

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mohamed Khider Biskra
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Réf: ... / ...

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de
Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire**

Thème

L'effet de l'inoculation, et du sol sur la nodulation du
Sulla (Hédysarum coronarium)

Présenté par : M^{elle} SADOUN Fatima

Devant le jury:

Président: ZOUAOUI Wafa (M.A.B)

Promoteur: MOKRANI Djamilia (M.A.A)

Examineur : YAKOUB Fadjria (M.A.A)

Année Universitaire 2013/ 2014

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent particulièrement à l'équipe du laboratoire des Biotechnologies de l'agronomie (Naima, chahla, khadija), pour m'avoir ouvert son laboratoire sans aucune restriction.

Je remercie également Madame MOKRANI Djamilia d'avoir accepté de m'encadrer, et m'avoir suivie régulièrement pour la réalisation de ce travail et de tout ce qu'il a fait pour me permettre d'atteindre ces résultats, ainsi son aide précieuse et ces conseils judicieux.

A toute l'équipe du laboratoire des Biotechnologies du département SNV de Université Mohamed Khider Biskra pour leur soutien matériel et moral.

A mes amis de promotion Hanane, Meriem j'adresse un grand merci pour leur soutien et leur aide aux moments difficiles.

Aux membres du Jury au président et d'Examineur qui m'ont fait l'honneur de leur présence et d'avoir sacrifié leur temps pour juger ce travail.

A toutes et à tous qui, de loin ou de près, ont contribué à la réalisation de ce mémoire surtout : Houria, Ichrak, Intissar, Karima, Imane.

Enfin, je remercie par la même occasion ma famille.

DEDICACE

Je tiens à dédier ce modeste travail à :

*La belle image, la fleur de mon cœur, la merveille de mon univers, le symbole
d'amour et de tendresse pour son encouragement de formation,*

« Ma Mère »

*Mon très cher père qui m'a donné la volonté, l'espoir, le courage, et la patience
d'aller plus loin.*

Mes chers frères : Abd elkhader, kimo

Mes douces sœurs : Amel, Souade.

Mes oncles, mes tantes

Mes cousins, mes cousines surtout Aicha.

Toutes mes amies de la cité universitaire surtout :

Houria, Ichrak, Imane, Fatiha, Salima.Hadjer.

Tous mes collègues en particulier Karima, Hanane, Meriem, Intissar, Imane.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Partie bibliographie

Chapitre 1: Généralité sur le sol et les légumineuses

I. Généralités sur le sol	
I.1. Définition du sol	3
I.2. Caractéristique générale des phases du sol.....	3
I.3. Constituant fondamentaux du sol	4
I.3.1. La fraction minérale.....	4
I.3.2. La fraction organique	4
I.4. Caractéristiques physico-chimiques du sol	6
I. 4.1. Taille des particules et texture du sol.....	6
I.4.2. Capacité d'échange de cation (CEC) du sol.....	7
II. Les légumineuses	8
II.1. Classification des légumineuses	8
II.1.1. <i>Mimosoideae</i>	8
II.1.2. <i>Caesalpinioideae</i>	8
II.1.3. <i>Papilionaceae (Fabaceae)</i>	8
II.2. Le sulla (<i>Hedysarum coronarium</i>).....	9
II.3. Intérêts environnementaux	10
III. Le microsymbiont : les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L)	10
IV. Principe étape d'infection et de nodulation	10
IV.1. L'infection	11
IV.1.1. Phase de pré-infection	11

IV.1.2. Phase de l'infection et de la formation des nodules.....	11
IV.1.3. Phase de dégénérescence.....	12
VI. Morphologie du nodule.....	12
VI.1. Nodosités à forme indéterminée.....	12
VI.2. Nodosités à croissance déterminée.....	12
V. L'inoculation	12
V.1. Les inoculant à légumineuses (Rhizobia)	13
V.2. Les types d'inoculations	13
V.2. 1.L'application aux graines (enrobage).....	13
V.2. 2.L'application au sol (liquide)	13
V.3. Les avantages de L'inoculation des légumineuses.....	13

Partie expérimentale

Chapitre 2 : Matériel et méthode

I. Echantillonnages.....	15
I.1. Collecte des sols.....	15
I. 2. Analyse physico-chimique des sols.....	16
I.2.1. Mesure du pH	16
I.2.2. La conductivité électrique	16
I.2.3. Dosage du calcaire total.....	17
I.2.4. Dosage du calcaire actif.....	18
I.2.5. Dosage du Phosphore assimilable	19
I.2.6. dosage de Na et K	21
II. Matériel végétal	22
II.1. Stérilisation des graines.....	22
II.2. Le Semis	23
II.3. Méthodes d'inoculations.....	24

Chapitre 3: Résultat et discussion

I. Les résultats d'analyse physico-chimiques du sol.....	25
I.1.Le pH.....	25
I.2. Conductivité électrique	26
I.3.Dosage sodium et potassium	27
I.4.Calcaire total	29
I.5.Calcaire actif	30
I.6. Phosphore assimilable	31
II. Résultat du prélèvement des plantes.....	32
Conclusion.....	36
Références bibliographiques.....	38
Annexe	

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Classification de la taille des particules dans le système USDA et Français (STEINHARDT, 2008)	7
Tableau 2.2. Préparation la concentration de la gamme	20
Tableau 3.3. Les résultats des plantations	31
Tableau 3.4. Normes d'interprétation du taux du calcaire totale du sol BAIZE(2000).....	30
Tableau 3.5. Les résultats des plantations.....	33

Liste des figures

Figure 1.1. Les proportions moyennes des divers constituants du sol (CALVET, 2003).....	6
Figure 1. 2. <i>Hedysarum coronarium</i> . (Sulla) au stade floraison (SANA, 2011).....	9
Figure 1.3. L'infection et la nodulation (JOURNET, 2004).....	11
Figure 2.4. Sites des collectes des sols	15
Figure 2.5 .PH- mètre (pH 211micro processor pH micro HANNA)	16
Figure2.6 .Conductimètre (EC212 conductivité mètre).....	16
Figure 2.7. Calcimètre (photo originale).....	17
Figure 2.8 .Etape de titration.....	18
Figure 2.9. Etapes du dosage.....	19
Figure 2.10. Photomètre à flamme (JEWWAY RFP7).....	21
Figure 2.11. Etapes de germination des graines (photo originale).....	22
Figure 2.12. Les graines utilisé dans cette étude ; Sulla (<i>Hédysarum coronarium</i>).....	23
Figure 2.13. Pot de semis (photo originale).....	23
Figure 2.14. Méthode de plantation et d'inoculation (photo originale).....	24
Figure 3.15. PH du sol des régions d'étude.....	25
Figure 3.16. La conductivité des régions d'étude.....	26
Figure 3.17. Le dosage de sodium dans région d'étude.....	27
Figure 3.18. Dosage de potassium dans région d'étude.....	27
Figure 3. 19. Pourcentage du calcaire total dans les régions d'étude.....	29

Figure 3.20. Pourcentage du calcaire actif dans les régions d'étude.....	30
Figure 3. 21. Les concentrations de phosphore du sol des échantillons.....	31
Figure 3. 22. Les résultats positifs (présence de nodules).....	34

Liste d'abréviation

B.N.L : Bactéries Nodulant les Légumineuses

C : Carbone

Ca : Calcium

CaCO_3 : Carbonate de calcium

CEC : Capacité d'échange de cation

Co : Cobalt

Cu : Cuivre

Fe : Fer

H : Hydrogène

K : Potassium

KCl : Chlorure potassium

Mg : Magnésium

Mn : Manganèse

N : Azote

Na : Sodium

NaCl : Chlorure Sodium

Ni : Nickel

O : Oxygène

P : Phosphore

S : Souche

S : Soufre

T : témoin

Zn : Zinc

Introduction

INTRODUCTION

Le sol est la partie de la couche superficielle de l'écorce terrestre qui, grâce à sa structure meuble et sa composition physico-chimique, est en mesure d'assurer un développement normal des végétaux cultivés. Selon leur nature héritée des matériaux originels aux dépens desquels ils se sont développés (désagrégation physique ou fragmentation de la roche ; altération chimique ou transformation des minéraux de la roche). Les sols présentent différentes propriétés physiques et chimiques jouant un rôle sur le devenir des amendements, des fertilisants est les risques de lessivage. (PIERRE *et al*, 2003)

Le sol n'est pas seulement le support d'une vie microbienne intense .c'est aussi le milieu où a lieu la germination des graines de la grande majorité des végétaux .C'est le substrat dans lequel ils ancrent leurs racines et d'où ils retirent ,grâce à elles , l'eau et les sels minéraux qui leur sont nécessaires .les racines des plantes sont donc des habitants du sol à part entière .Elles jouent de ce fait un rôle capital dans les équilibres microbiens et ne peuvent pas être négligées par le microbiologiste. De même, le botaniste ou l'agronome ne peuvent se permettre d'ignorer les effets exercés par les microorganismes sur les plantes par l'intermédiaire des racines (PIERRE, 1996).

Les végétaux puisent dans le sol une partie des éléments nécessaires a leur développement ; ces éléments sont assimilés sous forme d'ions en solution dans le sol, Pour se développer, les plantes prélèvent dans le milieu qui les entoure – air, eau, sol – les éléments nécessaires à leur vie et à leur développement.

L'azote est, pour la plupart des plantes, prélevé dans le sol sous forme minérale, mais pour les légumineuses, il est prélevé dans l'air du sol par les bactéries des nodosités racinaires.

La famille des légumineuses appelée aujourd'hui fabacée comprend de nombreuses espèces potagères comme le haricot, fèves, pois, soja, sula,... (DELMOND et BOUCH, 2006).

Elle caractérisée par la capacité de fixer l'azote de l'air. Cette fixation est due à la présence des bactéries dans les nodosités des racines. Les nodosités sont ainsi le lieu d'une activité symbiotique : la plante fournit les substances carbonées aux bactéries, et les bactéries fournissent à la plante les substances azotées synthétisées à partir de l'azote atmosphérique.

Parmi les légumineuses, le genre *Hedysarum* connue sous le nom vulgaire de sulla ou sainfoin d'Espagne, est une espèce fourragère. Dans les endroits où le sulla pousse spontanément, les plantes, malgré des caractéristiques agronomiques limitées (port rampant, rendement fourragère faible...), sont exploitées par les agriculteurs pour la pâture et pour la protection des sols, particulièrement sur les pentes marneuses sensibles à l'érosion (TRITI-FARAH, 1989).

Les espèces du genre *Hedysarum* ont un intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité d'améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique (HANNACHI-et al, 2004).

Dans l'objectif d'étudier l'effet du sol et l'inoculation par des bactéries symbiotiques, sur la nodulation de *Hedysarum coronarium* connu sous le nom Sulla, a suivi les étapes suivantes :

- Une étude bibliographique consistant en une synthèse des connaissances sur le sol et ses différents constituants ainsi qu'une partie générale sur la famille des légumineuses et méthode de l'inoculation.
- Dans le deuxième chapitre, nous abordons l'aspect expérimental en présentant les techniques et les protocoles expérimentaux utilisés :
 - Les différentes techniques d'analyse du sol.
 - La présentation des techniques utilisées pour la caractérisation agronomique du Sulla dans les pots inoculés.
- Dans le troisième chapitre vise à discuter les différents résultats obtenus.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le sol et la légumineuse

I.1. Définition du sol

C'est la formation naturelle de surface, à structure meuble et d'épaisseur variable, résultant de la transformation de la roche mère sous-jacente sous l'influence de divers processus, physiques, chimiques et biologiques, au contact de l'atmosphère et des êtres vivants (SIOBHAN *al.*, 2011) Le sol comme étant le produit de la transformation, sur une très longue période, de substances minérales et organiques à la surface de la terre, sous l'influence de facteurs environnementaux et ayant une organisation et une morphologie définies (SCHROEDER, 1984).

