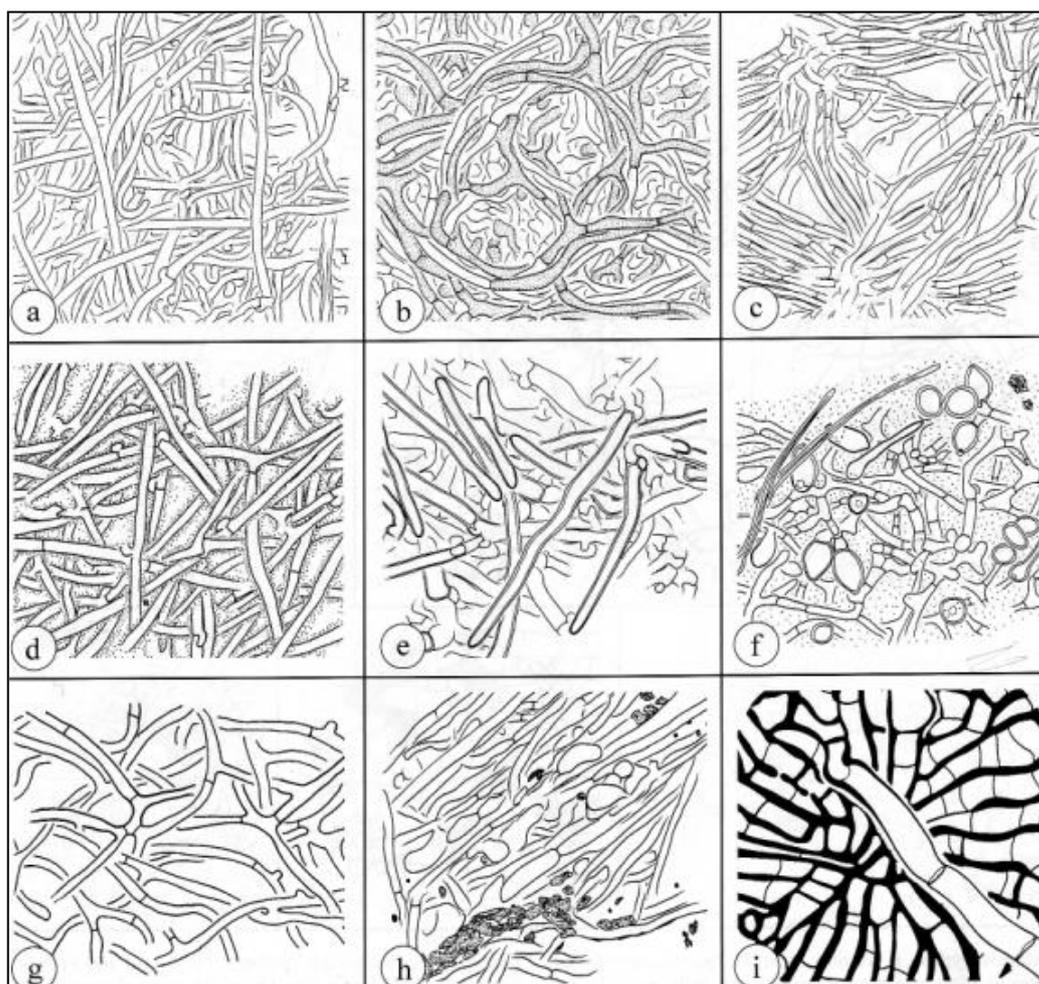
- Emission d'exsudats racinaires par la plante hôte (vitamines, acides aminées, facteur M) et stimulation par conséquent de la croissance du champignon symbiotique vers la racine (stimulation de la germination des spores ectomycorhiziennes, intensification de la ramification des hyphes) (**GOGALA, 1991 ; ALI et JACKSON, 1988 ; HORAN et CHILVERS, 1990 in BEGUIRISTAIN, 1996**).
- Exsudation d'une gamme de substances par le champignon ectomycorhizien (auxine, AIA, cytokinines, gibbérellines) (**DURAND et al., 1995 in BEGUIRISTAIN, 1996**) afin de faciliter la colonisation de la racine en modifiant vraisemblablement les propriétés élastiques de la paroi (**CLELAND, 1995; GOGALA, 1991; BEYRLE, 1995; RUPP et al., 1989 in BEGUIRISTAIN, 1996**).

- Contact entre les partenaires : les plantes hôtes possèdent des sucres spécifiques à leur surface lesquels sont reconnus par le champignon grâce à des lectines spécifiques (**GIOLLANT et al., 1993 in BEGUIRISTAIN, 1996**).

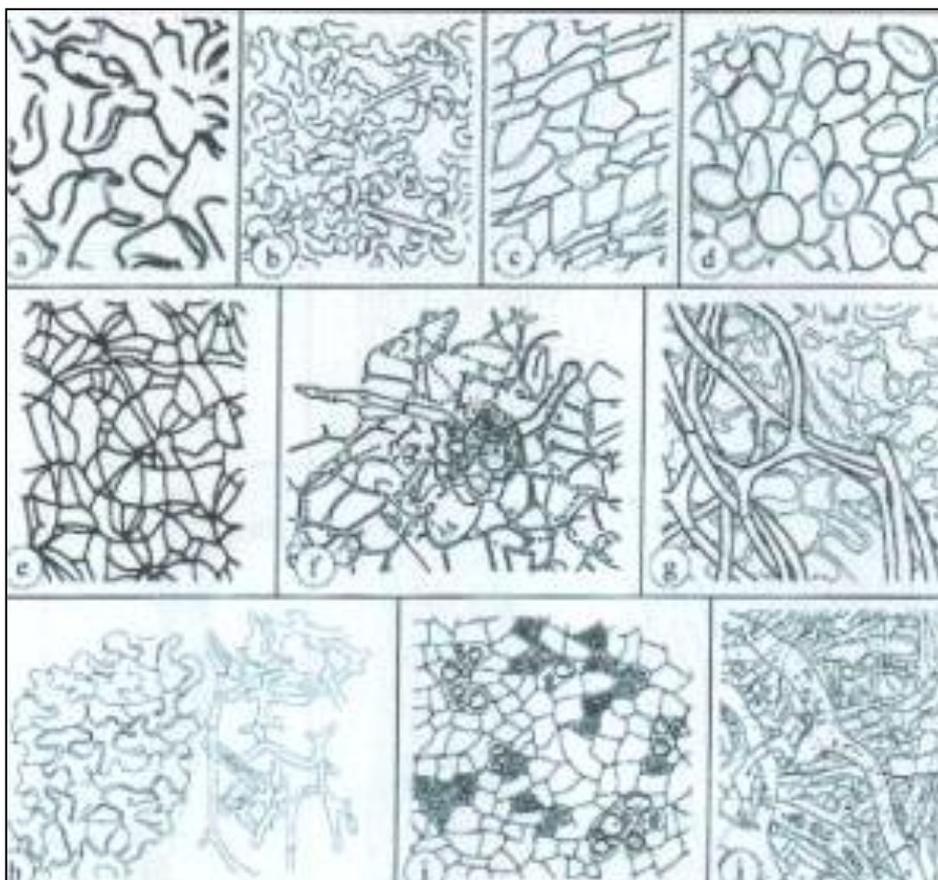
- Ramification abondante des hyphes et adhérence à la surface de la racine grâce aux microfibrilles émises par le champignon (**MASSICOTE et al., 1987; MASSICOTTE et al., 1989 in BEGUIRISTAIN, 1996**).

- Formation du manteau fongique : (*ex planta*) par Agglutination des hyphes autour de la racine (**site 4**).

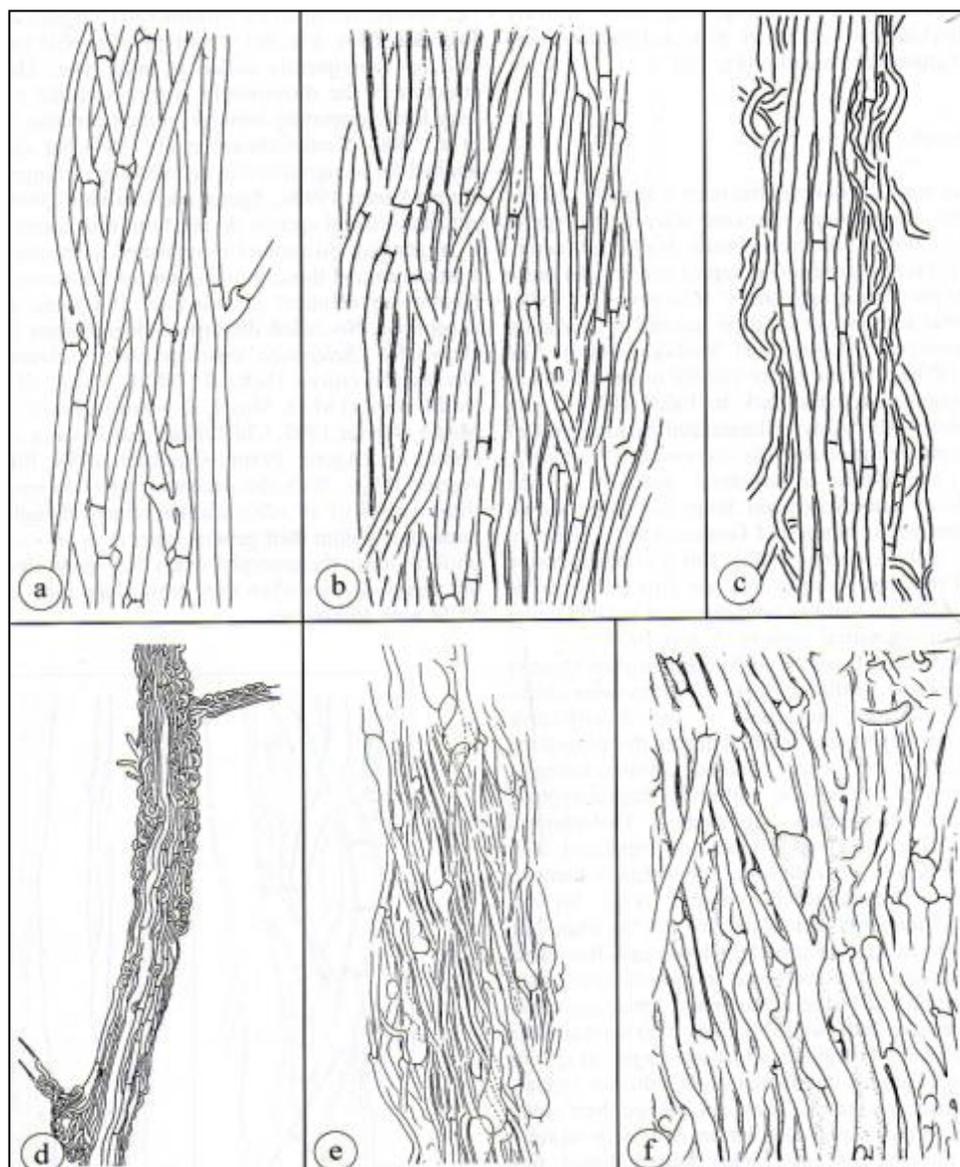
- Formation du réseau de Hartig : (*in planta*) suite à la progression du mycélium entre les cellules du rhizoderme et parfois du cortex sans jamais franchir l'endoderme (site d'échange) (**HARLEY et SMITH, 1983 in BEGUIRISTAIN, 1996; site 4**).



**Figure 7:** Types de manteaux: a: type B plectenchymateux, b: type A plectenchymateux, c: type A plectenchymateux, d: type C plectenchymateux, e: type D plectenchymateux, f: type D plectenchymateux, g: type E plectenchymateux, h: type F plectenchymateux, i: type G plectenchymateux (d'après **AGERER, 2006**).



**Figure 8:** Types de manteaux: a: type H plectenchymateux, b: type I plectenchymateux, c: type L pseudoparenchymateux, d: type K pseudoparenchymateux, e: type K pseudoparenchymateux, f: type O pseudoparenchymateux, g: type P pseudoparenchymateux, h: type Q pseudoparenchymateux (d'après AGERER, 2006).



**Figure 9** : Types de rhizomorphes: a: type Uniform-loose, b: type Uniform-compact, c et d: type Thelephoroide, e: type Ramarioide, f: type Phlegmacioide (d'après **AGERER, 2006**).

#### **2.4.4. Le fonctionnement général de l'ectomycorhize :**

Les ions minéraux sont d'abord capturés par le réseau mycélien et acheminés ensuite vers la racine de la plante où ils y seront plus ou moins absorbés (figure 10). Ce phénomène est alors régulé par l'approvisionnement en éléments minéraux de la région péri-racinaire plutôt que des besoins réels des tissus racinaires.

En 1983, **HARLEY** et **SMITH** (*in site 4*) ont constaté que les échanges de nutriments entre le champignon ECM et le phytosymbiote ne s'effectuaient qu'entre les cellules vivantes et en contact étroit. Cette condition n'est remplie que pendant une période limitée du développement de la symbiose et dans une région racinaire restreinte : la zone d'infection mycorhizienne. Avant ce stade de développement, le contact entre les partenaires est réduit et après celui-ci les cellules de la racine et/ou du champignon sont en phase de sénescence.

#### **2.4.5. Les types d'ectomycorhizes :**

Selon **BRUNDRETT** (2004) Il existe deux catégories d'ECM (**BRUNDRETT, 2004**):

2.4.5.1. Les ECM typique des angiospermes (ou ECM de type épidermal) tels que : *Eucalyptus*, *Betula*, *Populus* et *Fagus*. Le réseau de Hartig se limite en général aux cellules de l'épiderme (figure 6) (sauf pour *Dryas integrifolia*).

2.4.5.2. Les ectomycorhizes typiques des gymnospermes :

Le réseau de Hartig (figure 6) occupe plusieurs assises de cellules corticales (ex : les pinacées) (**PETERSON, 1987 in BRUNDRETT, 2004**).

#### **2.4.6. La spécificité chez les ectomycorhizes :**

Concernant les champignons ECM, certaines espèces sont capables d'infecter plusieurs espèces à la fois, d'autres au contraire sont spécifique à un seule espèce (ex : *Suillus grevillei* n'infecte que le mélèze d'Europe) (**LE TACON, 1988**), le sapin Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), peut être colonisé par environ 2000 espèces différentes (**TRAPPE, 1977**). Les cas de spécificité stricte chez les ectomycorhizes sont rares. On peut citer l'exemple des Lactaires et certains *Suillus* ou le cas de *Boletus elegans* avec le mélèze (**BEGUIRISTAIN, 1996**).

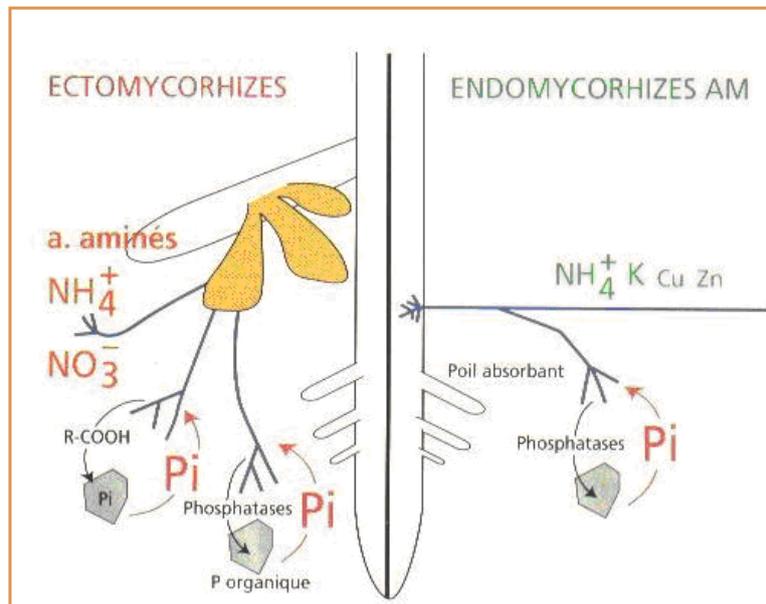
### **3. Rôle des mycorhizes :**

#### **3.1. Effets bénéfiques pour la plante hôte :**

La mycorhization peut avoir de nombreux effets bénéfiques sur la plante hôte, on peut citer :

- Une meilleure assimilation des éléments peu mobiles tels que : Zn, P, Cu, S, Ca, Mg, K, Na, B, Fe (**KOTHARI et al., 1991 in DAVET,1996 ; GIANINAZZI -PEARSON, 1982**).
- Amélioration de la nutrition azotée grâce à l'absorption, l'assimilation et la translocation des composés azotés du sol vers la plante (figure 10) (**MARTIN et BOTTON, 1983 in BEDDIAR, 2003**).

- Exploration d'un volume de sol plus important (plus de 20cm de la racine) et accroissement par conséquent de la surface d'absorption (Le TACON et OBATON, 1984 in BEDDIAR, 2003; DAVET, 1996).



**Figure 10 :** Représentation schématique de l'acquisition des principaux éléments minéraux par les deux types de mycorhizes (d'après DUHOUX et NICOLE, 2004).

- Augmentation de l'assimilation de l'eau par la plante en conditions défavorables (MOUSSAIN *et al.*, 1994).
- Piégeage et accumulation des métaux lourds (tels que ; Zn, Cu, Cd, Mn, S, K, Ca) qui sont présents en excès dans la solution du sol par les cordons mycéliens ou encore dans les tissus racinaires (HILDEBRANDT *et al.*, 1999 in Dell, 2002).
- Protection de la plante hôte contre les parasites (production de substances antagonistes des agents pathogènes, utilisation des mêmes ressources nutritives que ces derniers, « barrière mécanique » représentée par le manteau fongique (KRUPA et FRIES, 1971 in BEDDIAR, 2003; DUPONNOIS *et al.*, 2000).
- Assemblage des particules de sol en agrégats stables et volumineux autour des filaments et amélioration par conséquent de la circulation des gaz et de la rétention de l'eau (DAVET, 1996).
- Transfert des nutriments d'une espèce végétale à une autre par l'intermédiaire des « ponts mycéliens » (DOMMARGUES *et al.*, 1999 ; GRIME *et al.*, 1987 in DAVET, 1996).
- Amélioration de la tolérance de la plante hôte aux divers facteurs édaphiques (acidité, salinité excessive, sécheresse, toxicité manganique ou aluminique (DOMMARGUES *et al.*, 1999).
- Amélioration de la nutrition phosphatée en stockant celui-ci dans les structures fongiques sous forme de polyphosphates (GIANINAZZI- PEARSON et GIANINAZZI, 1986).

### **3.2 Effets bénéfiques pour le champignon mycorhizien :**

- Apport des carbohydrates par la plante hôte sous forme de photosynthétats (4 à 20% de la quantité totale des composés photosynthétisés) (SMITH et READ, 1996 in DOMMERGUES *et al.*, 1996).

## **II. la symbiose actinorhizienne et la symbiose rhizobienne :**

### **1. La fixation de l'azote :**

#### **1.1. Généralités sur la fixation de l'azote :**

L'azote est présent dans l'atmosphère en quantité quasiment illimitée. La transformation de l'azote moléculaire en azote combiné est appelée fixation d'azote. Ce processus peut avoir lieu selon des voies biologiques ou chimiques (DAVET, 1996).

La fixation biologique de l'azote (environ 180 millions de tonnes /an) est réalisée uniquement par certains microorganismes procaryotes tels que : *Rhizobium*, *Frankia*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *etc.*

La fixation chimique naturelle représente environ  $20 \cdot 10^6$  tonnes et la synthèse chimique d'ammoniaque par le procédé Haber environ  $100 \cdot 10^6$  tonnes (BOGUSZ et FRANCHE, 1986).

C'est à la fin du dix-neuvième siècle que les bactéries symbiotiques des légumineuses ont été commercialisées et utilisées à grande échelle pour améliorer la fixation de l'azote par des plantes fourragères comme la luzerne ou le trèfle (DAVET, 1996).

Les *Frankia* beaucoup moins connus ne sont commercialisés que depuis peu d'années (l'isolement de *Frankia* date seulement de 1978). De très grandes surfaces ont déjà été plantées avec des arbustes inoculés en pépinière.

Comme dans notre travail nous nous sommes intéressés à *Alnus glutinosa* et *Acacia melanoxydon* (qui sont actinorhizienne et rhizobienne respectivement) nous développerons dans ce qui suit les deux formes de symbiose: actinorhizienne et rhizobienne.

## 1.2. Comparaison de quelques aspects caractérisant les deux symbioses actinorhizienne et rhizobienne :

**Tableau 2 :** Tableau synthétique comparant quelques aspects qui caractérisent les deux symbioses actinorhiziennes et rhizobienne.

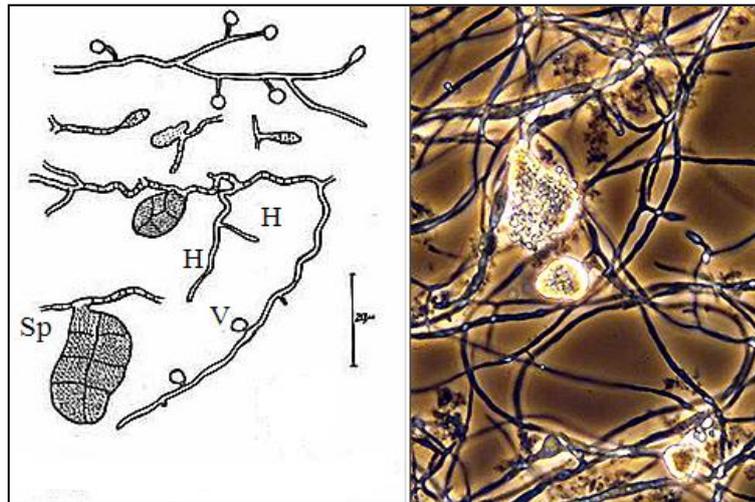
	<b>Symbiose actinorhizienne</b>	<b>Symbiose rhizobienne</b>
<b>Familles des plantes concernées</b>	- Appartiennent à 8 familles d'angiospermes : Betulacées ( <i>Alnus</i> ), Casuarinacées ( <i>Casuarina</i> , <i>Allocasuarina</i> ), Myricacées ( <i>Comptonia</i> , <i>Myrica</i> ), Eleagnacées ( <i>Eleagnus</i> ), Rhamnacées ( <i>Ceanothus</i> , <i>Discaria</i> ), Rosacées ( <i>Cercocarpus</i> , <i>Dryas</i> ), Coriariacées ( <i>Coriaria</i> ) ( <b>BOND et WHEELER, 1980 ; BECKING, 1982 in GAUTHIER, 1984</b> ).	- Appartiennent toutes à la superfamille des Fabacées (= Légumineuses) à l'exception de <i>Parasponia</i> (Ulmacées) ( <b>SVISTOONOFF, 2003</b> ), elle se divise en 3 familles : Mimosoïdées, les Caesalpinoïdées (arbres et arbustes) et les Papilionoïdées (plantes herbacées) ( <b>MENNA et al., 2006</b> ).
<b>Partenaire bactérien</b>	<u><i>Frankia</i></u> - Bactérie filamenteuse à Gram positive appartenant au phylum des Actinobacteria actinomycètes ( <b>site 5</b> ). - Structures spécialisées développées <i>in vitro</i> : Hyphes septés, vésicules, sporanges (figure 11) ( <b>HAFEEZ et al., 1984 ; HAHN et al., 1988 ; TZEAN et TORREY, 1989</b> ).  - <u>Etat saprophytique dans le sol:</u> Sous forme de structures filamenteuses, hyphes, pouvant supporter des vésicules et probablement des sporanges ( <b>MOHAPATRA et al., 2006</b> ).	<u><i>Rhizobium</i></u> -Bâtonnets à l'état libre, à gram négatif ( <b>FRY, 2000</b> ). - Dimensions : 0.5-0.9× 1.2 - 3.0 µm ( <b>BERGEY et HOLT, 1994</b> ). - Bactéries non sporulantes, généralement mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles. - Bactéries aérobies ( <b>JORDAN, 1984</b> ) - Très mobiles à l'état libre dans le sol (forme végétative) - Acquièrent en général la capacité de fixer l'azote au sein du nodule ( <b>PRESCOTT, 2003</b> ).
<b>Taxonomie</b>	- Classification non définitive <u>Phylum</u> : Actinobacteria <u>Classe</u> :Actinobacteria <u>Sous-classe</u> : Actinobacteridae <u>Sous-ordre</u> : Frankineae <u>Famille</u> : Frankiaceae <u>Genre</u> : <i>Frankia</i> <b>(d'après site 5)</b> .	- Classification non définitive <u>Sous -classe</u> : <i>Alpha- proteobacteria</i> <u>Genres</u> : <i>Sinorhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Allorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i> et <i>Methylobacterium</i> <b>(DE LAJUDIE et al., 1998; SY et al., 2001; YOUNG et HAUKKA, 1996)</b> .

**Suite tableau 2 :**

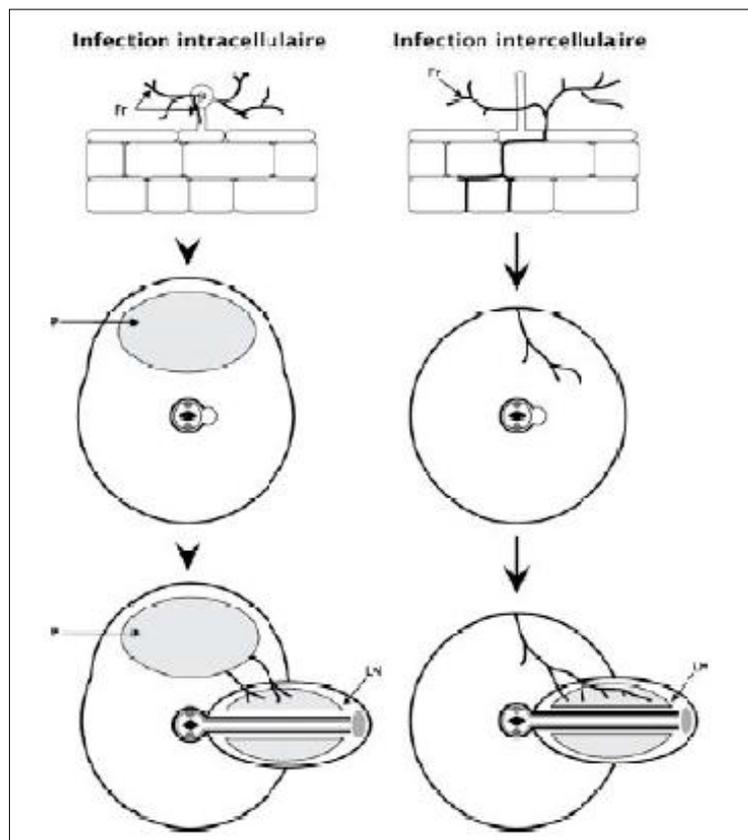
<p><b>Processus d'infection</b></p>	<p><u>Préinfection</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Emission par les plantes de signaux perçus par <i>Frankia</i>.</li> <li>- Production d'un signal symbiotique par <i>Frankia</i> engendrant une courbure des poils absorbants de la plante hôte (Infection intracellulaire) (figure14) (<b>DOMMERGUES et al. ,1999</b>).</li> </ul> <p><u>Infection intracellulaire</u> (figure12)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pénétration des hyphes de <i>Frankia</i> dans les cellules par le biais du cordon d'infection</li> <li>- Division des cellules corticales à proximité et formation du prénodule.</li> <li>- Induction de divisions cellulaires au niveau du péricycle et formation du lobe nodulaire.</li> <li>- Infection du lobe nodulaire par les filaments de <i>Frankia</i> en provenance du prénodule (<b>PERET, 2007</b>).</li> </ul> <p><u>Infection intercellulaire : (<i>Elaeagnus Ceanothus</i>)</u> (figure12)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infection indépendante de la présence de la présence de poils absorbants.</li> <li>- Les filaments de <i>Frankia</i> pénètrent les cellules du rhizoderme et progression à travers le cortex en empruntant les espaces intercellulaires.</li> <li>- Initiation simultanément d'un lobe nodulaire (pas de formation de prénodule) qui est par la suite envahi par les filaments de <i>Frankia</i> (figure 12).</li> </ul>	<p><u>Préinfection</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Exsudation d'une large gamme de substances (essentiellement les flavonoïdes) par la racine (<b>FRY, 2000</b>) (figure 15).</li> <li>- Stimulation de la biosynthèse des facteurs Nod par la bactérie (<b>SCHOFIELD , 1998</b>).</li> <li>- Courbure des poils absorbants de la plante hôte (<b>LODWIG, 2001</b>).</li> </ul> <p><u>Infection intracellulaire</u> (figure15)</p> <p>Pénétration des bactéries dans les cellules entourées par le cordon d'infection qui progresse vers le cortex (<b>PAWLOWSKI et BISSELING, 1996 in SVISTOONOFF, 2003</b>).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Simultanément : Division des cellules corticales et formation du <i>primordium</i> nodulaire qui évolue ensuite en lobe nodulaire (<b>REID, 1995</b>).</li> <li>- Envahissement des cellules du lobe nodulaire par le cordon d'infection et déversement des bactéries dans le cytosol (<b>WHITE, 2006</b>).</li> </ul> <p><u>Infection intercellulaire (crack entry)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Les bactéries pénètrent : <ul style="list-style-type: none"> <li>• entre les cellules du rhizoderme (<b>PAWLOWSKI ET BISSELING, 1996 in PERET, 2007</b>).</li> <li>• au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives.</li> <li>• Egalement à travers des excroissances du tissu cortical (<b>DOMMERGUES et al., 1999</b>).</li> </ul> </li> <li>- Progression des <i>Rhizobia</i> ensuite vers le <i>primordium</i> nodulaire en formant des cordons d'infection (<b>SVISTOONOFF, 2003</b>).</li> </ul>
-------------------------------------	---	--

Suite du tableau 2 :

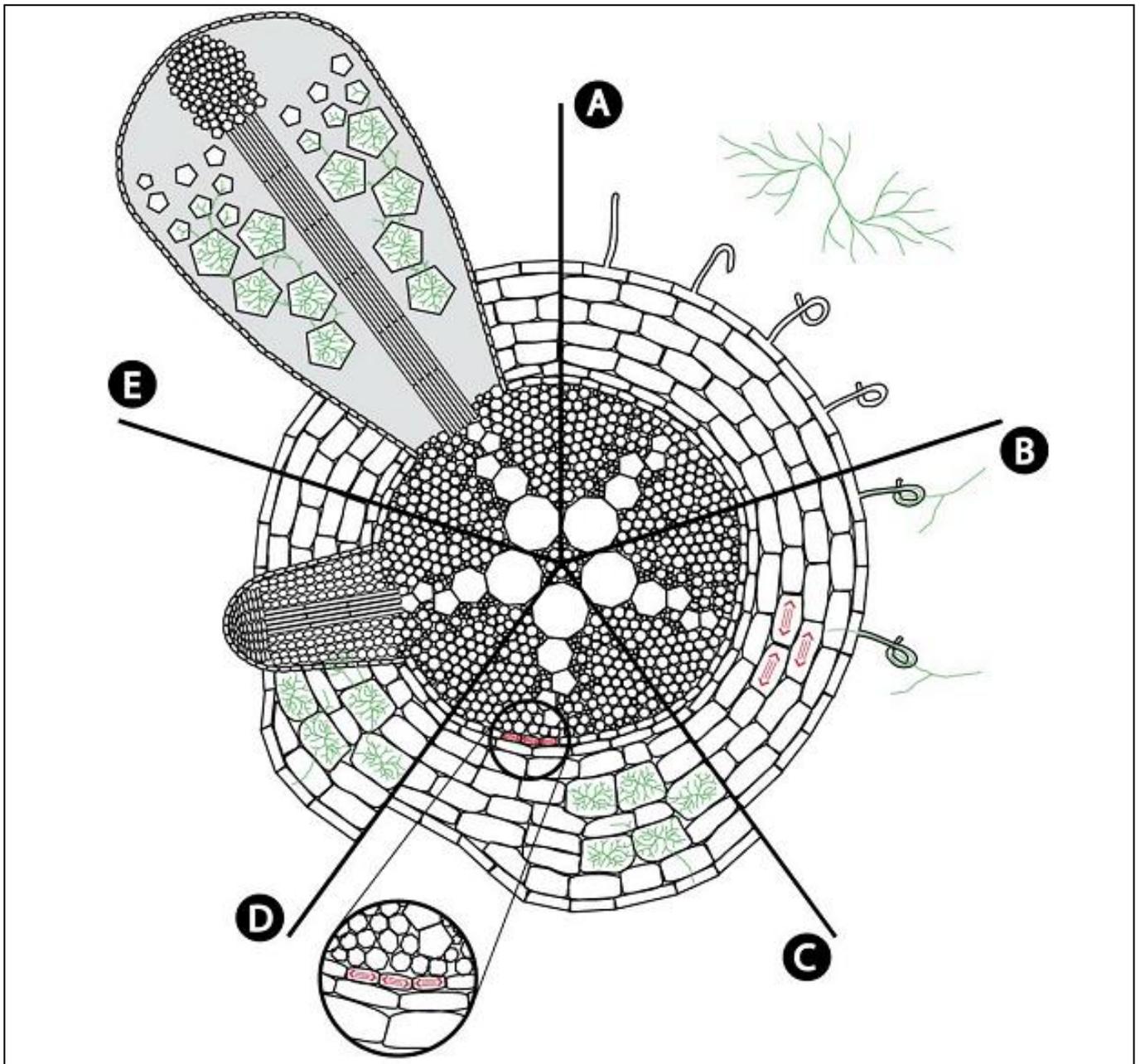
<p><b>Développement du nodule</b></p>	<p>- Ramification des lobes nodulaires (structure coralloïde) (<b>SVISTOONOFF, 2003</b>).</p> <p>Les zones du nodule:  <b>zone I (méristématique):</b> Apicale, dépourvue de <i>Frankia</i>, responsable de la croissance en longueur du lobe nodulaire et de sa ramification (<b>SVISTOONOFF, 2003</b>).</p> <p><b>zone II (d'infection): (adjacente à l'apex)</b> Infection des cellules corticales nouvellement formées par <i>Frankia</i>.</p> <p><b>zone III (de fixation):</b> Contient des cellules infectées hypertrophiées (siège de la fixation de l'azote) (<b>NICOLE et DUHOUX, 2004</b>).</p> <p><b>zone IV (de sénescence): (nodules âgés)</b>          -Dégénérescence des cellules végétales et bactériennes          -Production de sporanges par <i>Frankia</i> (<b>PERRADIN, 1982</b>).</p>	<p>Types de nodule et structure :  <b>Nodule de type déterminé:</b> (figure16)          - Méristème non persistant =&gt;croissance du nodule en épaisseur.          -même état de différenciation pour toutes les cellules (<b>NICOLE et DUHOUX, 2004</b>).</p> <p><b>Nodule de type indéterminé:</b> (figure16)          - Méristème persistant =&gt; croissance allongée du nodule.</p> <p>Les zones du nodule:  <b>Zone I (méristématique):</b> Apicale, dépourvue de bactéries.</p> <p><b>zone II (de préfixation):</b>          - Cellules corticales envahies par les cordons d'infection          - Différenciation des bactéries en bactéroïdes (ne fixant pas encore l'azote).</p> <p><b>interzone II-III:</b> Poursuite de la Différenciation des bactéroïdes et début de la fixation de l'azote.</p> <p><b>zone III (de fixation):</b> Bactéroïdes différenciés et fixation active de l'azote.</p> <p><b>zone IV (de sénescence):</b> Présente chez les nodules âgés (<b>DOMMERCUES et al., 1999</b>).</p>
---------------------------------------	--	---



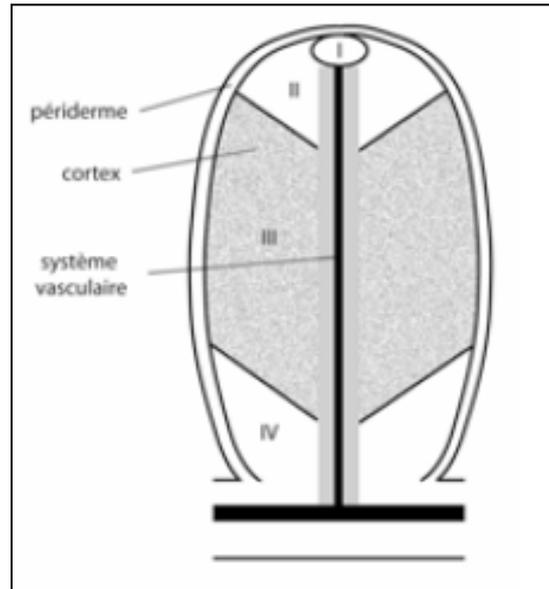
**Figure 11 :** Culture de *Frankia* isolée à partir de *Alnus glutinosa* présentant des hyphes (H) ramifiées et septées , des vésicules(V) et un sporange (d'après site 5).