I.2. Caractéristique générale des phases du sol

Le sol est un mélange variable de substances solides, gazeuses et liquides formant un système à trois phases.

- **La Phase solide**

Comprend des constituants minéraux, et rassemble des particules de dimension de forme variées et constituant organique formée d'organisme vivant divers et résidus organique (ROPERT, 1996).

- **La Phase liquide**

Est une solution dans l'eau d'ions minéraux et de petites molécules organique, qui varie dans sa composition et sa mobilité ; une partie en effet de cette solution du sol est plus ou moins intensément fixée sur la phase solide (ROPERT, 1996).

- **La Phase gazeuse**

Composée de gaz (azote, oxygène, dioxyde de carbone) et de vapeur d'eau (STENGEL *et al.*, 1998) .Elle occupe les espaces libres, laissés entre la particule solide qui ne sont pas remplis par la phase liquide.

I.3. Constituant fondamentaux du sol

Les proportions des composants principaux varient selon les caractéristiques du sol (fig. 1.1) qui est composé de deux fractions :

I.3.1. La fraction minérale

Les constituants minéraux du sol sont issus de la dégradation des roches, La phase minérale généralement séparée en trois fractions selon la taille des particules (DIXON et SCHULZE, 2002): les particules dont le diamètre est inférieur à 2 μm , compris entre 2 et 50 μm , et supérieur à 50 μm constituent respectivement les fractions argileuses, limoneuses et sableuses. (SIOBHAN et *al.* , 2011)

- **Les argiles**

Ils sont issus de l'altération des roches par hydrolyse de minéral silicate, toutes les argiles jouent un rôle central dans le sol au sens agronomique, influençant sa structure, et sa porosité à capacité d'échange.

- **Le limon**

Ce sont des minéraux riches en fer, ils altèrent au contact de l'oxygène atmosphérique et produisent le limon, le mouvement de l'air et l'eau s'en trouvent retardés, alors que les sols limoneux restent donc humides longtemps (DOUCET ,2006)

- **Le sable**

Le quartz et silice pure désagrégé forment des dépôts de sable qui peuvent remanier par le vent .Les sols sableux ont une grande perméabilité de l'ordre de 15 à 20cm/heure et de faible capacité de rétention d'eau d'ordre de 5 à 6% par rapport à la terre sèche .

I.3.2. Fraction organique

La fraction organique peut être définie comme une matière hydrocarbonée provenant des êtres vivants végétaux et animaux. Elle est composée des éléments principaux (C, H, O, N) et des éléments secondaires (S, P, K, Ca, Mg) (FLOGEAC, 2004). Elle peut se diviser en plusieurs catégories :

- A-** Organismes vivants constituant la biomasse : racines, faune du sol, micro population (bactéries, champignons, algues...).
- B-** Organismes mort en voie de dégradation : ceux-ci forment des résidus qui perdent progressivement leurs structure externes et internes, ils sont constitués pour une très large part de débris végétaux demeures sur le sol lui-même ou bien incorporé dans ce dernier après leur transformation en fumiers. Les plantes sont généralement composées de 15 à 60% de cellulose, 10 à 30% d hémicellulose ,5à30% de lignine ,2à15% de protéines.

C- L'humus est le composé final de la dégradation de la matière organique. C'est un Composé organique stable, à noyaux aromatiques, Il comprend des acides fulviques et humiques, ainsi que l'humine.

Il comprend également des composés de masse moléculaire élevée (> 100 000 Da) qui sont polymérisés à partir de noyaux aromatiques (phénols) provenant de la destruction de la Cellulose et de la lignine sous l'action microbienne (SPOSITO, 1989). L'humus est généralement associé aux minéraux argileux et forme les complexes argilo-humiques qui jouent un rôle important d'échangeurs dans l'alimentation des plantes car ils fixent à leur surface des substances nutritives échangeables, qui déterminent de manière essentielle la fertilité des sols (ROBERT et CLAUS ,2001).

D- Les substances non humiques sont des molécules appartenant à des familles chimiques identifiées : glucides, protéines et acides aminés, lipides, lignines et acides organiques (CALVET, 2003).

Ces substances organiques, de faibles poids moléculaire, sont généralement labiles et relativement faciles à métaboliser et/ou dégrader par les enzymes hydrolytiques produites par les microorganismes (VICTOR ,2006). (Fig1.1)

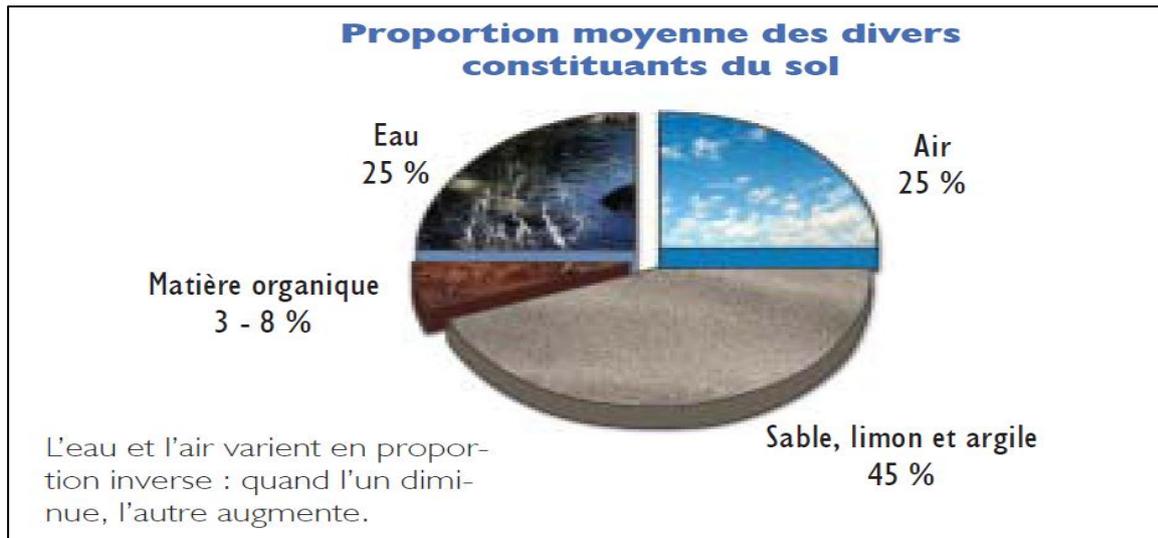


Figure 1.1. Les proportions moyennes du divers constituant du sol (CALVET, 2003).

I.4. Caractéristiques physico-chimiques du sol

I. 4.1. Taille des particules et texture du sol

La distribution statistique des tailles des particules du sol (granulométrie) permet de définir plusieurs propriétés physiques du sol dont la texture. La plupart des systèmes de classification des sols utilise la distribution des tailles des particules comme un critère (STEINHARDT, 2008). La gamme des tailles des particules du sol est très large (des cailloux aux argiles fines).

Les critères de cette classification varient selon les pays et les disciplines. Le Tableau 1.1. présente les critères de classification du système Français et celui du Département Américain d'Agronomie (USDA) basés sur le sol fin (< 2 mm de diamètre). Les différentes fractions des sols sont obtenues par tamisage et par sédimentation.

Tableau 1.1. Classification de la taille des particules dans le système USDA et Français(<http://soils.usda.gov/technical/handbook/contents/part618.html>) (STEINHARDT, 2008)

Nom des classes	Taille (mm) USDA	Taille (mm) France
argile, total	<0.002	<0.002
Limon, total	0.002-0.05	0.002-0.05
Limon fin	0.002-0.02	0.002-0.02
Limon grossier	0.02-0.05	0.02-0.05
Sable, total	0.05-2.00	0.05-2.00
sable très fin	0.05-0.10	
Sable fin	0.10-0.25	0.05-0.20
Sable moyen	0.25-0.50	
Sable grossier	0.50-1.00	0.20-2.00
Sable très grossier	1.00-2.00	

I.4.2. Capacité d'échange de cation (CEC) du sol

La capacité d'échange cationique d'un sol, est la quantité de cations qu'il peut adsorber, exprimée en milliéquivalent par 100 grammes (meq /100 g) de sol.

Les sols sont capables de retenir de façon réversible des cations par les charges négatives de leurs minéraux argileux et de leurs substances organiques.

La matière organique du sol, en particulier les substances humiques et fulviques qui ont une forte concentration des groupements carboxyle (COOH) et hydroxyle phénolique (OH) peuvent avoir des charges négatives en fonction du pH. Quand le pH augmente, les ions H⁺ se dissocient des groupements COOH et OH en créant des charges négatives et donc augmentent la capacité d'échange cationique de la matière organique (SCHROEDER, 1984). La capacité de la matière organique à fixer les cations métalliques décroît selon l'ordre approximatif suivant : Cu > Ni > Co > Zn > Fe > Mn > Ca > Mg (SIOBHAN et al ., 2011)

II. Les légumineuses

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, avec plus de 650 genres et 18000 espèces. Cette famille comprend des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses ; elle colonise aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre (JEAN, 1995).

II.1. Classification des légumineuses

Les légumineuses constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les angiospermes, (Grande importance agronomique et alimentaire/économique) du fait de leur capacité à former des symbioses avec les rhizobia et importante source de protéines végétales pour l'alimentation animale et humaine, Exemple: Luzerne, trèfle, lotier, lentille, pois, soja, haricot (THIERRY, 2013). Elles constituent un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondant et les plus diversifié, elle est subdivisée en trois sous familles d'importance inégale:

II.1.1. *Mimosoideae*

Ils ont de très nombreuses petites fleurs en grappes serrées à nombreuses étamines saillantes en dehors des petits pétales ; les fleurs sont symétriques. Ce sont en majorité des arbres et arbuste des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille comprend 62 genres et environ 2500 espèces. Parmi les 10% d'espèces déjà examinées, la majorité sont nodulées (*Glycine, Acacia,...*) (MAXTED et BENNETT, 2001).

II.1.2. *Caesalpinioideae*

Ils ont habituellement des fleurs comme des papillons et à étamines unies, comprenant environ 150 genres et 2200 espèces. Ce sont principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. 23 % seulement des espèces parmi celles examinées, sont connues pour être nodulées par les rhizobia (MAXTED et BENNETT, 2001).

II.1.3. *Papilionaceae* ou *Fabaceae*

Représente la sous-famille la plus diversifiée avec 429 genres et plus de 12000 espèces, principalement herbes et petits arbustes distribués dans le monde entier, elles sont présentés en régions tempérées et tropicales, y compris les légumineuses à graines bien connues (FERCHICHI, 2006). Elles ont des fleurs en forme de papillon avec un pétale supérieur appelé étendard, deux pétales latéraux ou ailes et une carène formée par deux pétales

inférieurs unis ; les sépales au nombre de 5 sont soudés en tube (MAXTED et BENNETT, 2001). Les *Papilionoideae* sont utilisées pour la production des graines alimentaires comme le pois (*Pisum sativum*L.) et le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.); mais aussi pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage tels que la luzerne (*Medicago sativa* L.) et le sulla (*Hedysarum coronarium*).