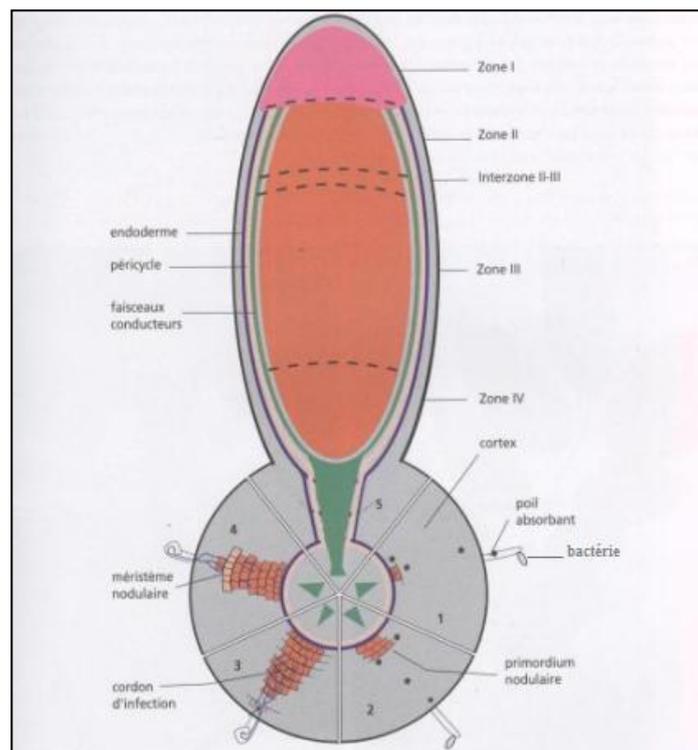
**Figure 12:** Représentation schématique des deux modes d'infection des plantes actinorhiziennes par *Frankia*. Fr: hyphes de *Frankia*, Pr: protoxylème, LN: lobe nodulaire (d'après DOMMERGUES *et al.*, 1999).



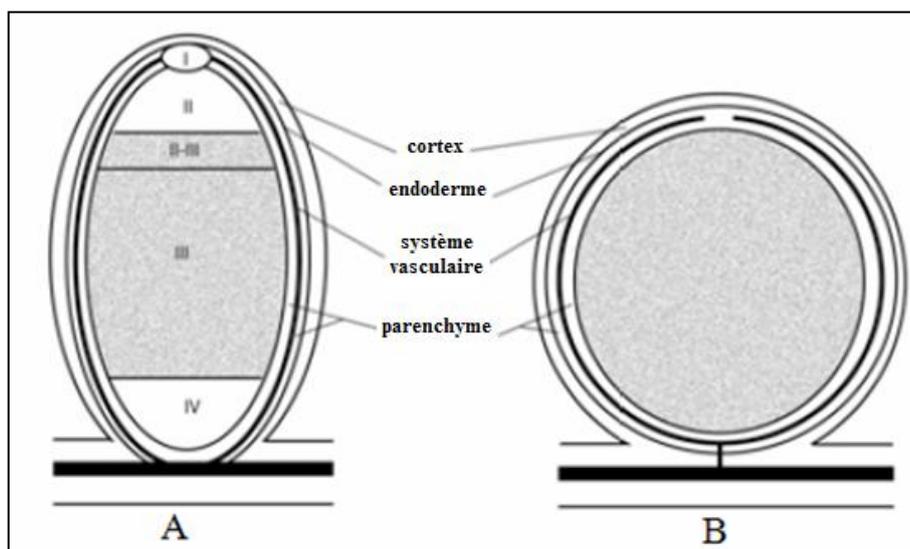
**Figure 13:** Processus d'infection intracellulaire et organogénèse d'un lobe nodulaire chez les plantes actinorhiziennes: (A): échange de signaux entre *Frankia* et la plante actinorhizienne et déformation du poil racinaire, (B): pénétration de la bactérie, division et infection des cellules corticales et naissance du pré-nodule, (C): formation du *primordium* nodulaire (D): envahissement des cellules corticales du nodule naissant par les hyphes de *Frankia* en provenance du pré-nodule, (E) : nodule mature (D'après PERET, 2007).



**Figure 14:** Structure du nodule des plantes actinorhiziennes. I : zone méristématique, II : zone d'infection, III: zone de fixation, IV: zone de sénescence (d'après PAWLOWSKI et BISSELING, 1996 in SVISTOONOFF, 2003).



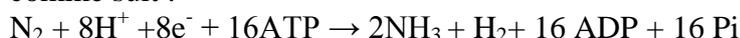
**Figure 15:** Etapes de l'ontogénèse d'un nodule indéterminé : **1:** échange de signaux entre *Rhizobium* et la plante hôte, **2:** Division des cellules corticales et début de formation du primordium nodulaire **3 et 4:** Envahissement des cellules par le cordon d'infection et déversement des bactéries **5:** développement et maturation du lobe nodulaire (d'après NICOLE et DUHOUX, 2004).



**Figure 16:** Structure des nodules de légumineuses. **A :** nodule de type indéterminé. **B :** nodule de type déterminé (d'après PAWLOWSKI et BISSELING, 1996 in SVISTOONOFF, 2003).

## 2. Mécanisme de la fixation de l'azote :

La fixation biologique de l'azote se déroule à une température de 25°C et est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase. La réaction globale se présente comme suit :



Le complexe enzymatique nitrogénase est constituée deux protéines :

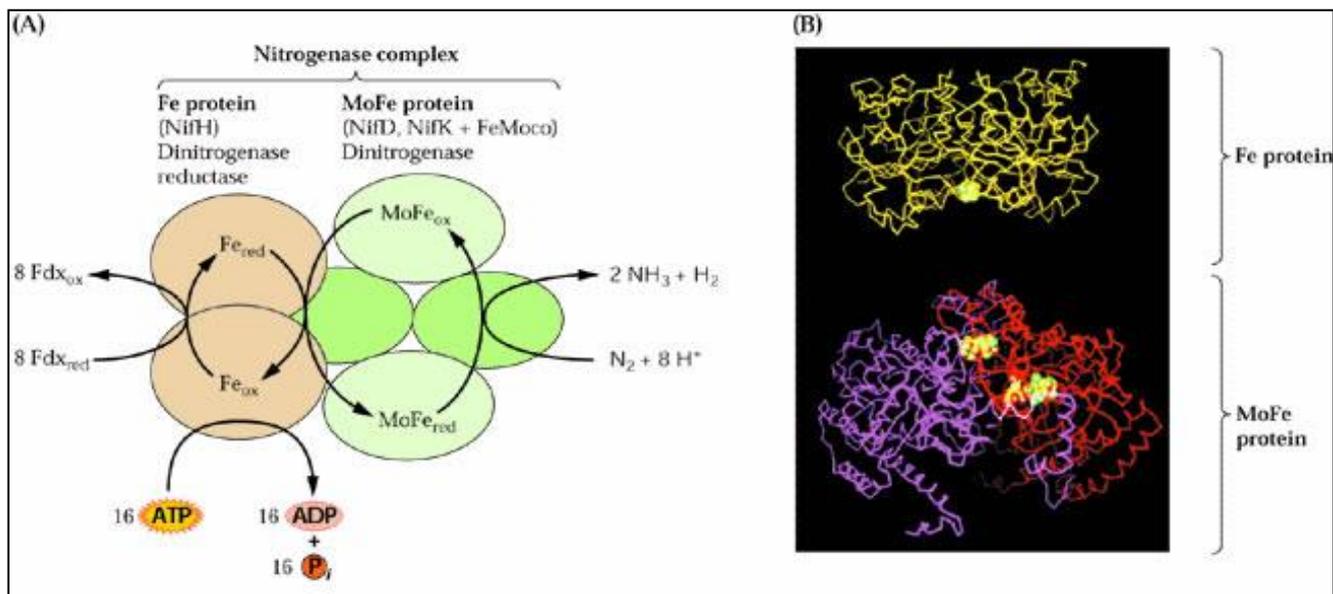
- Une ferroprotéine (protéine Fe): C'est le composant donneur d'électrons.
- La ferromolybdoprotéine (protéine FeMo): Elle contient le site réducteur du substrat et le site de liaison de l'ATP.

Le mécanisme réactionnel se déroule comme suit :

Réduction de la protéine Fe par un donneur d'électrons (ferrodoxine ou flavodoxine) → transfert d'un électrons de la protéine Fe vers protéine FeMo → répétition de l'opération jusqu'à ce que le nombre d'électrons transmis arrive à 8 → transfert des électrons au diazote et production de l'ammoniac (figure 17).

**NB :** Pour chaque électron fourni à la protéine FeMo il y a consommation de deux molécules d'ATP.

Le complexe nitrogénase est sensible au dioxygène qui l'inactive de manière irréversible. Des mécanismes biologiques existent pour protéger l'enzyme de l'oxygène. La leghémoglobine présente dans les nodules rhizobiens permet d'assurer un transport efficace de l'oxygène jusqu'aux chaînes respiratoires mitochondriales tout en maintenant une  $\text{ppO}_2$  faible compatible avec l'activité de la nitrogénase (APPLEBY, 1988 in SVISTOONOFF, 2003).



**Figure 17 :** Mécanisme d'action de la nitrogénase : représentation schématisée des étapes de la réduction de l'azote (site 6).

La protection de la nitrogénase de *Frankia* contre l'oxygène se déroule au niveau de l'enveloppe des diazovésicules ; celle-ci contient de fortes quantités lipides hopanoïdes qui limitent les échanges gazeux, protégeant ainsi la nitrogénase de l'oxygène (BERRY *et al.*, 1993. in SVISTOONOFF, 2003). La nitrogénase peut également être abritée par des parois épaissies de la nodosité (*Casuarina*). Dans ce cas le transport de l'oxygène est assuré par une hémoglobine proche de celle des légumineuses (DAVET, 1996).

### 3. Effets bénéfiques de la combinaison mycorhizes/actinorhizes/ symbiose rhizobienne:

- Gain de croissance, augmentation des taux de phosphore prélevés et amélioration de la nodulation chez les plantes actinorhiziennes endomycorhizées (MEJSTRIK et BENECKE, 1963).
- Des interactions de ce type ont été mises en évidence chez les légumineuses (MEUNS et MOSS, 1980 in DIAGNE et LE TACON, 1982 ; DIEM et GAUTHIER, 1982) et chez *Alnus glutinosa* (FRAGA- BEDDIAR et Le TACON, 1990).

### 4. Rôle des symbioses fixatrices d'azote:

Les symbioses fixatrices d'azote jouent un rôle économique considérable. Elles sont utilisées à des fins d'enrichissement des sols en semant ou en plantant des végétaux dits « améliorants » qui peuvent alors être utilisés pour réaliser des productions de type agricole ou forestier.

En effet, ces symbioses restituent aux sols stériles lors de la chute des feuilles une matière organique riche en composés azotés, grâce à laquelle une végétation pourra s'implanter. Ils constituent de ce fait le premier maillon pour la reconstitution d'un écosystème.

Le tableau 3 reprend quelques résultats relatifs à la Ndfa (quantité de  $N_2$  fixé) déterminé au champ chez certaines plantes actinorhiziennes et quelques légumineuses ligneuses.

**Tableau 3:** Tableau synthétique reprenant la quantité d'azote fixé au champ par quelques plantes actinorhiziennes et légumineuses ligneuses (d'après **DOMMERGUES et al., 1999**).

Espèce	pays	Age (Ans)	Nombre de plants/ ha	N <sub>2</sub> fixé (kg/ha/an)	
				Kg/ha	pendant
<i>Alnus incana</i>	Suède	1	7700	2	1 an
<i>Alnus rubra</i>	Amérique du Nord	1-40	-	1-40	1 an
<i>Casuarina equisetifolia</i>	Sénégal	13	2000	58	1 an
<i>Hipophaë rhamnoides</i>	Angleterre	3-16	-	1.5-57.5	1 an
<i>Acacia melanoxylon</i>	Australie	2.25	180	< 1	27 mois
<i>Acacia mangium</i>	Congo	7	800	120	1 an
<i>Gliricidia sepium</i>	Sri Lanka	-	5000	87-308	9 mois
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Autriche	2	5714	110	1 an
<i>Sebania rostrata</i>	Philippines	0.15	500 000	458	55 jours
<i>Cajanus cajan</i>	Inde	0.55	55 000	120-170	200 jours

## **I. Description de la zone d'étude:**

### **1. Situation géographique de la zone d'étude :**

La station d'étude est située au niveau du lac Tonga et plus précisément au niveau de son arboretum. Ce dernier délimite sa partie supérieure et s'étend sur une aire de 99ha.

Le lac Tonga occupe une large dépression côtière située à 6km à l'est de la ville d'El Kala en bordure de la RN 44 et occupe une aire de 2700 ha (ANONYME, 1991). Il est bordé au Nord par un épais bourrelet de dunes maritimes et des collines argilo-sableuses le séparent du lac Oubeira au Nord- Ouest (**figure 18**).

Le lac Tonga est entouré sur toute sa partie Sud, Ouest, Est et Nord- Est par les derniers contreforts des montagnes de Kroumirie. La dépression du lac reçoit les eaux drainées par deux grands Oueds qui sont : oued El Hout au Sud et oued El Eurg au Nord-Est.

### **2. Situation administrative :**

L'arboretum du Tonga (**figure 19**) est régi par la Sous Direction des forêts d'El Tarf, Circonscription d'El Kala, District El Kala, Canton les dunes. Juridiquement, il dépend de la forêt domaniale de Tonga-Est.

### **3. Localisation générale :**

#### **3.1. Coordonnées géographiques :**

Les coordonnées géographiques de la Réserve Intégrale du Lac Tonga sont les suivantes : 36° 49' N-8° 32' E à l'extrême Nord-Est du Parc National d'El Kala (ANONYME, 2003).

#### **3.2. Topographie :**

Les coordonnées de la station d'étude sont les suivantes

X=413

Y=1019-1020

L'arboretum du Tonga est situé à une altitude de 2.20 m (ANONYME, 2003) par rapport au niveau de la mer. Il occupe une surface plane et par conséquent la pente est nulle.

### **4. Facteurs climatiques de la région d'El Kala :**

#### **4.1. Pluviométrie et aridité :**

Entre 1913 et 1968 la moyenne pluviométrique a été de 910 mm répartis sur 115 jours avec un période de sécheresse de 5 mois (Mai- Septembre) (ANONYME, 1991).

#### **4.2. Les températures :**

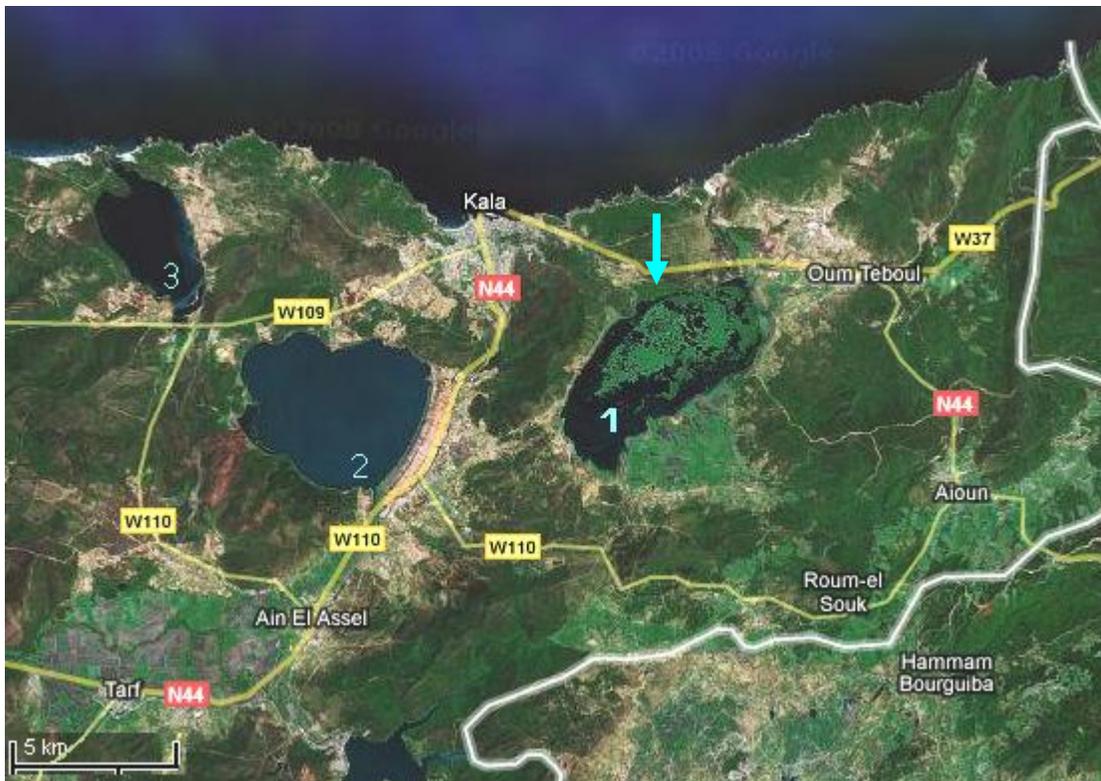
La moyenne annuelle des températures est de : 18.62°C avec :

m(moyenne des minima)=14.62

m'(moyenne des minima absolus)=0.82

M (moyenne des maxima)=22.62

Le coefficient d'Emberger de la région d'El Kala est égal à 142.5 et m=8.5. On considère donc le climat d'El Kala comme typiquement méditerranéen et on le classe dans l'étage bioclimatique subhumide à variante chaude.



**Figure 18:** Localisation géographique de la station d'étude.

↓ : Station d'étude, 1 : Lac Tonga, 2 : Lac Oubeira, 3 : Lac El Mellah (d'après site 7).



**Figure 19 :** Vue générale d'une partie de l'aulnaie du lac Tonga (les arbres hauts sont des acacias et ceux du bas correspondent à l'aulne glutineux - cliché SOUALMIA).

Les données climatiques enregistrées au cours de la période d'étude (période allant de Janvier 2007 à Mai 2008) nous ont été fournies par la station météorologique El Mellaha. Elles sont illustrées dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Données climatiques de la période allant de Janvier 2007 à Avril 2008.

mois	Température (°C)	Précipitation (mm)
Janvier	11.9	35
Février	12.9	51
Mars	12.6	204
Avril	15.9	27
Mai	18.9	42
Juin	22.4	52
Juillet	24.7	3
Août	25.3	3
Septembre	23.7	33
Octobre	19.4	102
Novembre	14.2	84
Décembre	11.4	125
Janvier	11.3	14
Février	11.3	17
Mars	12.4	97
Avril	16.1	16

### 5. Types de sols:

Les sols du bassin versant du lac Tonga ont été étudiés en 1952 par Darans J.H. On distingue 3 types de sols : les sols tourbeux inondés, dépôts alluvionnaires et les sols de prairies marécageuses.

### 6. Végétation de l'arboretum:

La végétation arborescente de l'arboretum est essentiellement constitué de : *Taxodium distichum* (cyprés chauves), *Acacia melanoxylon* (mimosa à bois noir), *Alnus glutinosa* (aulnes glutineux), *Populus alba* (peupliers blancs), *Populus nigra* (peupliers noires), *Ulmus campestris* (ormes), *Fraxinus*(frênes) et *Pinus pinea* (pins pignons).

La végétation arbustive est composée essentiellement de *Hedera helix* (liane), *Vitis vinifera* (la vigne), *Ficus carica* (figuier commun), *Smilax aspera* (salse) et *Rubus ulmiflorus* (ronce). La végétation herbacée est assez pauvre et constituée en particulier de fougères (*Pteridium aquilinum*).

L'aulnaie se situe au niveau de la rive Nord et s'étend sur une superficie de 50 ha. *Acacia melanoxylon* se situe au milieu de l'arboretum entre l'aulne et la plantation de cyprés chauves. Cette essence possède un grand pouvoir de régénération et envahit par conséquent toute une partie de l'aulnaie ainsi que la cypraie. Elle occupe une superficie de 1.6 ha.

Sous les acacias le sol est souvent nu de tout couvert végétal et ce à cause de la densité du peuplement. On note cependant la présence de *Pteridium aquilinum* dans les endroits les plus

éclairés mais également *Hedera helix*, *Smilax aspera*, *Carex muricata* (laîche), *Asparagus acutifolius*, *Iris pseudo-acorus*. On peut aussi rencontrer des géraniums et des herbes sauvages.

## II. Description du matériel végétal:

### 1. Description de l'espèce *Alnus glutinosa* (L.Gaertn): (figure 20-1)

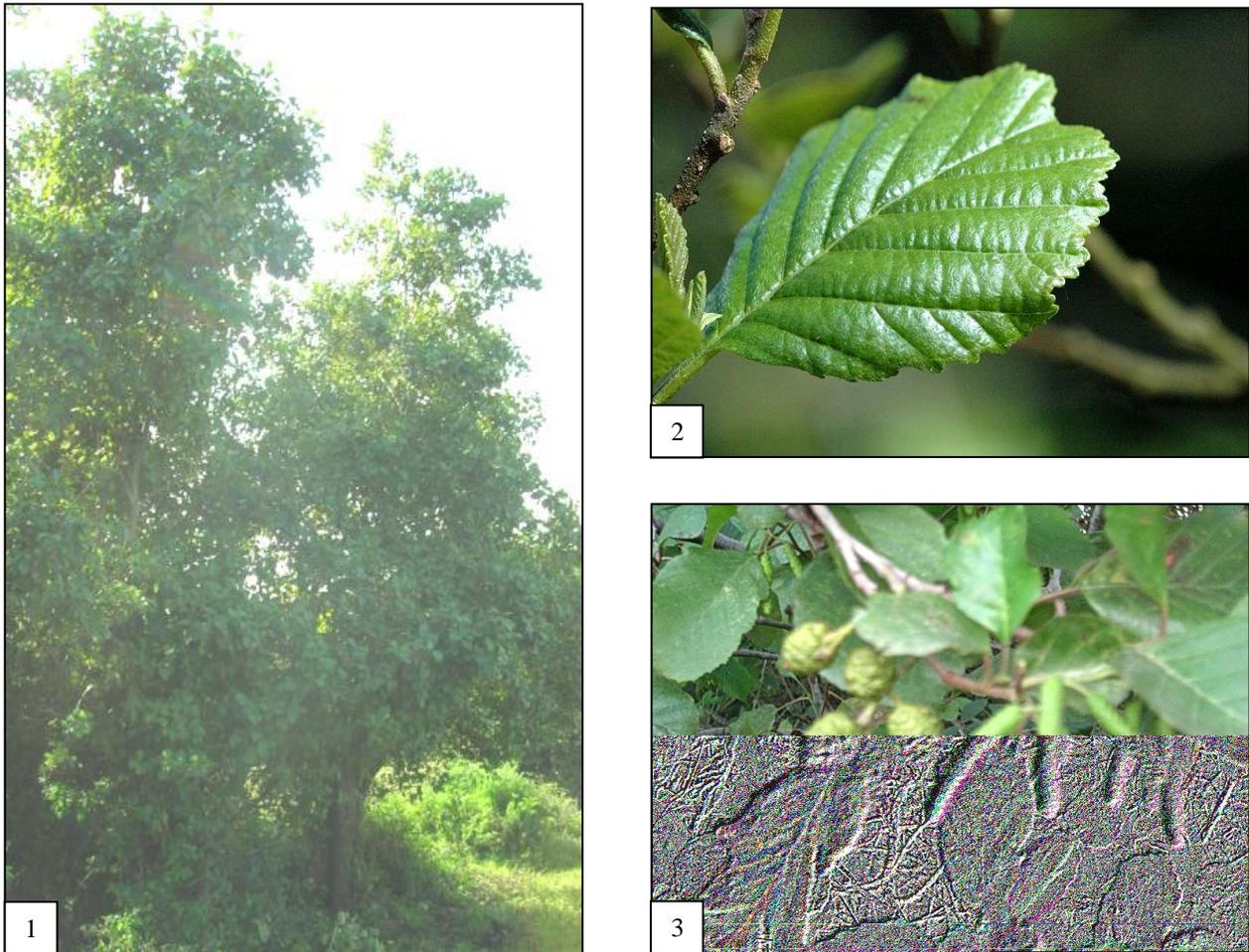
**Tableau 5** : Tableau synthétique décrivant l'espèce *Alnus glutinosa* (L.Gaertn).

Aire de distribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toute l'Europe, Asie occidentale et Afrique du Nord (<b>site 8</b>).</li> <li>- Recensé jusqu'à 1200 m d'altitude.</li> </ul>
Aspect	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hauteur: 20 à 25m (<b>site 9</b>).</li> <li>- Silhouette oblongue ou ovoïde, pointue et serrée.</li> <li>- Ecorce: Verte ou gris-brun (arbre jeune), brun-noir et marquée de lenticelles horizontales (sujet âgé) (<b>site 10</b>).</li> </ul>
Feuillage	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Feuilles: Alternes, vert foncé (<b>site 11</b>), luisantes, obovales (figure 20-2), obtuses, émarginées au sommet, dentées et très visqueuses étant jeunes (<b>ANONYME ,1975</b>).</li> </ul>
Reproduction	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Espèce monoïque.</li> <li>- Organes de reproduction : (figure 20-3)  <u>les chatons mâles</u>: en forme de cônes, munis d'écailles ligneuses (s'entrouvrent à l'automne et libèrent les akènes) (<b>OSIE, 1980</b>).</li> <li><u>Les chatons femelles</u>: ovoïdes, groupés par deux ou trois.</li> <li>- Floraison précède feuillaison</li> </ul>
Exigences écologiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensible aux gelées printanières (<b>ANONYME, 1995</b>).</li> <li>- hygrophile préférant les sols alluviaux à nappe permanente oxygénée, mais supporte les sols marécageux (marais, tourbière).</li> <li>- Indifférente à la nature du sol (tourbe, argile, compacte, sable, limon).</li> <li>- Acidocline mais tolérant entre pH3.5 et 8.0 (<b>GAUTHIER, 1984</b>).</li> <li>potentiel fixateur d'azote se situe entre 60 et 300kg/ hectare / an(<b>COTE et CAMIRE 1984, in GAUTHIER, 1984</b>).</li> </ul>

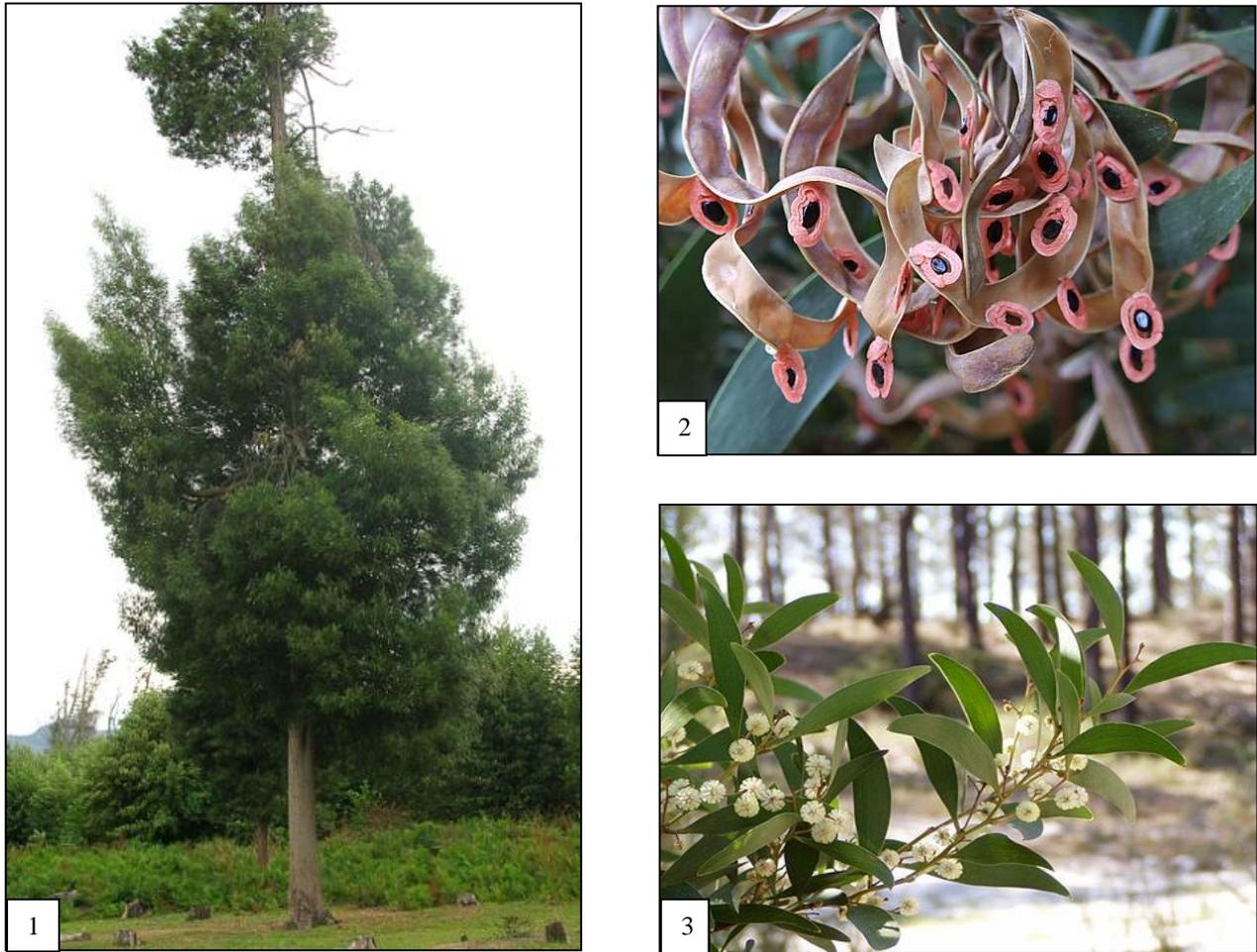
## 2. Description de l'espèce *Acacia melanoxylon* (L.) : (figure 21-1)

**Tableau 6** : Tableau synthétique décrivant l'espèce *Acacia melanoxylon* (L.)

Origine	- Origine : l'Est Australien et forêts d'altitude de Tasmanie ( <b>site 12</b> ).
Distribution	Sud de l'Europe ( <b>site 12</b> ) et Afrique du Nord.
Feuillage	- Feuillage Persistant <u>feuilles adultes</u> (phyllodes): 10-15 cm de long sur 1-3 cm de large, vert mat à gris, possédant 3 et 7 nervures longitudinales et à extrémité obtuse ( <b>site 13</b> ). - <u>Feuilles juvéniles</u> : bi-composées, aux foliolules elliptiques, minuscules ( <b>site 13</b> ).
Fleurs et fruit	- Floraison: de Mars à Juin. - Fleurs: (figure 21-3) de couleur jaune-crème, composées de petites grappes axillaires, ramifiées, de 5-10 cm de long et formées de glomérules de 1 cm de diamètre. - Fruit: (figure 21-2) une gousse de 6-8 mm de large.
Répartition des sexes et Pollinisation	- Espèce hermaphrodite et pollinisation entomogame ( <b>site 14</b> ).
Rusticité	- Très rustique. - supporte des gelées brèves de -5 à -7°C.
Usages	- Charpenterie, ébénisterie. - Arbre d'alignement.
Exigences écologiques	- Une bonne exposition à la lumière - Sol siliceux, léger, peu acide, frais l'été, mais drainant l'hiver. - Supporte éventuellement les sols légèrement calcaires mais n'apprécie pas la sécheresse ( <b>site 15</b> ).



**Figure 20:** Clichés représentant: (1) *Alnus glutinosa* (Gaertn.) (Cliché SOUALMIA), (2): Feuille d'*Alnus glutinosa* (site 16), (3): Organes mâles et femelles d'*Alnus glutinosa* (cliché SOUALMIA).



**Figure 21:** Clichés représentant : (1): *Acacia melanoxylon* (L.)(Cliché SOUALMIA) (2): Gousses d'*Acacia melanoxylon* (site 17), (3) : feuilles d'*Acacia melanoxylon* (site 18).

### 3. Positions systématiques des deux espèces :

#### 3.1. L'espèce *Alnus glutinosa* (Gaertn.): (Classification classique -site 19)

**Règne** : Plantae

**Division** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Ordre** : Fagales

**Famille** : Betulaceae

**Genre** : *Alnus*

**Espèce** : *Alnus glutinosa*

#### 3.2. L'espèce *Acacia melanoxylon* (L.) : (Classification classique -site 20)

**Règne** : Plantae

**Sous-règne** : Tracheobionta

**Embranchement** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Sous-classe** : Rosidae

**Ordre** : Fabales

**Famille** : Mimosaceae

**Tribu** : Acacieae

**Genre** : *Acacia*

**Espèce** : *Acacia melanoxylon*

### III. Analyse physicochimique du sol de la station d'étude :

Les paramètres physicochimiques étudiés sont les suivants :pH eau, taux de carbone (C%), taux de la matière organique (MO%), calcaire total et granulométrie.

#### 1. pH eau du sol:

Afin de déterminer le pHeau du sol nous avons suivi les étapes suivantes :

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

#### 2. Carbone total (C%) et matière organique:

Pour déterminer le carbone total nous avons utilisé la méthode d'Anne modifiée qui consiste à :

- Mettre 1 g de sol dans un erlen-meyer.
- Ajouter 10 ml de solution de bichromates de potassium ( $KCr_2O_7$ ) à 8% et 15ml d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) pur.
- Faire bouillir pendant 5 minutes et laisser refroidir ensuite.
- Transvaser dans un matras de 100 ml puis ajuster avec les eaux de rinçage.
- Transvaser dans un bécher.
- Prélever 20ml dans un bécher et diluer jusqu'à 100ml avec de l'eau distillée.
- Ajouter 1.5ml de FNa et 3 à 4 gouttes de diphénylamine.
- Préparer en parallèle un témoin mais sans mettre de sol.
- Effectuer un titrage avec du sel de Mohr à 0.2N.

La liqueur primitive de couleur brune noirâtre vire au vert.

On utilise la relation suivante pour déterminer la concentraion du carbone:

$$C\%=(Y-X) \times 0.615 \times 100/20 \times 100/p \times 1/1000$$

Y : sel de Mohr utilisé lors du titrage du témoin (en ml).

X : sel de mohr utilisé lors du titrage de l'échantillon (en ml).

P : poids du sol (1g).

#### 3. Matière organique:

Elle est déterminée par la relation ci-dessous :

$$MO\%=C\% \times 1.72$$

#### 4. Calcaire total:

Afin de déterminer le calcaire total il faut d'abord prendre un peu de sol et mettre dessus quelques gouttes d'HCl. S'il n'y a pas d'effervescence, on peut dire que le sol testé n'est pas calcaire. Si en revanche on note une effervescence, ceci nous indique que le sol en question est calcaire.

Le calcaire total est déterminé par la technique de titrimétrie :

- Mettre 10 g de sol tamisé à 2 mm dans erlen-meyer.
- Ajouter 50 ml de HCl à 0.5N et couvrir l'erien.
- Faire bouillir l'erien pendant 15 minutes et laisser refroidir.

- Filtrer la solution et laver le filtrat avec de l'eau distillée afin de lessiver l'HCl.
- Déterminer la quantité de HCl qui ne réagit pas avec le CaCO<sub>3</sub> en ajoutant quelques gouttes de phénolftaline.
- Titrer la solution avec le NaOH à 0.2N.

On utilise la relation suivante pour déterminer la teneur du sol en CaCO<sub>3</sub>  
 $\text{CaCO}_3 = 5x (50x \text{ normalité de HCl} - \text{normalité de NaOH} \times \text{quantité de NaOH utilisée}) / 10g.$

### 5. La texture:

La méthode utilisée est celle de la saturation et qui consiste à mesurer le pourcentage d'humidité du sol (y) et à le comparer à une échelle qui détermine la texture qui lui correspond.

Les étapes suivies sont les suivantes:

- Peser 50 g de sol dans un récipient et les imbiber d'eau au goutte à goutte.
- Mélanger le tout jusqu'à ce que la pâte devienne luisante et glisse doucement lorsqu'on incline le récipient.
- Peser une capsule vide (P<sub>1</sub>).
- Mettre une petite quantité de la pâte dans la capsule et repeser (P<sub>2</sub>).
- Mettre à l'étuve à 105°C pendant 24 heures.
- Peser la capsule à nouveau (P<sub>3</sub>). Le poids obtenu correspond au poids de la capsule vide + le poids du sol sec.
- Puis calculer :  
 $X1 = P_2 - P_3$  (poids de l'humidité).  
 $X2 = P_3 - P_1$  (poids du sol sec).
- Appliquer ensuite une règle de 3 pour calculer le pourcentage d'humidité:  
 $X1 \longrightarrow X2 \text{ g du sol sec}$   
 $Y \longrightarrow 100 \text{ g de sol sec}$

Le résultat obtenu est comparé au tableau 7 pour déterminer la texture.

**Tableau 7:** échelle de la texture.

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

## **IV. Estimation de la colonisation mycorhizienne arbusculaire (AM) chez *Alnus glutinosa* (Gaertn.) et *Acacia melanoxylon* (L.):**

### **1. Prélèvement et traitement des échantillons racinaires:**

Les endomycorhizes ne sont observables qu'au microscope, mais il faut au préalable leur faire subir une série de traitements pour qu'elles soient visibles. Les étapes que nous avons suivies se résument comme suit (figure 22):

- Prélever les échantillons racinaires à trois endroits différents autour de l'arbre
- Laver les racines abondamment à l'eau du robinet.
- Prélever les racines les plus fines et éliminer les autres.
- Plonger les racines d'abord dans une solution de KOH à 10% au bain marie (à 90°C) pendant une trentaine de minutes et changer la solution au fur et mesure que celle-ci brunisse. Le KOH a pour rôle de vider les contenus cellulaires.
- Rincer les racines abondamment à l'eau du robinet.
- Immerger les racines successivement dans de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 V ensuite dans une solution de HCl à 2%, pendant trente minutes et rincer ensuite les échantillons racinaires.
- Plonger les racines dans une solution de noir de Chlorazol à 0.1% pendant quarante minutes.

### **2. Observation et estimation du taux de colonisation par les champignons arbusculaires AM :**

Afin d'estimer la colonisation par les CMA nous avons utilisé la méthode de TROUVELOT *et al.* (1986).

Après avoir coloré les racines, nous les avons découpées en fragments de 1 cm environ, puis nous les avons montées parallèlement les uns aux autres entre lame et lamelle dans du glycérol. Nous avons pris trente fragments racinaires pour chaque arbre que nous avons ensuite distribué sur deux lames (15 fragments par lame) (la figure 22).

Les lames sont ensuite observées au microscope photonique selon le sens indiqué en bas de la figure au grossissement x10 puis x 40 pour avoir plus de détails. L'estimation de la colonisation endomycorhizienne est exprimée dans une grille d'évaluation (annexe 1).

Cette grille est remplie selon deux échelles :

- une première échelle : elle se compose cinq (05) classes notées de 0 à 5. Chaque classe traduit le degré d'intensité de la colonisation du cortex racinaire de chaque fragment racinaire observé (figure 23).
- La deuxième échelle permet d'évaluer la présence des arbuscules et des vésicules. Cette échelle comporte quatre (04) classes allant de A<sub>0</sub> à A<sub>3</sub> qui indiquent leur fréquence (figure 24).

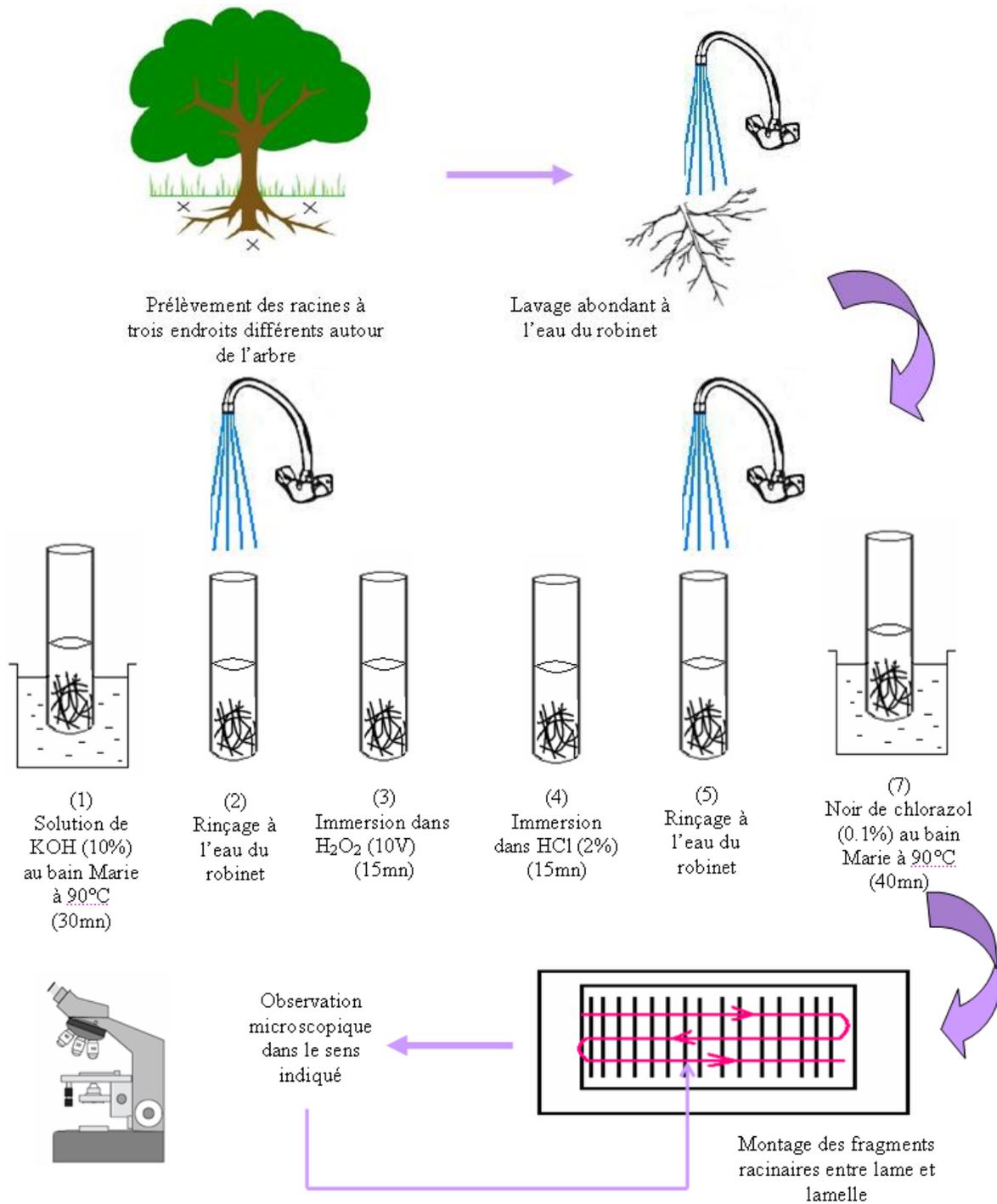
La méthode de TROUVELOT *et al.* (1986) permet de calculer cinq (05) paramètres de l'infection mycorhizienne (pourcentage du nombre de fragments racinaires endomycorhizés) qui sont :

F% : Fréquence d'endomycorhization.

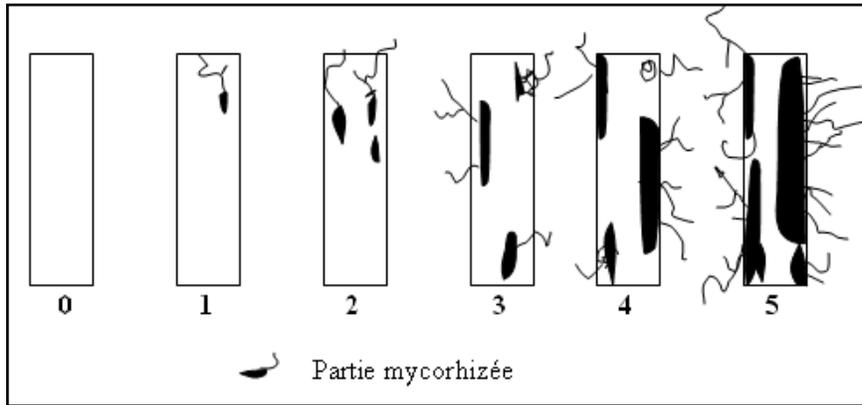
M% : Intensité de colonisation du cortex racinaire estimé par rapport au système racinaire entier.

m% : Intensité de l'infection développée dans la partie endomycorhizée du système racinaire.

A% : Teneur arbusculaire de l'infection par rapport au système racinaire entier.

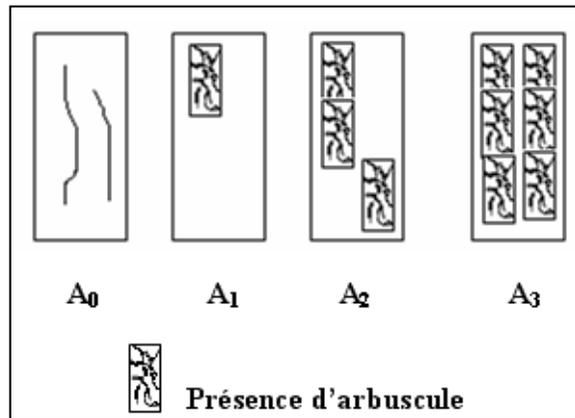


**Figure 22:** Schéma récapitulatif des différentes étapes à suivre pour la coloration et l'observation des racines endomycorhizées.



Classes	Pourcentage des classes
0	Absence d'infection
1	Moins de 1% de la surface est colonisée
2	Moins de 10% de la surface est colonisée
3	Entre 11 et 50% de la surface est colonisée
4	Entre 50 et 90% de la surface est colonisée
5	Plus de 90% de la surface est colonisée

**Figure 23:** Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire.



Classe	Pourcentage de présence des arbuscules
A <sub>0</sub>	Absence d'arbuscules
A <sub>1</sub>	Peu d'arbuscules 10%
A <sub>2</sub>	Arbuscules fréquents 50%
A <sub>3</sub>	Arbuscules abondants 100%

**Figure 24:** Echelle d'évaluation de la présence arbusculaire.

a% : Teneur arbusculaire de l'infection dans la partie endomycorhizée du système racinaire.

Nous avons toute fois, fait appel à un programme informatique appelé « mycocalc » (**site 21**) pour calculer tous ces paramètres, et ceci en introduisant les résultats de chaque grille dans le programme en question.

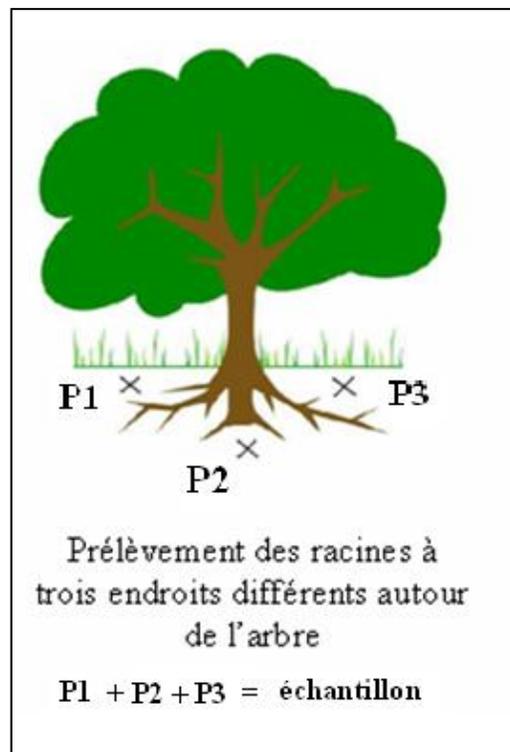
Des prise de photos ont également été réalisées sous le microscope photonique (de marque HUND wetzlar) muni d'une caméra (JVC C751 EG), le tout étant relié à un microordinateur avec le logiciel « Pic Ed Cora ».

## V. Description des ectomycorhizes rencontrées chez *Alnus glutinosa*:

### 1. Prélèvement des ectomycorhizes:

Nous avons prélevés au niveau de notre station 6 échantillons racinaires. Chaque échantillon est en réalité constitué de 3 prélèvements (figure 25) : ces derniers ont été prélevés à divers endroits dans la station et ce dans le but d'avoir des résultats représentatifs.

Il faut noter que les échantillons sont prélevés en déterrants les racines au départ de la base du tronc afin qu'on soit certain de leur identité. Chaque échantillon est ensuite mis dans un sac plastique étiqueté avec un peu de sol humidifié (pour éviter le dessèchement).



**Figure 25:** Schématisation du prélèvement des racines pour l'observation des ectomycorhizes (**P** : prélèvement).

Au laboratoire les racines sont d'abord lavées à l'eau du robinet pour éliminer les débris et les particules organiques. Après cela, les racines vont être observées à la loupe binoculaire et

triées selon leurs morphotypes. Les critères pris en considération pour le tri des morphotypes seront développés ultérieurement.

Chaque morphotype est par ensuite photographié, décrit et fixé dans du FAA (annexe 2) (JOHANSEN, 1940 in ABOUROUH, 1996) et conservé à température ambiante.

## 2. Réalisation des coupes:

Afin d'observer les ectomycorhizes, au microscope nous avons réalisé des coupes transversales. L'ectomycorhize est maintenue délicatement et aussi droit que possible avec l'index sur une lame porte-objet et découpée finement au moyen d'une lame de rasoir.

Sous une hotte aspirante, les coupes les plus fines sont montées sur une lame porte objet dans une ou deux gouttes d'une solution à 0,05 % de bleu de coton dans du lactophénol d'Amann (annexe 3) et laissées à sécher. Une fois les coupes sèches celles-ci sont recouvertes d'acide lactique afin d'éliminer l'excès de colorant. Elles sont enfin recouvertes d'une lamelle et observées au microscope photonique au grossissements:  $\times 40$ .

## 3. Description des ectomycorhizes:

Afin de décrire les différents morphotypes rencontrés nous nous sommes basés sur:

- La classification établie par El Abrass (1985).
- La classification établie par AGERER (2006).
- La base de données de Blaszkowski regroupant des descriptions d'ectomycorhizes (**site 22**).

Les caractéristiques relevées sont les suivantes :

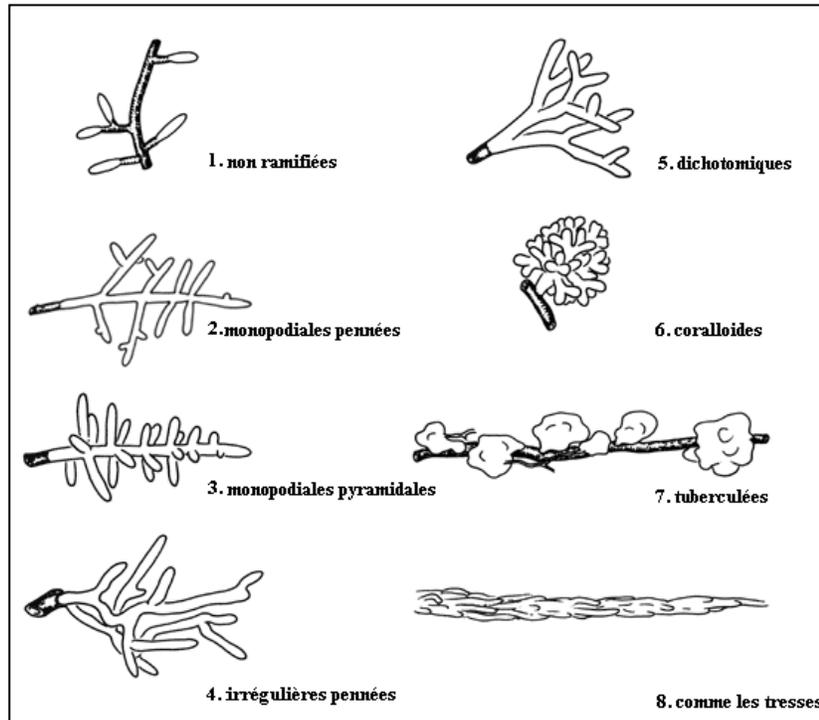
**a. Les caractères macroscopiques (la morphologie du système mycorhizien):** observables à l'œil nu ou sous une loupe binoculaire:

- Forme de la mycorhize (figure 26).
- Longueur de la mycorhize.
- Présence ou absence de ramifications.
- Fréquence des ramifications : solitaires ou en petit nombre.
- Morphologie des apex (figure 27).
- Couleur du manteau.
- Transparence du manteau.
- Couleur des apex.
- Couleur des parties les plus anciennes.
- La texture la surface du manteau : lisse, granuleuse, en feutrage, veloutée, verruqueuse, laineuse, cotonneuse, épineuse, etc (figure 28).
- Présence ou absence des hyphes extramatriciels.
- Fréquence des hyphes.
- Présence ou absence des cordons.
- Fréquence des cordons.
- Présence ou absence des rhizomorphes.
- Fréquence et couleur des rhizomorphes.
- Forme de leur section.

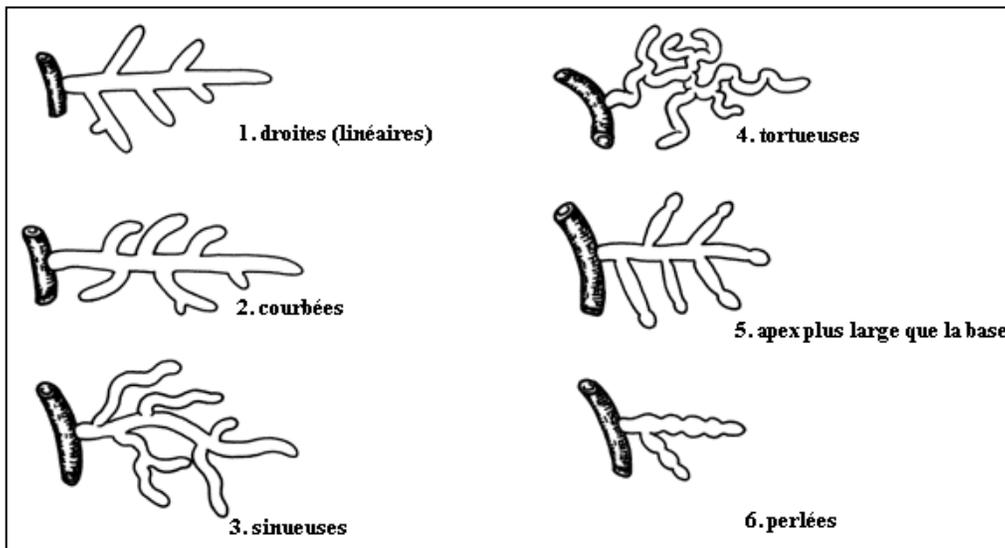
**Remarque :** La description des ectomycorhizes en se basant sur la couleur est subjective étant donnée que celle-ci peut changer.

**b. Les caractères microscopiques:** les caractères microscopiques relevés sont :

- L'épaisseur du manteau par rapport au diamètre de la coupe.
- La structure du manteau : prosenchymateuse, plectenchymateuse, pseudoparenchymateuse.
- Anatomie du réseau de Hartig: profondeur et densité.



**Figure 26:** Les formes de ramifications (site 22).



**Figure 27:** Les formes des pointes (site 22).

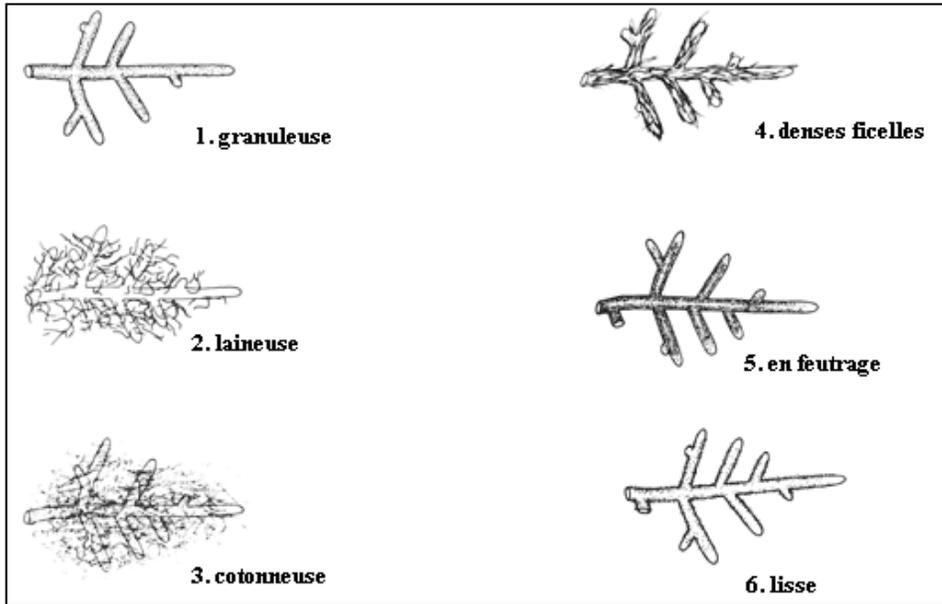


Figure 28 : Différentes textures du manteau (site 22).

## VI. Etude du potentiel mycorhizogène du sol de la station d'étude:

### 1. Conduite de l'essai:

La méthode que nous avons utilisée est celle décrite par ALEXANDER (1965) et qui consiste à diluer les propagules du sol et à les piéger par une plante hôte, et ce dans le but de déterminer la valeur du paramètre MPN (Most Probable Number).

Nous avons choisi d'utiliser le poireau (*Allium porum*) comme plante hôte. Les graines ont été stérilisées dans de l'eau de javel pendant 20 minutes, rincées à l'eau distillée stérile puis mises à germer axéniquement à une température de 30°C dans l'obscurité.

Des dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  ont été effectuées et ce en mélangeant selon le degré de dilution du sol stérile et du sol naturel (figure 29).

Les dilutions ont été effectuées comme suit :

- Dilution  $10^{-1}$  : 30g de sol non stérile (sol naturel) + 270g de sol stérile = 300g (1).

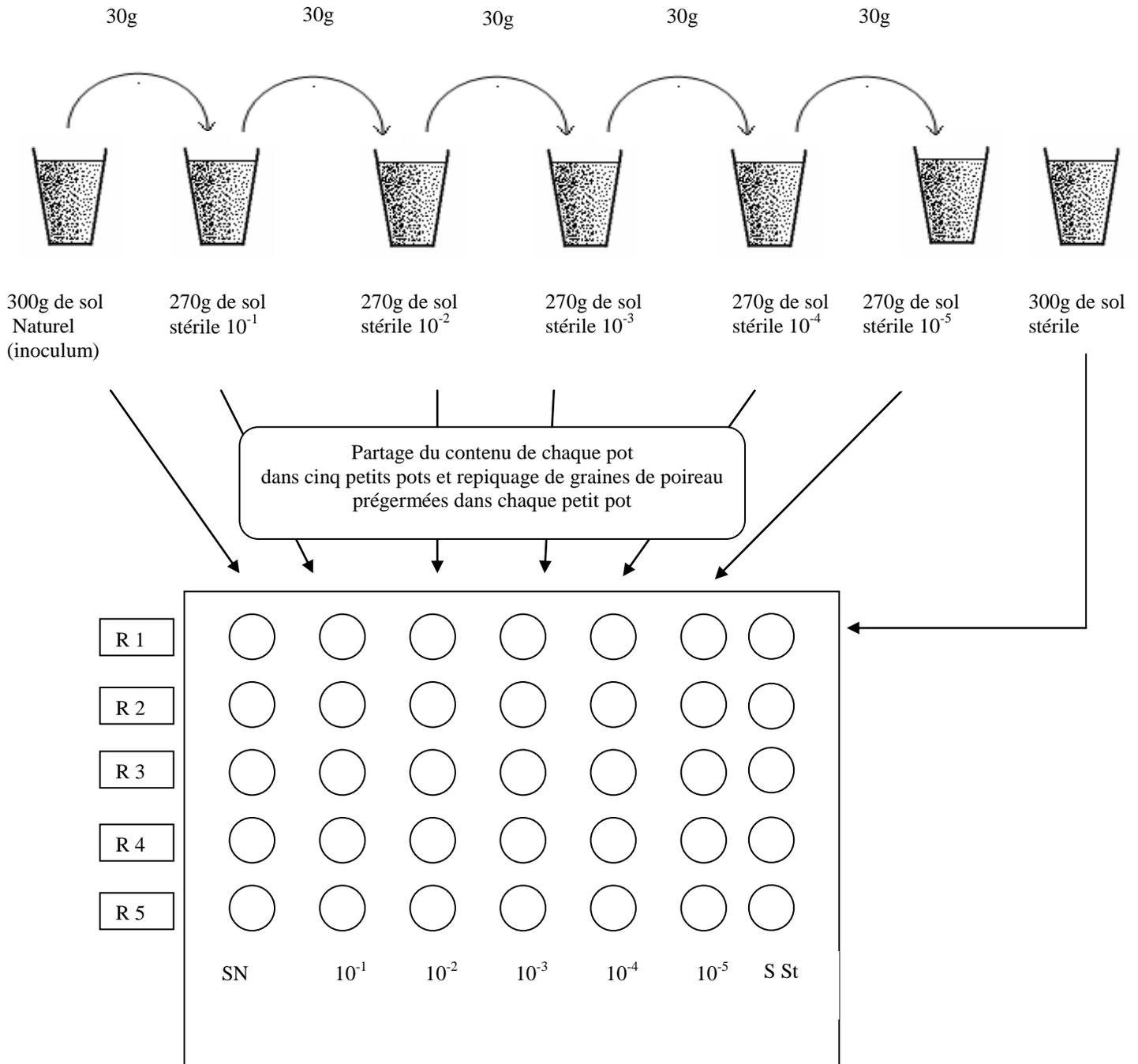
250g vont être prélevés des 300g (1) et vont être répartis dans 5 petits pots (gobelets) à raison de 50g par gobelet. 30g sont prélevés des 50g restants et sont mélangés à 270g de sol stérile pour obtenir la dilution  $10^{-2}$ .

- Dilution  $10^{-2}$  = 30g (1) + 270g de sol stérile = 300g (2).

- Dilution  $10^{-3}$  = 30g (2) + 270g de sol stérile = 300g (3).

- Dilution  $10^{-4}$  = 30g (3) + 270g de sol stérile = 300g (4).

- Dilution  $10^{-5}$  = 30g (4) + 270g de sol stérile = 300g (5).



**Figure 29:** Schématisation de la méthode de réalisation du test du Nombre le Plus Probable (Most Probable Number) testé sur du poireau (*Allium porrum*). R (1,...6) : répétitions, SN : sol naturel, S St : sol stérile.

- 250g de sol non stérile et 250g de sol stérile ont également été répartis dans des gobelets (figure 29). Ces deux séries peuvent être considérées comme témoins et servir ainsi comme une base de comparaison avec les autres séries.

**Remarque :** Le dispositif illustré dans la figure a été suivi pour les deux espèces à savoir *Alnus glutinosa* et *Acacia melanoxylon*.

## 2. Méthode de calcul de la MPN:

Pour déterminer la valeur de la MPN on dénombre pour chaque dilution le nombre de systèmes racinaires infectés et on détermine la dernière dilution ( $P_1$ ) dans laquelle il y aura le maximum de plantes infectées ( $P_1 < 5$ ). on prend en considération également le nombre de plantes infectées dans les deux dilutions qui succèdent à la valeur  $P_1$ . ces deux valeurs représentent  $P_2$  et  $P_3$ . Les valeurs  $P_1$ ,  $P_2$  et  $P_3$  permettent de calculer la valeur de la MPN en utilisant la table de COCHRAN (annexe 4). La valeur de la MPN obtenue est exprimée en nombre de propagules par kg de sol et les valeurs obtenues sont encadrées dans l'intervalle de confiance à 95%.

## VII. Recherche de microorganismes symbiotiques dans le sol de la station d'étude:

### 1. Evaluation de l'abondance des spores dans le sol:

Le dénombrement des spores a été effectué durant la saison de printemps en suivant les étapes suivantes :

- Tamiser 5 g de sol par tamisage humide.
- Récupérer la fraction de chaque tamis dans un pilulier avec de l'eau distillée.
- Procéder à l'observation des fractions millilitre par millilitre : chaque spore rencontrée et comptée et répertoriée par morphotype.

Ainsi, on détermine le nombre total de spores dans 5 g de sol, qu'on va diviser ensuite par 5 afin d'obtenir le nombre de spores par gramme.

### 2. Piégeage des microorganismes symbiotiques:

Afin de piéger les microorganismes qui se trouvent dans la rhizosphère des deux espèces étudiées (*Alnus glutinosa* et *Acacia melanoxylon*), nous avons d'abord prélevé du sol dans les vingt premiers centimètres. Puis, nous avons distribué le sol dans des pots en plastique. Cinq graines prégermées axéniquement ont été repiquées par la suite dans chaque pot. Les graines d'*Alnus glutinosa* ont été désinfectées superficiellement à l'eau oxygénée à 30 volumes et rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile.

Les graines d'*Acacia melanoxylon* sont en revanche plus coriaces ; un traitement à l'acide sulfurique pur a été nécessaire afin de faciliter leur germination. Les graines sont recouvertes d'acide sulfurique pendant une trentaine de minutes et rincées ensuite à l'eau distillée stérile.

### 3. Evaluation de la biodiversité des spores fongiques présentes dans les rhizosphères d'*Alnus glutinosa* et d'*Acacia melanoxylon* :

Nous avons utilisé la méthode de GERDEMANN (1963), DANIELS et SKEPPER (1982) dans le but d'évaluer la biodiversité des spores des champignons endomycorhizogènes au niveau des deux rhizosphères d' *Alnus glutinosa* et d'*Acacia melanoxylon*.

Elle consiste à déposer un échantillon de sol de 200g sur une série de tamis superposés (figure30), et de le soumettre à un jet d'eau du robinet jusqu'à ce que l'eau qui coule du tamis le plus fin devienne claire.

Les tamisât de sol sont par la suite récupérés à l'aide d'une pissette dans des bouteilles d'eau minérales étiquetées. On prélève ensuite un échantillon du tamisât qu'on va diluer avec de l'eau distillée et observer à la loupe binoculaire. Les spores sont récupérées au moyen d'une micropipette (figure 30) et montées entre lame et lamelle pour les observer au microscope. Les spores sont également traitées au réactif de Melzer (annexe 5), qui -selon la spore -va interagir ou pas avec la paroi.

#### 4. Description des spores:

- **Morphologie générale:**

##### a. Identification de la forme:

La forme de la spore peut être sphérique, ovale, obovale, etc.

##### b. Détermination de la couleur:

Afin de déterminer la couleur des spores nous sommes basée sur une formule exprimée en pourcentage de Cyan (bleu),Magenta (rouge), Jaune et Noir suivant un code couleur défini par INVAM (annexe 6) (**site 23**).

Formule= %Cyan /Magenta/Yellow/Black

##### c. Mesure de la taille:

Le diamètre des spores est estimé au microscope à l'aide d'un micromètre oculaire. On choisira le grossissement qui permettra d'estimer le diamètre avec le plus de précision que possible. Après lecture du nombre de graduations sur le micromètre, cette valeur va être multipliée selon le grossissement (tableau 7). La valeur obtenue correspond au diamètre de la spore en micromètres.

**Tableau 8:** Correspondance entre la lecture à l'objectif (nombre de graduations) et la dimension réelle de l'objet mesuré.

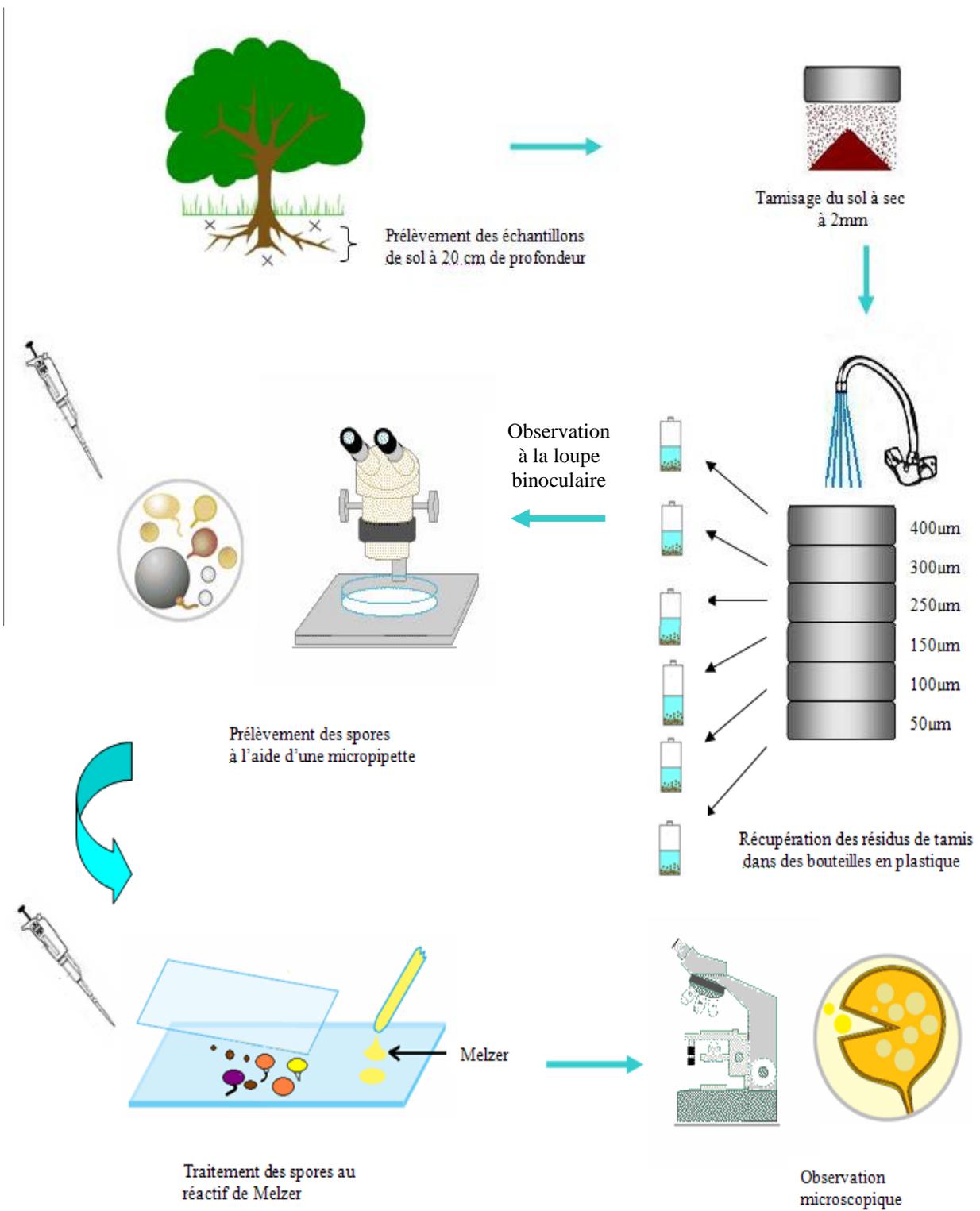
Objectif	04	10	20	40	100
Graduation= $x\mu\text{m}$	22	10	06	04	01

Par exemple, si on lit sur le micromètre au grossissement 10 ,10 graduations, le diamètre de la spore en question est de  $100\mu\text{m}$  (10 x 10).

##### d. Caractères morphologiques :

Certaines particularités morphologiques caractérisant les spores sont très importantes dans la taxonomie et il est donc impératif de les noter :

- Présence d'hyphe suspenseur pour le genre *Glomus*.
- Présence de cellules sporagènes bulbiforme avec ou sans prolongement hyphal pour les genres *Gigaspora et Scutellospora*.



**Figure 30:** Schéma représentatif des étapes à suivre pour évaluer la biodiversité des spores fongiques.

## VIII. Isolement des symbiotes fixateurs d'azote des nodules d'*Alnus glutinosa* et d'*Acacia melanoxylon*:

### 1. L'endophyte *Frankia*:

#### 1.1. Isolement de l'endophyte:

La technique que nous avons utilisée est inspirée de celle de LALONDE et CALVERT (1979) in. **DOMMERGUES et al. (1999)** Cette méthode consiste à mettre l'endophyte *Frankia* (à partir de fragments de nodules) dans des conditions de croissance artificielles dans le but d'obtenir des cultures non contaminées.

Les étapes suivies se résument comme suit (figure 31):

- Prélèver des nodules sur les racines d'*Alnus glutinosa*.
- Brosser délicatement les nodules pour enlever les particules de sol accrochés et les débris organiques.
- Nettoyer les nodules à l'eau du robinet additionnée d'une goutte de détergent puis les rincer.
- Séparer les nodules en lobes nodulaires.
- Stériliser les lobes au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10V) sous une hotte à flux laminaire puis rincer à l'eau distillée stérile.
- Découper les lobes axéniquement et prélever à l'aide d'une aiguille stérile des petits fragments de la zone du parenchyme cortical (blanc écru) sans toucher aux tissus subérisifiés (brun foncé).
- Plonger les petits fragments successivement dans une solution de PBS+PVP puis une solution d'acides aminés (annexe 7) pendant une demi heure.

**NB :** La solution PBS (Phosphate Buffer Saline) a pour rôle de maintenir une pression osmotique suffisante pour éviter les lésions de l'endophyte.

Le PVP (polyvinyl pyrrolidone) va servir à complexer les composés phénoliques qui sont toxiques pour l'endophyte (**LOOMIS et BATAILLE, 1966 in BEDDIAR, 2003**). L'alanine et la leucine qui rentrent dans la composition de la solution d'acides aminés ont un rôle nutritif.

- Reprélever le morceaux à l'aide d'une aiguille stérile et les ensemercer dans des tubes à essai contenant 10ml du milieu Quispel modifié avec 10mg de lécithine Qmod10 (annexe 8) préalablement autoclavé dans une cocotte-minute pendant 20 minutes.
- Incuber les tubes à une température de 25°C.