II.2.Le sulla (*Hedysarum coronarium*)

Hedysarum coronarium L. (Sulla) (Légumineuse, Papilionacée) (Fig1.2) est une plante herbacée annuelle (ALI et al., 1982), elle est fortement enracinée, possède une racine de 2 m de longueur et de nombreuses racines secondaires. La floraison commence au début de l'été, où les fleurs sont réunies en racème jusqu'à 35 fleurs; s'étendant de la rose à la violette .La température de croissance varie de 4 à 30°C, mais elle est incapable de pousser à des températures beaucoup au-dessous de zéro. C'est une plante florissante sur des sols avec un pH variant entre pH 6 et pH 8,5.Cette plante joue un rôle dans l'amélioration et la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique, (HANNACHI et al ., 2004).



Figure1.2. *Hedysarum coronarium*. (sulla) au stade floraison (SANA, 2011).

II.3. Intérêts environnementaux

En plus de son haut potentiel de production fourragère, le sulla offre la possibilité d'améliorer la teneur en matière organique et de maintenir une richesse en azote du sol, elle a un effet direct sur la stabilisation des agrégats du sol et indirect sur la stimulation des activités microbiennes de la rhizosphère. Grâce à son système racinaire puissant et pivotant, le Sulla offre l'avantage de protéger le sol contre l'érosion (SANA, 2011).

III. Le microsymbiont : les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L)

« Rhizobia » est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les légumineuses, et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose.

La particularité de ces microorganismes, aussi bien les rhizobia que les non-rhizobia, donc les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.) sont capables de s'associer aux racines de ces plantes avec la plupart des espèces de légumineuses en formant des nodosités sur les racines dont lesquelles ils réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac. Le BNL peut aussi inhiber la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes (CAN, 2001).

IV. Principe étape d'infection et de nodulation

La fixation azotée prend place dans des nodules localisés dans les racines de la plante hôte. Mais le processus de la fixation biologique de l'azote est précédé par la formation de nodules ou nodosités. En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infestation des racines par les *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection (MAOUGAL, 2004).

IV.1.L'infection

IV.1.1.Phase de pré-infection

L'interaction entre la plante et la bactérie débute dans la rhizosphère, la plante permet la croissance des bactéries de manière sélective (SAVKA et *al.*,2002).Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances, principalement par les phénylpropanoïdes exsudés par la racine. Une production plus importante de ces composés est observée en condition de carence azotée .

Les flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires induisent l'expression des gènes nod bactériens qui gouvernent la production des facteurs Nod (BENJAMIN, 2007).

IV.1.2.Phase de l'infection et de la formation des nodules

L'infection consiste en la pénétration des B.N.L en différents points du système racinaire. Il se forme dans le poil absorbant, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectieux (Fig1.3). Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection, puis les nodosités se forment par multiplication des cellules infectées.

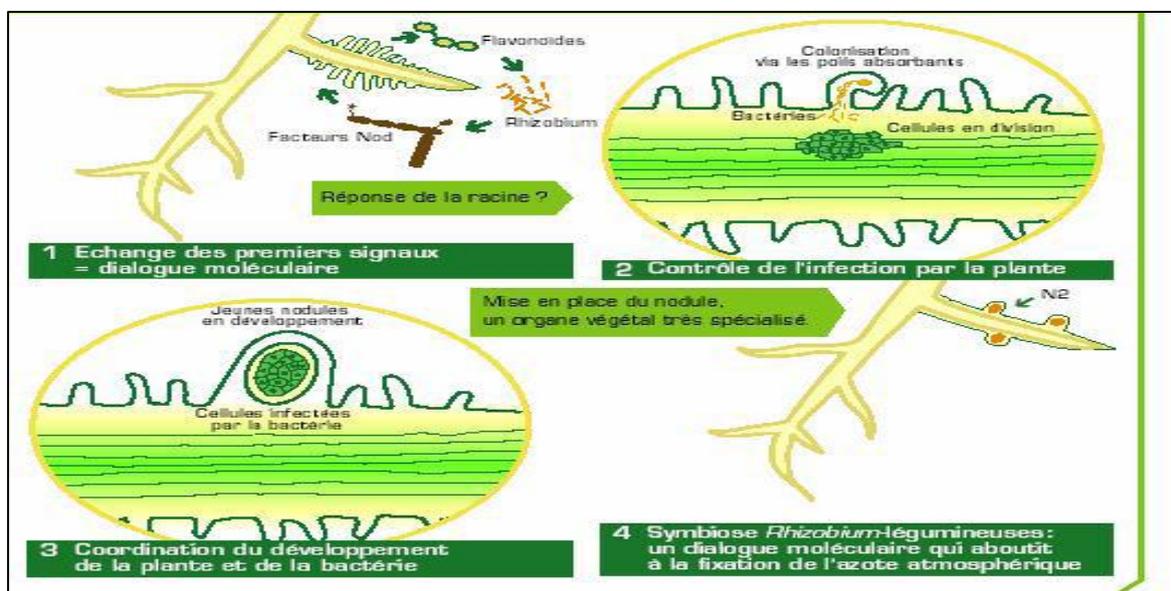


Figure 1.3 .L'infection et la nodulation (JOURNET, 2004)

IV.1.3. Phase de dégénérescence

L'étape finale dans le processus d'infection se déroule lors de la lyse des bactéroïdes et de la libération des bactéries dans le sol.

VI. Morphologie du nodule

Dans la famille des légumineuses, la morphologie des nodules et le type de nodosité développée est déterminé par la plante hôte. Deux types majeurs de nodosités. Sont souvent distingués en se basant sur l'existence ou non du méristème persistant:

VI. 1. Nodosités à forme indéterminée

De nouvelles cellules apicales sont continuellement infectées. Cela résulte en une forme cylindrique de la nodosité. Ces nodosités sont connues chez les légumineuses des zones tempérées (Sulla, pois, *Vicia sp*, *Medicago sativa* L., etc...) (SANA, 2011).

VI. 2. Nodosités à croissance déterminée

Les cellules infectées engendrent d'autres cellules infectées et la nodosité grandissant par expansion acquerront une forme sphérique. Ce type de nodosité existe seulement chez les légumineuses des zones tropicales telles que le soja et le haricot (SANA, 2011).

V. L'inoculation

L'inoculation est la pratique qui consiste à introduire les souches de Rhizobia dans l'écosystème plante-sol.

L'inoculation des légumineuses est un moyen de s'assurer que la souche de Rhizobia la plus adaptée, et en nombre suffisant, soit présente dans la rhizosphère et permette une nodulation abondante allée à une bonne fixation d'azote.

Malgré les difficultés qui peuvent survenir pendant l'inoculation des légumineuses, sa pratique est simple. Le but de cette manœuvre est d'assurer une fixation élevée d'azote.

V.1. Les inoculant à légumineuses (Rhizobia)

Les semences des légumineuses doivent être mélangées avec les Rhizobia afin de les inoculer, il est important de bien faire ces inoculation lorsqu' il n y a jamais eu de légumineuse dans la rotation.

Les Rhizobia restent dans le sol plusieurs années, et il n'est pas toujours nécessaire d'inoculer les plantes de nouveau par la suite. Chaque légumineuse doit être inoculée avec l'espèce de Rhizobia qui lui convient (WILL et DUVAL, 2009).

V.2. Les types d'inoculations

Deux types d'inoculation sont utilisés: l'application aux graines et l'application au sol.

V.2. 1. L'application aux graines (enrobage)

L'application de l'inoculum à la surface des graines avant le semis est la méthode traditionnelle de l'inoculation . Cette méthode est plus effective car elle permet la mobilité des Rhizobia dans la rhizosphère quand l'inoculum est mixé avec de l'eau.

V.2. 2. L'application au sol (liquide)

L'inoculum appliqué au sol est réalisé dans le sillon au moment du semis avec de l'herbicide ou de l'insecticide. Ce type d'inoculum est plus facile à utiliser mais son coût est plus élevé (KANNAIYAN et al, 2000).

V.3. Les avantages de L'inoculation des légumineuses

L'inoculation des semences des légumineuses est une pratique devenue courante, Les avantages de cette méthode peuvent être résumés dans les points suivants:

- A)** Neutralisation de l'acidité du sol ou de l'engrais ou des deux dans le micro-environnement des semences permettant une survie accrue des rhizobia.
- B)** Le semis aérien des semences inoculées devient une opération pratique beaucoup plus efficace. La mort presque complète des bactéries de l'inoculum était fréquemment constatée dans le cas de semis aérien, la graine et l inoculum n'étant pas suffisamment protégés.

- C)** En cas de retard entre l'inoculation et le semis, une augmentation dix fois plus importante de la survie des bactéries sur des semences enrobées de chaux est constatée. On peut conserver ces semences pendant une semaine avant de les utiliser.
- D)** Une nodulation plus rapide et plus complète surtout lorsque les pluies tardent à venir et que les semences restent dans le sol sans pouvoir germer (ANONYME, 1972).

Chapitre II

Materiel et méthodes

I. Echantillonnages

I.1. Collecte des sols

Le sol utilisé pour cette étude a été prélevé de manière aléatoire dans l'horizon de surface (0-20 cm), des différentes régions des wilayas suivantes :

-Biskra (Choucha, Ain ben naoui, El hadjeb, Manbaa al ghezlane, Ain el karma)

-Batna (Tamara)

-El Oued (Regiba) (Fig. 2.4), Ces échantillons ont servi à la détermination des caractéristiques physico-chimiques du sol.

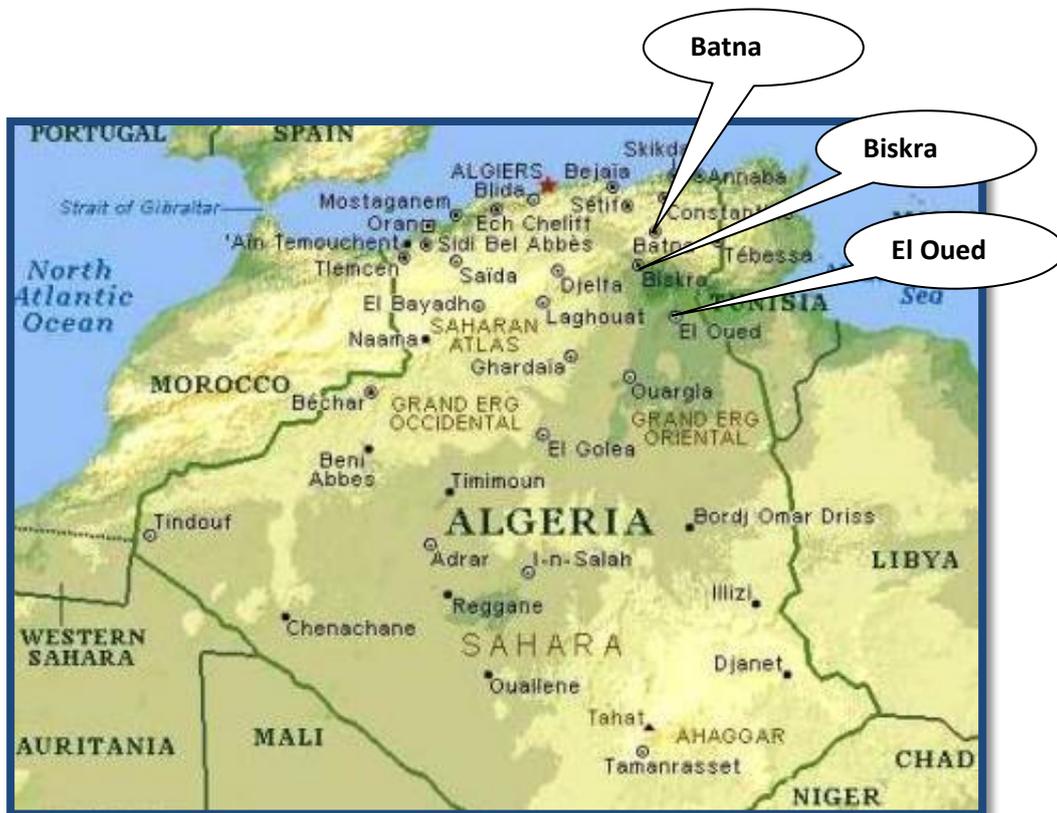


Figure 2. 4. Sites des collectes des sols

I. 2. Analyse physico-chimique des sols

Les différentes analyses ont été effectuées au laboratoire de l'institut d'agronomie Université Mohamed Khider Biskra.

I.2.1. Mesure du pH

Chacun des 07 échantillons du sol tamisé a été mis en suspension dans un bécher (20g de sol pour 50ml d'eau distillée), ce dernier est mis à agiter pendant 5min puis laisser reposer 15 minutes avant la mesure. Le pH-mètre utilisé (Fig. 2.5) est préalablement étalonné à l'aide de deux solutions, l'une à pH 7 et l'autre à pH 4 (CAVARD, 2005).



Figure .2.5. pH- mètre (pH 211micro processor pH micro HANNA)

I.2.2.La conductivité électrique

La conductivité électrique a été calculée avec rapport 1/5, en mélangeant 10 g de sol et 50 ml d'eau distillée dans un bécher, après 15 min on filtre, puis on mesure la conductivité à l'aide conductimètre (ms/cm) (Fig. 2.6).

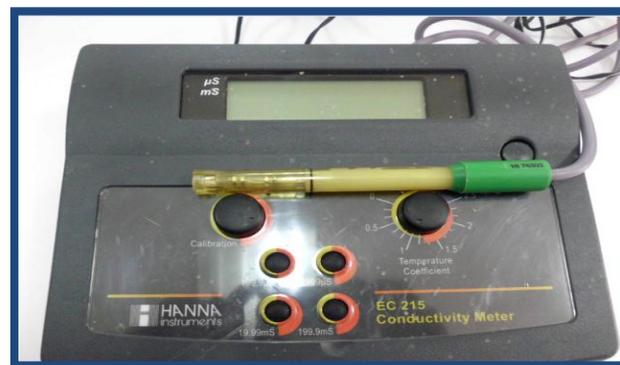


Figure 2.6. Conductimètre (EC212 conductivité mètre)

I.2.3. Dosage du calcaire total

A partir d'un échantillon tamisé, on prélève 1g de terre fine pour un échantillon à une teneur présumée en CaCO_3 de 20-39.9% et 0.5g pour 40-79.9%.

Verser la prise d'essai dans l'erenmeyer et introduire le tube contenant HCl en prenant soin de garder le tube vertical et ne pas le verser sur la prise d'essai. Relier l'erenmeyer au calcimètre (Fig. 2.7) et équilibrer la pression en ramenant au zéro de la colonne, le niveau d'eau de l'ampoule par le dispositif prévu.

Verser l'acide contenu dans le tube sur la prise d'essai en inclinant la fiole et agiter énergiquement en tenant la fiole par le col et en évitant tout échauffement, suivre et équilibrer en permanence le niveau d'eau de la colonne et celui de l'ampoule, noter le volume V_1 après stabilisation du volume de gaz dégagé.

Dans les mêmes conditions et avec les mêmes réactifs procéder à une prise d'essai de 0.3g de CaCO_3 et noter le volume correspondant V_2 (AFNOR, 1987).

Calcule le calcaire total par la formule suivant :

$$\text{CaCO}_3(\%) = (V_1 \times 0.3 \times 100) / P \times V_2$$

P : pois de sol

V_1 : volume d'échantillon

V_2 : volume de témoin

P : poids de sol



Figure 2.7. Calcimètre Bernard (photo originale)

I.2.4. Dosage du calcaire actif (Méthode Drouineau)

Introduire dans un flacon de 250 ml 1 g de sol, ajouter 100 ml de solution oxalate. Agiter 2H à l'aide d'un agitateur rotatif, filtrer la solution dans un bécher de 250ml, reprendre les premiers ml du filtrat et refiltrer.

Prélever avec une pipette de 20 ml de la solution d'extraction. Ajouter 100 ml d'eau distillée puis 5ml de H₂SO₄.

Chauffer sans dépasser 60/70 °C puis titrer par KMnO₄ (solution de permanganate) 0, 2 N jusqu'à coloration rose persistante (Fig. 2.8). Noter le n le volume de KMnO₄ utilisé.

Refaire les mêmes étapes pour le témoin mais sans sol.



Figure 2. 8. La titration de calcaire actif

- Le pourcentage de CaCO₃ se calcule suivant la relation :

$$\text{CaCO}_3(\%) = 5 \times (N - n)$$

N : volume de permanganate de témoin

n : volume de permanganate d'échantillon

I.2.5. Dosage du Phosphore assimilable (méthode Joret –Hebert)

A- Extraction

- Peser 4g de terre broyée et passer au tamis de 2 mm ; introduire dans un flacon d'agitation de 150ml.
- On ajoute 100 ml de la solution d'oxalate d'ammonium 0.2N, agiter à l'aide d'un agitateur pendant 2 heures et filtrer à l'aide du papier filtre.

B- Dosage

Les dosages sont effectués sur un volume de 10 ml dans des tubes à essai.

On ajoute 1.5 ml de prise d'essai et 2 ml de réactif sulfomolybdique et 6.5ml de solution d'acide ascorbique puis homogénéiser les solutions et chauffer au bain – Marie bouillant pendant 10 à 12 min .

Laisser refroidir et faites la lecture au spectrophotomètre (Fig. 2.9) à 650nm.



Figure 2.9. Le dosage de phosphore assimilable

- **Etablissement de la gamme**

Les dosages sont effectués sur un volume de 10 ml dans des tubes à essai bien homogénéisé, la réduction de l'acide phosphomolybdique est obtenue en maintenant les tubes au bain-Marie bouillant entre 80 et 100° C pendant 10 à 12 min, les solutions viront au bleu.

Tableau 2.2. Préparation la concentration de la gamme

N °de tube	0	1	2	3	4	5
Solution KH ₂ PO ₄ (50ppm)/ml	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Oxalate d'ammonium (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Réactif sulfomolybdique (ml)	2	2	2	2	2	2
Acide ascorbique (ml)	6,5	6,4	6,3	6,2	6,1	6,0
Concentration finale (ppm)	0	0,5	1	1,5	2	2,5

- **Le calcul**

La quantité de phosphore assimilable est trouvée selon la relation suivante :

$$P_2O_5(\text{ppm}) = X \times U \times V/p \times v$$

X : concentration lue sur graphique en mg/l de P₂O₅.

U : volume colorimètre (10ml).

V : volume de prise d'essai (1,5ml).

V : volume de la solution d'extraction (100ml).

P : poids de la prise de terre.

I.2.6. Dosage de Na et K

- **Les échantillons**

Le dosage de sodium et potassium est effectué, à partir de 20g du sol passée au tamis de 2mm.

Dans bécher de 500ml contenant 100ml d'eau distillée avec agitation pendant 2 heures. Après un repos d'une heure, on passe à la filtration.

- **Les gammes d' étalonnages**

A. Le sodium

Préparer la solution mère de concentration 1000 ppm par addition de 2,543g de NaCl dans un 1L d'eau distillée .A partir de cette solution mère, faire venir des solutions de 100ml a la concentration suivant : 10, 20, 40, 60, 80,100.

B. Le potassium

Préparer la solution mère de concentration 1000 ppm par addition de 1,910g de KCl dans un 1L d'eau distillée, puis préparer des solutions à concentration : 10, 15,20, 25, 30, 35,40.

Le dosage est réalisé à l'aide d'un photomètre à flamme (Fig. 2.10), premièrement on passe la gamme la plus concentres (100pour Na et 40pour k) trois fois et entre eux ont fait passer l'eau distillée, ensuite on retourne à la gamme la moins concentrée. Après la lecture des autres gammes, on passe les différents échantillons du sol.



Figure 2.10. Photomètre à flamme (JEWWAY RFP7)

II. Matériel végétal

La plante choisie est l' *Hedysarum coronarium L*, connue sous le nom Sulla.
Les graines sont collectées pendant le mois d'aout dans la région de Constantine

II.1. Stérilisation des graines

La stérilisation est faite par l'acide sulfurique concentré suivant les étapes ci-dessous:

1 - Placer les semences dans un erlenmeyer stérile et recouvrir d'une demi-boîte de Pétri stérile.

2 - Ajouter de l'acide juste assez pour recouvrir les graines, pour permettre la stérilisation et la scarification des graines pendant 10 min, puis égoutter l'excès d'acide.

3 - Ajouter de l'eau stérile à un volume suffisant pour dissiper la chaleur générée par la réaction exothermique, rincer et vider l'eau du premier rinçage, cette opération doit se faire rapidement pour éviter la chaleur tuant les graines, continuer de rincer avec cinq changements d'eau.

4 - placer les graines (avec de l'eau distillée stérile) toute la nuit dans le réfrigérateur pour que les graines absorbent et se gonfler bien.