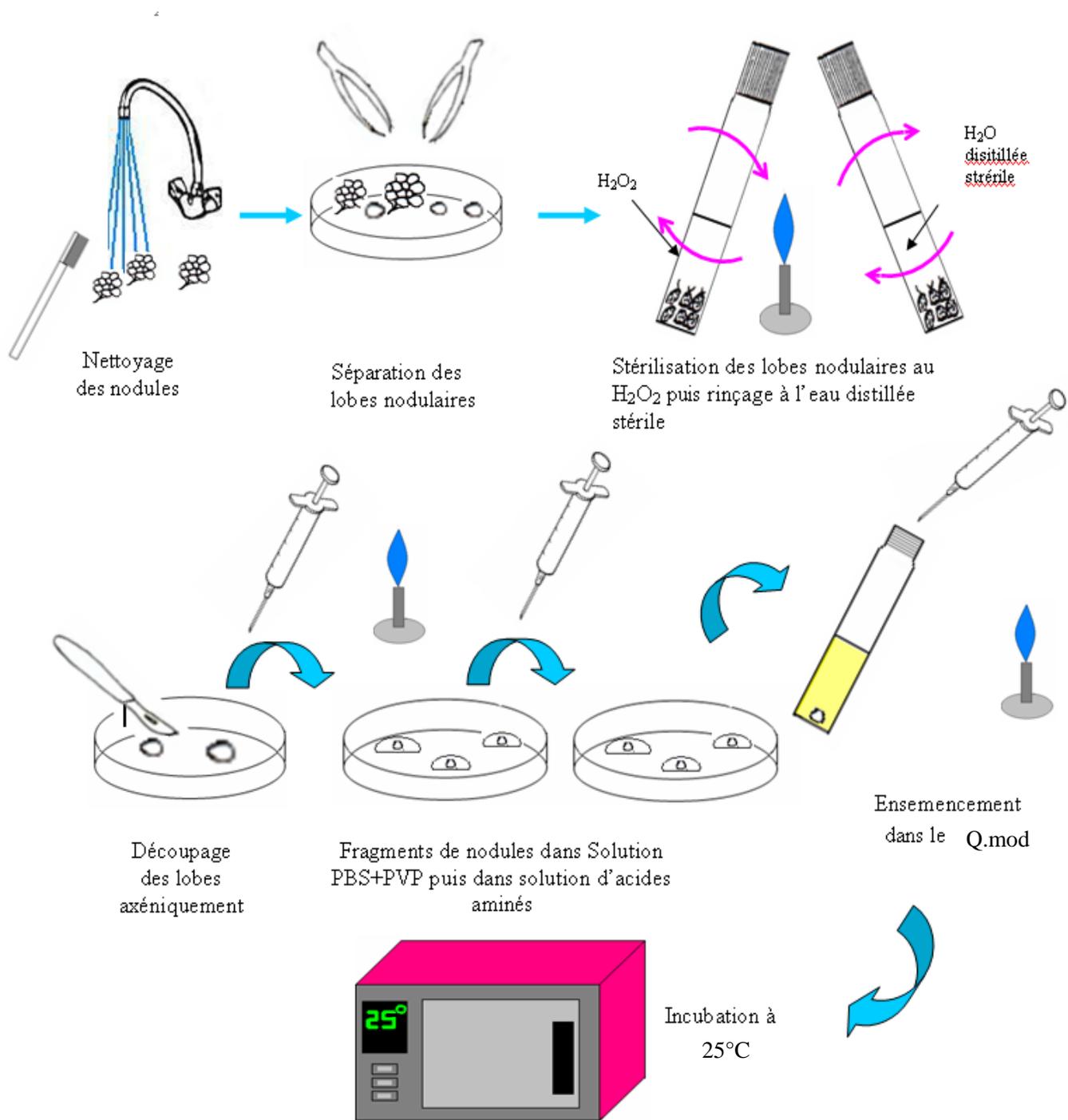
#### 1.2. Culture de *Frankia* :

Après 3 à 4 semaines de croissance, les fragments de nodules exempts de contaminations et qui présentant un développement de colonies de *Frankia* (léger voile blanchâtre) sont déposés dans une boîte de Pétri stérile sous une hôte à flux laminaire. Les colonies de *Frankia* sont désagrégées au moyen d'une aiguille stérile et chaque fragment de la colonie microbienne est ensuite réensemencé dans un tube contenant du Qmod et incubé à nouveau à 25°C.

## 2. L'endophyte *Rhizobium*:

### 2.1. Isolement des bactéries *Rhizobium* à partir des nodules d'*Acacia melanoxylon* :

Afin d'isoler des souches de *Rhizobium* à partir des nodules d'*Acacia melanoxylon* nous avons suivi les étapes suivantes :



**Figure 31:** Schématisation des différentes étapes à suivre afin d'isoler *Frankia*.

### 2.1.1. Nettoyage et conservation des nodules:

Dans un premier temps, les racines portant des nodules sont rincées à l'eau du robinet afin d'éliminer les débris organiques et séchées dans un papier filtre.

Pour un usage immédiat, les nodules frais peuvent se conserver au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 heures. Pour une longue conservation, une dessiccation est recommandée. Dans des flacons hermétiques en verre on dépose en premier du CaCl<sub>2</sub> (1/4 du volume), du coton hydrophile (3/4 du volume) et enfin les nodules destinés à être conservés (figure 32). Les flacons sont par la suite étiquetés et placés au réfrigérateur à 4°C.

Une utilisation postérieure des nodules conservés nécessitera une réhydratation une nuit au réfrigérateur dans de l'eau distillée (VINCENT, 1970). Il faut également noter qu'avant de procéder à l'isolement à partir des nodules conservés ces derniers doivent être d'abord mis à température ambiante.

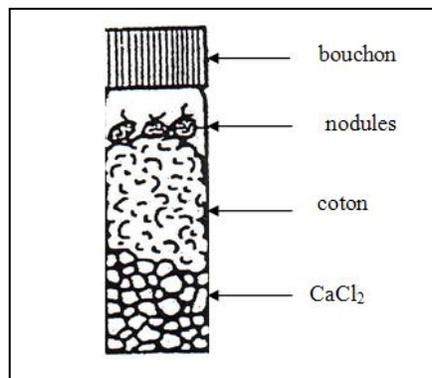


Figure 32: Conservation des nodules.

### 2.1.2. Stérilisation des nodules:

Les nodules sont immergés 05 à 10 secondes dans de l'éthanol à 95%, puis transférés immédiatement dans du calcium hypochlorite à 5 % ou dans du chlorure de mercure acidifié 0,1% (p/v) pendant 3 minutes. La stérilisation est suivie par un abondant rinçage à l'eau distillée stérile (7 à 10 fois selon l'agent stérilisant) (SOMASEGARAN et HOBEN, 1994)

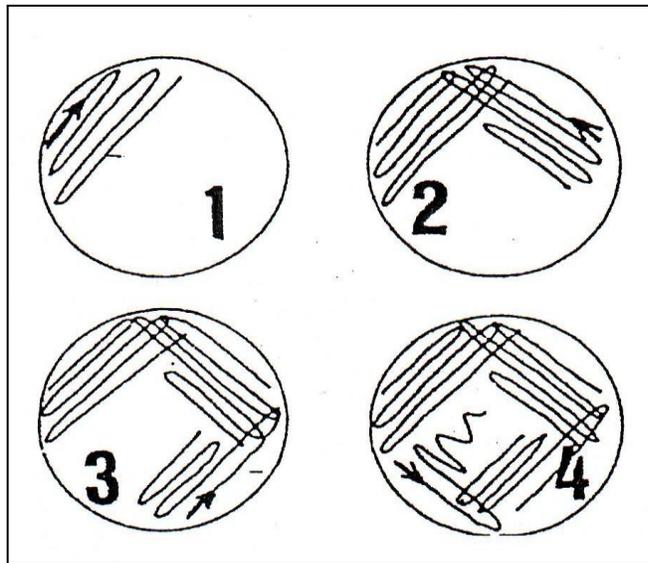
### 2.1.3. Isolement selon la méthode du nodule écrasé:

Cette méthode consiste à:

- Déposer dans une boîte de Pétri stérile 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile.
- Déposer dans chaque goutte le nodule préalablement stérilisé.
- Ecraser le nodule et à l'aide d'une pince stérile.
- Ensemencer avec l'anse de platine une boîte contenant du Yeast Mannitol Agar (YMA) (Annexe 9-1) dont on a ajusté le pH à 6.9 et auquel on a ajouté 10 ml de Rouge Congo à 1 % (p/v) dans l'eau (annexe 9-2) (SOMASEGARAN et HOBEN, 1994).

L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans (figure 33) de manière à isoler des colonies simples. Les boîtes sont incubées pendant 72 heures à 28-30 °C.

Les colonies ayant peu absorbé le colorant (genres *Rhizobium* ou *Agrobacterium*) sont séparées des autres fortement colorées (qui pourraient être éventuellement des contaminants) et testées sur le milieu Glucose-Peptone-Agar (GPA)+ pourpre de bromocrésol ) (annexe 9-3).



**Figure 33:** Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide YMA (SOMASEGARAN et HOBEN, 1994).

#### 2.1.4. Détermination des souches selon la méthode de la coloration de Gram:

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

A chaque prise, l'anse est stérilisée et refroidie dans une boîte contenant du milieu YMA solide. Les lames sont ensuite mises à sécher sur un support stérile dans la hotte. L'émulsion est séchée à la flamme.

Sur un support fermé, les lames sont colorées par le violet de Gentiane pendant une minute. Elles sont ensuite traitées par la solution de Lugol pendant trente secondes.

Après cela les frottis sont décolorés par lavage avec l'éthanol ou l'acétone puis traités par de la Fuschine pendant une minute et rincés par la suite à l'eau.

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

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

#### 2.1.5. Purification des isolats :

La purification des isolats est réalisée par des repiquages répétés dans un bouillon de Y.M.B (Yeast Mannitol Broth) (Annexe 9-4) suivi par des ensemencements sur milieu solide YMA (Yeast Mannitol Agar).

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

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

Les tubes sont ensuite incubés à l'étuve à 28-30 °C, pendant 24-72h selon les souches.

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

#### **2.1.6. Conservation des isolats :**

Afin de conserver les isolats obtenus ces derniers sont ensemencés dans des tubes inclinés contenant du YMA et 3 g/l de CaCO<sub>3</sub> (BOONE, 2001). Les souches sont ensuite conservées à 4°C et leur survie est ainsi assurée pendant 2 à 3 ans. La période de survie peut s'allonger si la température est de 2°C (Vincent, 1970).

**Remarque :** A 15°C les souches peuvent être viables jusqu'à deux mois (Vincent, 1970).

### **2.2. Identification des isolats:**

#### **2.2.1. Test distinctif entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Test de 3-cétolactose):**

Le test de 3-cétolactose permet de distinguer le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium* (JORDAN, 1984). Il se base sur l'oxydation du C<sub>3</sub> du glycosyl des saccharides (BERNAERTS et DE LEY, 1963 in TOUIL, 2008).

Les souches sont incubées à 30°C, pendant 3 jours sur milieu glucosé (g/l) (annexe 9-5), stérilisé à 120°C, pendant 20 minutes.

Une anse de cette culture est ensemencée sur milieu lactosé (g/l) (annexe 9-6) stérilisé à 120°C pendant 20 minutes. Les boîtes sont incubées pendant deux jours à 30°C. Suite à cela les boîtes vont être inondées avec le réactif de Benedict (annexe 9-7) à température ambiante afin de révéler les résultats.

Si on note la présence d'un halo jaune (2-3cm de diamètre) au bout d'une heure de temps, on peut affirmer qu'on est en présence d'un *Agrobacterium*, car seules les souches d'*Agrobacterium spp.* produisent l'enzyme 3- Cétoglucosidase responsable de l'apparition de ce dernier.

A *contrario*, si la couleur du réactif ne change pas, on peut dire avec certitude qu'à ce stade de l'identification la souche étudiée n'est pas un *Agrobacterium*.

#### **2.2.2. Test de nodulation:**

Ce test nous permet d'évaluer l'aptitude des isolats à former des nodules sur la plante hôte avant la mise en collection. Mais malheureusement, nous n'avons pas pu mener ce test selon la méthode de Léonard (1957) faute de moyens. Nous avons donc choisis de remplacer les jarres par des pots en plastiques qu'on a désinfecté à l'eau de javel et rincés à l'eau distillée stérile.

Les graines d'*Acacia melanoxylon* sont sélectionnées selon leur taille et attaquées à l'acide sulfurique pur pendant 30 minutes, puis abondamment rincées à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite mises à germer sur milieu gélosé (eau distillée +agar) (figure34) à 30°C pendant 3 jours jusqu'à l'apparition des radicules.

Les plantules exemptes de contamination sont ensuite transférées dans les pots qu'on a remplis d'un mélange de sable et de sol naturel (3/1 (p/p)) stérilisé à la cocotte-minute trois fois pendant 20 minutes.

Dans chaque pot, trois plantules ont été repiquées et inoculées avec 1ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Elles sont ensuite cultivées en lumière discontinue 8h/16h à température ambiante.



**Figure 34:** Germination des graines sur milieu gélosé (cliché SOUALMIA).

### 2.2.3. Caractérisation phénotypiques des isolats:

#### 2.2.3.1. Test cytomorphologique: Vitesse de croissance: Test Y.M.A+BTB

Cinq millilitres de Bleu de Bromothymole (BTB) à une concentration de 1% p/v dans de l'éthanol sont ajoutés au milieu YMA après autoclavage de ce dernier. Le milieu YMA est liquéfié dans un bain-marie à 100°C. On laisse refroidir jusqu'à 45°C puis on ajoute le BMB, sous la hotte. Dans des boîtes de Pétri ayant reçu le mélange, on ensemence à partir de bouillon YMB des bactéries en phase de croissance exponentielle. Les boîtes sont incubées à 28-30°C et l'observation s'effectue à partir de 24 heures.

Lorsque le milieu vire du vert au jaune en 24 heures d'incubation, ceci prouve que les bactéries ont une croissance rapide tandis que pour les bactéries à croissance lente, le milieu vire du vert à la couleur bleuâtre au bout de 72 heures.

#### 2.2.3.2. Tests nutritionnels : Utilisation de la source de carbone:

Les souches sont cultivées sur un milieu solide semblable au YMA mais le mannitol y a été remplacé par 0,1% des sucres suivants: glucose, saccharose, lactose (le YMA est utilisé comme témoin). La quantité de l'extrait de levure est diminuée à 0,05g/l et le pH du milieu est ajusté à 6,8. Les boîtes sont incubées à 28-30°C pendant 24 heures et les résultats obtenus sont comparés au témoin.

**Remarque:** Nous n'avons pas pu tester les sucres; fructose, arabinose, galactose, maltose, raffinose car ils n'étaient pas disponibles au laboratoire.

### **2.2.3.3. Tests physiologiques:**

#### **a. Tolérance au sel (Na Cl):**

L'osmotolérance des *Rhizobium* est testée sur YMB additionné de 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5% et 10% de Na Cl. Les échantillons sont incubés ensuite pendant 24 heures à 28- 30°C. La croissance est déterminée par l'observation visuelle du trouble et la mesure de la densité optique.

#### **b. Effet de la température:**

Afin d'étudier l'effet de la température sur les souches, les souches sontensemencées sur YMA et incubées à 4 °C, 20°C, 28 °C, 37 °C et 45°C. Ce test est réalisé en présence d'un témoin incubé à 30°C. La croissance est déterminée par une observation des colonies obtenues après 24 et 48 heures sauf pour la température de 4 °C où l'incubation peut durer jusqu'à 10 jours.

#### **c. Croissance à différents pH:**

Les souches sont cultivées sur YMB ajusté à différents pH (4,0 - 4,5 - 5,0 - 5,5 - 5,8 - 6,8 -7,8 - 8,8 et 9,8) en présence d'un témoin pH à 6,8. La croissance est déterminée par l'observation visuelle du trouble obtenu après 24 h d'incubation à 28-30 °C.

## I. Paramètres physicochimiques du sol:

Les résultats obtenus quant aux paramètres physicochimiques du sol sont résumés dans le tableau 9.

**Tableau 9:** Résultats obtenus pour les paramètres physicochimiques du sol de la station d'étude.

pH	Conductivité *	Calcaire Total en%	C%	MO%	Phosphore assimilable *	Azote total en % *	Texture
5.42	0.49	0.00	5.38	9.29	266.69	4.11	argileuse

D'après le tableau 9 on peut dire que le sol de la station d'étude est de texture argileuse, ayant un pH acide, non calcaire et relativement riche en matière organique.

**Remarque:\*** : Ces tests ont été effectués au niveau du laboratoire de pédologie de l'Université de Batna, car le matériel nécessaire à cet effet n'était pas disponible au niveau de notre laboratoire.

## II. Estimation de la colonisation endomycorhizienne arbusculaire (AM) chez *Alnus glutinosa* et *Acacia melanoxylon*:

L'observation des échantillons racinaires par la technique de TROUVELOT *et al*, 1986 a révélé la présence de champignons AM chez tous les échantillons (appartenant aux deux espèces : *Alnus glutinosa* et *Acacia melanoxylon*) et tout au long de l'année.

L'infection endomycorhizienne s'est manifestée surtout par la présence de mycélium intra- et intercellulaire fin (figure 37-3, 4, 5). On a également observé des arbuscules (figure 37-1,2) plus ou moins importants en nombre suivant la saison étudiée. Leur observation n'a pas été chose facile : au grossissement  $\times 100$ , ces derniers apparaissaient sous forme de tâches foncées et il fallait souvent aller au grossissements supérieurs pour avoir plus de détails.

La présence de vésicules a été notée chez *Alnus glutinosa* et *Acacia melanoxylon*, mais elles étaient plus importantes, surtout chez la seconde.

La valeur moyenne du taux d'infection AM (F%) enregistrée durant l'hiver 2007 pour l'aulne glutineux a été de 20% (figure 35-1), une valeur certes faible mais qui peut s'expliquer d'une part par les températures hivernales et d'autre part par le taux de saturation du sol en eau au niveau de la station d'étude; Il a été établi que ces deux facteurs sont défavorables au développement de l'activité endomycorhizienne.

Les valeurs enregistrées durant le printemps 2007 sont plus élevées que celles enregistrées durant l'hiver, mais restent cependant inférieures à ce qui est a été rapporté dans la littérature, car selon (MOSSE, 1973; KHELFAINE-GOUCHEM, 2000. in BEDDIAR 2003) les taux les plus importants sont enregistrés durant cette saison, car cette période de l'année correspond à la reprise de l'activité végétale et une intensification de l'activité photosynthétique.

Ce taux faible pourrait s'expliquer en partie par le taux de précipitations enregistré durant la période de prélèvement : les prélèvements ont été effectués durant la première

semaine d'Avril et cette période a succédé à un mois de Mars relativement pluvieux (204 mm).

Les valeurs enregistrées pour la saison de l'été 2007 observent une légère baisse par rapport à celles du printemps, mais sont considérées toutefois comme raisonnables. Une légère augmentation est enregistrée durant la saison de l'automne. Cette période correspond aux premières pluies qui concordent avec la fluctuation des premiers champignons.

La coloration n'a pas été réalisée pour l'hiver 2008 parce que la station était inondée et par conséquent inaccessible.

En comparaison avec les résultats obtenus pour la saison du printemps 2007, ceux enregistrés pour le printemps 2008 sont exceptionnellement élevés; 76.47% pour *Alnus glutinosa* (figures 35-1) et 64.44% pour *Acacia melanoxylon* (figures 36-1). Les taux d'infection étaient deux fois plus élevés que ceux du printemps précédent. Les conditions climatiques durant la période d'étude correspondaient aux normes saisonnières ce qui expliquerait les résultats obtenus pour cette période. On remarque toutefois que durant l'année 2007 l'abondance des arbuscules et la variation de la teneur arbusculaire dans la partie endomycorhizée de la racine restent faibles.

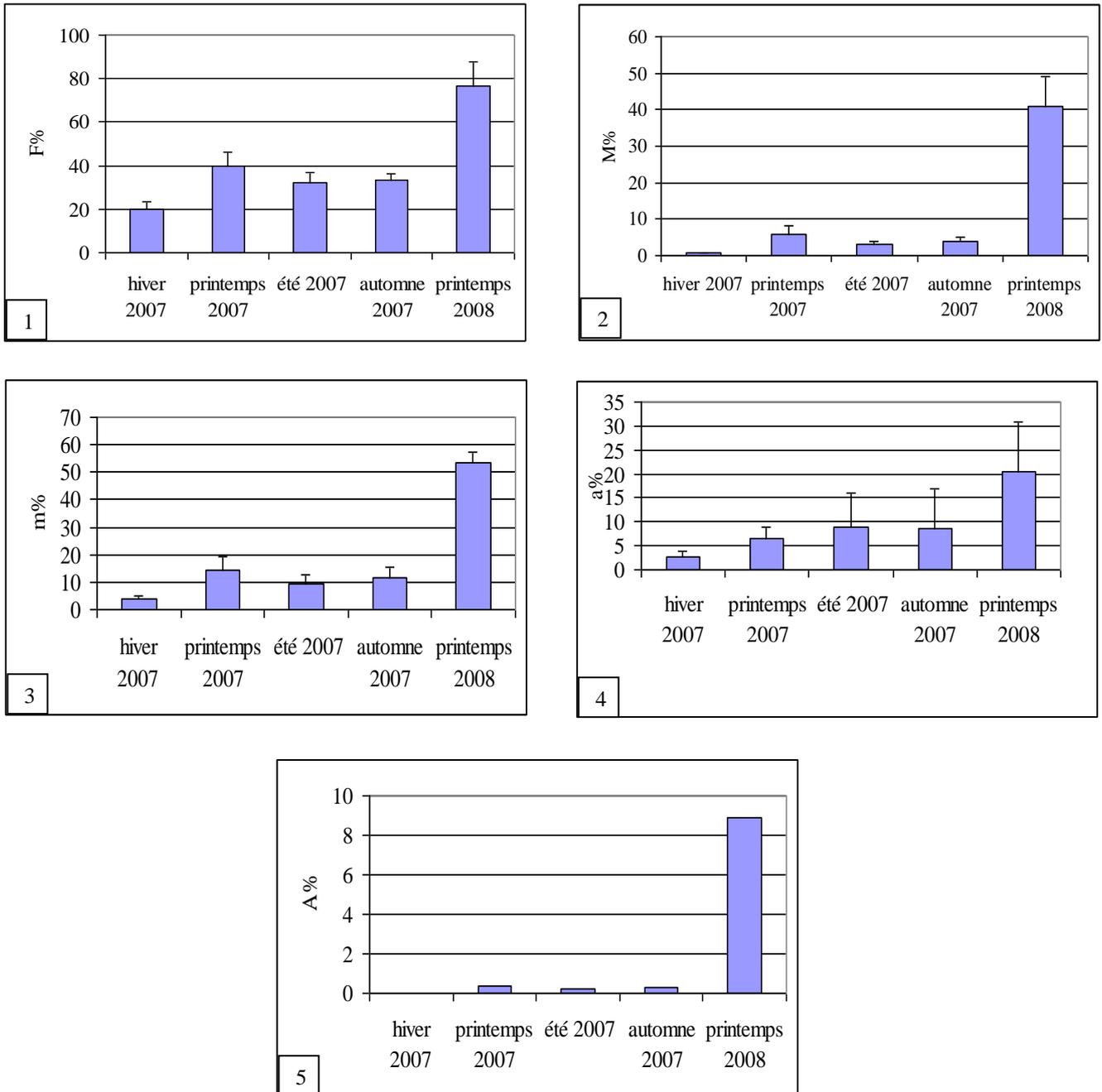
L'augmentation notée d'une saison à une autre est croissante mais reste relativement faible. Néanmoins, cette tendance s'inverse au printemps 2008 avec une teneur arbusculaire moyenne de 8.852% pour *Alnus glutinosa* (figure 35 -5).

Concernant *Acacia melanoxylon*, on peut dire que la tendance est similaire à celle de *Alnus glutinosa*. Les taux d'infection relevés pour cette espèce enregistrent une légère augmentation entre l'hiver 2007 et l'automne 2007 de saison en saison: le taux moyen d'infection va de 10.84% en hiver et atteint 36.22% en automne (figure 36-1). Comme pour *Alnus glutinosa* les résultats enregistrés durant le printemps 2008 équivalent environ au triple de la valeur relevée au printemps précédent.

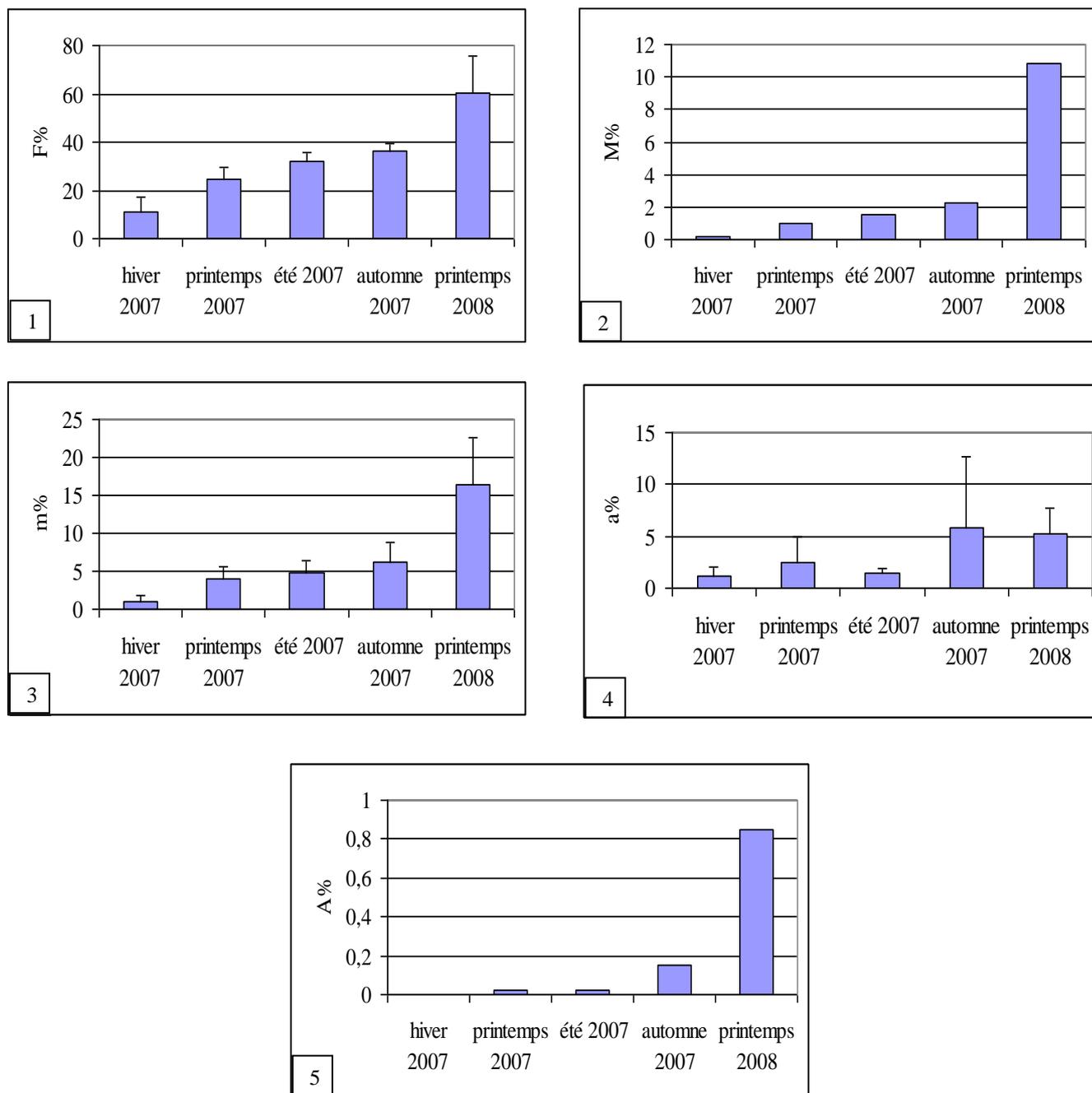
La variation de l'intensité de la colonisation du cortex racinaire (M%) (figure 36-2) et la variation de l'infection dans la partie endomycorhizée de la racine pour *Acacia melanoxylon* (m%) (figure 36-3) progressent d'une manière similaire. Une augmentation progressive est observée entre l'hiver 2007 et l'automne 2007 et puis par la suite une augmentation fulgurante est notée durant le printemps 2008.

Les résultats relatifs à la variation de la teneur arbusculaire dans la partie endomycorhizée de la racine (a%) pour *Acacia melanoxylon* (figure 36-4) évolue en dents de scie avec néanmoins des taux plus importants en ce qui concerne l'automne 2007. La valeur moyenne maximale a été relevé durant l'automne 2007 suivi de près par celle du printemps 2008 (figure 36-4).

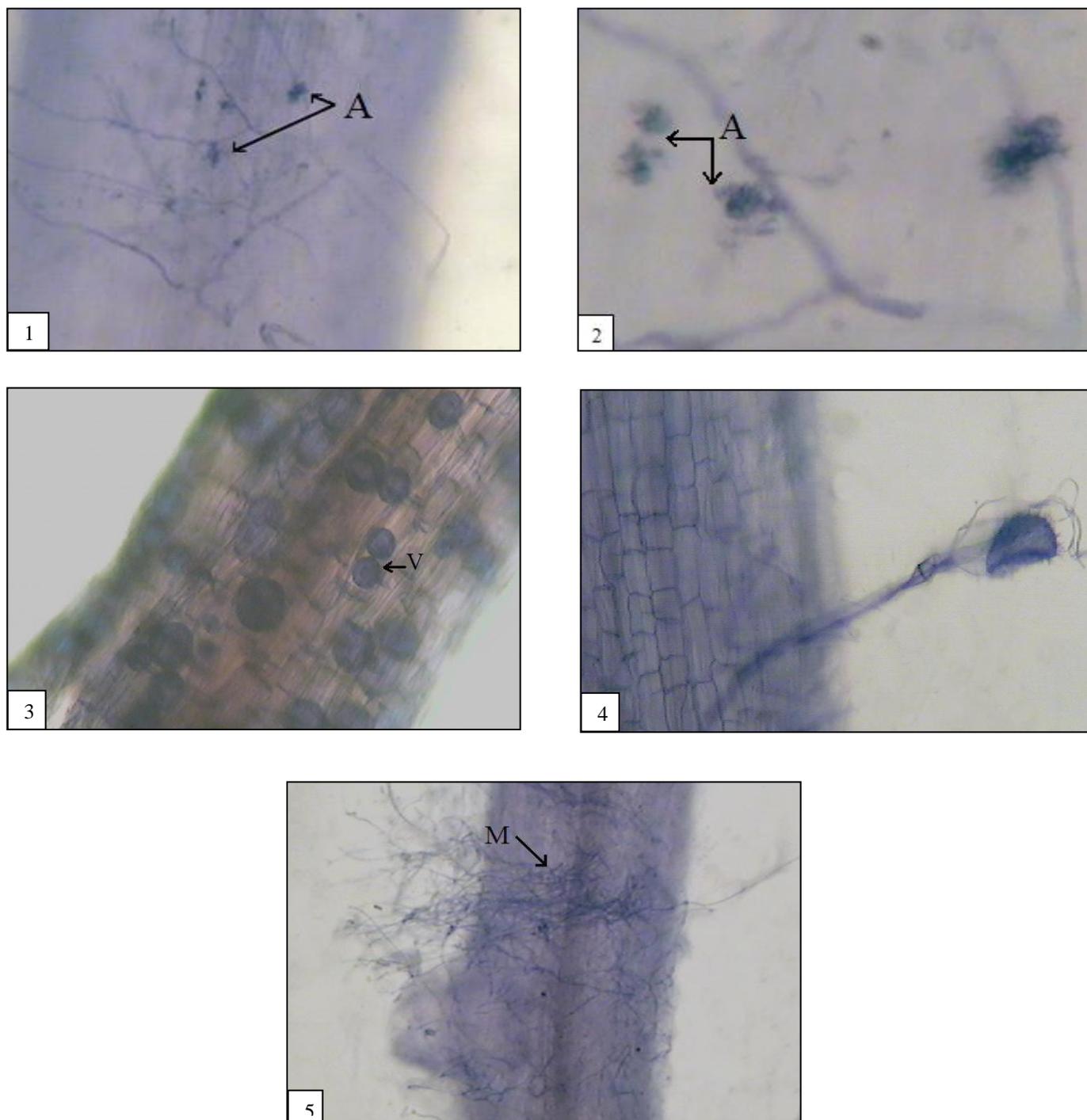
En observant la figure (36-5) on remarque que la teneur arbusculaire de la racine pour *Acacia melanoxylon* A% augmente progressivement et d'une manière croissante pour atteindre son apogée au printemps 2008. Les taux enregistrés demeurent malgré tout, faibles tout au long de la période d'étude.



**Figure 35:** Résultats relatifs aux paramètres de l'infection endomycorhizienne pour *Alnus glutinosa*: **1:** Evaluation du taux d'infection AM (F%), **2:** Variation de l'intensité de la colonisation du cortex racinaire (M%), **3:** Variation de l'infection dans la partie endomycorhizée de la racine (m%), **4:** Variation de la teneur arbusculaire dans la partie endomycorhizée de la racine (a%), **5:** Variation de la teneur arbusculaire de la racine (A%).



**Figure 36:** Résultats relatifs aux paramètres de l'infection endomycorhizienne pour *Acacia melanoxylon*: **1:** Evaluation du taux d'infection AM, **2:** Variation de l'intensité de la colonisation du cortex racinaire (M%), **3:** Variation de l'infection dans la partie endomycorhizée de la racine (m%), **4:** Variation de la teneur arbusculaire dans la partie endomycorhizée de la racine (a%), **5:** Variation de la teneur arbusculaire de la racine (A%).



**Figure 37:** Quelques aspects de la colonisation par les champignons endomycorhiziens: **1** et **2:** **A:** arbuscules sur la racine de *Alnus glutinosa* au grossissement ( $\times 100$ ) et ( $\times 400$ ), **3:** **V:** vésicules sur la racine de *Acacia melanoxylon* au grossissement ( $\times 100$ ), **4:** spore sur racine de *Alnus glutinosa* au grossissement ( $\times 100$ ), **5:** mycélium sur la racine de *Alnus glutinosa* au grossissement ( $\times 30$ ) (clichés SOUALMIA).

### III. Estimation de la diversité des ectomycorhizes chez *Alnus glutinosa* :

#### 1. Morphotype 1:

- Forme de la mycorhize: non ramifiée.
- Longueur de la mycorhize:
  - Axe principal: 8mm.
  - Branchements: entre 3.5 et 5 mm.
- Présence ou absence de ramifications: absence de ramifications.
- Couleur du manteau: beige clair.
- Transparence du manteau: totalement transparent.
- Morphologie des apex: apex plus larges que la base.
- Couleur des apex: marron foncé.
- Couleur des parties les plus anciennes: brun foncé.
- La texture la surface du manteau: lisse.
- Présence ou absence des hyphes extramatriciels: absence d'hyphes extramatriciels.
- Présence ou absence des cordons: absence des cordons.
- Présence ou absence des rhizomorphes: absence des rhizomorphes.

#### Paramètres microscopiques: (figure 38 - 1,2)

- Diamètre de la mycorhize: 0.4mm.
- Epaisseur du manteau: 50µm.

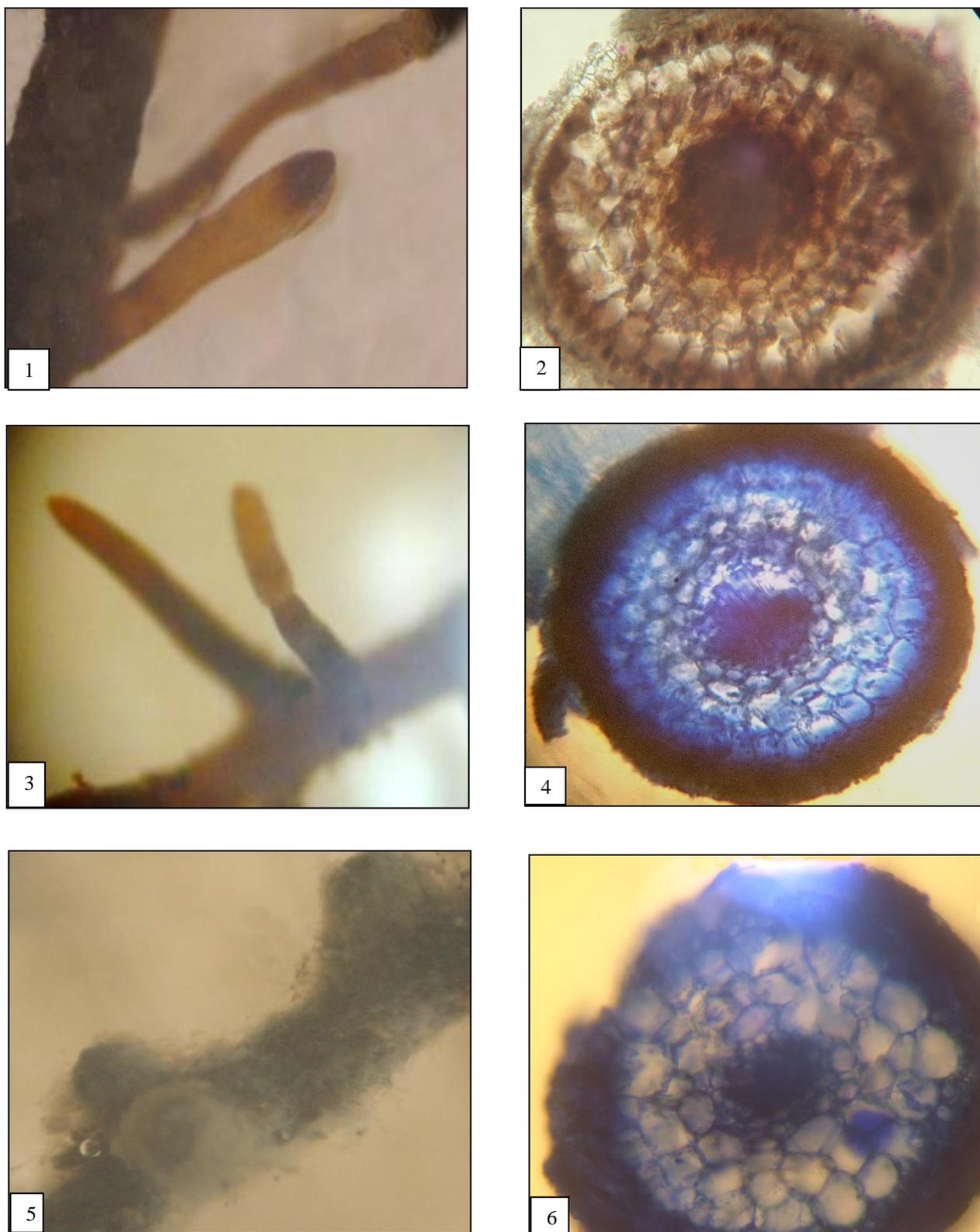
Après consultation et comparaison avec les morphotypes décrits par BEDDIAR (2003) et EL ABRASS (1985), on pourrait supposer que cette ectomycorhize est induite par le genre *Paxillus*.