5 - Les graines sont mises à germer sur boîtes de gélose pendant 3 à 7 jours à température ambiante (Fig 2.11), loin de la lumière c'est pour ça Les boîtes sont couvertes avec de papier aluminium. (SOMASEGARAM, et HOBEN, 1994)

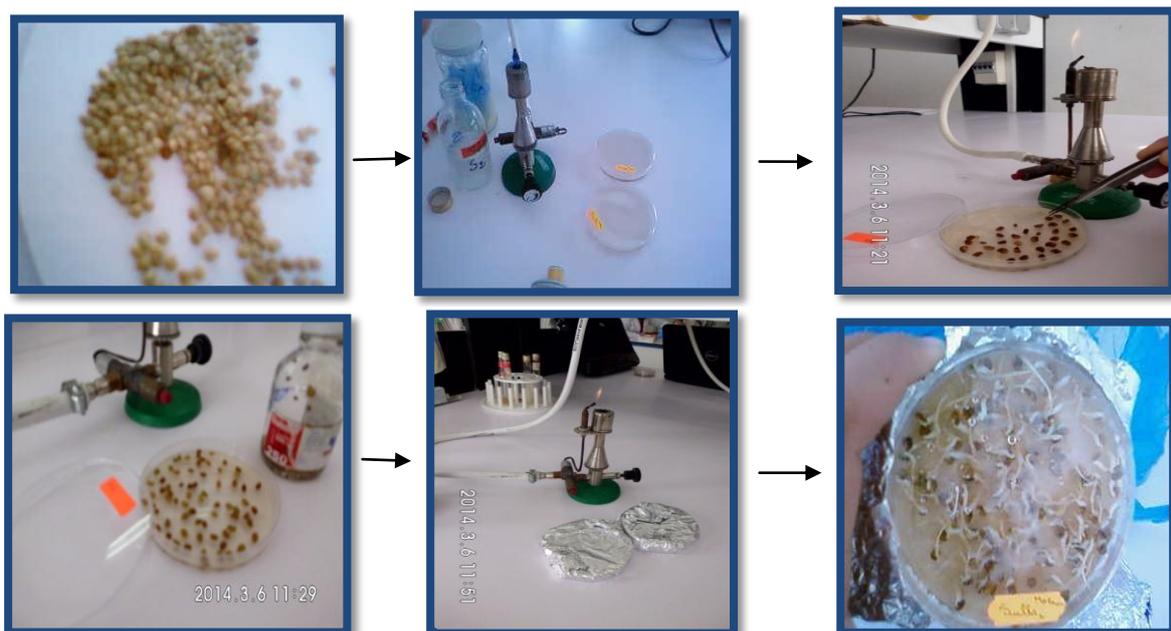


Figure 2. 11. Etapes de germination des graines (photo originale)

II.2.Le Semis

Le semis a eu lieu dans des pots en plastique, il a été effectué manuellement à raison deux graine par pot, et à une profondeur d'environ 2à4cm. (Fig. 2.12). Les pots ont été par la suite inoculés puis placés sous serre (Fig. 2.13). 07 témoins ont été utilisés dans cet essai non inoculés (témoins), et 07 inoculée par souche bactérie A₆ (*Rhizobium sulla* sp nov. RH A₆). L'essai a été maintenu 30 jours après l'inoculation, le résultat a été évalué par voir des nodosités sur les racines.



1 -Gousses de Sulla



2 –Graines de cor tiquée

Figure 2.12. Les graines utilisé dans cette étude ; Sulla (*Hédysarum coronarium*)



Figure 2.13.Pot de semis (photo originale)

II.3. Méthodes d'inoculations

- **Préparation d'inoculum**

Deux erlenmeyer contenant 100 ml d'Yeast-Mannitol-Broth (voir Annexe5). Chaque erlenmeyer est inoculé par 1 ml de la souche A₆, cette souche est provenue, du laboratoire des Biotechnologie de l'Université de Constantine, du port du professeur .A. Ben guadiouira.

Cultivés sur Tryptone-Yeast-Agar (voir Annexe 5), Puis incubé dans un étuve à 28°C, l'incubation dure 3 jours durant le quelles, des échantillons sont effectués.

La première mesuré est prise directement après l'inoculation (t = 0), la lecture est faite dans un spectrophotomètre à densité optique ($\lambda = 600 \text{ nm}$) est mesurée régulièrement t=24h, t=48h. Ces mesures sont faites pour détecter la phase exponentielle de cette souche et expliquée la croissance bactérien.

- **L'inoculation**

Après avoir planté les graines à une profondeur de 2 à 4 cm, chaque pot est inoculé par 1 ml d'une suspension bactérienne (A₆) cultivée sur Tryptone-Yeast-Agar à 28° C (Fig 2.14), la chambre de croissance doit être réglée à 23°C le jour et 18 °C à la nuit .mais le manque de cette chambre nous a conduit mettre les pots dans une serre au niveau de notre institut.



Figure 2.14. Méthode de plantation et d'inoculation (photo originale)

Chapitre III

Résultats et discussions

I. Les résultats d'analyse physico-chimiques du sol

I.1.Le pH

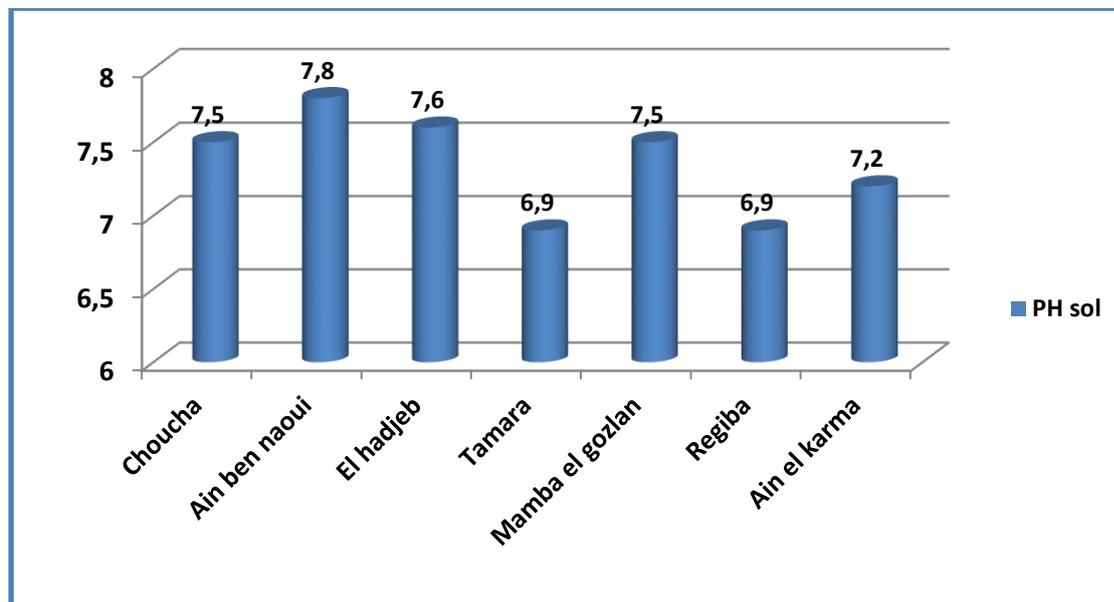


Figure 3.15. pH du sol des régions d'étude

En générale, les résultats obtenus montre le pH des régions d'étude est proche. Selon les normes de Baize (2000) (Voir Annexe 2), on a trouvé le pH du sol de Choucha, Tamara, Manbaa el ghezlane, Regiba, Ain el karma sont neutres, il varie de 6,5 à 7,5, par contre le reste des régions Ain ben naoui, et El hadjeb sont caractérisées respectivement par un sol basique (pH 7,5 à 8,7). Le pH neutre se rencontre dans les régions de Tamara, et Choucha où on a observée une poussée et une croissance rapide d' *H coronarium* et une présence des nodosités sur leurs racines. Le résultat négatif de la nodulation du Regiba, malgré son pH neutre, peut s'expliquer par l'incapacité de la souche de s'intégrer dans la région semi-aride surtout que la plante est originaire de zones tempérées. Contrairement au sol d'Ain ben naoui ayant un pH basique conduisant à l'absence des nodules. Il est à signaler que le pH a un effet sur la fixation symbiotique de l'azote.

D'après GUNASKARAN et BALACHANDAR (2000) Le pH du sol affecte également les deux partenaires de la symbiose (Bactéries-légumineuse), en général un pH de 6.0 à 7.0 fournit un environnement optimal à l'assimilation d'azote, plus le sol est acide, moins la biomasse microbienne est importante.

De façon générale, les plantes absorbent les nutriments du sol si ces derniers sont dissous dans l'eau. Le pH du sol, quant à lui, influe sur la solubilité des nutriments et sur l'activité des

organismes qui sont responsables de la transformation de la matière organique et de la fixation de l'azote.

Cette étude est en accord avec l'étude du DOMMERGUES et MONGENOT(1970), qui rapporte que le pH neutre ou légèrement alcalin est plus favorable au phénomène de la nodulation et de la fixation d'azote.

WOLIGORO et TETU (2008) ont montré l'influence de pH sur la nodosité en indiquant que l'activité des rhizobia est différente selon le climat et le pH. Dans les zones tempérés, la nodulation est plus active sur les sols neutres ou légèrement acides, et il y'a une baisse de nodulation sur les sols acides.

I.2 .Conductivité électrique

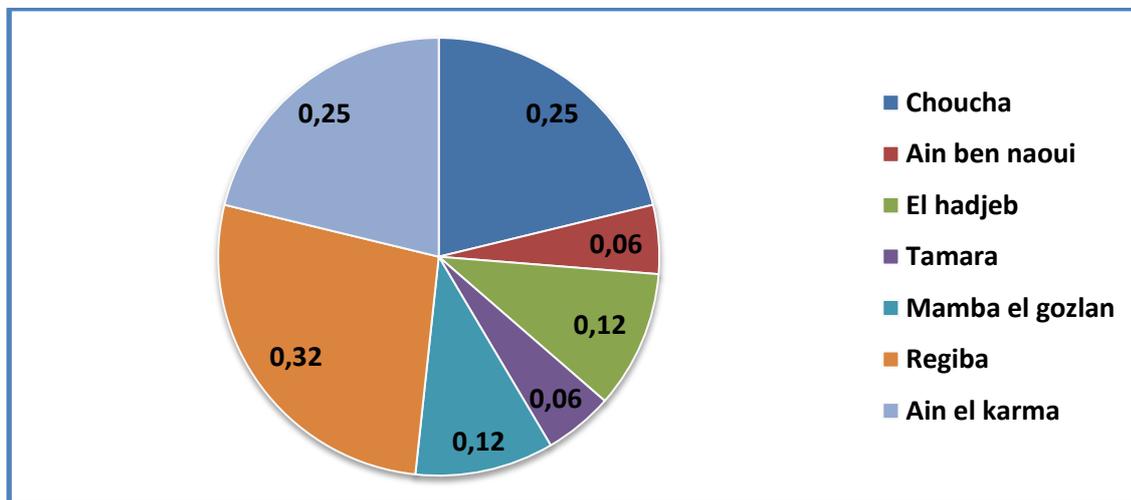


Figure 3.16. La conductivité des régions d'étude

D'après les résultats consignés dans le secteur ci-dessus, on peut dire que la salinité des sols varie de 0.6 jusqu'à 0.32 ms/cm (valeur maximale à Regiba ayant enregistré une nodulation négative). De la norme d'interprétation des mesures de la salinité du sol (AUBERT, 1978), les sols des régions d'étude sont non salés, prouvant que ces des sols sont pauvre en minéraux. Ainsi KHABTONE (2010) a rapporté que les sols sont salés si la CE est supérieur à 02.