#### 2. Morphotype 2:

- Forme de la mycorhize: non ramifiée.
- Longueur de la mycorhize :
  - Axe principal: 15mm.
  - Branchements: entre 1.5 et 3 mm.
- Présence ou absence de ramifications: absence de ramifications.
- Couleur du manteau: brun foncé.
- Transparence du manteau: opaque.
- Morphologie des apex: droits+ présence de structures en forme de massue.
- Couleur des apex:
  - Apex en forme de massue: beige clair avec un pointe rouge.
  - Autres: brun clair.
- Couleur des parties les plus anciennes: brun foncé.
- La texture la surface du manteau: en feutrage.
- Présence ou absence des hyphes extramatriciels: absence des hyphes extramatriciels.
- Présence ou absence des cordons: absence de cordons.
- Présence ou absence des rhizomorphes: absence de rhizomorphes.

#### Paramètres microscopiques (figure 38 - 3,4):

- Diamètre de la mycorhize: 0.32mm.
- Epaisseur du manteau: 35µm.



**Figure 38 :** Clichés représentatifs des différents morphotypes d'ectomycorhizes recensés chez *Alnus glutinosa*: **1:** morphotype1 au grossissement ( $\times 40$ ), **2:** coupe transversale du morphotype1 au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** morphotype 2 au grossissement ( $\times 40$ ), **4:** coupe transversale du morphotype 2 au grossissement ( $\times 400$ ), **5:** morphotype 3 au grossissement ( $\times 40$ ), **6:** coupe transversale du morphotype 3 au grossissement ( $\times 400$ ).

Après consultation et comparaison avec les morphotypes décrits par BEDDIAR (2003) et EL ABRASS (1985), on pourrait supposer que cette ectomycorhize se rapproche du type C<sub>122</sub> décrit par par EL ABRASS (1985).

### 3. Morphotype 3:

- Forme de la mycorhize: tuberculée.
- Longueur de la mycorhize:
  - Axe principal: 20 mm.
  - Branchements: entre 1 et 2 mm.
- Présence ou absence de ramifications: absence de ramifications.
- couleur du manteau: blanc argenté.
- Transparence du manteau: translucide.
- Morphologie des apex: droits.
- Couleur des apex: noir.
- Couleur des parties les plus anciennes: noir.
- Texture de la surface du manteau: cotonneux/ laineux.
- Présence ou absence des hyphes extramatriciels: absence des hyphes extramatriciels.
- Présence ou absence des cordons: absence de cordons.
- Présence ou absence des rhizomorphes: absence des rhizomorphes.

### Paramètres microscopiques (figure 38 – 5, 6):

- Diamètre de la mycorhize: 0.56mm.
- Epaisseur du manteau: 100µm.

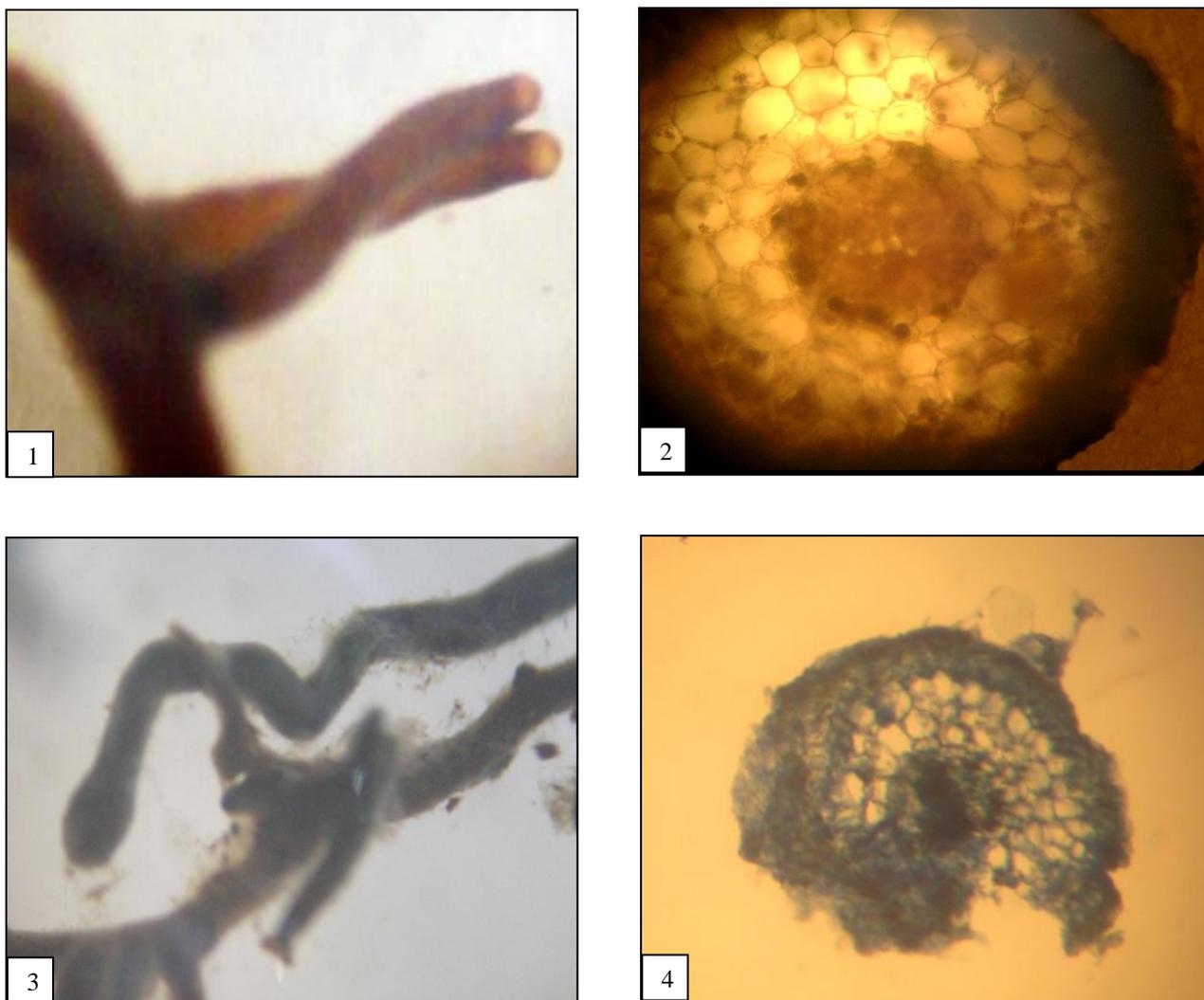
Après consultation et comparaison avec les morphotypes décrits par BEDDIAR (2003) et EL ABRASS (1985), on pourrait supposer que cette ectomycorhize se rapproche du type C<sub>112</sub>.

### 4. Morphotype 4:

- Forme de la mycorhize: non ramifiée.
- Longueur de la mycorhize:
  - Axe principal: 17mm
  - branchements: entre 2.5 et 3.5mm.
- Présence ou absence de ramifications: absence de ramifications
- couleur du manteau: beige
- Transparence du manteau: transparent.
- Morphologie des apex: droits ou bien légèrement recourbés.
- Couleur des apex: beige clair.
- Couleur des parties les plus anciennes: marron foncé.
- La texture la surface du manteau: feutrage.
- Présence ou absence des hyphes extramatriciels: absence d'hyphes extramatriciels
- Présence ou absence des cordons: absence de cordons.
- Présence ou absence des rhizomorphes: absence de rhizomorphes.

### Paramètres microscopiques du morphotype 4 (figure 39 - 1,2) :

- Diamètre de la mycorhize : 0.38mm.
- Epaisseur du manteau : 80µm.



**Figure 39:** Clichés représentatifs des différents morphotypes d'ectomycorhizes recensés chez *Alnus glutinosa* : **1:** morphotype 4 au grossissement ( $\times 40$ ), **2:** coupe transversale du morphotype 4 au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** morphotype 5 au grossissement ( $\times 40$ ), **4 :** coupe transversale du morphotype 5 au grossissement ( $\times 400$ ).

Après consultation et comparaison avec les morphotypes décrits par BEDDIAR (2003) et la classification établie par INGLEBY *et al.*,(1990) on pourrait supposer que cette ectomycorhize est due au genre *Lactarius*.

#### **5. Morphotype 5:**

- Forme de la mycorhize: irrégulière.
- Longueur de la mycorhize: 7mm.
- Présence ou absence de ramifications: -
- Fréquence des ramifications: solitaires ou en petit nombre :-
- Couleur du manteau: blanc cassé à jaunâtre.
- Transparence du manteau: translucide.
- Morphologie des apex: apex renflé.
- Couleur des apex: noir.
- Couleur des parties les plus anciennes: -
- La texture la surface du manteau: en forme de ficelles denses.
- Présence ou absence des hyphes extramatriciels: hyphes extramatriciels absents.
- Présence ou absence des cordons: absence de cordons
- Présence ou absence des rhizomorphes: absence de rhizomorphes.

#### **Paramètres microscopiques (figure 39 - 3,4) :**

- Diamètre de la mycorhize: 0.45mm.
- Epaisseur du manteau: 70µm.

Après consultation et comparaison avec les morphotypes décrits par BEDDIAR (2003), la EL ABRASS (1985) et la classification de INGLEBY *et al.* (1990), on pourrait supposer que cette ectomycorhize est induite par le genre *Paxillus*.

#### IV. Etude du Potentiel mycorhizogène du sol de la station d'étude:

Après six semaines de culture les racines de poireaux sont colorées selon la même méthode appliquée sur les arbres étudiés mais en diminuant le temps pour chaque opération car les racines de poireaux sont relativement fragiles.

La présence (1) ou l'absence (0) de toute forme de colonisation (mycélium, vésicules, arbuscules) est notée sur les tableaux 10 et 11. La figure 40 regroupe quelques aspects de la colonisation des racines de poireaux par les champignons AM.



**Figure 40 :** Cliché représentant le dispositif de la MPN après six semaines de culture (**cliché SOUALMIA**).

**Tableau 10:** Résultats du MPN relatifs à *Alnus glutinosa*.

	Sol naturel	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	Sol stérile
1	1	0	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	0	0	0	0	0
3	1	1	0	1	0	0	0	0
4	1	1	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	0	0	0	0	0
total	5	4	3	2	1	0	0	0
		(P1)	(P2)	(P3)				

**Tableau 11:** Résultats de la MPN relatifs à *Acacia melanoxylon*.

	Sol naturel	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	Sol stérile
1	1	1	1	1	0	0	0	0
2	1	1	1	0	0	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	1	0	0	0
5	1	0	0	1	0	0	0	0
total	5	3	3	2	1	0	0	0
			(P1)	(P2)	(P3)			

Le nombre de propagules par kg de sol est de 1300 propagules /kg de sol pour *Acacia melanoxylon* et de 566 propagules/kg de sol pour *Alnus glutinosa*.

En comparaison avec les résultats obtenus dans la région d'El Kala : 1400 propagules/kg au niveau de Sidi m'barek (NOUASRIA, 2008), 1400 propagules/kg au niveau de la station Elhadjra Elwasâa (CHAABNA, 2006) nous pouvons dire qu'au niveau de la rhizosphère de *Alnus glutinosa* le potentiel endomycorhizogène est considéré comme moyen puisqu'il renferme moins de 1000 propagules par kg de sol. Ceci pourrait s'expliquer par le taux de saturation en eau au niveau de la rhizosphère, car la station est souvent inondée, le sol est par conséquent mal aéré et le développement et la dissémination des spores sont inhibés.

Le potentiel endomycorhizogène concernant *Acacia melanoxylon* est de 1300 propagules /kg de sol. Comparativement aux données suscités, ce résultat est considéré comme convenable.

L'hypothèse la plus plausible qui pourrait expliquer cette différence entre les deux rhizosphères est que *Acacia melanoxylon* est situé la plupart du temps en périphérie de l'aulnaie ; le sol est moins imbibé d'eau et donc mieux aéré que celui de l'aulne glutineux.

Il faut rappeler que *Alnus glutinosa* est colonisé également par les ectomycorhizes qui prédominent chez les sujets adultes d'où la faible présence de propagules endomycorhizogènes.

## V. Evaluation de l'abondance des spores dans le sol:

D'après les résultats obtenus nous constatons que les spores sont recensées à partir de la fraction 150µm et ce pour les deux espèces étudiées à savoir: *Alnus glutinosa* et *Acacia melanoxylon* (tableaux 12 et 13) avec une abondance importante au niveau de la fraction 50µm.

On note toutefois une certaine dynamique dans la rhizosphère d'*Acacia melanoxylon* en comparaison avec celle de *Alnus glutinosa*. Le nombre total de spores dans la rhizosphère de *Acacia melanoxylon* s'élève à 48 spores, ce qui correspond par extrapolation à 9600 spores/kg de sol contre 6200 spores/kg de sol pour *Alnus glutinosa*. Néanmoins, ces chiffres ne traduisent pas forcément un grand potentiel mycorhizogène, ils indiquent au contraire un nombre assez conséquent de spores non viables.

Concernant la diversité sporale celle-ci est rencontrée essentiellement au niveau de la fraction 50µm pour les deux espèces avec une légère supériorité néanmoins pour *Acacia melanoxylon* (5/4).

**Tableau 12 :** Estimation de la diversité sporale de *Alnus glutinosa* dans 5g de sol.

Fraction	400µm	300µm	250µm	150µm	100µm	50µm	Total
Abondance							
Nombre de spores	0	0	0	1	9	23	33
Nombre de morphotypes	0	0	0	1	2	4	7

**Tableau 13** : Estimation de la diversité sporale de *Acacia melanoxylon* dans 5g de sol.

Fraction \ Abondance	400µm	300µm	250µm	150µm	100µm	50µm	Total
Nombre de spores	0	0	0	2	12	34	48
Nbre de morphotypes	0	0	0	2	3	5	10

## VI. Evaluation de la biodiversité des spores fongiques:

Afin de présenter une comparaison de la biodiversité fongique au niveau des deux rhizosphères de *Alnus glutinosa* et de *Acacia melanoxylon*, nous avons d'abord observé les différents morphotypes à la loupe binoculaire puis au microscope optique, puis nous avons fait appel au manuel de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (disponible en ligne sur le [site 24](#)) afin de les identifier. Enfin, des fiches descriptives ont été dressées pour les différents morphotypes rencontrés.

Il faut rappeler que malgré l'utilisation des deux manuels qui étaient en notre disposition, l'identification des différents morphotypes n'a pas été une tâche simple et nous avons été contraints de nous arrêter au rang genre.

Les résultats obtenus quant à *Alnus glutinosa* se présentent comme suit:

### 1. Spores retrouvées dans la rhizosphère d'*Alnus glutinosa*:

#### - Paramètres mesurés pour le morphotype ALNUS 1 (grosse spore): (figure 42)

##### Paramètres de la spore :

Couleur: 0% Cyan/40% Magenta/40% Yellow /0% Black.

Forme: légèrement ovoïde en grappe.

Diamètre : 184µm.

##### Paramètres de la paroi :

Épaisseur : selon endroit varie entre 12µm et 16 µm.

Nombre de couches : deux couches ne réagissant pas avec le réactif de Melzer.

##### Paramètres de l'hyphe d'attache :

Couleur : Yellow, Magenta et Black.

Forme : long et fin.

Paroi : continue avec deux couches.

Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI ([site 24](#)), nous estimons qu'il s'agit probablement de : *Glomus fasciculatum* (présence de protubérences sur l'hyphe d'attache)

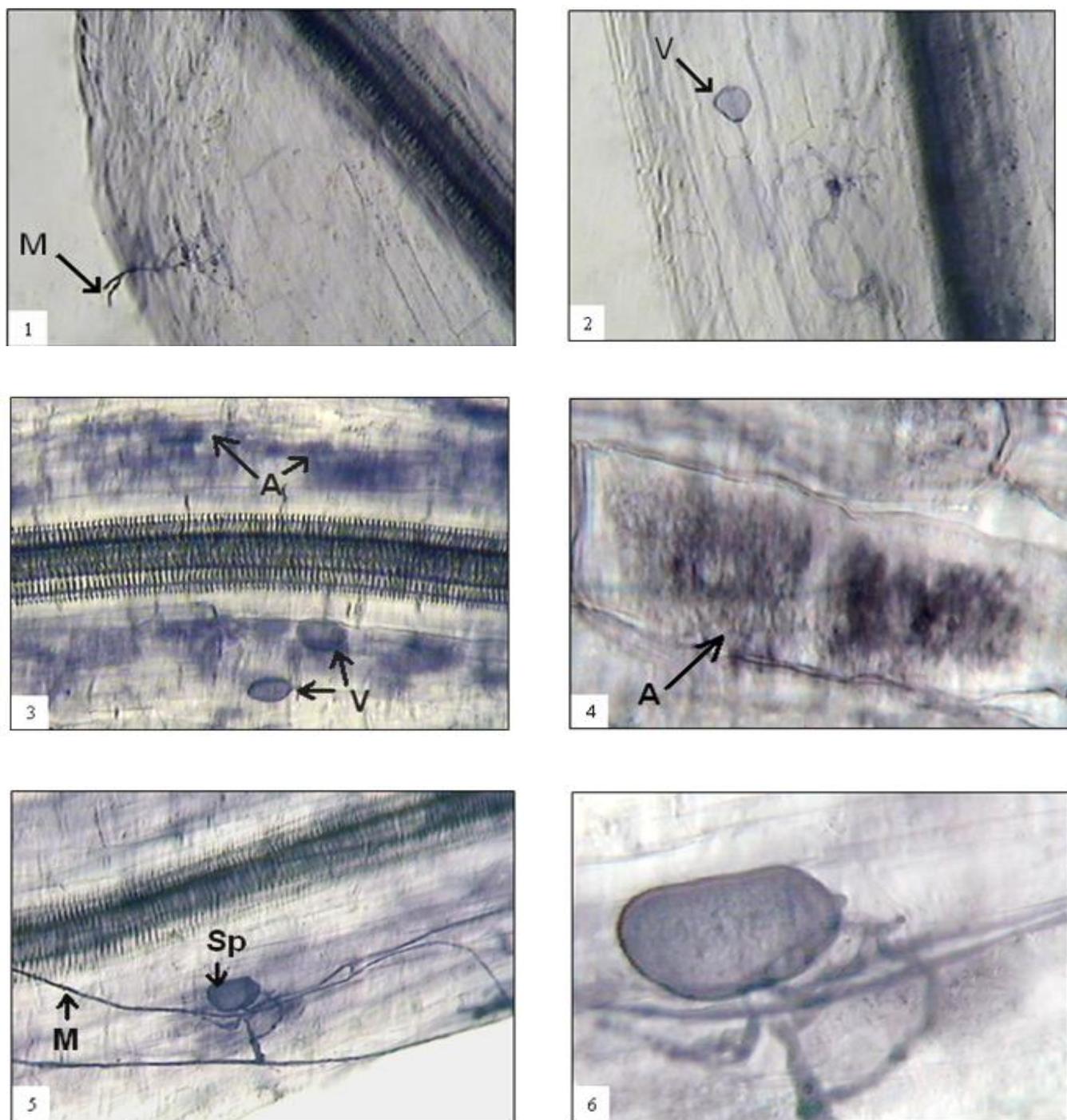
#### - Paramètres mesurés pour le morphotype ALNUS 2: (figure 43)

##### Paramètres de la spore :

Couleur : 20% Cyan /40% Magenta / 70% Yellow / 10% Black.

Forme: obovale.

Diamètre spore : 172µm.



**Figure 41:** Différents aspects de la colonisation des racines de poireau par les champignons endomycorhiziens: **1 et 2:** Racines de poireau planté sur sol d'acacia (dilution  $10^{-2}$ ): **M:** mycélium pénétrant la racine, **V:** vésicule au grossissement ( $\times 100$ ). **3, 4, 5 et 6:** Racines de poireau planté sur sol d'aulne (sol naturel): **3-A:** arbuscules, **3-V:** vésicules au grossissement ( $\times 100$ ), **4-A:** arbuscules au grossissement ( $\times 400$ ), **5-M:** mycélium, **5-Sp:** spore au grossissement ( $\times 100$ ), **6:** spore au grossissement ( $\times 400$ ).

**Paramètres de la paroi :**

Epaisseur paroi : 6µm.

Nombre de couches de la paroi : trois couches laminées dont la deuxième réagissant avec le réactif de Melzer.

**Paramètres de l'hyphe d'attache :**

Couleur: Yellow incrusté de Black.

Forme: recourbé.

Paroi: deux couches continues.

Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous estimons qu'il s'agit de *Glomus sp.*<sub>1</sub>

**- Paramètres mesurés pour fiche 3 (morphotype ALNUS 3): (figure 44)**

**Paramètres de la spore :**

Couleur: 40% Cyan / 60% Magenta / 30% Yellow/ 10% Black.

Diamètre: 208µm.

**Paramètres paroi :**

Epaisseur paroi: 20µm.

Nombre de couches: trois couches laminées réagissant au réactif de Melzer avec une couche interne membraneuse plissée.

**Paramètres hyphe d'attache:**

Couleur: Magenta incrusté de Cyan et de Yellow.

Forme: en forme d'entonnoir.

Paroi: continue avec deux couches.

Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous estimons qu'il s'agit de : *Glomus sp.*<sub>2</sub>

**- Paramètres mesurés pour la fiche 4 (morphotype ALNUS 4): (figure 45)**

**Paramètres de la spore :**

Couleur: 20% Cyan/ 40% Magenta / 60% Yellow/ 0% Black.

Forme: ovoïde.

Diamètre: 164µm sur 144 µm.

**Paramètres de la paroi :**

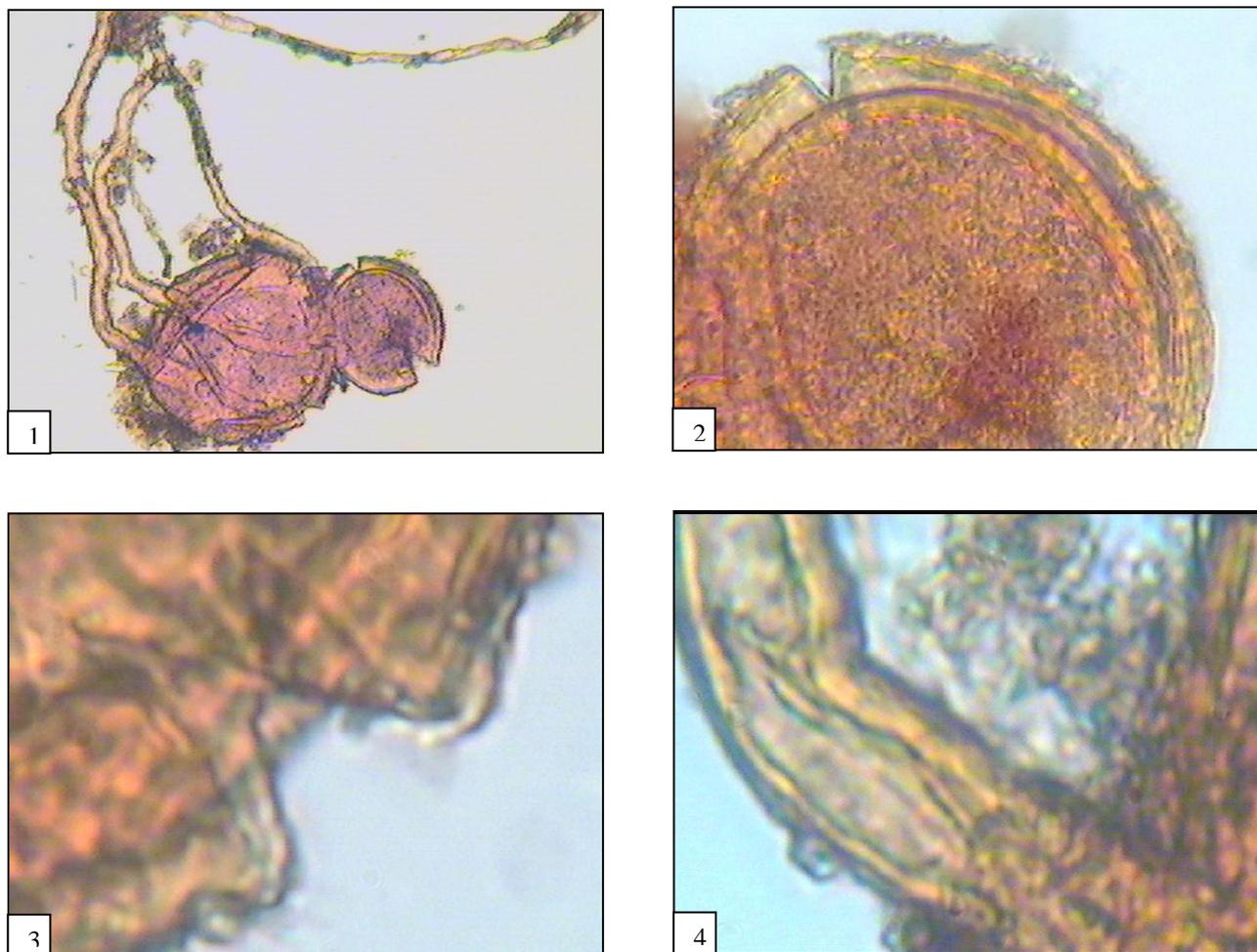
Epaisseur paroi : 8 µm.

Nombre de couches : deux couches ne réagissant pas au Melzer et dont l'externe comporte des ornements.

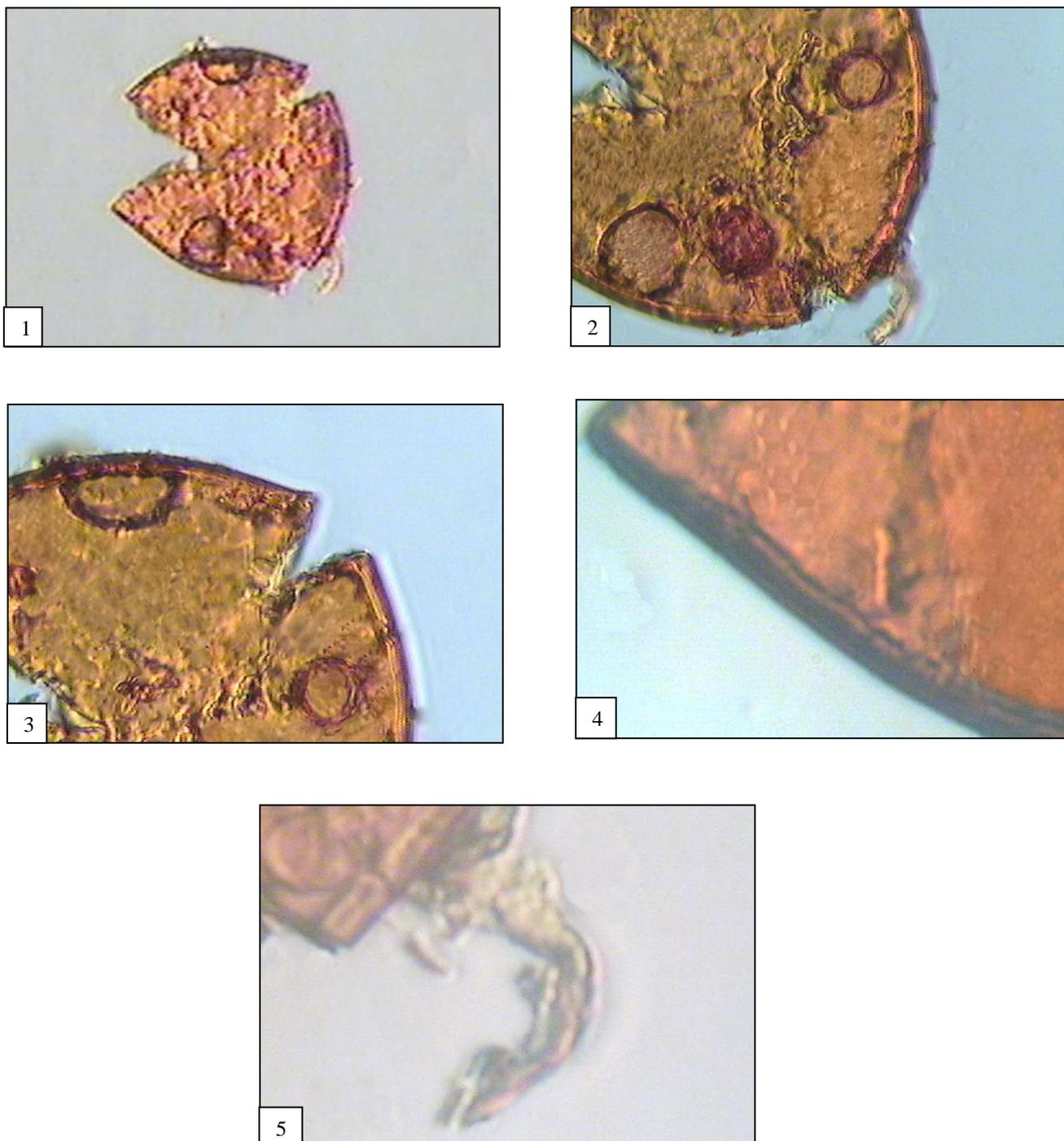
**Paramètres de l'hyphe d'attache :**

Forme : recourbé.

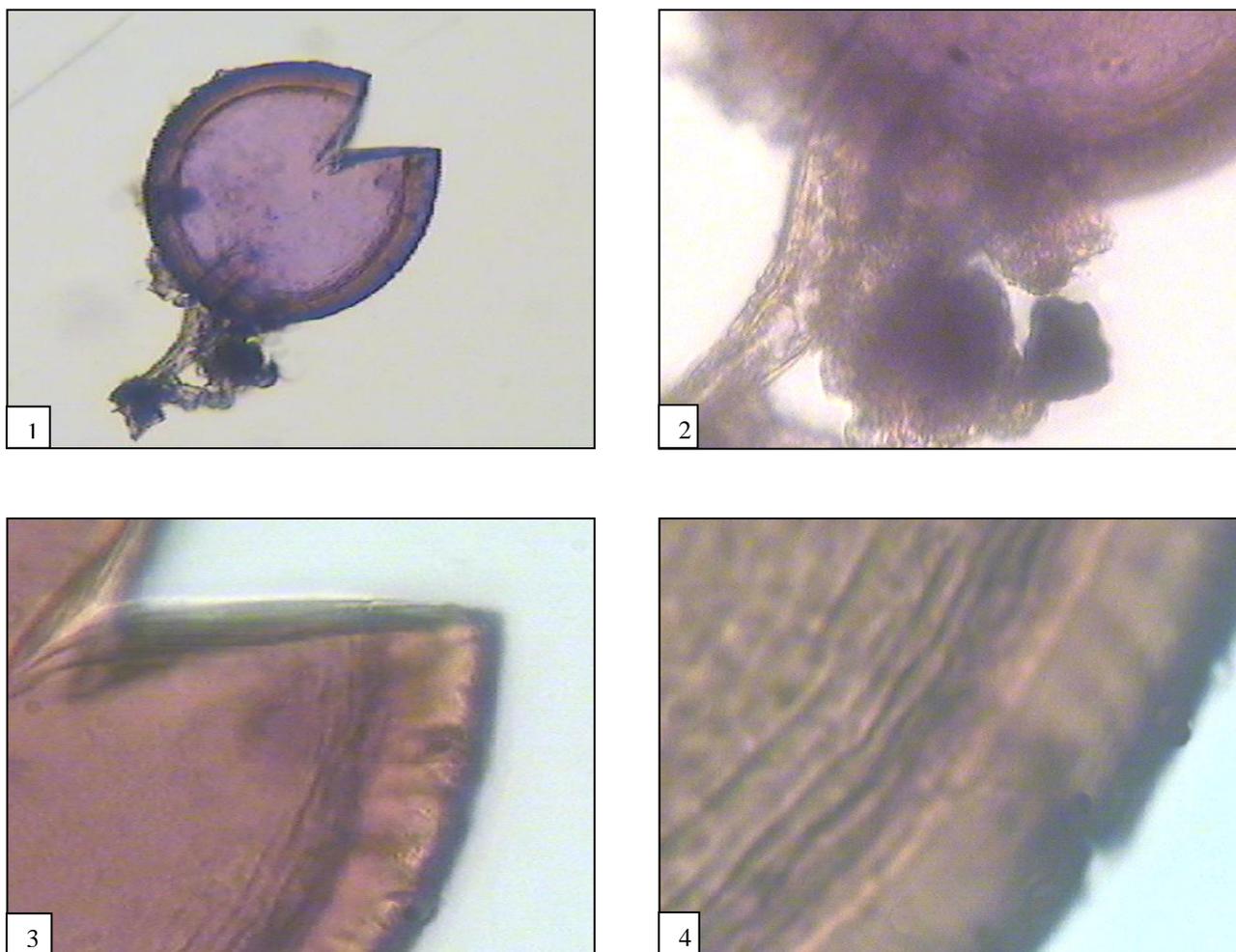
Paroi : continue avec deux couches.



**Figure 42:** Fiche représentative du morphotype ALNUS 1 (fraction 150 $\mu$ m de l'aulne): **1:** spore au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** spore au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 1000$ ), **4:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 1000$ ).



**Figure 43:** Fiche représentative du morphotype ALNUS 2: **1:** spore au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** spore au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 400$ ), **4:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 1000$ ), **5:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 1000$ ).



**Figure 44:** Fiche représentative du morphotype ALNUS 3 (fraction 100 $\mu$ m de l'aulne): **1:** spore au grossissement ( $\times$ 100), **2:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times$ 400), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times$ 400), **4:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times$  1000).

Couleur: Yellow.

Après consultation du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous pensons qu'il s'agit de : *Acaulospora sp.*<sub>1</sub>

**- Paramètres mesurés pour la fiche 5 (morphotype ALNUS 5): (figure 46)**

**Paramètres de la spore :**

Couleur: 0% cyan/ 20% Magenta / 30% Yellow/ 10% Black.

Diamètre: 128 µm.

**Paramètres paroi :**

Epaisseur: 8 µm.

Nbre de couches: deux couches dont la plus interne réagit au Melzer.

**Paramètres hyphe d'attache :**

Couleur: Yellow incrusté de Black.

Forme: globuleux à l'attache.

Diamètre bulbe: 40µm.

Paroi: une couche continue.

Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous estimons qu'il s'agit de : *Scutellospora sp.*

**2. Spores retrouvées dans la rhizosphère d'*Acacia melanoxylon*:**

**- Paramètres mesurés pour la fiche 6 (morphotype ACACIA 1) : (figure 47)**

**Paramètres de la spore :**

Couleur: 60% Cyan/ 80% Magenta / 20% Yellow/ 0% Black.

Diamètre: 148 µm.

**Paramètres de la paroi :**

Epaisseur: 6 à 8µm.

Nbre de couches: trois couches dont la troisième réagit au Melzer.

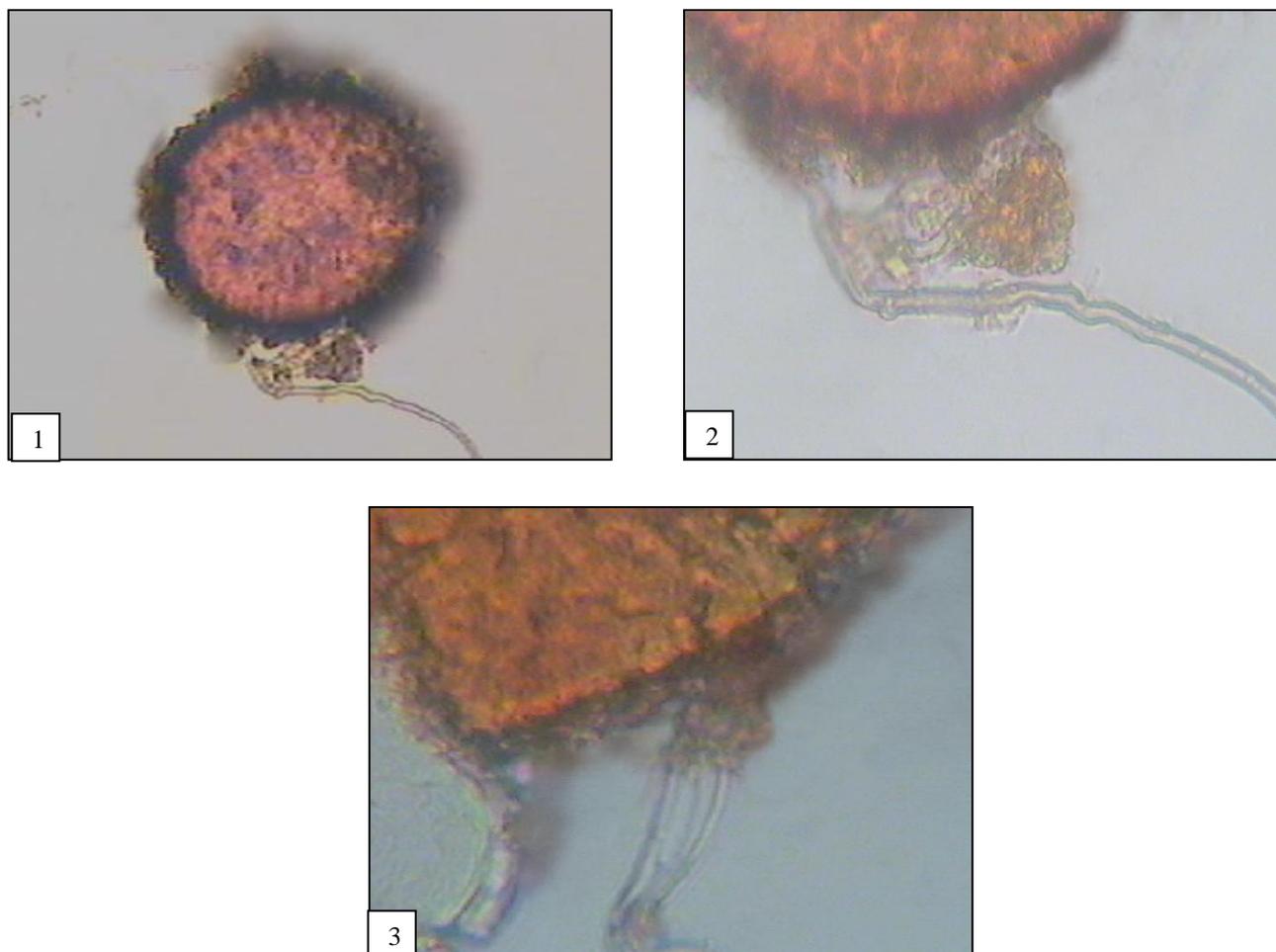
**Paramètres de hyphe d'attache :**

Couleur: Yellow Cyan et Magenta.