I.3.Dosage sodium et potassium

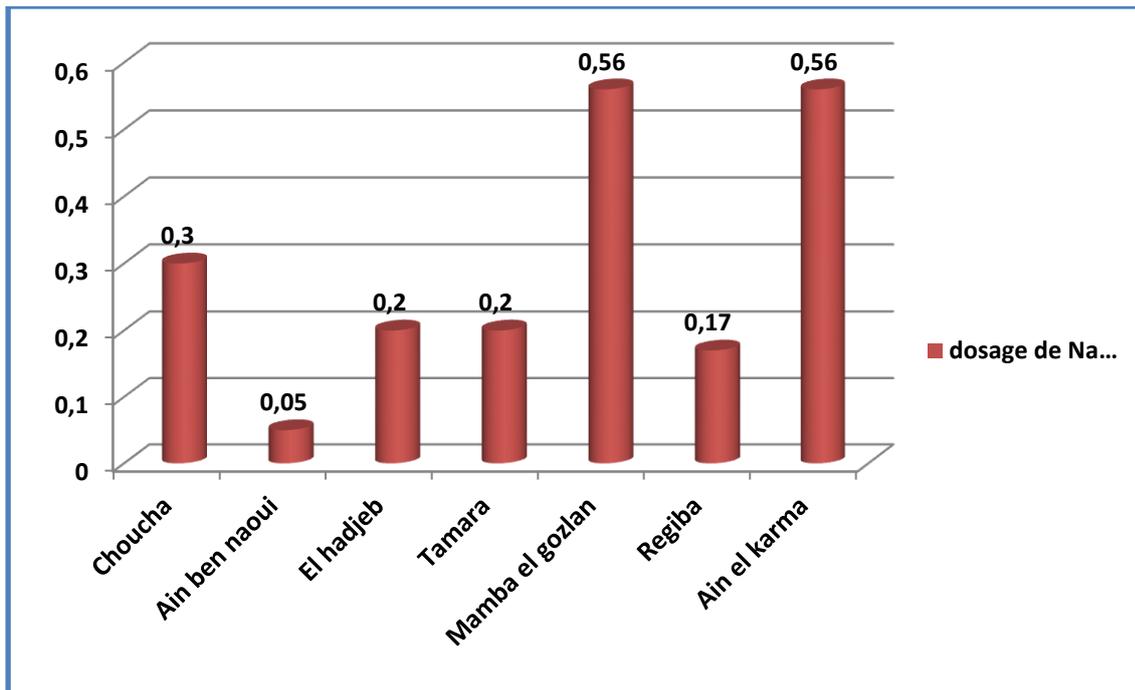


Figure 3. 17.Le dosage de sodium dans les régions d'étude

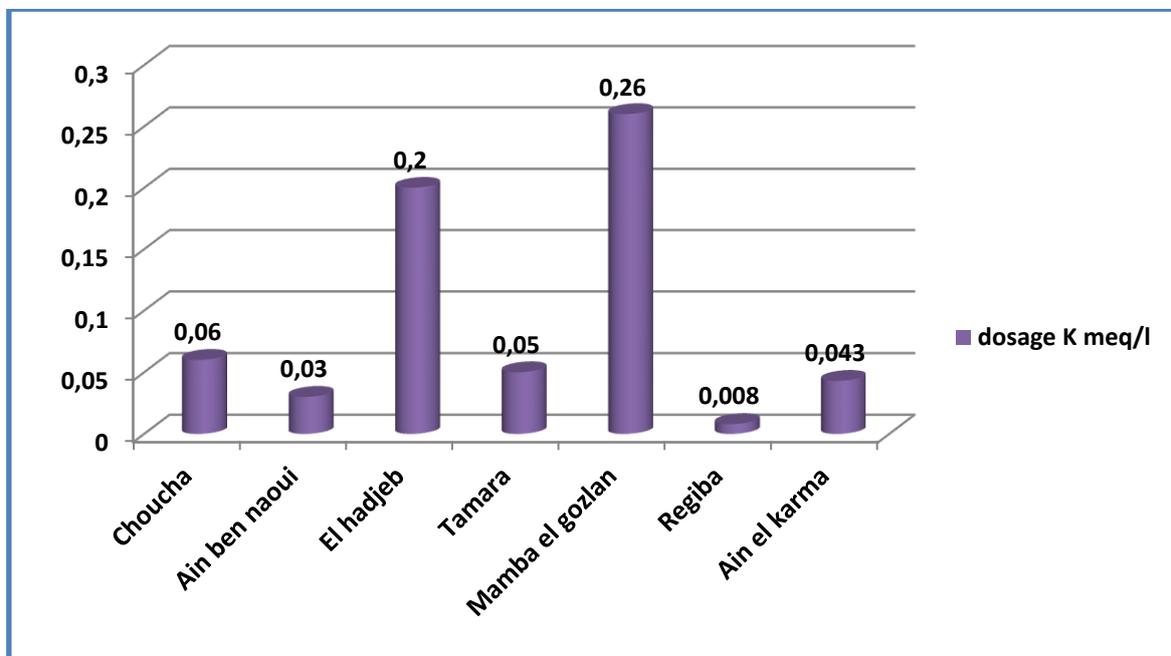


Figure 3.18. Dosage de potassium dans les régions d'étude

La concentration de sodium et de potassium est différente dans nos échantillons. On remarque que la concentration de sodium est relativement élevée dans les sols de Ain el karma et Manbaa, et elle varie de la plus faible 0.05 à Ain ben naoui jusqu'à 0.30 à Choucha, par contre la concentration de potassium est basse sauf les échantillons d'El hadjeb et Manbaâ enregistrant des concentrations élevées qui sont respectivement 0.2 et 0.26. Selon l'Institut de Recherche pour le Développement(IRD) les concentrations de Na et K ont un rôle d'accroître la quantité de sels dans les sols et leur teneur dépendent à des types d'argile de chaque sol (ROLAND, 2013).

La conductivité électrique est un indice de la teneur de la solution de sol en éléments minéraux, et elle exprime approximativement la concentration des sels solubles dans les sols. A partir de la concentration des sels minéraux dans les sols étudiés qui est relativement élevée au niveau de sol d'Elhadjeb, Ain el karma et Manbâa, ayant de concentrations de sodium et potassium élevés. Cela probablement a une influence sur la nodulation des plantes dans les échantillons du sol et sur la croissance de plantes ou on a obtenue des pots vides sans aucune croissance sauf à Manbaa

Selon ROPERT(1960), la présence de concentration élevé des sels dans la solution du sol peut être liée à la pression osmotique élevé et empêche les plantules de s'alimenter en eau où les racines ne peuvent tirer l'eau du sol dans la quelle les éléments nutritifs se trouvent solubilisés. Contrairement aux sols de Tamara, et Choucha qui présentent de sol non salé avec une faible teneur en sels minéraux, c'est pour ça on a observé une croissance des plantes et présence des nodosités sur les racines. Ces résultats se concordent à l'étude de SINHA(1980), montrant que le stress salin inhibe la croissance des micro-organismes et en générale inhibe la nodulation.

Ainsi WOLIGORO et TETU (2008) montre que le stress salin affecte à la fois les population rhizobienne et les légumineuses hôtes. La formation des nodules est extrêmement sensible à la présence de NaCl par réduction des sites d'infection de la racine et du nombre de poils absorbants. Des résultats ont été décrits par CORDOVIALL et *al.* (1996) chez d'autre légumineuse et par SOUSSI et *al.* (1998) chez le pois chiche, montrent que la salinité a inhibé la fixation de l'azote .La Salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules.

Cependant les travaux suggèrent que l'accumulation des ions toxique (Na^+ et Cl^-) dans la nodosité peut affecter le métabolisme dans ces organes et inhiber leur activité nodulaire (MOUAFEK ,2006)

I.4. Calcaire total

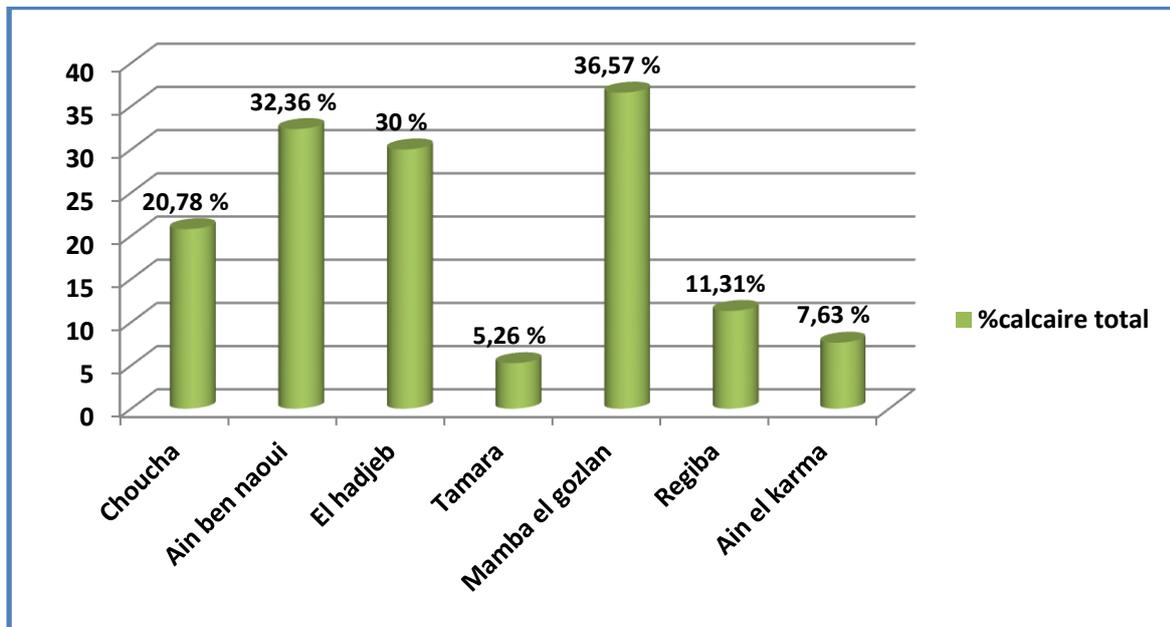


Figure 3.19. Pourcentage du calcaire total dans les régions d'étude

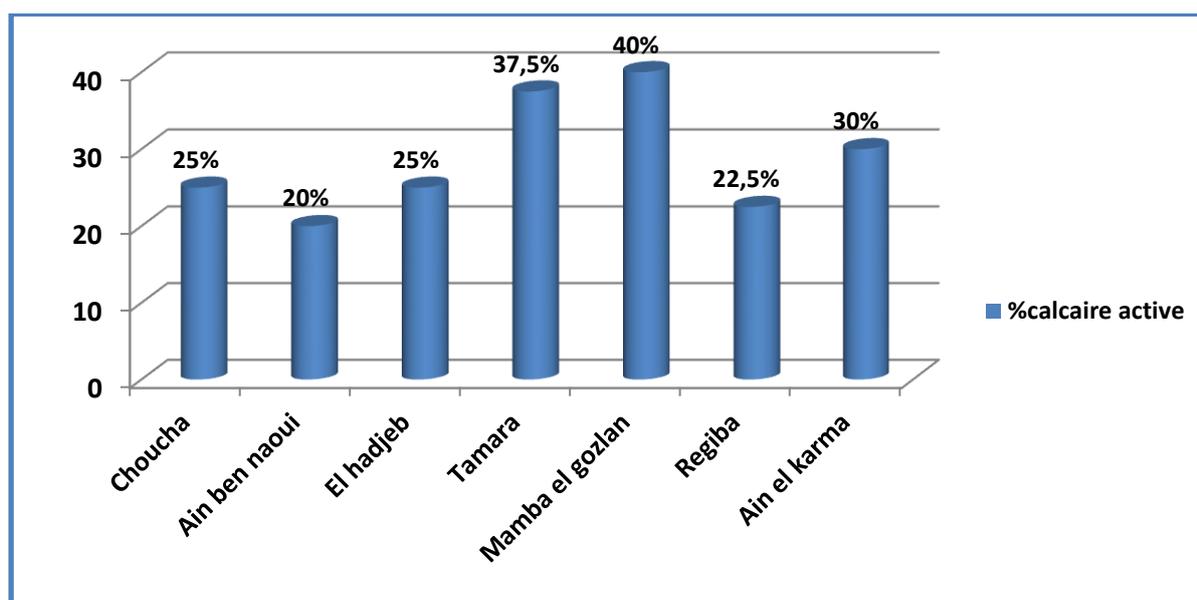
Nous constatons selon les résultats consignés dans le graphique (fig. 3.19), que la teneur du carbonate de calcium des sols oscille entre 5.8 et 36.57%, d'après les normes de BAIZE (2000) (Tabl 3.5) ces résultats signifient un sol modérément calcaire (5 à 25%), sauf la région de Tamara, qu'on peut déduire que c'est un sol peu calcaire entre (1 à 5%).