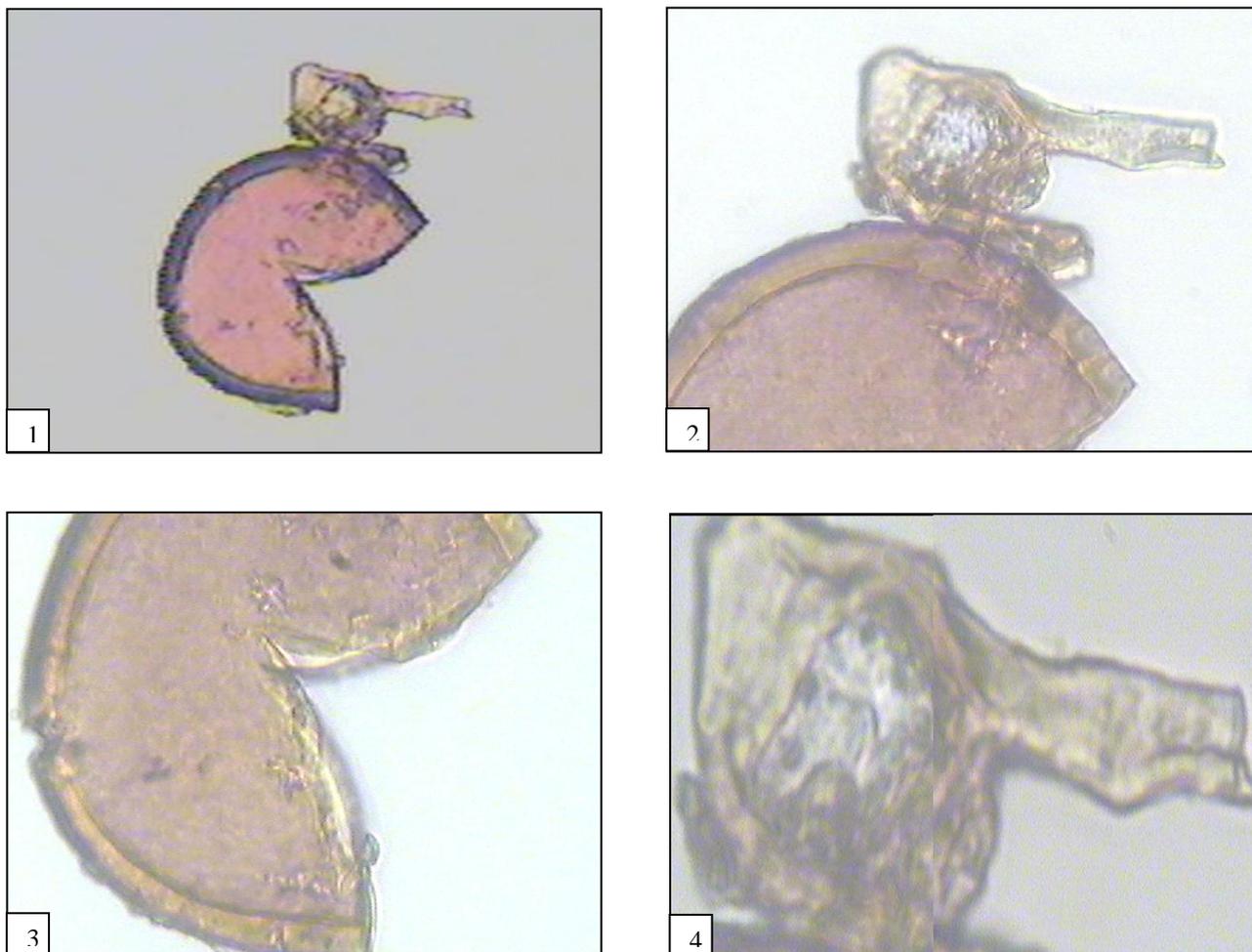
Forme: en forme d'entonnoir.

Paroi: une couche continue mais lobée.

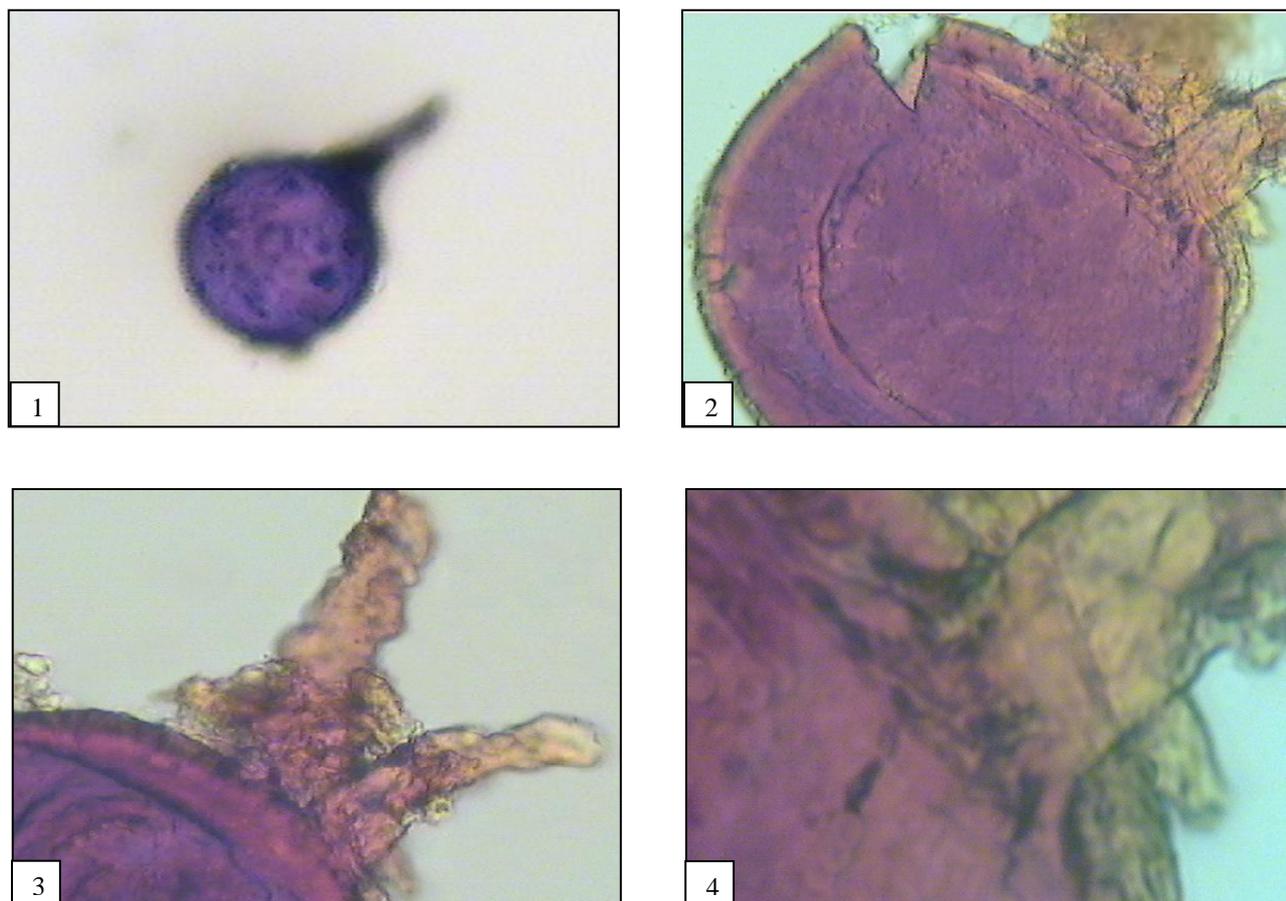
Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous estimons qu'il s'agit de : *Glomus sp.*<sub>3</sub>.



**Figure 45 :** Fiche représentative du morphotype ALNUS 4 (fraction 100 $\mu$ m de l'aulne: **1**: spore au grossissement ( $\times 100$ ), **2,3 et 4** : aspects de la paroi au grossissement ( $\times 400$ )).



**Figure 46:** Fiche représentative du morphotype ALNUS 5 (fraction 50 $\mu$ m de l'aulne): **1:** spore au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 400$ ), **4:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 1000$ ).



**Figure 47:** Fiche représentative du morphotype ACACIA 1 (fraction 50 $\mu$ m de l'aulne): **1:** spore au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 400$ ), **4:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 1000$ ).

**- Paramètres mesurés pour la fiche 7 (morphotype ACACIA 2) : (figure 48)**

**Paramètres de la spore:**

Couleur: 60% Cyan / 80% Magenta / 50% Yellow / 10% Black.

Diamètre: 136 µm.

**Paramètres de la paroi:**

Epaisseur: 8 µm.

Nombre de couches: quatre couches dont la deuxième réagit au Melzer.

**Paramètres de hyphe d'attache:**

Couleur: Magenta et Yellow incrusté de Black.

Forme: légèrement coudé.

Paroi: continue avec trois couches.

Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous estimons qu'il s'agit de : *Glomus sp4*.

**- Paramètres mesurés pour la fiche 8 (morphotype ACACIA 3): (figure 49)**

**Paramètres de la spore:**

Couleur: 40% Cyan / 80% Magenta / 30% Yellow / 10% Black.

Diamètre: 152 µ.

**Paramètres de la paroi:**

Epaisseur: 4 µm.

Nombre de couches : trois couches dont :

- La première réagit au réactif de Melzer
- La deuxième est laminée
- La troisième est membraneuse

**Paramètres del' hyphe d'attache:**

Couleur: Yellow et Magenta.

Forme: droit et large

Paroi: une seule couche continue.

Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous estimons qu'il s'agit de : *Glomus Sp.5*

**- Paramètres mesurés pour la fiche 9 (morphotype ACACIA 4) : (figure 50)**

**Paramètres de la spore**

Couleur: 40% Cyan / 60% Magenta / 30% Yellow / 10% Black.

Diamètre: 160 µm.

**Paramètres de la paroi :**

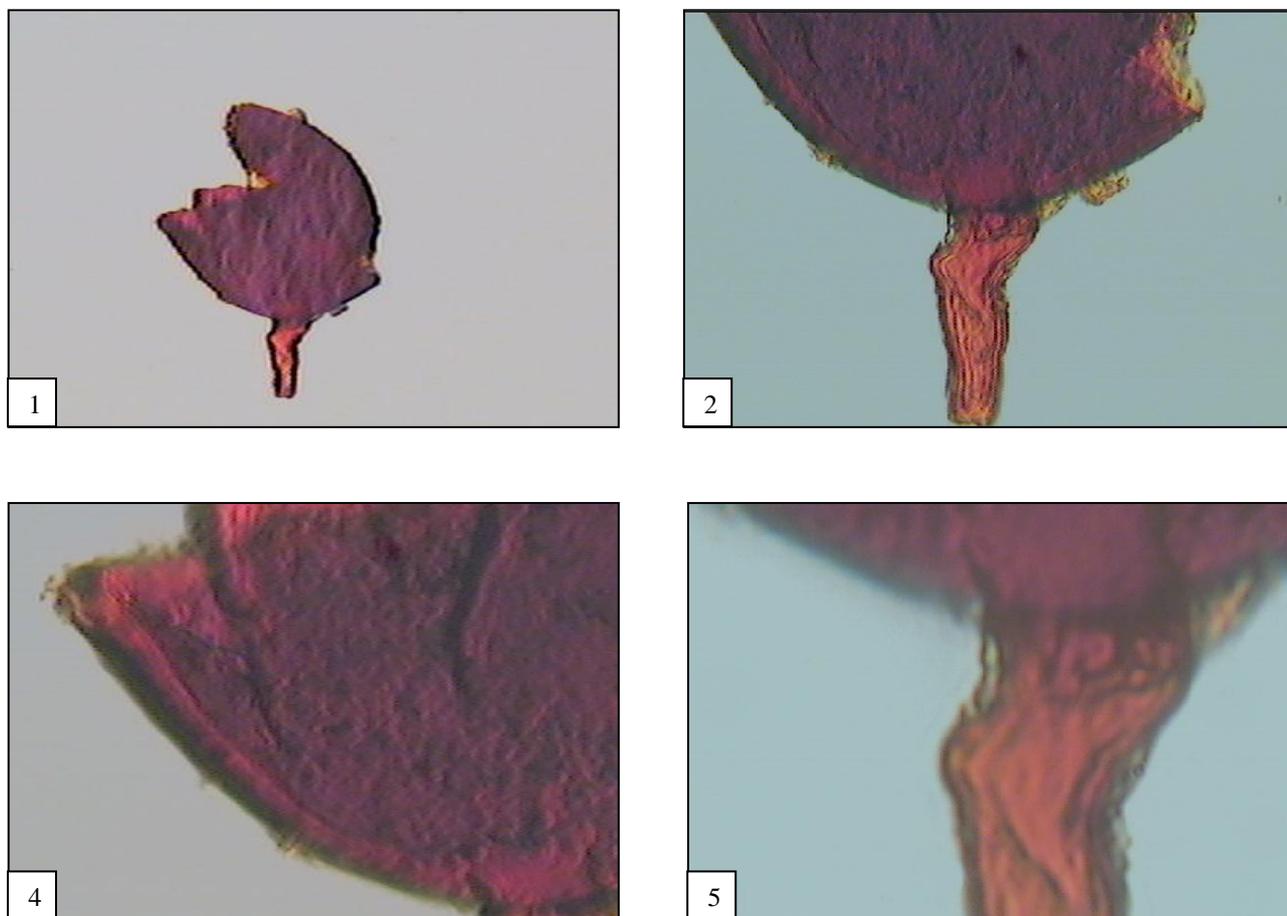
Epaisseur: 7 µm.

Nombre de couches : trois couches.

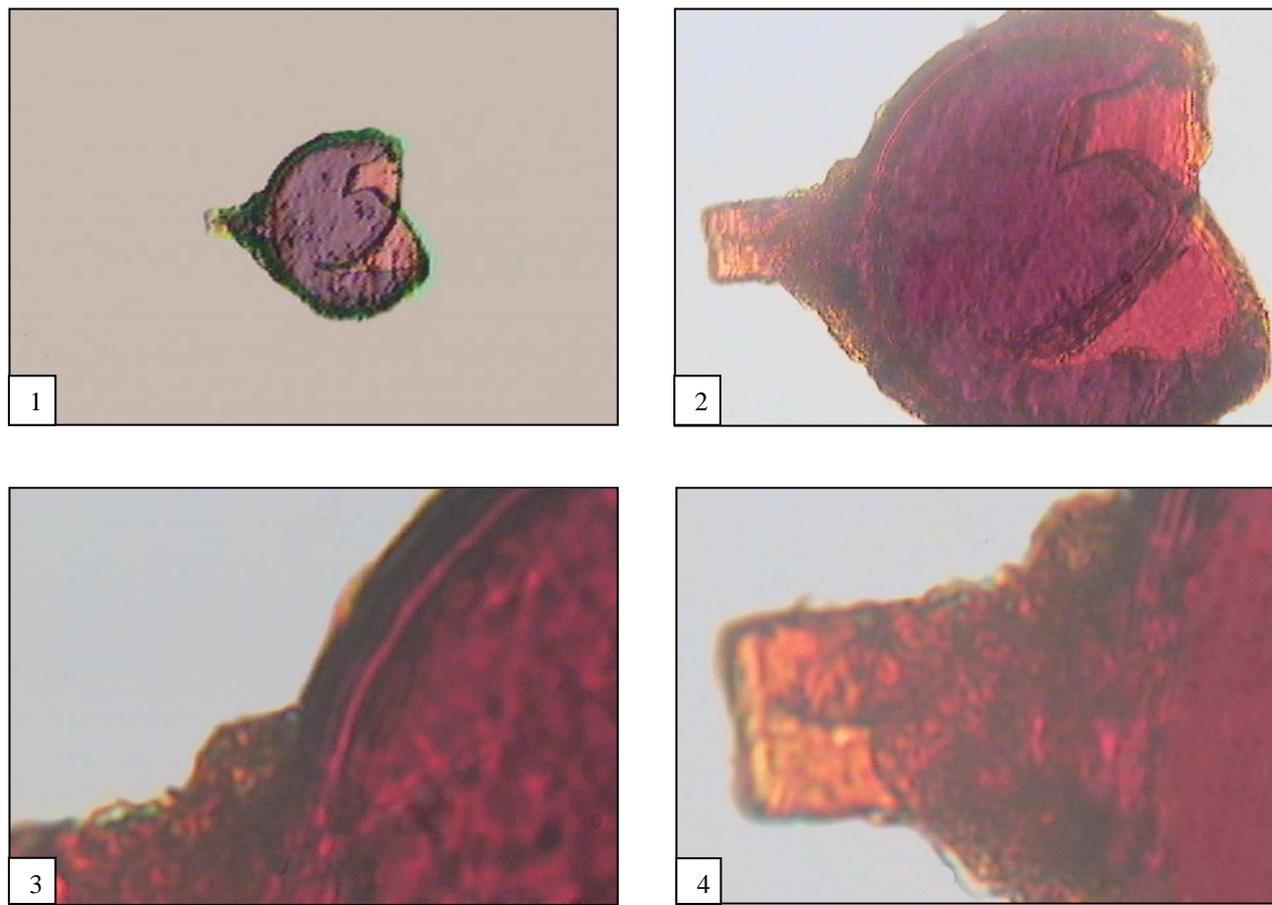
**Paramètres de hyphe d'attache :**

Hyphe d'attache : pas visible.

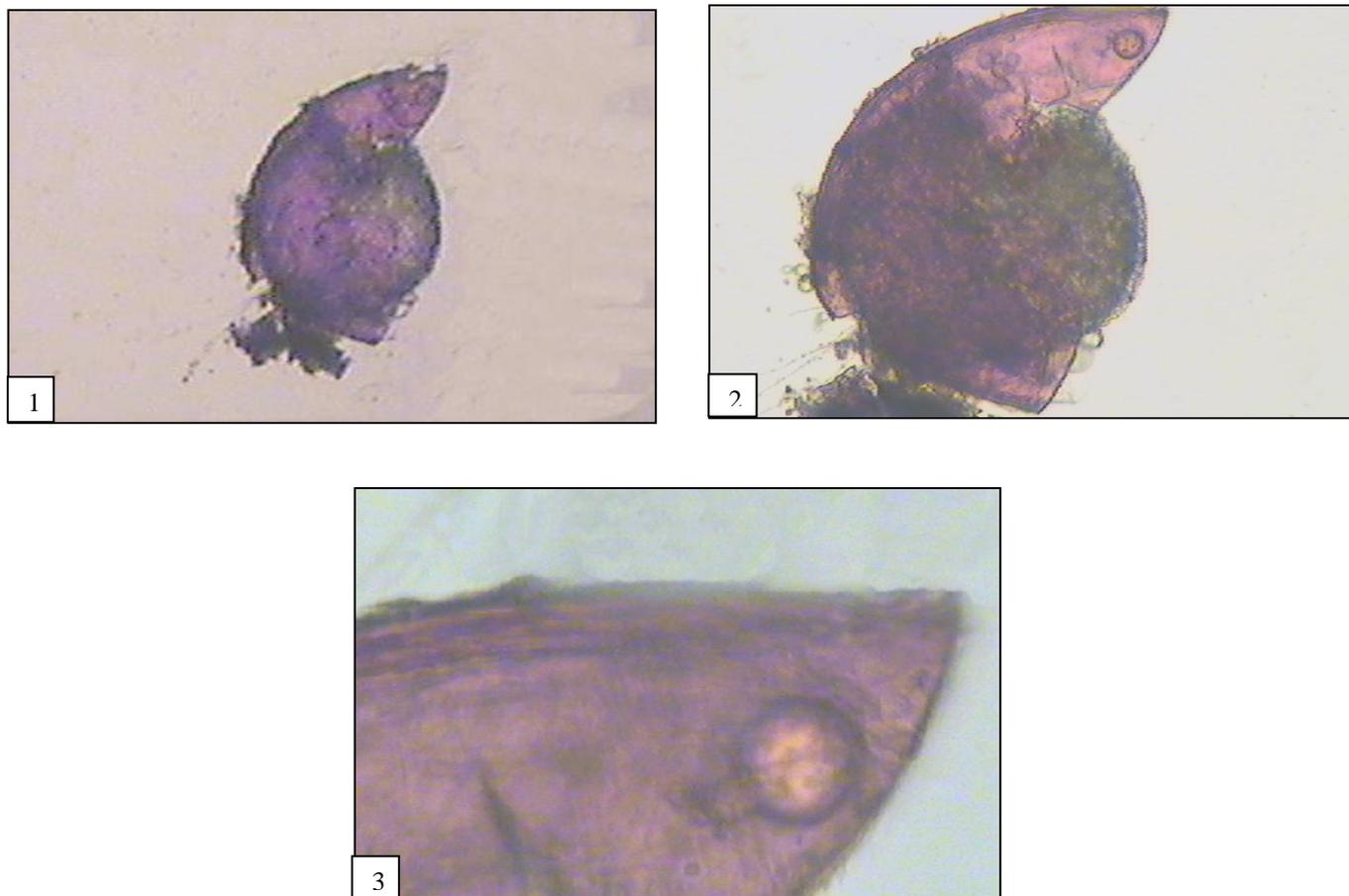
Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous estimons qu'il s'agit de: *Acaulospora sp.*



**Figure 48:** Fiche représentative du morphotype ACACIA 2 (fraction 50 $\mu$ m de l'aulne): **1:** spore au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 400$ ), **4:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 1000$ ).



**Figure 49:** Fiche représentative du morphotype ACACIA 3: **1:** spore au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 400$ ), **4:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 1000$ ).



**Figure 50:** Fiche représentative du morphotype ACACIA 4: **1:** spore au grossissement ( $\times 30$ ), **2:** spore au grossissement au grossissement ( $\times 100$ ), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 400$ ).

**- Paramètres mesurés pour la fiche 10 (morphotype ACACIA 5): (figure 51):**

**Paramètres de la spore:**

Couleur: 20% Cyan/ 40% Magenta / 60% Yellow/ 0% Black.

Diamètre: 140µm.

**Paramètres de la paroi :**

Epaisseur: 6µm.

Nombre de couches: trois couches dont la plus interne réagit au Melzer.

**Paramètres de hyphe d'attache:**

Couleur: Yellow et Magenta incrusté de Cyan.

Forme: droit.

Paroi: deux couches discontinues.

Après consultations du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986) et celui de BLASZKOWSKI (site 24), nous estimons qu'il s'agit de : *Glomus sp.*<sup>6</sup>.

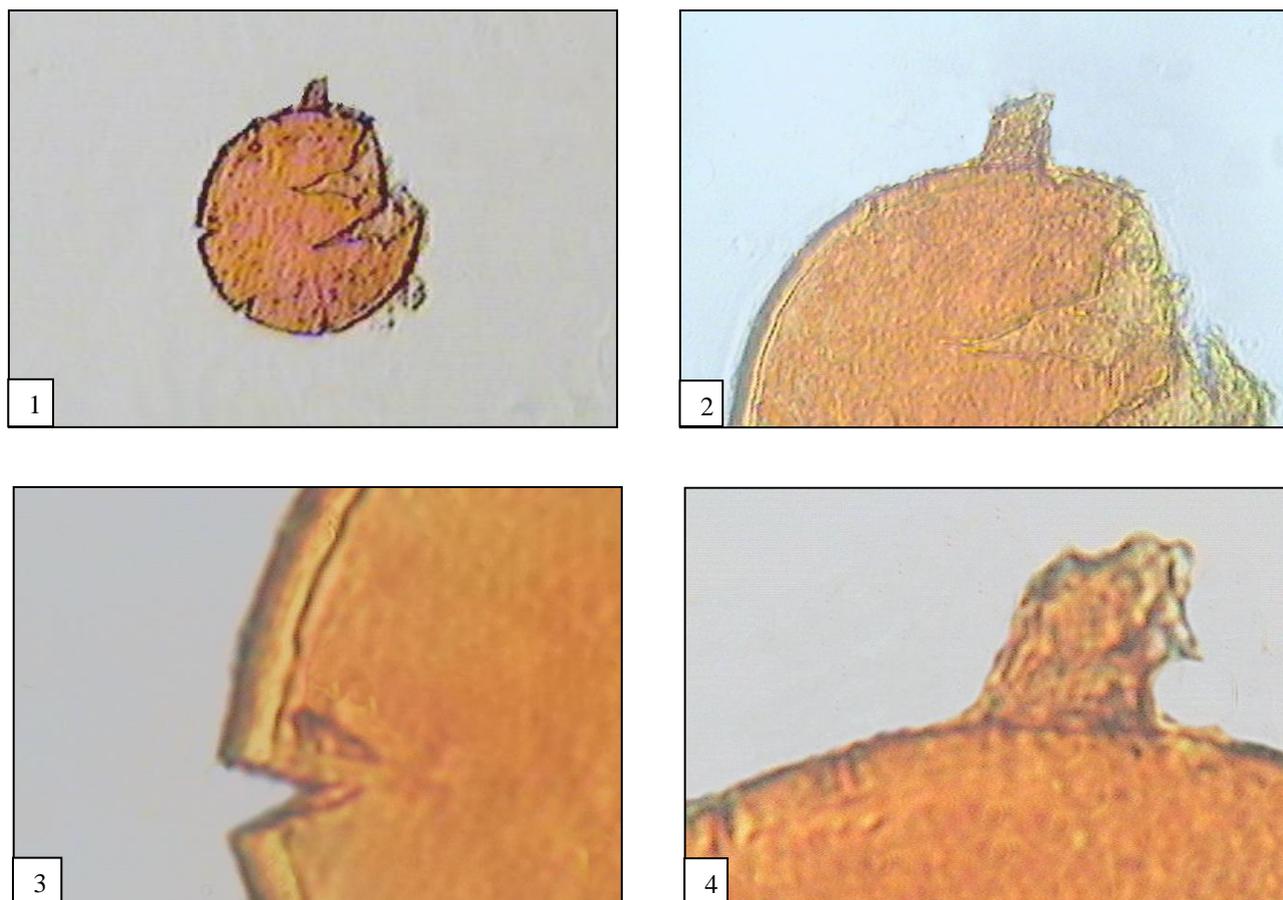
**Autres structures recensées :**

En plus des spores retrouvées au niveau des deux rhizosphères nous avons également retrouvé d'autres structures qui sont : des sporocarpes au niveau des deux rhizosphères de *Alnus glutinosa* et de *Acacia melanoxylon* et des cellules auxiliaires.

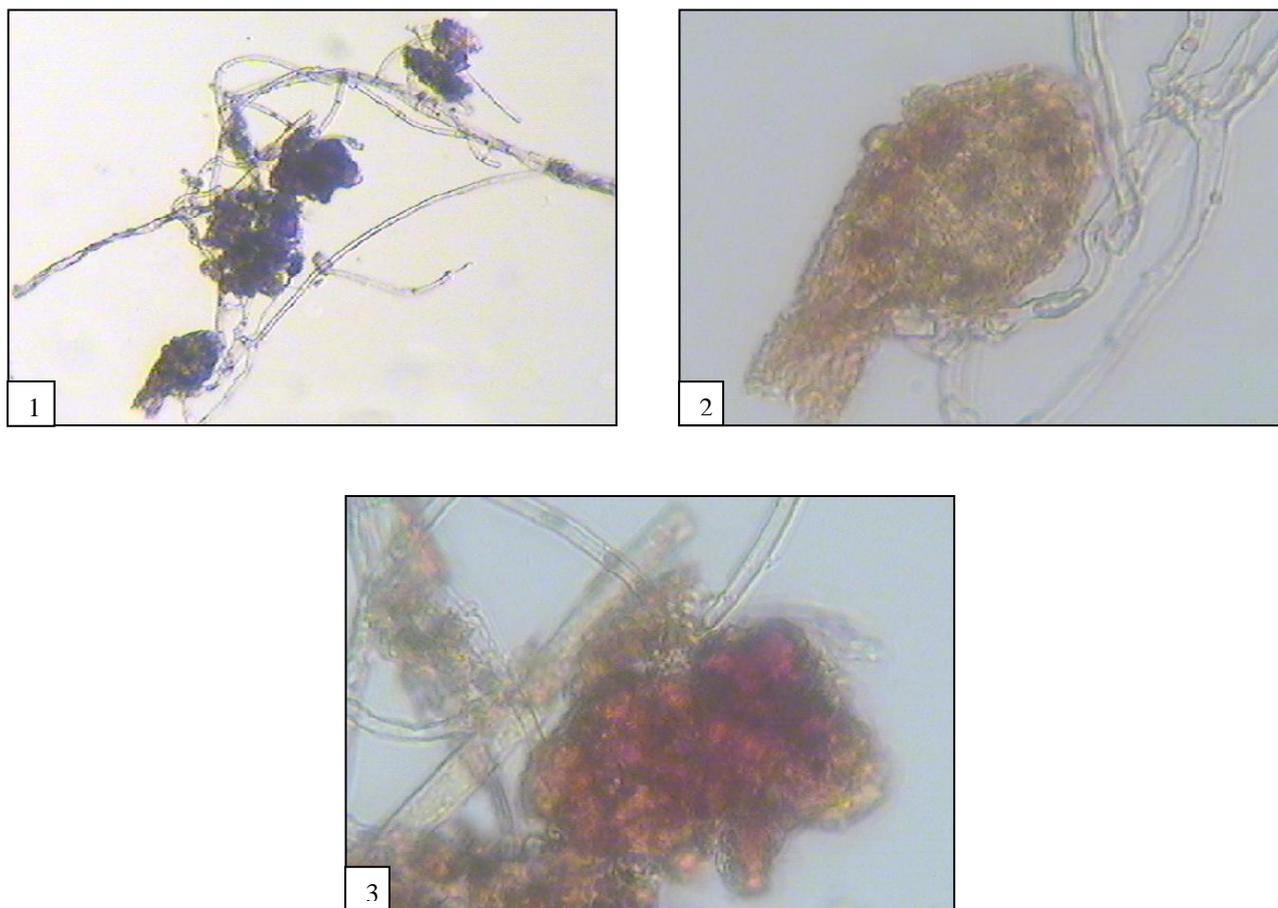
La figure 52 représente des cellules auxiliaires retrouvées au niveau de la rhizosphère de *Alnus glutinosa*. Après consultation du manuel d'identification de SCHENCK et PEREZ (1986), nous estimons qu'il s'agirait de cellules auxiliaires appartenant au genre *Glomus*.

La figure 53 illustre un sporocarpe retrouvé également au niveau de la rhizosphère de *Alnus glutinosa* et qui serait vraisemblablement un sporocarpe portant des spores appartenant au genre *Glomus* (SCHENCK et PEREZ, 1986).

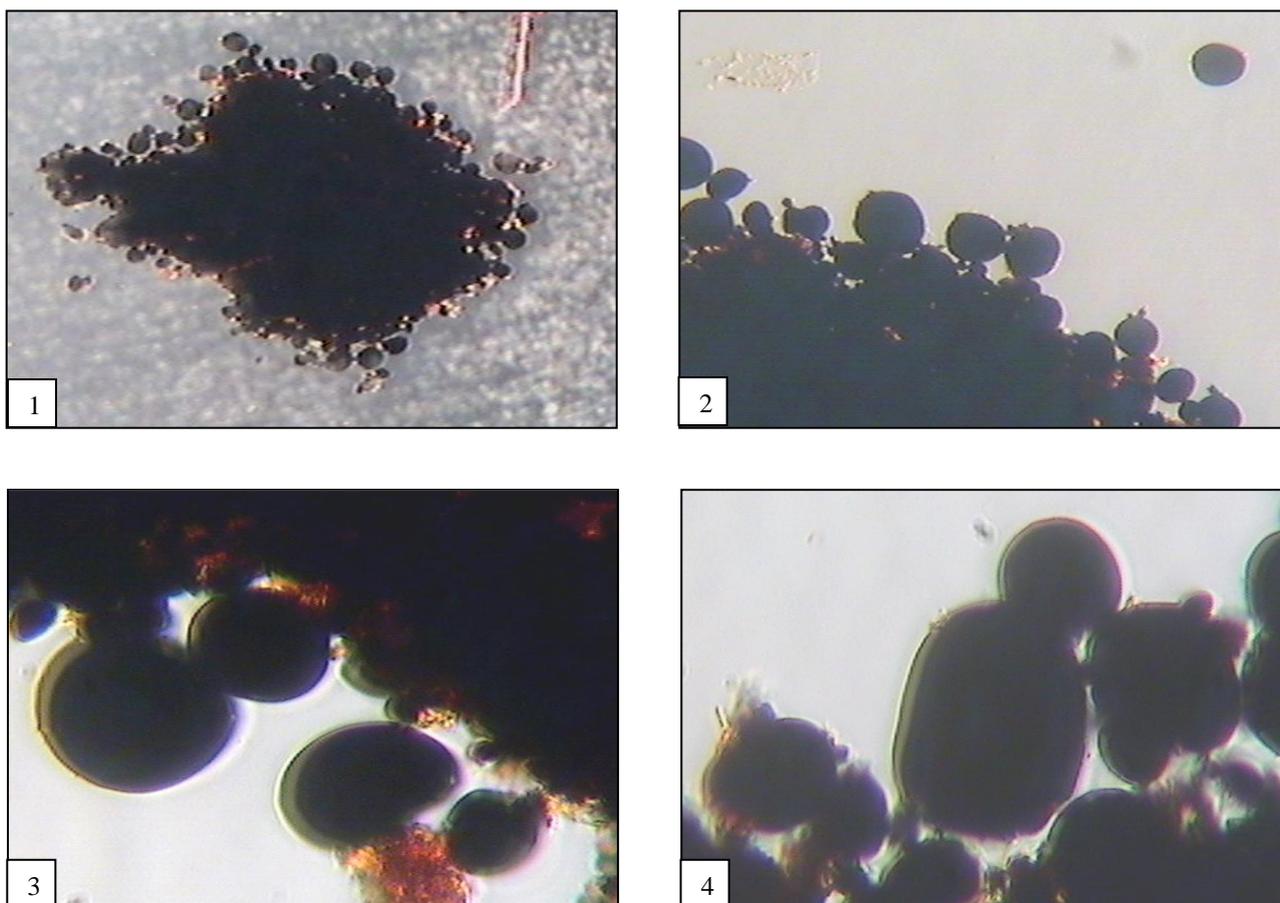
Selon le manuel de SCHENCK et PEREZ, (1986) la structure de la figure 54 serait une cellule auxiliaire appartenant au genre *Gigaspora*, cette dernière a été observée au niveau de la rhizosphère de *Acacia melanoxylon*.



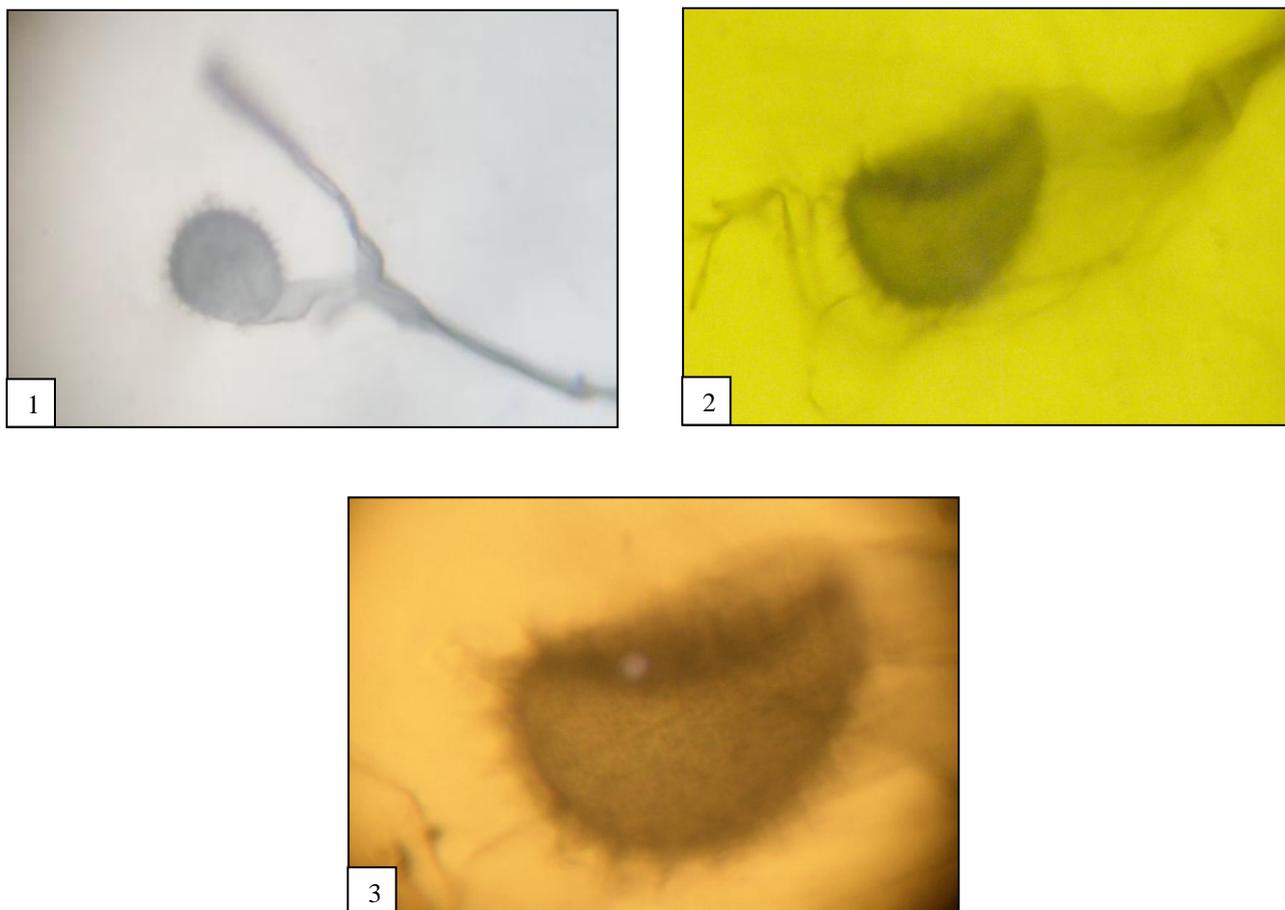
**Figure 51:** Fiche représentative du morphotype ACACIA 5: **1:** spore au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** aspect de la paroi au grossissement ( $\times 400$ ), **4:** hyphe d'attache au grossissement ( $\times 1000$ ).