Le calcaire joue un rôle important non seulement dans la nutrition des plantes mais aussi dans la pédogénèse de sol.

Tableau 3. 4 : Normes d'interprétation du taux du calcaire totale du sol BAIZE(2000)

Taux du calcaire%	Appréciation
< 1	Non calcaire
1 à 5	Peu calcaire
5 à 25	Modérément calcaire
25 à 50	Fortement calcaire
50 à 80	Très fortement calcaire
>80	Excessivement calcaire

I.5.Calcaire actif

**Figure 3.20.** Pourcentage du calcaire actif dans les régions d'étude

Le taux de calcaire actif dans la plupart des régions d'étude est élevé et il n'existe pas une relation entre les taux de calcaire total et active dans le même sol, par exemple Tamara modérément calcaire mais le taux de calcaire actif est plus élevé.

D'après MAIGNIEN(1969), un sol est dit riche en calcaire actif lorsque le taux de ce dernier dépasse 10%, ce qui est enregistré avec tous nos échantillons dont le pourcentage de calcaire actif diffère de 20 - 40%. Pour discuter ce test, il doit être complété par l'analyse de

la granulométrie mais la panne du l'appareil enregistré nous a poser un problème de discussion

I.6. Phosphore assimilable

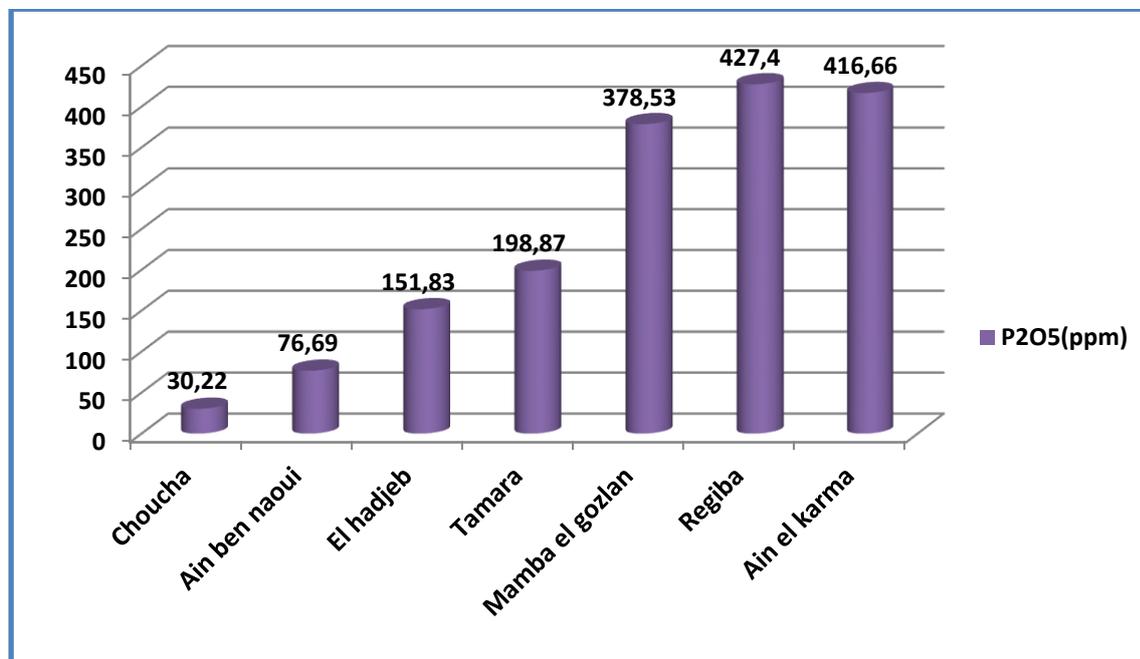


Figure 3.21. Les concentrations de phosphore du sol des échantillons

Le phosphore joue un rôle majeur dans la photosynthèse et le développement des enzymes et des protéines. Il intervient aussi de façon importante dans la division cellulaire de même que dans la fabrication et le transport des glucides et des amidons (MAAARO ,2011)

Le manque de phosphore dans le sol a également un effet inhibiteur sur la nodulation et la fixation de N₂.

Les résultats obtenus du dosage du phosphore assimilable par la méthode de «Jorret-Hebert» font ressortir trois niveaux différents de phosphore et ce, d'après la norme d'interprétation habituellement employé dans cette méthode (JORET et HEBERT 1955)

- Niveau élevé pour le sol de Mambaa el ghozlan et Regiba Ain el karma .
- Niveau normal en phosphore pour l'échantillon de Tamara et Elhadjeb.
- Et les autres régions étudiées (Choucha, Ain ben naoui) sont caractérisées par un sol très faible en teneur de phosphore inférieure à 100.

D'après TIBAOUÏ et ZOUAGHI(2003), le phosphore modifie la fixation de l'azote atmosphérique ainsi que le poids des nodules chez de nombreuses légumineuses. L'apport de

phosphore sous forme assimilable améliore le développement du système racinaire et l'efficacité de nodule. Une carence en phosphore provoque une accumulation d'acide aminés libres et un ralentissement de la croissance par de diminution de la synthèse protéique.

Ainsi WOLIGORO et TETU (2008) ont montré que certains micro-organismes des légumineuses ont de grandes facultés à mobiliser le phosphore du sol qui va bénéficier à la plante.

Malgré que le taux de phosphore soit faible dans les régions Tamara, et Choucha, on a obtenu une nodulation. Par contre les autres régions enregistrant une grande concentration du phosphore, une nodulation négative est enregistrée.

D'une façon générale, Le travail est une première démarche qui doit se répéter les années prochaines, on peut pas arriver à des résultats dès le première test, on est fixé par le temps, c'est pour ça on n'a pas fait une deux ou trois répétition pour arriver à un résultat significatif.

II. Résultats du prélèvement des plantes

Vue les dates de soutenance fixés par notre Département, on été obligé de vérifier la présence des nodules après seulement 21 jours (la période s'étale normalement sur 2 mois). Les racines sont soigneusement lavées puis détecter la formation des nodosités, les résultats sont enregistrés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.5. Les résultats des plantations

Les régions	Témoins		Echantillon inoculée par A ₆
	Présence des plantes	Présence des nodules	
Choucha	+	-	+
Ain ben naoui	-	-	-
El hadjeb	-	-	-
Tamara	+	-	+
Manbaa el ghezlane	+	+	+
Regiba	+	-	-
Ain el karma	-	-	-



Choucha (S)



Tamara (S)



Manbaa el ghezlane (T)



Manbaa el ghezlane (S)

Figure 3.22. Les résultats positifs (présence de nodules)

Tous les résultats positifs (fig. 3.22) sont révélées par la présences des nodosités sur les racines d' *H coronarium*, dans les échantillons des sols de Choucha, Tamara et Manbaa el ghezlane . un résultat négatif de la nodulation est enregistré dans les plantes inoculée du sol de Ain ben naoui et El Hadjeb, Regiba et Ain el karma.

Les résultats de nodulation de *Sulla* montrent de tout évidence la formation des nodules par les plantes varie selon la région et le type d'inoculum. Ces résultats sont en accords avec les travaux de CARTHAGE (1998) et MONTPLLIER (2000).

Le nombre de nodule est très faible et localisé dans la racine principale.

Les résultats de Tamara et Choucha confirme l'occupation des plantes par les souches testées car les témoins ont répondu négativement.

Les résultats obtenus correspondent avec ceux obtenus par MAKO et *al.*, (2010) qui supposent que le taux de nodulation est très élevée dans les parcelles inoculées que dans les parcelles témoins.

Le fait de trouver des nodules dans les pots témoins et les pots inoculés de Mambaa el ghezlane, nous oblige à faire des tests pour différencier entre les rhizobies existantes dans le sol et les rhizobies inoculés c'est-à-dire, est-ce que la plante inoculée avec la A6 est nodulée par la souche propre du sol de Mambaa el ghezlane ou la A6 ; Cela est permis par des études de la biologie moléculaire ex : (Analyse de séquençage 16S) malheureusement cela n'est pas disponible au niveau de notre laboratoire.

Conclusion

Conclusion

Dans notre étude, nous avons essayé d'envisager l'influence de certains paramètres physico-chimiques du sol des différentes régions et aussi tester l'effet de l'inoculation sur la nodulation de la plante *Hedysarum coronarium*.

Concernant la croissance des plantes étudiées elle a été variable selon la nature du sol. L'absence de plantes dans quelque échantillon peut être expliqué par des conditions défavorables au niveau de l'institut, tel que l'indisponibilité du chambre de culture réglée. La présence des nodules sur la majorité des pots inoculés révèle que la plantes répondue positivement à l'inoculation, surtout pour le sol de Tamara.

Les résultats obtenus suite aux analyses physico-chimique du sol montrent que l'espèce *Hedysarum coronarium* et les bactéries symbiotiques peuvent s'adapter aux conditions des régions (zones tempérées). En enregistrant un pH neutre ou légèrement alcalin qui est plus favorable à la nodulation.

Les sols salins constituent un environnement défavorable pour les légumineuses. Il est inhébe la nutrition des plantes et ralentissement la circulation de l'eau, qui peut être responsable à l'arrêt du développement de nos espèce au niveau des sols du Regiba, Ain el karma.

La stress salin influence négativement sur les bactéries symbiotiques et inhébe la formation des nodules par réduction de site d'infection de la racine.

Ainsi les résultats obtenus montrent que les légumineuses préfèrent le sol calcaire.

Une forte concentration on phosphore, est enregistré dans les sols d'El-hadjeb et Ain el karma , qui doit favoriser la fixation d'azote marqué par le développement des nodules, mais malheureusement, un résultat négatif est enregistré avec les échantillons du sol de deux régions, il font chercher dans l'avenir la cause.

Enfin on peut conclure que Les rhizobia est une bactérie naturellement présente dans les sols mais certaines souches sont spécifiques de la légumineuse semée, et la formation des nodules peut être liée à l'adaptation de la plante- hôte et les bactéries avec le milieu.

Cette étude est une première démarche dans l'étude de tester la capacité de la nodulation *Hedysarum coronarium* dans des régions aride et semi arides.

Ces tests doivent être confirmés dans l'avenir par des répétitions et pourquoi pas faire le travail directement dans les stations pour mieux exploiter les résultats. Sans oublier de différencier entre les souches indigènes et les souches inoculées par de méthode d'identification.