**Figure 52:** Aspect de cellules auxiliaires appartenant au genre *Glomus*: **1:** au grossissement ( $\times 100$ ), **2 et 3:** au grossissement ( $\times 400$ ) (fraction  $100\mu\text{m}$  de l'aulne).



**Figure 53:** Aspect de sporocarpie retrouvé dans la rhizosphère de *Alnus glutinosa* (genre *Glomus*): **1:** au grossissement ( $\times 30$ ), **2:** au grossissement ( $\times 100$ ), **3 et 4:** au grossissement ( $\times 400$ ).



**Figure 54:** Photos illustrant une cellule auxiliaire de *Gigaspora sp.* retrouvée dans la rhizosphère de *Acacia melanoxylon* : **1:** aspect au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** aspect au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** aspect au grossissement ( $\times 1000$ ).

## VII. Isolement des symbiotes fixateurs d'azote des nodules racinaires d'*Alnus glutinosa* et d'*Acacia melanoxylon*:

### 1. Isolement de l'endophyte *Frankia* :

Les tubes contenant les fragments des actinorhizes d'*Alnus glutinosa* (prélevés axéniquement et mis à incuber dans du Qmod<sub>10</sub>) ont été observés au bout de 48 heures afin d'éliminer ceux qui étaient contaminés.

Les contaminants qui sont apparus dans les tubes étaient de type bactérien et de type fongique; les contaminants fongiques avaient une croissance plus rapide que celle des bactéries.

Les premières colonies sont apparues environ trois semaines après l'incubation dans trois tubes sur une soixantaine de tubesensemencés sous forme d'un voile blanchâtre qui recouvrait les fragments nodulaires.

Afin d'observer les colonies de *Frankia* au microscope optique (au bout de huit semaines d'incubation), le contenu du tube est vidé dans une boîte de pétri axéniquement et les amas de *Frankia* qui se trouvent sur le fragment de nodule sont désagrégés au moyen d'une aiguille stérile. Des gouttes de cette suspension sont prélevés à nouveau à l'aide d'une aiguille stérile et montées entre lames et lamelles.

Les échantillons ont été observés au microscope optique au grossissement 3, 10 et 40 et 100. Des photos ont également été réalisées aux différents grossissements et ceci au moyen d'une caméra (JVC C751 EG) reliée au microscope et au microordinateur par le logiciel « Pic Ed Cora »

D'après les figures (55,56) les colonies de *Frankia* sont toutes transparentes et ont un diamètre qui se situe entre 0.02 et 0.04 mm.

On constate également que les colonies sont transparentes à la périphérie et plus denses au centre.

Nous n'avons pas noté la présence de sporanges ni de vésicules et ceci sur pratiquement l'ensemble des échantillons à l'exception de la colonie 24 (figure 56-3) qui présente des renflements terminaux qui pourraient être vraisemblablement un sporange naissant.

Sur la figure on observe des tâches brunâtres qui sont des pigments extracellulaires.

**Remarque :** Nous n'avons pas tenté d'inoculation avec les isolats obtenus parce que nous n'avons pas réussi à faire germer les graines de l'aulne.

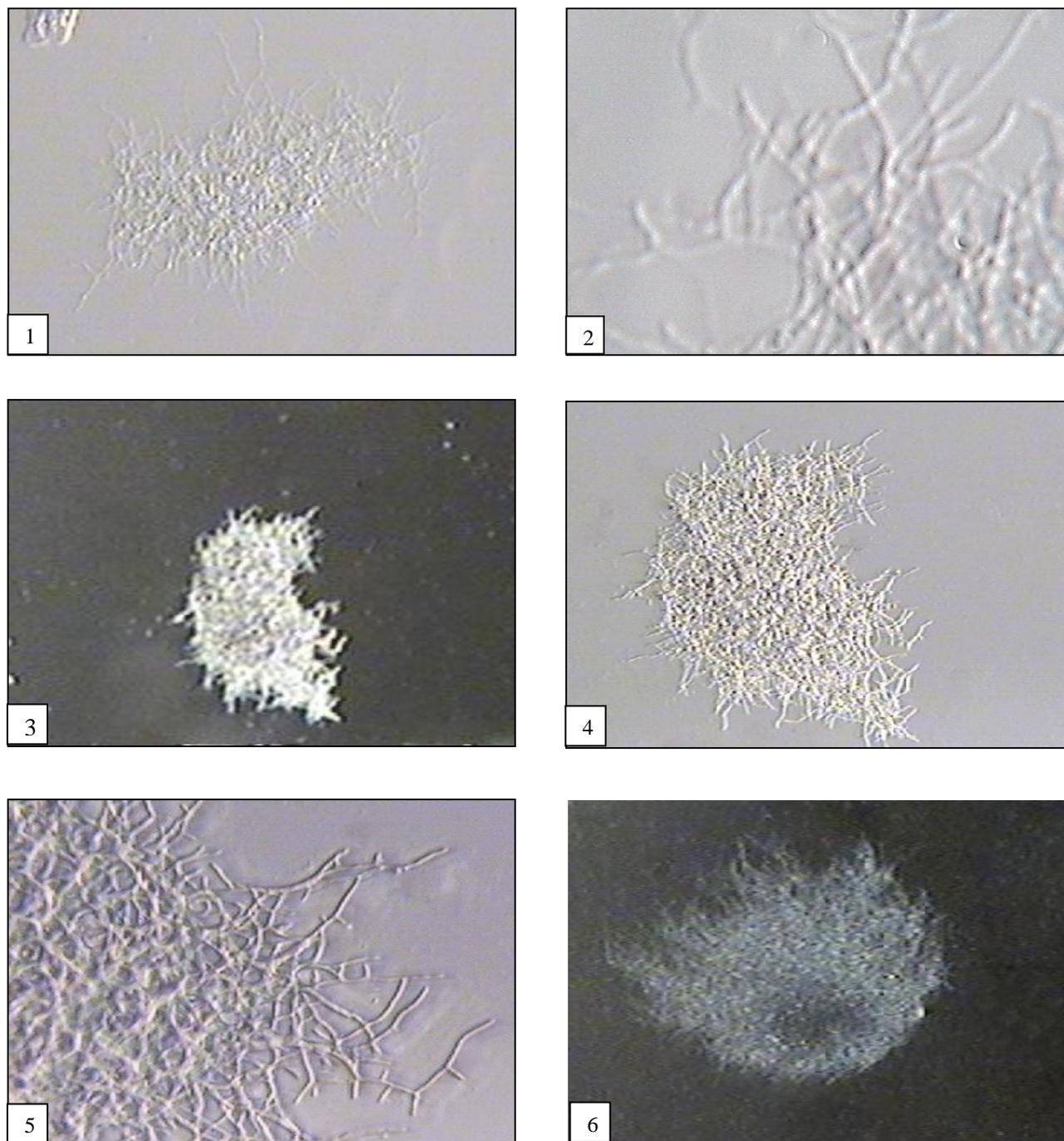
### 2. Isolement et identification de l'endophyte *Rhizobium* :

L'objectif principal ici est d'isoler autant de souches que possible à partir des nodules de *Acacia melanoxylon* et de les identifier par la suite sur le plan morphologique et cultural.

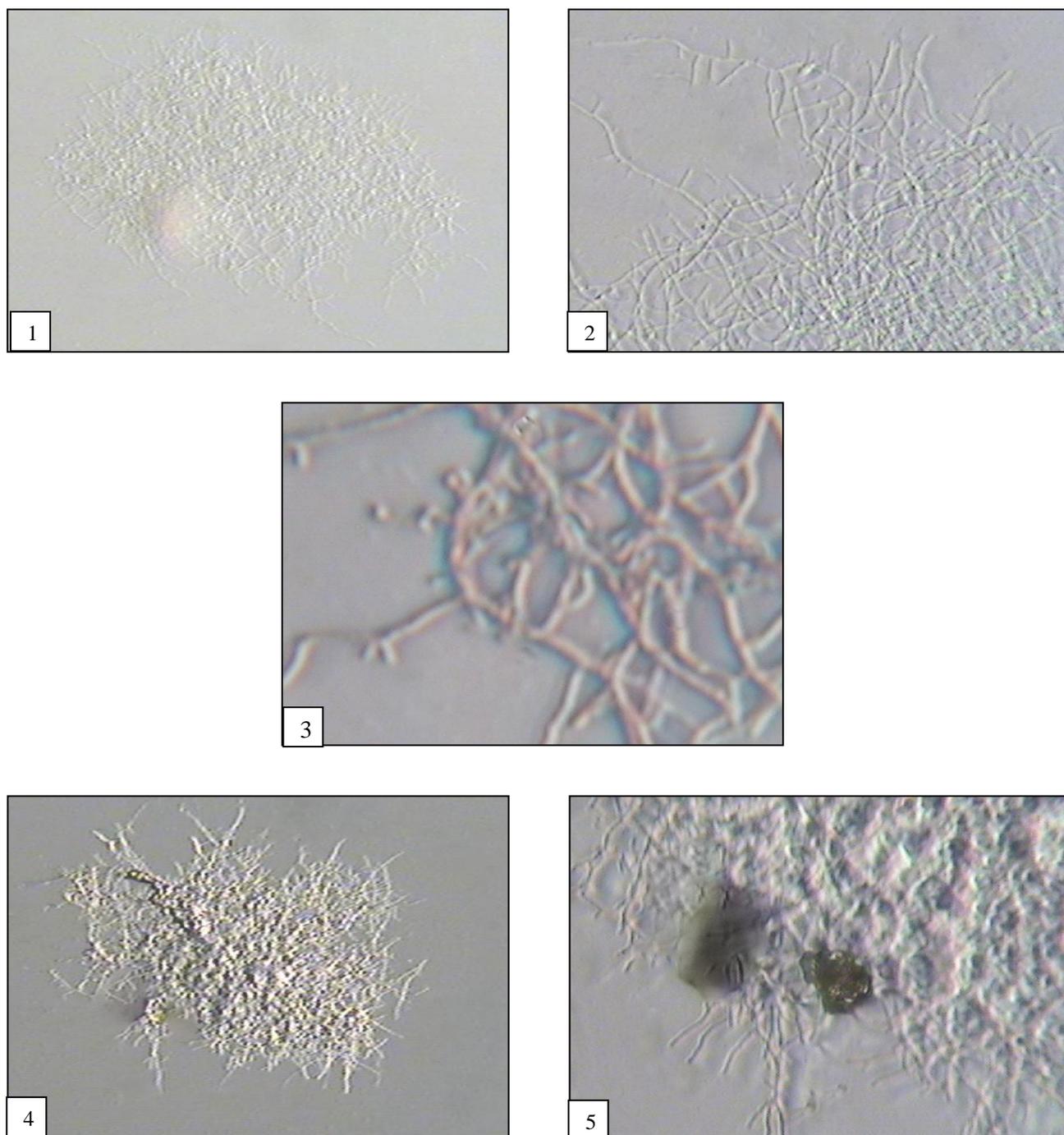
Dans cette étude 15 isolats ont été obtenus à partir des nodules prélevés sur *Acacia melanoxylon* mais seulement deux ont été retenues pour les tests qui suivront.

Ces deux isolats ont été retenus suite au test de nodulation et appelés **Isolat<sub>1</sub> (Is<sub>1</sub>)** et **Isolat<sub>2</sub> (Is<sub>2</sub>)**.

Les méthodes d'identification utilisées sont celles décrites par **VINCENT (1970)**, **BECK et al.,(1993) in TOUIL** et **SOMASEGARAN et HOBEN (1994)**.



**Figure 55 :** Aspect des colonies de *Frankia*: **1:** Colonie C4 au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** Colonie C4 au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** Colonie 7 au grossissement ( $\times 30$ ), **(4):** Colonie 7 au grossissement ( $\times 100$ ), **5:** Colonie 7 au grossissement ( $\times 400$ ), **6:** Colonie 3 au grossissement ( $\times 30$ ).



**Figure 56 :** **1:** Colonie 3 au grossissement ( $\times 100$ ), **2:** Colonie 3 au grossissement ( $\times 400$ ), **3:** Colonie 24 au grossissement ( $\times 100$ ), **4:** Colonie 24 au grossissement ( $\times 400$ ), **5:** Colonie 24 au grossissement ( $\times 1000$ ).

**Remarques :**

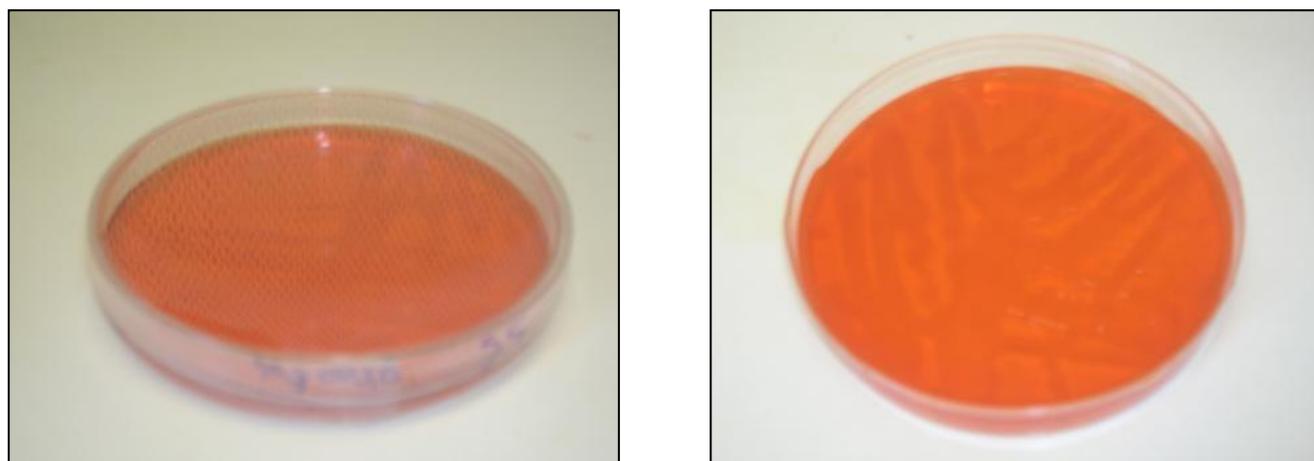
- Tous les tests qui vont suivre auraient du être conduits en utilisant des souches de référence pour plus de fiabilité dans les résultats. Mais, malheureusement celles-ci n'étaient pas disponibles au niveau du laboratoire.

-Trois répétitions ont été effectuées pour chaque paramètre étudié et pour chaque souche.

**2.1. Examen morphologique:**

**2.1.1. Croissance sur le milieu YMA-RC:**

Au bout de 72 heures d'incubation à 28°C les colonies chez les deux isolats étaient de couleur blanchâtre à rosâtre, translucides, luisantes. Les isolats n'ayant pas absorbé et ou/ très peu le colorant ce qui indique qu'on est en présence de *Rhizobium* à croissance rapide (figure 57) (VINCENT, 1970 ; NDOYE, 2002).



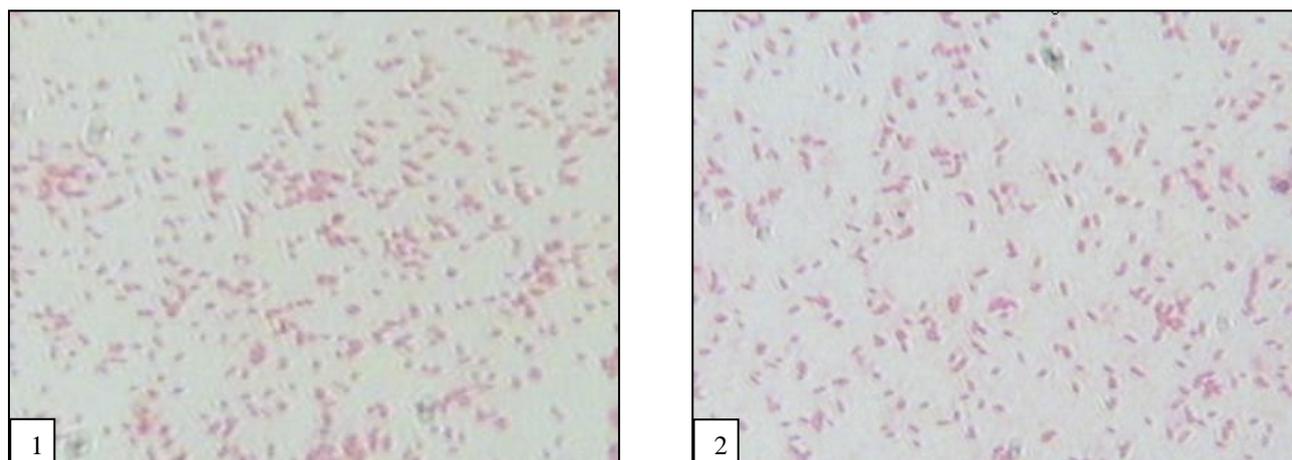
**Figure 57:** Croissance des deux isolats sur le milieu YMA-RC.

**2.1.2. Croissance sur le milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + pourpre de bromocrésol (BCP):**

Au bout de 72 heures d'incubation le milieu garde sa couleur pourpre pour les deux souches. Ceci indique qu'on est en présence de *Rhizobium* et non pas de contaminants, car dans le cas contraire les contaminants auraient provoqué une acidification du milieu qui aurait viré du pourpre au jaune (SOMASAGAN et HOBEN, 1994).

**2.2. Examen microscopique: Détermination des souches selon la méthode de la coloration de Gram:**

La coloration de Gram a révélé des bâtonnets courts à Gram négatif : la couleur des cellules vire du violet au rose (figure 58). Il faut noter que ce test est certainement fondamental dans la classification des *Rhizobium*, mais il reste néanmoins insuffisant pour l'identifier avec certitude car dans la nature un grand nombre d'organismes sont Gram négatif (CLET-MAREL, 1992 in MOKRANI, 2001).



**Figure 58** : Coloration de gram des deux isolats: **1:** Is<sub>1</sub>, **2:** Is<sub>2</sub> (grossissement × 400).

### 2.3. Identification des isolats :

#### 2.3.1. Test distinctif *Agrobacterium Rhizobium* (test du 3-Cétolactose):

La plupart des colonies restent blanchâtres après l'innodation des boîtes avec le réactif de Benedict (annexe) ce qui indique que les deux souches étudiées sont des *Rhizobium* (BERNEARTS et DELEY 1963 in TOUIL, 2008).

Dans le cas de *Agrobacterium* on aurait constaté l'apparition d'un halo jaune de Cu<sub>2</sub>O autour des colonies : seules les souches de *Agrobacterium* produisent l'enzyme 3-Cétoglucosidase responsable de l'apparition de ce halo autour des colonies (KERTSTERS *et al.*, 1973).

#### 2.3.2. Test de nodulation:

Douze isolats ont été testé pour les besoins de ce test et ce respectant soigneusement des règles de stérilisation (se référer au chapitre précédent). En ce qui concerne les résultats du test de nodulation, nous avons constaté la formation de nodules dans les pots qui ont été inoculé avec les isolats Is<sub>1</sub> et Is<sub>2</sub>. On peut donc en déduire que sur les douze souches utilisées seules ces deux dernières sont infectives de *Acacia melanoxylon*.

#### 2.3.3. Caractérisation phénotypiques des isolats:

##### 2.3.3.1. Test de la vitesse de croissance sur milieu YMA+ bleu de bromothymol (BTB):

La vitesse de croissance des deux isolats étudiés est appréciée en cultivant les deux souches sur milieu YMA additionné de bleu de bromothymol (BTB).

Au bout de 72 heures d'incubation à 28°C on constate un changement de couleur du milieu de culture qui vire du bleu au jaune verdâtre (EL-HILALI, 2006). Ce changement de couleur indique une acidification du milieu. Ceci caractérise les bactéries à croissance rapide (JORDAN, 1984).

##### 2.3.3.2. Tests nutritionnels (utilisation de la source de carbone):

Ce test a été réalisé sur un milieu semblable au YMA mais le mannitol y a été remplacé par les sucres suivants : glucose, saccharose, lactose. Le milieu YMA a également été utilisé comme témoin.

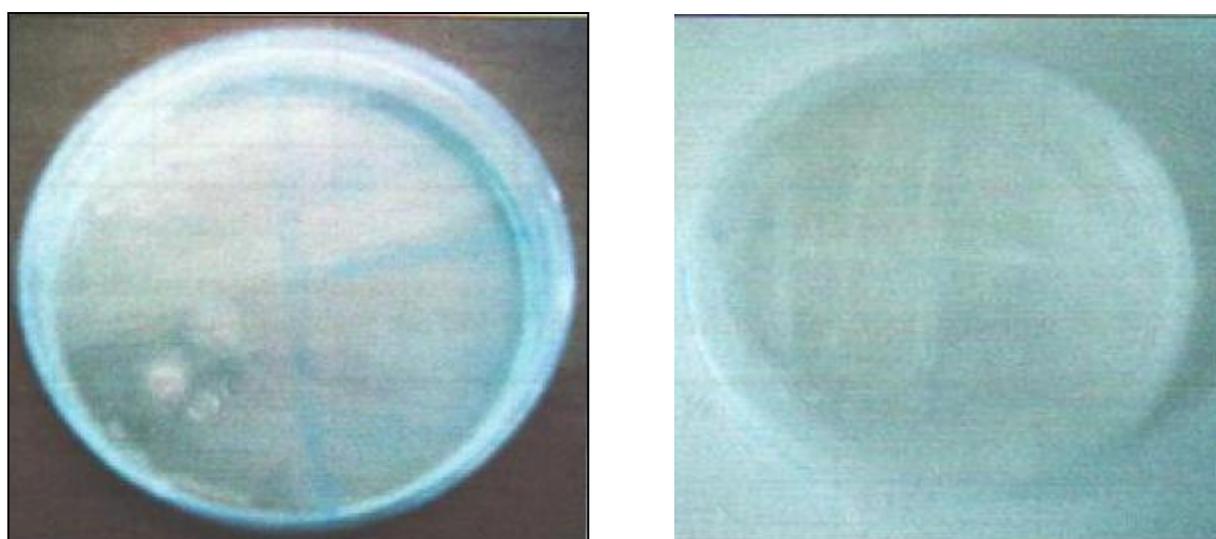
Au bout de 24 heures d'incubation des deux souches à 28°C on a constaté une croissance sur les différents milieux (tableau 14) et qui s'est manifestée par l'apparition de colonies blanchâtres avec de petites zones visqueuses.

Selon **JORDAN (1984)** les *Rhizobium* ont une croissance optimale sur un milieu qui contient des sels minéraux, de l'extrait de levure et l'un des carbohydrates suivants: mannitol, glucose, fructose ou lactose avec une préférence tout de même pour le mannitol.

**Tableau 14:** Culture des isolats sur milieu YMA en présence de différents sucres.

milieux souches	Mannitol	glucose	lactose	saccharose
<b>Is<sub>1</sub></b>	+	+	+	+
<b>Is<sub>2</sub></b>	+	+	+	+

**NB:** Nous n'avons pu tester les sucres; fructose, arabinose, galactose, maltose, raffinose car ils n'étaient pas disponibles au niveau du laboratoire.



**Figure 59 :** Croissance des deux isolats (Is<sub>1</sub> et Is<sub>2</sub>) en présence de mannitol.

### 2.3.3.3. Tests physiologiques :

#### a. Test de la tolérance au NaCl :

Le stress salin figure parmi les facteurs majeurs pouvant affecter l'équilibre du processus de la fixation de l'azote. Une teneur élevée en sel peut entre autre influencer le développement des nodules (**DELGADO et al. 1993 in TEJERA et al., 2005**): elle peut causer la production en excès de certaines molécules (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH, O<sub>2</sub>) qui à forte dose deviennent toxiques et accélèrent la senescence des nodules.

D'après le tableau 15 on peut constater que l'isolat S4 est capable de se développer en présence de concentrations de NaCl qui se situent 0.5 et 5%, mais ne se développe pas néanmoins à la concentration 10%.

Le développement de l'isolat **Is<sub>1</sub>** en présence de fortes concentrations de NaCl peut s'expliquer par le fait que les *Rhizobium* sont capables de développer des mécanismes de résistance qui leur permettent de surmonter l'effet du stress salin : on peut citer à titre d'exemple la production d'enzymes tels que les superoxide-dismutase, les catalases et peroxidases (**TEJERA et al., 2005**) qui ont pour rôle de dégrader les molécules de O<sub>2</sub>, OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui peuvent être toxiques quand elles sont produites en excès.

L'intervalle d'osmotolérance de l'isolat **Is<sub>2</sub>** est plus restreint que celui de **Is<sub>1</sub>**, il se situe entre 0.5 et 3% de NaCl. On peut en déduire que cet isolat est moins adapté au stress salin que l'isolat S4.

Il faut aussi noter que les *Rhizobium* qui sont en symbiose avec les légumineuses sont plus sensibles au stress salin que ceux vivant à l'état libre. Par conséquent, les souches rhizobiennes se révélant halotolérantes *in vitro* peuvent s'avérer ineffectives sur terrain (CEPEDA HERNANDEZ, 2005).

**Tableau 15:** Culture des isolats sur milieu YMB en présence de différentes concentrations de NaCl.

NaCl \ Souches	0.5%	1%	2%	3 %	5 %	10 %
<b>Is<sub>1</sub></b>	+	+	+	+	+ -	-
<b>Is<sub>2</sub></b>	+	+	+	+	-	-

• **Mesure de la densité optique :**

**Tableau 16 :** Densité optique des isolats en présence de différentes concentrations de NaCl.

NaCl \ Souches	0.5%	1%	2%	3 %	5 %	10 %
<b>Is<sub>1</sub></b>	0.209	0.191	0.265	0.224	0.114	0.105
<b>Is<sub>2</sub></b>	0.204	0.200	0.240	0.233	0.118	0.120

**b. Test de croissance à différents pH :**

D'après le tableau 17 on constate que les deux isolats sont capables de se développer entre le pH 4.5 et 8.8. On constate également que la croissance est inhibée au pH 4 et au pH 9.8.

Les résultats obtenus concordent avec la littérature : d'après **JORDAN (1984)**, les souches de *Rhizobium* sont capables de croître dans un intervalle de pH situé entre 4.5 et 9.5.

Selon (**WATKIN et al., 1997**) la croissance des *Rhizobium* est fortement affectée par un pH bas (acide), néanmoins beaucoup d'espèces de *Rhizobium* ont été recensés dans des régions dites « à stress acide »(acid stress zone). En effet ces espèces sont parvenues à développer un mécanisme d'adaptation à cette contrainte et certains des gènes responsables de ce processus ont même été identifiés par **GLENN** et ses collaborateurs en (**1999**).

**Tableau 17 :** Croissance des deux isolats à différents pH.

pH \ souches	4	4.5	5	5.5	5.8	6.8	7.8	8.8	9.8
<b>Is<sub>1</sub></b>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Is<sub>2</sub></b>	-	+	+	+	+	+	+	+	-

**c. Effet de la température**

D'après le tableau 18 on constate que la croissance des deux souches est inhibée aux températures 4, 45 et 50°C. Les deux isolats sont viables entre 25°C 37°C : la croissance des deux isolats est optimale à 25°C, mais elle est moins importante à 37°C.

Cependant, la croissance des souches à 37°C ne signifie pas forcément qu'elles sont efficaces (CEPEDA HERNANDEZ, 2005). Selon SCHOMBERG et WEAVER, 1992 in WEAVER et GRAHAM, 1994 Les hautes températures du sol peuvent partiellement inhiber le processus de nodulation et les nodules qui se forment dans de telles conditions se révèlent pour la plupart inefficaces.

**Tableau 18:** Effet de la température sur les deux isolats.

souches \ T°	4°	25°	°37	45°	50°
<b>Is<sub>1</sub></b>	-	+	+-	-	-
<b>Is<sub>2</sub></b>	-	+	+-	-	-

## Conclusion et perspectives

Dans notre travail nous nous sommes proposés d'étudier les formes de symbioses suivantes : endomycorhizienne à arbuscules (AM), ectomycorhizienne, actinorhizienne et rhizobienne chez *Alnus Glutinosa* (Gaertn.) et *Acacia melanoxyton* (L.) dans la station du lac Tonga (Nord-Est Algérien). Les objectifs que nous nous étions fixés se résument comme suit :

- Estimation de la colonisation par les champignons endomycorhiziens chez *Alnus Glutinosa* (Gaertn.) et *Acacia melanoxyton* (L.)
- Prospection des spores fongiques au niveau de la rhizosphère deux espèces étudiées.
- Description de quelques morphotypes d'ectomycorhizes de l'aulne glutineux.
- Etude du le potentiel mycorhizogène du sol de la station d'étude pour les deux espèces.
- Isolement du phytosymbiote *Frankia* chez *Alnus glutinosa* et étude de l'effet de l'inoculation par les souches isolées sur des plants d'*Alnus glutinosa*.
- Isolement et caractérisation de la bactérie *Rhizobium* symbiotique de l'*Acacia melanoxyton*.

Les résultats obtenus quant à la colonisation par les champignons endomycorhiziens révèlent un système racinaire faiblement colonisé (20% en moyenne) pour *Alnus Glutinosa* (Gaertn.) et *Acacia melanoxyton* (L.). Ces valeurs traduisent néanmoins une dépendance vis-à-vis des mycorhizes et confirment la conclusion formulée par (TRAPPE, 1977) selon laquelle l'état mycorhizien est un état général dans le monde végétal.

Les valeurs relevées durant le printemps 2008 ont été exceptionnellement élevées (76.47% et 64.44% respectivement) en comparaison avec le printemps précédent, car les conditions météorologiques correspondaient plus aux normes saisonnières. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de (MOSSE, 1973; KHELFAINE-GOUCHEM, 2000. in BEDDIAR 2003) qui imputent ce phénomène à la reprise de l'activité végétale et l'intensification de l'activité photosynthétique.

Les teneurs arbusculaires relevées pour les deux espèces ont augmenté progressivement d'une saison à une autre (les valeurs les plus faibles étant enregistrées durant l'hiver et les plus importantes au printemps), mais demeurent néanmoins faibles pour les deux espèces tout au long de la période d'étude. Il faut signaler que ce paramètre a été très probablement sous-estimé puisque les arbuscules sont des structures fragiles et éphémères et donc difficiles à observer.

La recherche des spores fongiques nous a permis de mettre en évidence une biodiversité considérable pour les deux espèces étudiées. Les champignons endomycorhiziens à arbuscules appartiennent aux genres : *Glomus*, *Acaulospora* et *Gigaspora*, avec une prédominance du genre *Glomus*.

L'évaluation du potentiel mycorhizogène par la méthode de calcul du nombre le plus probable (MPN) a révélé un potentiel endomycorhizogène de 556 propagules/ kg de sol au niveau de la rhizosphère de *Alnus glutinosa*. Ce résultat est considéré comme moyen puisqu'il est inférieur à 1000 propagules/kg de sol (CHAABNA, 2006). Nous pensons que ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la station soit souvent inondée, le développement et la dissémination des spores se trouvent par conséquent inhibés. Il faut aussi noter qu'en plus de la symbiose endomycorhizienne, l'aulne peut également entrer en symbiose avec des champignons ectomycorhiziens, il y a par conséquent une compétition qui s'opère entre les

champignons endo- et ectomycorhiziens pour la colonisation du système racinaire. Le potentiel mycorhizogène obtenu quant à *Acacia melanoxylon* a été estimé à 1300 propagules/ kg de sol. La différence notée entre les deux espèces est probablement due au fait que l'acacia est situé majoritairement à la périphérie de l'aulnaie ; le sol y est moins imbibé d'eau et donc mieux aéré et favorable à la propagation des spores.

Pour ce qui est des ectomycorhizes, cinq morphotypes ont été décrits et identifiés. Mais il faut signaler que la définition que nous avons présentée manque de fiabilité car la qualité des photographies et des coupes histologiques ne nous a pas permis de relever toutes les caractéristiques nécessaires à l'identification. Il faudrait donc, d'une part, faire appel à des techniques plus récentes et plus particulièrement pour la réalisation des coupes histologiques et d'autre part, établir l'inventaire fongique sous l'aulne glutineux car celui-ci permettrait de faire des comparaisons avec l'observation microscopique et contribuerait à l'identification préalable des espèces responsables des ectomycorhizes.

Concernant le phytosymbiote *Frankia* cinq souches ont été isolées et conservées. Nous devons procéder par la suite à une inoculation de plants d'*Alnus gutinosa*, mais malencontreusement les graines prégermées ne survivaient pas une fois repiquées en pots.

Les premiers tests de caractérisation des deux souches de *Rhizobium* (infectives de l'*Acacia melanoxylon*) ont été conduits en l'absence de souches de référence car celles-ci n'étaient pas disponibles au niveau du laboratoire. De plus, par manque de produits tous les tests d'identification n'ont pas pu être effectués et nous avons été contraints de nous arrêter au rang genre. Les résultats auxquels nous sommes parvenus nous permettent toutefois de dire qu'on est vraisemblablement en présence de deux souches de *Rhizobium* à croissance rapide.

Sur le plan écologique, il est important de signaler que l'*Acacia melanoxylon* s'est très bien acclimatée au milieu dans lequel il a été introduit et qu'il est en train de se développer et de proliférer au dépend d'autres espèces endémiques de la région. De plus, la quantité d'azote moléculaire fixé par le biais de la symbiose rhizobienne est quasi insignifiante (< 1kg/ha/an) (DOMMERGUES *et al.*, 1999). Par conséquent, les intérêts économiques et écologiques de cette espèce sont discutables. Il faudrait donc mettre en place des dispositifs afin de freiner sa prolifération en valorisant les espèces qui poussent spontanément dans la région comme l'aulne glutineux. En effet, Cette espèce est non seulement capable de fixer l'azote moléculaire grâce à la symbiose actinorhizienne, mais elle approvisionne aussi la litière en biomasse riche en azote lors de la chute des feuilles. D'autre part, cet arbre peut être employé dans la recolonisation des sites perturbés (MIDGLEY *et al.*, 1983 *in* FRAGA-BEDDIAR, 2002) et constitue également une source d'énergie et de bois d'œuvre (GARDNER, 1986). Malheureusement, cette espèce est menacée par l'activité humaine (surpâturage, exploitation anarchique du bois, mise en culture des terres sur lesquelles pousse l'aulne, etc.), il devient donc urgent de la valoriser afin de la sauvegarder.

A la lumière de ce qui a été évoqué, plusieurs perspectives sont envisageables. En effet, nos futurs travaux de recherche pourraient être orientés vers les points suivants:

- Une étude plus approfondie concernant les spores endomycorhiziennes afin de déterminer l'espèce car les moyens dont nous disposons nous ont juste permis de déterminer le genre.
- Une étude plus poussée s'avère nécessaire pour identifier les espèces de *Rhizobium* entrant en symbiose avec *Acacia melanoxylon*.

- Tenter une inoculation des plants d' *Alnus glutinosa* *in vitro* permettrait d'obtenir des nodules moins contaminés que ceux prélevés dans le sol naturel, et donc au final moins de contaminants lors de l'isolement.
- La partie qui a traitée des ectomycorhizes offre également beaucoup de perspectives et mérite d'être poursuivie sur plusieurs plans. On pourrait citer à titre d'exemple :
  - La récolte et l'identification des carpophores des champignons ectomycorhiziens.
  - L'estimation de l'infection ectomycorhizienne
  - L'amélioration des coupes histologiques en faisant appel à des techniques et à des moyens plus récents.

## Annexes

### Annexe 1 : Grille d'évaluation de l'infection AM.

	0	1				2				3				4				5				
		A <sub>3</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>0</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>0</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>0</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>0</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>0</sub>	
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						
6																						
7																						
8																						
9																						
10																						
11																						
12																						
13																						
14																						
15																						
16																						
17																						
18																						
19																						
20																						
21																						
22																						
23																						
24																						
25																						
26																						
27																						
28																						
29																						
30																						
Tot																						

### Annexe 2 : Composition du FAA

Formol                    5 V

Acide acétique        5V

Alcool                    90V

### Annexe 3: Composition du bleu coton (site 25)

Dissolution de 0.1 g de bleu Coton C. 4B dans 100 ml d'acide lactique pur.

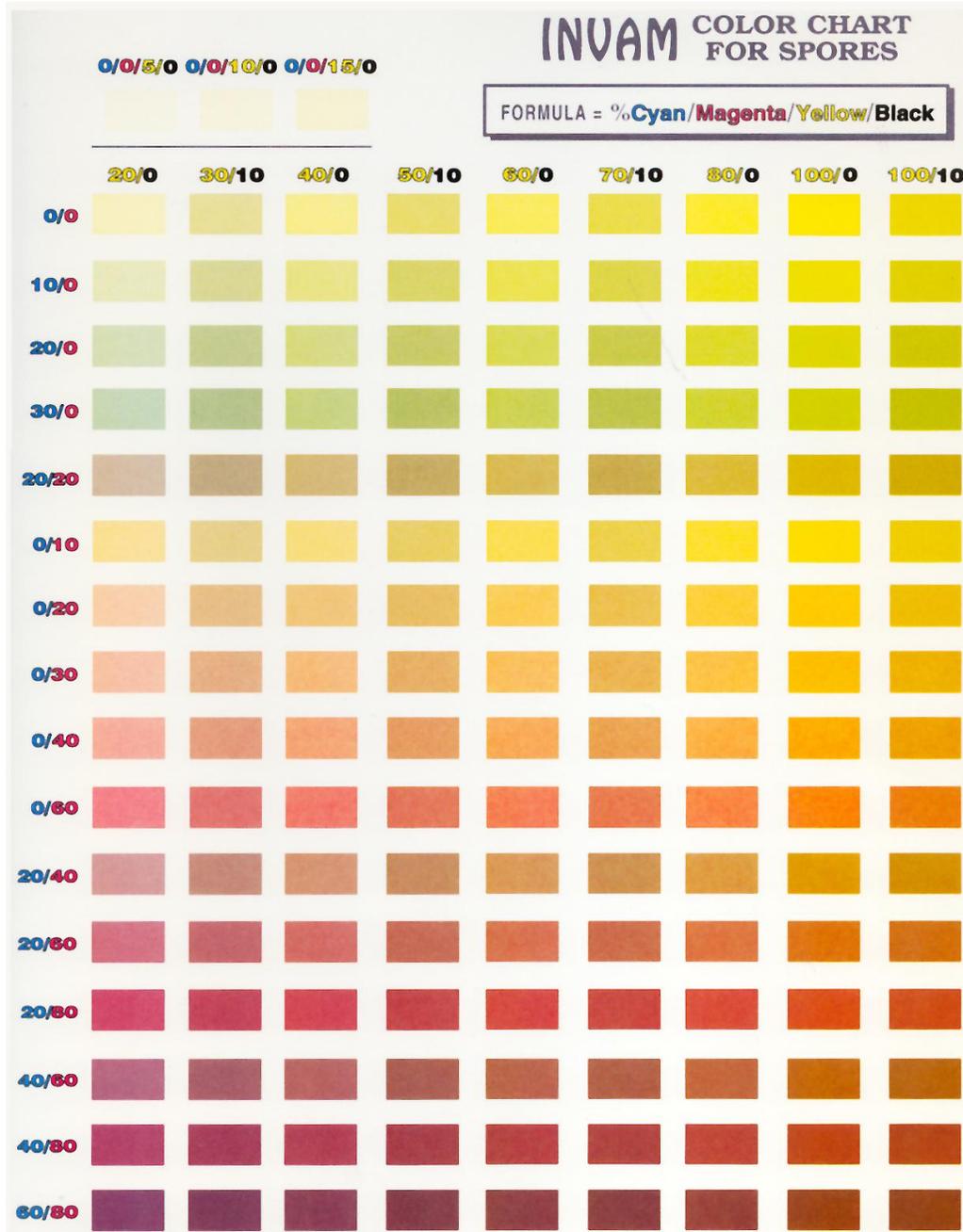
**Annexe 4 :** Tables d'Alexander (1965) et méthode de calcul du nombre le plus probable de propagules de champignons mycorrhizogènes dans le sol

P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	Most probable number for indicated values of P <sub>3</sub>					
		0	1	2	3	4	5
0	0	-	0,019	0,036	0,054	0,072	0,09
0	1	0,019	0,036	0,055	0,073	0,091	0,11
0	2	0,037	0,055	0,074	0,092	0,11	0,1
0	3	0,056	0,074	0,093	0,11	0,13	0,15
0	4	0,075	0,094	0,11	0,13	0,15	0,17
0	5	0,094	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19
1	0	0,02	0,04	0,06	0,09	0,1	0,12
1	1	0,04	0,061	0,081	0,1	0,12	0,14
1	2	0,061	0,082	0,1	0,12	0,15	0,17
1	3	0,093	0,1	0,13	0,15	0,17	0,19
1	4	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19	0,22
1	5	0,13	0,15	0,17	0,19	0,22	0,24
2	0	0,045	0,068	0,091	0,12	0,14	0,16
2	1	0,068	0,092	0,12	0,14	0,17	0,19
2	2	0,093	0,12	0,14	0,17	0,19	0,22
2	3	0,12	0,14	0,17	0,2	0,22	0,25
2	4	0,15	0,17	0,2	0,23	0,25	0,29
2	5	0,17	0,2	0,23	0,26	0,29	0,32
3	0	0,078	0,11	0,13	0,16	0,2	0,23
3	1	0,11	0,14	0,17	0,2	0,23	0,27
3	2	0,14	0,17	0,2	0,24	0,27	0,31
3	3	0,17	0,21	0,24	0,28	0,31	0,35
3	4	0,21	0,24	0,28	0,32	0,36	0,4
3	5	0,25	0,29	0,32	0,37	0,41	0,45
4	0	0,13	0,17	0,21	0,25	0,3	0,36
4	1	0,17	0,21	0,26	0,31	0,36	0,42
4	2	0,22	0,26	0,32	0,38	0,44	0,5
4	3	0,27	0,33	0,39	0,45	0,52	0,59
4	4	0,34	0,4	0,47	0,54	0,62	0,69
4	5	0,41	0,48	0,56	0,64	0,72	0,81
5	0	0,23	0,31	0,43	0,58	0,76	0,95
5	1	0,33	0,46	0,64	0,84	1,1	1,3
5	2	0,49	0,7	0,95	1,2	1,5	1,8
5	3	0,79	1,1	1,4	1,8	2,1	2,5
5	4	1,3	1,7	2,2	2,8	3,5	4,3
5	5	2,4	3,5	5,4	9,2	1,6	-

**Annexe 5:** Composition du Melzer

Acide chlorhydrique	5 g
Iode	1.5g
Iodure de potassium	100 ml
Eau distillée	100g

**Annexe 6:** Charte de la couleur des spores INVAM (site 23) :



**Annexe 7 : Composition de la solution PBS + PVP.**

NaCl	0.8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O	1.52 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
PVP	1 g
Eau distillée	1000 ml

**Annexe 8 : Composition du milieu Qmod<sub>10</sub>: (LALONDE et CALVERT, 1979 in DOMMERGUES *et al.*, 1999).**

Composants	Concentration (g/l d'eau déminéralisée)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.2
KCl	0.2
Extrait de levure	0.5
Peptone	5.0
Glucose	10.0
Solution de L- $\alpha$ -lécithine de soja*	1ml
Solution d'oligoéléments**	1ml

Le milieu est ajusté à pH6.8-7

L- $\alpha$ -lécithine de soja (sigma) à 22% de phosphatidyl choline : dissoudre 500mg dans 50 ml d'éthanol absolu et ajouter 5ml d'eau déminéralisée.

Solution d'oligoéléments (/l) : H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.5; MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.8 ; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.6; CuSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.1; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0.2 ; CoSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.0

## **Annexe 9:**

### **1. Yeast Mannitol Agar (Y.M.A) g/l (VINCENT 1970):**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
Na Cl	0.1
Mannitol	10
Extrait de levure	0.4
Agar	15
Eau distillé	1000ml

### **2. Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo:**

Avant de stériliser le milieu on rajoute 10 ml d'une solution aqueuse de Rouge Congo à 0,25 %.

### **3. Glucose – Peptone – Agar (G.P. A) g/l (VINCENT 1970):**

Glucose	10
Peptone	5
Agar	15

Rajouter au milieu 10 ml d'une solution de Pourpre de Bromocrésol à 1% dans l'éthanol.

### **4. Yeast Mannitol Broth (Y.M.B) g/l (Vincent 1970):**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
Na Cl	0.1
Extrait de levure	0.4
PH	6.9

### **5. Milieu glucosé (VINCENT 1970):**

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

### **6. Milieu lactosé (VINCENT 1970):**

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

### **7. Réactif de Benedict (VINCENT 1970):**

Citrate de Sodium	173 g
Carbonate de Sodium	100g
anhydre	
Cu SO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	17.3 g
Eau distillée	100ml

**Annexe 10 :**

**1. Tableau représentant les résultats relatifs aux paramètres de la colonisation endomycorhizienne étudiés, les moyennes et les écart-types pour *Alnus glutinosa* :**

saisons		Hiver	Printemps	Eté	Automne	Printemps
paramètres		2007	2007	2007	2007	2008
F%	Al1	18.89	45.56	35.56	35.56	84.44
	Al2	22.22	46.67	34.44	28.89	84.62
	Al3	24.44	40.00	24.44	33.33	84.44
	Al4	17.78	32.22	35.56	35.56	64.44
	Al5	16.67	33.33	32.22	34.44	64.44
	moy	20	39.556	32.444	33.556	76.476
	Sx	3.236	6.697	4.677	2.767	10.987
M%	Al1	1.10	10.26	4.02	3.00	49.29
	Al2	0.67	4.84	2.30	2.16	45.77
	Al3	0.69	5.04	3.18	4.89	44.83
	Al4	0.77	3.71	1.91	4.28	30.28
	Al5	0.48	4.86	3.71	5.32	35.13
	moy	0.742	5.742	3.024	3.93	41.06
	sx	0.226	2.580	0.901	1.320	7.99
m%	Al1	5.82	22.51	11.31	8.44	58.37
	Al2	3.00	10.38	6.68	7.46	54.09
	Al3	2.82	12.61	13.00	14.67	53.09
	Al4	4.31	11.52	5.38	12.03	46.98
	Al5	2.87	14.57	11.52	15.45	54.52
	moy	3.764	14.318	9.578	11.61	53.41
	Sx	1.303	4.832	3.335	3.590	4.115
a%	Al1	1.31	3.97	11.66	23.07	37.27
	Al2	2.33	7.25	5.31	9.18	22.97
	Al3	2.74	4.16	1.43	4.36	14.24
	Al4	2.46	6.95	19.59	3.48	16.92
	Al5	4.65	9.95	6.95	2.28	11.05
	moy	2.698	6.456	8.988	8.474	20.49
	Sx	1.217	2.476	6.970	8.569	10.351
A%	Al1	0.01	0.41	0.47	0.69	18.37
	Al2	0.02	0.35	0.12	0.20	10.51
	Al3	0.02	0.21	0.05	0.21	6.38
	Al4	0.02	0.26	0.37	0.15	5.12
	Al5	0.02	0.48	0.26	0.12	3.88
	moy	0.018	0.342	0.254	0.274	8.852
	Sx	0.004	0.109	0.173	0.235	5.875

**2. Tableau représentant les résultats relatifs aux paramètres de de la colonisation endomycorhizienne étudiés, les moyennes et les écart-types pour *Acacia melanoxylon* :**

saisons		Hiver 2007	Printemps 2007	Eté 2007	Automne 2007	Printemps 2008
paramètres						
F%	Ac1	13.48	26.67	31.11	41.11	64.44
	Ac2	14.44	20.00	33.33	33.33	67.78
	Ac3	0.00	25.56	36.67	35.56	78.89
	Ac4	16.28	31.11	25.56	37.78	50.00
	Ac5	10	21.11	32.22	33.33	41.11
	moy	10.84	24.89	31.778	36.222	60.444
	Sx	6.475	4.486	4.051	3.297	14.940
M%	Ac 1	0.13	1.63	1.78	3.72	7.36
	Ac2	0.28	0.92	1.23	1.00	16.23
	Ac3	0.00	0.74	2.56	2.53	15.26
	Ac4	0.16	1.36	0.70	2.93	9.17
	Ac5	0.14	0.52	1.54	1.23	6.3
	moy	0.142	1.034	1.562	2.282	10.864
	Sx	0.099	0.454	0.688	1.151	4.585
m%	Ac 1	1.00	6.13	5.71	9.05	11.41
	Ac 2	1.92	4.61	3.70	3.00	23.95
	Ac 3	0.00	2.91	6.97	7.13	19.34
	Ac 4	1.00	4.36	2.74	7.76	18.33
	Ac 5	1.44	2.47	4.79	4.36	9.03
	moy	1.072	4.096	4.782	6.26	16.412
	Sx	0.709	1.459	1.657	2.501	6.094
a%	Ac 1	1.67	0.34	1.13	2.48	5.05
	Ac 2	0.8	0.24	2.16	2.44	7.64
	Ac 3	0.00	2.69	1.26	4.17	8.01
	Ac 4	2.14	6.3	1.59	17.99	3.12
	Ac 5	1.54	2.55	1.08	2.16	2.45
	moy	1.23	2.424	1.444	5.848	5.254
	Sx	0.838	2.460	0.446	6.833	2.537
A%	Ac 1	0.00	0.01	0.02	0.09	0.37
	Ac 2	0.00	0.00	0.03	0.02	2.24
	Ac 3	0.00	0.02	0.03	0.11	1.22
	Ac	0.00	0.08	0.01	0.53	0.29
	Ac	0.00	0.01	0.02	0.01	0.11
	moy	0.00	0.024	0.022	0.152	0.846
	S x	0.00	0.032	0.008	0.215	0.888

### 3. Résultats de l'analyse de la variance pour les paramètres de la colonisation :

**Tableau 1:** F% *Alnus glutinosa*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>		
					5%	1%	0.1%
Factorielle	4	9142,440	380,935	11,116***	5%	1%	0.1%
Résiduelle	20	822,3846	34,266		2,605	3,86	0,57
Totale	24	9964,825	-				

**Tableau 2:** M% *Alnus glutinosa*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>		
					5%	1%	0.1%
Factorielle	4	5750,139	239,589	19,654***	5%	1%	0.1%
Résiduelle	20	292,560	12,190		2,605	3,86	0,57
Totale	24	6042,699	-				

**Tableau 3:** m% *Alnus glutinosa*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>		
					5%	1%	0.1%
Factorielle	4	7902,073	329,253	29,928***	5%	1%	0.1%
Résiduelle	20	264,028	11,001		2,605	3,86	0,57
Totale	24	8166,102	-				

**Tableau 4:** a% *Alnus glutinosa*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>
					5%
Factorielle	4	887,985	36,999	0,937	5%
Résiduelle	20	947,223	39,467		2,605
Totale	24	1835,208	-	F <sub>obs</sub> < F <sub>1-α</sub>	

**Tableau 5:** A% *Alnus glutinosa*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>
					5%
Factorielle	4	298,206	12,425	2,153	5%
Résiduelle	20	138,490	5,770		2,605
Totale	24	436,696	-	F <sub>obs</sub> < F <sub>1-α</sub>	

**Tableau 6:** F% *Acacia melanoxylon*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>		
					5%	1%	0.1%
Factorielle	4	6608,744	1652,186	26,428***	5%	1%	0.1%
Résiduelle	20	1250,292	62,514		2,605	3,86	0,57
Totale	24	7859,036	-				

**Tableau 7 :** M% *Acacia melanoxylon*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>		
					5%	1%	0.1%
Factorielle	4	381,514	95,378	20,698***	5%	1%	0.1%
Résiduelle	20	92,158	4,607		2,605	3,86	0,57
Totale	24	473,672	-				

**Tableau 8:** m% *Acacia melanoxylon*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>		
					5%	1%	0.1%
Factorielle	4	682,481	276,751	28,364***	5%	1%	0.1%
Résiduelle	20	195,140	9,757		2,605	3,86	0,57
Totale	24	1302,146	-				

**Tableau 9:** a% *Acacia melanoxylon*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>	
					5%	F <sub>obs</sub> < F <sub>1-α</sub>
Factorielle	4	93,947	23,486	1,954	5%	
Résiduelle	20	240,387	12,019		2,605	
Totale	24	334,334	-			

**Tableau 10:** A% *Acacia melanoxylon*.

Source de variation	ddl	SCE	CM	F <sub>obs</sub>	F <sub>1-α</sub>	
					5%	1%
Factorielle	4	2,391	0,597	3,568*	5%	1%
Résiduelle	20	3,351	0,167		2,605	3,86
Totale	24	5,742	-			

**Annexe 11 : Tableau de correspondance conductivité/sel soluble.**

Le tableau fournit une interprétation de mesures de la conductivité du sol effectuées sur une boue constituée de deux parties d'eau pour une partie de sol, conformément aux recommandations en vertu du programme accrédité d'analyse du sol du MAAO [www.omafra.gov.on.ca/french/crops/gardbk/4soil.html](http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/gardbk/4soil.html).

<b>Conductivité (s/m)</b>	<b>Correspondance en sel soluble</b>	<b>Réaction des végétaux</b>
0 - 0,25	Faible	Convenable pour la plupart des plantes moyennant l'emploi des engrais recommandés.
0,26 - 0,45	Moyenne	Comme ci-dessus.
0,46 - 0,70	Élevée	Peut réduire la levée et causer des dommages bénins à sévères aux plants sensibles au sel.
0,71 - 1,0	Excessive	Peut empêcher la levée et causer des dommages bénins à sévères à la plupart.

## Références bibliographiques

- **AGERER, R. (2006):** Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae, German Mycological Society and Springer 2006, Mycol Progress (2006), 5: 67-107.
- **ABOUROUH, M. (1996):** Les ectomycorhizes du Chêne-liège. Caractéristiques et rôles possibles dans la régénération. Actes du séminaire méditerranéen sur la régénération des forêts de Chêne-liège. Tabarka du 22 au 24 octobre 1996. Annales de l'INGREF, numéro spécial.
- **AKYIAMA, K. (2007):** Chemical identification and fonctional analysis of apocarotenoides involved in the devlopment of arbuscular mycorrhizal symbiosis Biosc. Biotechnol.Biochem, 71 (6), 1405-1414,2007.
- **ANONYME (1975):** Encyclopédie Les végétaux V II, édition sciences et techniques.
- **ANONYME (1991):** L'arboretum de Tonga, 16 pages.
- **ANONYME (1995):** Le point sur les dépérissements récents de l'aulne glutineux en France et les pistes de recherche des facteurs explicatifs. 7pages.
- **ANONYME (2003):** Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar, Réserve Intégrale du Lac Tonga, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Direction Générale des forêts El Tarf. 7pages.
- **BEDDIAR, A. (2003):** Les symbioses racinaires chez les principales essences forestières spontanées ou introduites dans le Nord-Est Algérien (étude particulière de la symbiose quadripartite chez l'aulne glutineux). Thèse de Doctorat en Biologie Végétale. 209 pages.
- **BEGUIRISTAIN, T. (1996):** Isolement et caractérisation du composé indolique majeur de *Pisolithus tinctorius*, l'hypaphorine. Etude de son rôle au cours de l'établissement de l'ectomycorhize d'Eucalyptus-*Pisolithus*. *Thèse de Doctorat en Biologie Végétale Et Forestière. Université Henri Poincaré.*
- **BERGEY, D.H. et HOLT, J.G. (1994):** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins.9th edition.787 pages.
- **BOGUSZ, D. et FRANCHE, C. (1986):** La fixation biologique de l'azote: l'ORSTOM et les recherches fondamentales.
- **BOND, G. et WHEELER, C.T. (1980):** Non-legume nodule systems in: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. (F.J. Bergersen Ed). John Wiley and Sons: Chichester, U.K.185-211.

- **BONFANTE-FASOLO, P., GIANINAZZI-PEARSON, V., SCANNERENI et GIANINAZZI, S. (1986):** Analyses ultracytologiques des interactions entre plante et champignon au niveau cellulaire dans les mycorhizes .Physiol.Vég.1986, 24(2)245-252.
- **BOONE, D.R., CASTENHOLZ, R.W., GARRITY G.M., (2001):** Bergey's manual of systematic bacteriology / George M. Garrity, editor-in-chief. 2nd Ed. New York: Springer.
- **BRUNDRETT, M., BOUGHER, N., DELL, B., GROVE, T. et MALAJCZUK, N. (1996):** Working with mycorrhiza in agriculture and forestry, published by Australian Centre for International Agricultural Research.
- **BRUNDRETT, M. (2004):** Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biol. Rev. (2004), 79, pp. 473–495.
- **CEPEDA HERNANDEZ, M.L. (2005):** Phenotypic characterization of *Rhizobia* that nodulate ball clover. Master of Science Thesis. Soil Science. Texas A&M University. 53 pages.
- **CHAABNA, S. (2006):** Biodiversité et dynamique saisonnière des champignons endomycorhizogènes de la rhizosphère d'*Acacia decurrens* (Wendi.) dans la région d'El Kala. Mémoire d'Ingéniorat en Ecologie et environnement. 83 pages.
- **DAVET, P. (1996):** Vie microbienne du sol et production végétale, édition INRA, 383pages.
- **de LAJUDIE, P., LAURENT-FULELE, E., WILLEMS, A., TORCK, U., COOPMAN, R., COLLINS, M., D., KERSTERS, K. et GILLIS, M. (1998):** *Allorhizobium undicola* gen. Nov. sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. Int.J. Syst.Bacteriol. 48, 1277-1290.
- **DELL, B. (2002):** Role of Mycorrhizal Fungi in Ecosystems. School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Perth, Western Australia, CMU Journal.Vol. 1: 47-60.
- **De ROUGEMONT, M. (2007):** Les mycorhizes et l'olivier : Effets sur le développement des plants en pépinière et en verger.
- **DIAGNE, O. et LE TACON, F. (1982):** Interaction fertilisation-mycorhization-nodulation chez *Alnus incana*. Les mycorhizes biologie et utilisation. Ed INRA Publ. Les Colloques de l'INRA n°13 :199-206.
- **DIEM, H.G. et GAUTHIER, D. (1982):** Effet de l'infection endomycorhizienne (*Glomus mosseae*) sur la nodulation et la croissance de *Casuarina equisetifolia*, Fonds documentaires O.R.S.T.O.M.
- **DOMMERGUES, Y., DUHOUX, E., DIEM, H.G., (1999):** Les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes

méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides, éditions : CIRAD (Montpellier), Editions Espaces (Montpellier), FAO (Rome), IRD, (Paris) ,499 pages.

- **DUHOUX, E. et NICOLE, M. (2004):** Biologie végétale : interactions et associations chez les plantes, édition Dunod.
- **DUCOUSSO, M. et THOEN, D. (1991):** Les types mycorhiziens des Acaciaeae, Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides. Pp-Groupe d'Etude de l'Arbre - Paris, France (8pages).
- **DUPONNOIS, R., FOUNOUNE, H., BA, A., PLENCHETTE, C., EL JAAFARI, S., NEYRA, M., DUCOUSSO, M. (2000):** Ectomycorhization of *Acacia holosericea* A.Cunn.ex G.Don by *Pisolithus* spp. in Senegal: effect on plant growth and on root-knot nematode *meloidogyne javanica* Ann.For.Sci, 57 (2000). 345-350.
- **AL-ABRAS, K. (1985):** Évolution des types de mycorhizes de l'Épicéa commun en fonction de l'âge. mémoire de DEA Université Nancy I. 50 pages.
- **EL-HILALI , I. (2006):** La symbiose *Rhizobium*-lupin: biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus* .Université Mohammed V – Agdal, Thèse de Doctorat, 206 Pages.
- **FRAGGA-BEDDIAR et Le TACON, F. (1990):** Interaction between a VA Mycorrhizal fungus and *Frankia* Associated with Alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.). Symbiosis, 9. Balban Publishers. Philadelphia. 247-256.
- **FRY, J. (2000):** Myo-Inositol metabolism in *Rhizobium leguminosarum*, Ph.D. THESIS, Université Laval. 274 pages.
- **GAGNE, A. (2005):** Etude moléculaire du cortège ectomycorhizien de plantations de conifères sur des sites forestiers après coupes à blanc après coupes à blanc. Mémoire de maîtrise en sciences forestières pour l'obtention du grade de maître en sciences (M. Sc.). Département des Sciences du bois et de la forêt, Foresterie et Géomantique, Université Laval, Québec.
- **GARBAYE, J. (1988):** Les plantations forestières et tropicales : un champs d'application privilégié pour la mycorhization contrôlée. Revue bois et forêts des tropiques n°126: 23-34.
- **GARDNER, I. C. (1986):** Mycorrhizae of actinorhizal plants. MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2, 147-160.
- **GAUTHIER, D. (1984):** La symbiose *Frankia* - *Casuarina Equisetifolia*, thèse de doctorat d'état, Université Paris VII, 265 pages.
- **GERDMAN J.W., NICOLSON T.H. (1963):** Spores of endogone species from soil by wet sieving and decanting, Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235–244.

- **GIANINAZZI-PEARSON, V. (1982):** Importance des mycorhizes dans la nutrition et la physiologie des plantes. Ed INRA. Pp 51-57.
- **GIANINAZZI-PEARSON V., et GIANINAZZI S. (1986):** The physiology of improved phosphate nutrition in mycorrhizal plants. *In*: "Physiological and genetical aspects of mycorrhizae". Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds)., INRA, Paris, 101-109.
- **GLENN A.R., REEVE W.G., TIWARI, R.P., DILWORTH, M.J. (1999):** Acid tolerance in root nodule bacteria. *Novartis Found Symp.* 1999; 22: 112-26; discussion 126-30.
- **HAFEEZ, F., AKKERMANS, A.D.L. et CHAUDHARY, A.H. (1984):** Morphology, physiology and infectivity of two *Frankia* isolates An1 and An2 from root nodules of *Alnus nitida*. *plant and soil* 78,45-59.
- **HAHN, D., STARRENBURG, M.J.C. et AKKERMANS A.D.L. (1988):** Variable compatibility of cloned *Alnus glutinosa* ecotypes against ineffective *Frankia* strains. *Plant and Soil* 107,233-243.
- **HOSIE, R. C.(1980):** Arbres indigènes du Canada, 7<sup>e</sup> édition, édition Fides (Montréal, Québec), 389 pages.
- **JORDAN, D.C. (1984):** Family III. *Rhizobiaceae*. In Bergey's manual of systematic Bacteriology. Vol 1. Edited by N.R.
- **KERSTERS, K., DE LAY, J., SNEATH, P.H.A. et SACKIN, M. (1973):** Numerical taxonomic analysis of agrobacterium, -*J.Gen, Microbiol.* 78: 227-239.
- **LE TACON, F., GARBAYE, J., BOUCHARD, D., CHEVALIER, G., OLIVIER, J.M., GUIMBERTEAU, J., POITOU, N., FROCHOT, H. (1988):** Field results from ectomycorrhizal inoculation on France. Lalonde, M. /Piché,Y.(eds), Canadian Workshop n Mycorrhizae in Forestry C.R.B.F., Faculté de Foresterie et d Géodésie, Université Laval, Ste-Foy, Québec G1K7P4 :51-74.
- **LE TACON, F. (1998):** Vers une meilleure prise en compte des champignons mycorrhiziens dans la gestion forestière *in* champignons et mycorhizes en forêt. INRA – NANCY.
- **LODWIG, E.M. (2001):** Regulation of Carbon Metabolism in *Rhizobium Leguminosarum* , "Doctor of philosophy thesis, University of Reading, 235 pages.
- **MENNA, P., HUNGRIA, M., BARCELLOS, F.G., BANGELE, E.V., HESS, P.N., MARTINEZ-ROMERO, E. (2006):** Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology* 29 (2006) 315–332.

- **MEJSTRIK, V., BENECKE, U. (1969):** The ectotrophic mycorrhizas of *Alnus viridis* (Chaix) D. C. and their significance in respect to phosphorus uptake. *New Phytol.*, 68, 141.
- **MENKIS, A. (2005):** Root associated fungi of conifer seedlings and their role in afforestation of agricultural land. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. 18 pages.
- **MOHAPATRA, A., LEUL, M., SANDSTRÖM, G., SELLSTEDT, A., (2006):** Occurrence and characterisation of the hydrogen-evolving enzyme in *Frankia sp.* *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (2006) 1445 – 1451.
- **MOKRANI, D. (2001):** Etude de la symbiose *Hedysarum coronarium* L. –*Rhizobium* “hedysari”. Essai de production d’un inoculum. Mémoire de magistère en biochimie et microbiologie appliqué. Université Mentouri Constantine.
- **MOUSSAIN, D., PLASSARD, C., ARGILLIER, C., SARDIN, T., LEPRINCE, F., EL KARKOURI, K., ARVIEU, J.C., et CLEYET-MAREL, J.C. (1994):** Stratégie d’amélioration de la qualité des plants forestiers et des reboisements méditerranéens par utilisation de la mycorhization contrôlée en pépinière. *Acta.bot. Gallica*,141 (4)571-580.
- **ABOU NDIAYE, A., NDAO SYLLA, S., GUEYE, M., DE LAJUDIE, P., et NDOYE, I. (2002):** Protéines totales sur gel de polyacrylamide-sds (sds-page) pour l’étude de la diversité des rhizobiums d’*Acacia tortilis* (forsk.) hayne subsp. *raddiana* (*savi*) *brenan*. Vol. 3, No.1.
- **NOUASRIA, D. (2008):** Les mycorhizes et les actinorhizes de *Casuarina equisetifolia* (forst) dans la station de Ben m’hidi (Nord-Est algérien). Diversité, écologie et physiologie. Mémoire de magistère en écologie végétale et environnement. Université BADJI-MOKHTAR, ANNABA.
- **NULTSCH, W., et MIESCH, R. (1998):** Botanique générale, éditions : De Boeck, Bruxelles, 602 pages.
- **PERET, B. (2007):** Transport de l’auxine et développement du nodule actinorhizien chez l’arbre tropical *Casuarina glauca*, Université Montpellier II thèse de doctorat Discipline : Physiologie végétale, (77 pages).
- **PRESCOTT, L.M., HARLEY J.P. et KLEIN, D.A. (2003):** Microbiologie, 2e édition française, édition Boeck et Larcier, 1137 pages.
- **REID, C.J. (1995):** The regulation of the DCT system in *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* .University of reading. Doctor of Philosophy Thesis.
- **SCHOFIELD, N.A. (1998):** Development of Optical Trapping for the Isolation of Environmentally Regulated Genes. Doctor of Philosophy Thesis, University of Reading, School of Animal and Microbial Sciences,163 pages.

- **SEDDAS P.M.A., ARNOULD, C., TOLLOT, M., ARIAS, C.M., GIANINAZZI-PEARSON, V. (2008):** Spatial monitoring of gene activity in extraradical and intraradical developmental stages of arbuscular mycorrhizal fungi by direct fluorescent in situ RT-PCR *Fungal Genetics and Biology* 45 (2008) 1155–1165.
- **SEILER, J.R. (1985):** Morphological and physiological changes in black alder induced by water stress, *in: Plant, Cell and environment*, 8: 219-222.
- **SOMASEGARAN, P. et HOBEN, H. J. (1994):** Handbook for *Rhizobia*. Methods in Legume -*Rhizobium* Technology. Springer-Verlag New York, Inc. 450 pages.
- **SVISTOONOFF, S. (2003):** Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse de Doctorat Université Montpellier II – Sciences et Techniques du Languedoc. 59 pages.
- **TEJERA, N.A., CAMPOS, R., SANJUAN, J., et LLUCH C., (2005):** Effect of Sodium Chloride on Growth, Nutrient Accumulation, and Nitrogen Fixation of Common Bean Plants in Symbiosis with Isogenic Strains. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 1907–1921.
- **TOUIL, W. (2008):** Essai d'une double inoculation d'*Arachis hypogea* (L.) par *Glomus* sp. et *Bradyrhizobium* sp. Isolés du site d'El Frin (W. d'El Tarf, Nord-est algérien). Mémoire de magistère, Université Badji Mokhtar ANNABA, département de biologie, 108 pages.
- **TRAPPE, J.M. (1977):** Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology*; vol 15, 1977; pp. 203-222.
- **VESTBERG, M., KUKKONEN, S., SAARI, K., PARIKKA, P., HUTTUNEN, J., TAINIO, L., DEVOS, N., WEEKERS, F., KEVERS, C., THONART, P., LEMOINE, M.C., CORDIER, C., ALABOUVETTE, C., GIANINAZZI, S., (2004):** Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Soil Ecology* 27 (2004) 243–258.
- **VINCENT J.M. (1970):** A manual for the practical study of root nodbacteria. IBP Handbook No. 15 Blackwell, Oxford, 164p.
- **WATKIN E.L.J., O'HARA G.W. et GLENN, A.R. (1997):** Calcium and acid stress interact to affect the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*; *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 29, Issues 9-10, September-October 1997, Pages 1427-1432.
- **WEAVER, R.W., et GRAHAM, P.H. (1994):** Legume Nodule Symbionts, p. 199-222. In Weaver, Angle, S., Bottomley, P., Bezdicek, D., Smith, S., Tabatabai, A., and Wollum, A (eds.), *Methods of soil analysis, Part 2*, Am. Soc. of Agron., Madison, Wisconsin.
- **WHITE, J., (2006):** Amino Acid Transport and Metabolism by *Rhizobium leguminosarum*. Doctor of Philosophy Thesis. University of Reading. 312 pages.

- **YOUNG, J.P.W. et HAUKKA, K.E. (1996):** Diversity and phylogeny of *Rhizobia*. *New Phytol.* 133: 87-94.

## Sites INTERNET

1. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Mycorhize>.
2. <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/Classification.html>
3. image arbuscule vésicule
4. <http://mycor.nancy.inra.fr/fr/about/ectoMorphogenesis.html>.
5. <http://web.uconn.edu/mcbstaff/benson/Frankia/FrankiaTaxonomy.html>.
6. [www.nature.com/.../n8/fig\\_tab/nrmicro954\\_F1.html](http://www.nature.com/.../n8/fig_tab/nrmicro954_F1.html).
7. <http://maps.google.fr/maps?hl=fr&tab=wl>.
8. [http://www.pepinieres-moissenot.fr/iso\\_album/aulne\\_glutineux\\_avril05.pdf](http://www.pepinieres-moissenot.fr/iso_album/aulne_glutineux_avril05.pdf).
9. <http://www.visoflora.com/photos-nature/aulne-glutineux>.
10. <http://educatif.eau-et-rivieres.asso.fr/pdf/aulne-glutineux.pdf>.
11. <http://www.crfp.fr/bretagne/pdf-fiches-essences/AulneGlutineux.pdf>
12. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Mimosa\\_%C3%A0\\_bois\\_noir](http://fr.wikipedia.org/wiki/Mimosa_%C3%A0_bois_noir).
13. <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=197>.
14. <http://www.tela-botanica.org/eflore/BDNFF/4.02/nn/106/export/pdf>.
15. <http://gardenbreizh.org/modules/gbdb/plante-535-acacia-melanoxyton.html>.
16. [http://images.google.fr/imgres?imgurl=http://popgen.unimaas.nl/~jlindsey/commanster/Plants/Trees/Trees/Alnus.glutinosa4.jpg&imgrefurl=http://popgen.unimaas.nl/~jlindsey/commanster/Plants/Trees/Trees/Alnus.glutinosa.html&usq=\\_\\_j\\_IMRyt1pIjXTHkdGm9Gii9k0lg=&h=425&w=640&sz=82&hl=fr&start=4&tbnid=SvTjyvhXtxzndM:&tbnh=91&tbnw=137&prev=/images%3Fq%3DAlnus%2Bglutinosa%26gbv%3D2%26hl%3Dfr](http://images.google.fr/imgres?imgurl=http://popgen.unimaas.nl/~jlindsey/commanster/Plants/Trees/Trees/Alnus.glutinosa4.jpg&imgrefurl=http://popgen.unimaas.nl/~jlindsey/commanster/Plants/Trees/Trees/Alnus.glutinosa.html&usq=__j_IMRyt1pIjXTHkdGm9Gii9k0lg=&h=425&w=640&sz=82&hl=fr&start=4&tbnid=SvTjyvhXtxzndM:&tbnh=91&tbnw=137&prev=/images%3Fq%3DAlnus%2Bglutinosa%26gbv%3D2%26hl%3Dfr)
17. [www.apstas.com/sgaptas-springflowers4.html](http://www.apstas.com/sgaptas-springflowers4.html).
18. [http://images.google.fr/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b6/Acacia\\_melanoxyton\\_branch.jpg&imgrefurl=http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Acacia\\_melanoxyton\\_branch.jpg&usq=\\_\\_kH2Jvv4ItZ9BtCEzhtYGr5IJF\\_8=&h=1488&w=1984&sz=638&hl=fr&start=5&tbnid=jzp0hMAGafhTQM:&tbnh=113&tbnw=150&prev=/images%3Fq%3Dacacia%2Bmelanoxyton%26gbv%3D2%26hl%3Dfr](http://images.google.fr/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b6/Acacia_melanoxyton_branch.jpg&imgrefurl=http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Acacia_melanoxyton_branch.jpg&usq=__kH2Jvv4ItZ9BtCEzhtYGr5IJF_8=&h=1488&w=1984&sz=638&hl=fr&start=5&tbnid=jzp0hMAGafhTQM:&tbnh=113&tbnw=150&prev=/images%3Fq%3Dacacia%2Bmelanoxyton%26gbv%3D2%26hl%3Dfr).
19. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Aulne\\_glutineux](http://fr.wikipedia.org/wiki/Aulne_glutineux).
20. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Mimosa\\_%C3%A0\\_bois\\_noir](http://fr.wikipedia.org/wiki/Mimosa_%C3%A0_bois_noir).
21. <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/MYCOCALC.EXE>
22. <http://www.deemy.de>.
23. <http://invam.caf.wvu.edu/index.html>.
24. <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/index.html>.
25. <http://pagesperso-orange.fr/champignons.fc/dbasidios/micro/prepa.htm#cong>