Référence bibliographique

Référence bibliographie

- AFNOR .1987. - Qualité des Sols. Méthodes d'analyse. Recueil de normes françaises, Paris, 135p.
- ALI C., DANIEL C., MOHAMED M.1982 . Hérité et analyse chromatographique de la pigmentation des fleurs chez l'espèce *Hedysarum coronarium* L.C.N.R.S., Laboratoire de Physiologie et Génétique du développement des plantes, F 91190 Gif-sur-Yvette 2(10) :914-922.
- ANONYME. 2002. Activités biologiques et fertilité des sols. Intérêts et limites des méthodes analytiques disponibles.
- ANONYME.1972. Inoculation et traitement à la chaux des semences de légumineuse .Edition, Centre ORSTOM de NOWEA, p.1.
- AUBERT. 1978 . Méthode d'analyse des sols C.R.D.P. Merseille ,p.188.
- BAIZE D. 1988 .Guide des analyses courantes en pédologie. Choix. Expression. Présentation interprétation, INRA, Paris, p.172.
- BAIZE D. 2000 .Guide des analyses en pédologie. Edition, INRA, Paris, p.97.
- BENJAMI P. 2007.Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse doctorat, Université Montpellier II II, 71p.
- CALVET R. 2003 .Le Sol. Propriétés et fonctions. Edition, France Agricole, 456 p.
- CAN J. 2001. Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum biovartrifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Microbiol* 47: 590–593.
- CARTHAGE ,1998 ., MONTPLLLIER ,2000.Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. INRA, Paris, 411p.
- CAVARD X.2005.Ecologie de la fixation symbiotique de l'azote par les légumineuses. Edition, INRA, p.15.
- CRAAQ. 2003. Guide de référence en fertilisation. Edition, Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, Sainte-Foy xx, 294 p.
- DELMOND F., BOUCHE M. 2006 .Formation à la production de semences maraichères - Nature & Progrès/Semailles – légumineuse, p.1.
- DOMERGUE O 2006. Diversité de rhizobia associés à Onions Repeus : une légumineuse adapté aux milieux méditerranéens. UMR, Montpellier

- DOUCET R. 2006. Le climat et les sols agricoles. Edition, Berger, Eastman, Québec. xv, 443 p.
- FLOGEAC K . 2004. Etude de la capacité de rétention de Produits phytosanitaires aires par deux solides model des sols. Influence de la présence des cations métalliques, Université de Reims-Champagne –Ardenne, 156 p.
- HANNACHI S, A., BAATOUT. 2004. - Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI – FAO, Issue No.130, pp. 65 -72.
- JORRET G., HEBERT J 1955. Contribution à la détermination du besoins des sols en acide phosphorique. AGRON, Ann
- JOURNET E.P. 2004. Symbioses racinaires. Fiche 4. L’agriculture peut-elle utiliser Legumes. Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. 39:1-32.
- KHABTANE A. 2010. Contribution à l’étude du comportement ecphysiologique du genre tamarix das différents biotopes des zones aride de la région de Khanchla :Ecologie Végétale. Thèse de Magistère, université Mentouri, Constantine, 158
- MAAARO. 2011. Recommandations pour les cultures fruitières : Ministère de l’Agriculture, de l’Alimentation et des Affaires rurales de l’Ontario .34p
- MAOUGAL R . T. 2004.Techniques de production d’inoculum Rhizobial. Etude de cas pois chiche (*Cicer arietinum. L*) : Inoculation et nodulation. Mémoire de Magister, Université Mentouri de Constantine ,89 p.
- MAXTED., BENNETT S.J. 2001. Conservation, diversity and use of Mediterranean moins d’engrais.
- MOUAFEK A . 2006. L’effet de la salinité sur la nodulation chez la fève (*Vicia faba L*).Mémoire de fin d’étude pour but de l’obtention du Diplôme d’ingénieur d’Etat en Agronomie, 34 p.
- PIERRE B., MICHELE G ., MARCEL G. 2003. Description statistique des propriétés chimiques des sols minéraux du Québec. Agriculture, pêcheries et alimentation .Edition ,IRDA ,p.2.
- PIERRE D.1996.Vie microbienne du sol et production végétale. Edition, INRA, Paris, p.81.
- ROBERT P., Claus B. 2001.Chimie de l’environnement air, eau, sols, déchets, Paris ,347 p.
- ROLAND P. 2013. Les sol, des milieux vivants très fragil. IRD
- ROPERT M.1996. Les sols cultives.2^{ème} edition, Paris, p.2.

- SANA D F. 2011. Diversités phénotypique et moléculaire du micro symbiotes du sulla du nord (*Hedysarum coronarium L*) et sélection de souches Rhizobiales efficaces. Thèse doctorat,142 p.
- SIOBHAN S., HERVE Q ., JOSEPH S.E.I. 2011. Fonctionnement des phosphatases dans les sols tropicaux : influence de la composition organo-minérales sur l'expression de l'activité enzymatique. Thèse doctorat . Université de COCODY- ABIDJAN, p .145.
- SOMASEGARAM P., HOBEN H.J.1994. Hand book for Rhizobia .Edition, New York ,367 p.
- SPOSITO G. 1989.The chemistry of soils, Oxford University Press, New York.
- STEINHARDT G.C. 2008. Particle-size distribution, In: Ches worth, W. Edition, Encyclopedia of Soil Science. Springer-Verlag GmbH, Heidelberg Germany, pp. 505-510.
- STENGEL P., GELIN S., COORD. 1998. Sol interface fragile, Paris, 231 p.
- Thierry H . 2013. Symbioses Plantes -Microorganismes. Edition, Cécile Viret, p.25.
- TRITI-FARAH N., CHATTI W.S., MARRAKCHI M et PERNEST J.1989. Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium L*.en Tunisie. Amélioration des plantes 9,591-598.
- VICTOR N. 2006 .Substance humique du sol et du compost analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs : vers une approche thermodynamique. Thèse Doctorat, École doctorale : Transferts, Dynamiques des fluides, Energétiques et Procédés, p.20.
- WILL A. DUVAL J. 2009.fertilisants autre que les fumiers et les composts, p.8.
- WOLIGORO C., TETU T. 2008. Légumineuse. Technique cultural simplifiée. 48 : 12-22
- WWW.googl.dz/search-tarakiclub.org 04/2014

Annexe

Annexe 1

1. Réactif sulfomolybdique

- Dissoudre 3,75g de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dans un bécher de 500 ml contenant environ 15 ml d'eau distillée.
- Dans un bécher de 1000 ml, ajouter 28 ml de H_2SO_4 pur à 20 ml d'eau. Après refroidissement, verser lentement la solution molybdique tout en agitant doucement, laisser refroidir ; verser la solution dans une éprouvette de 1L et compléter avec de l'eau distillée, conserver dans un flacon fume au réfrigérateur.

2. solution d'acide ascorbique

- Peser 0,1 g d'acide ascorbique ; introduire dans un ballon jauge de 1000 ml, et compléter à 1L avec l'eau distillée.

3. solution d'orthophosphates

- Peser 1,917g de dihydrogenophosphate de potassium (KH_2PO_4), introduire dans une fiole jaugée de 1000ml, dissoudre et compléter à un litre avec de l'eau distillée (solution de 1000ppm).
- Préparer une solution de 50ppm pour l'établissement de la gamme.

4. solution d'extraction

- Peser 14,2 g d'oxalate d'ammonium introduire dans une fiole de 1 L et dissoudre avec l'eau distillée chaude sous agitation, après refroidissement ; compléter à 1 L (solution à 0,2).
- Vérifier le pH de la solution d'oxalate d'ammonium qui doit être compris entre 6,5 et 7, ajouter si besoin est quelques gouttes d'ammoniaque.

5. solution $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

- Dissoudre 49,04g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ séché à 200°C dans 01L d'eau distillée.

6. Indicateur à la diphenylamine

- Dissoudre 0,5g dans un mélange de 20ml d'eau distillée et de 100ml d'acide sulfurique concentré. diluer d'abord l'acide sulfurique dans l'eau sous jet d'eau (réaction exothermique puis y dissoudre l'indicateur).

Annexe 2

7. Sel de mohr 1N

- Dissoudre 278g de sulfate de fer $\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dans 800ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 1000 ml, ajouter 5ml de $\text{H}_2 \text{SO}_4$ concentré et compléter avec de l'eau distillée.

8. Tableau 4. Interprétation les résultats du pH (BAIZE, 2000)

Valeur du pH	Statut acido-basique
Inférieur à 3.5	Hyper- acide
3.5 à 4.2	Très- acide
4.2 à 5	acide
5 à 6.5	Peu acide
6.5 à 7.5	neutre
7.5 à 8.7	basique
Supérieur à 8.7	Très basique

9. Tableau 5. Interprétation de la conductivité électrique (AUBERT,1978)

Les domaines d'interprétation	Les normes d'interprétation
Inférieur à 2	Non salé
2 à 4	Peu salé
4 à 8	Salé
8 à 20	Très salé
Supérieur à 20	Extrêmement salé

Annexe 3

10. Tableau 6. Interprétation les résultats de calcaire total (BAIZE, 1988)

Les domaines d'interprétation	Les normes d'interprétation
1%	Non calcaire
1-5%	Peu calcaire
5-25%	Moderment calcaire
25-50%	Fortement calcaire
50-80%	Très Fortement calcaire
Supérieur à 80%	Excessivement calcaire

11. Calcule le pourcentage de phosphore

$$P_2O_5(\text{ppm}) = X \times U \times V/p \times v$$

X : concentration lue sur graphique en mg/l de P_2O_5 .

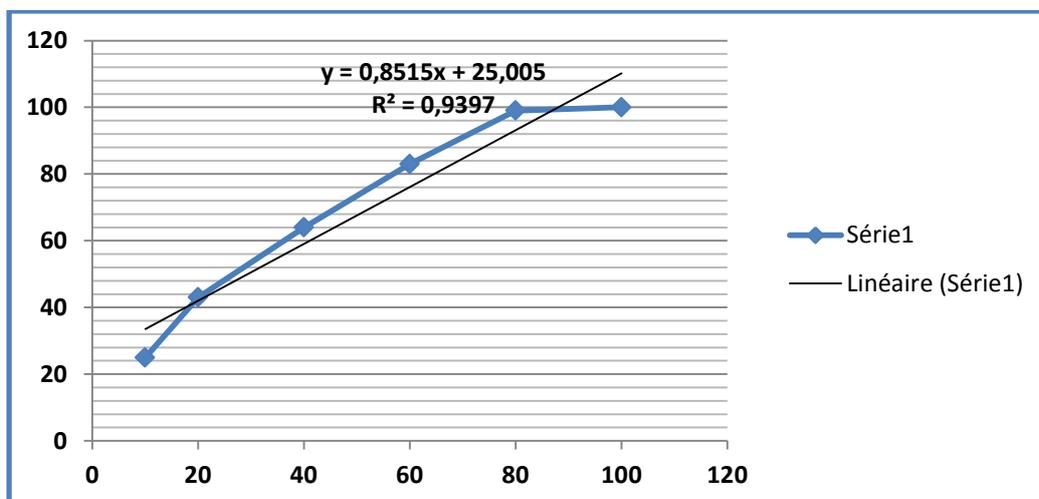
U : volume colorimètre (10ml).

V : volume de prise d'essai (1,5ml).

V : volume de la solution d'extraction (100ml).

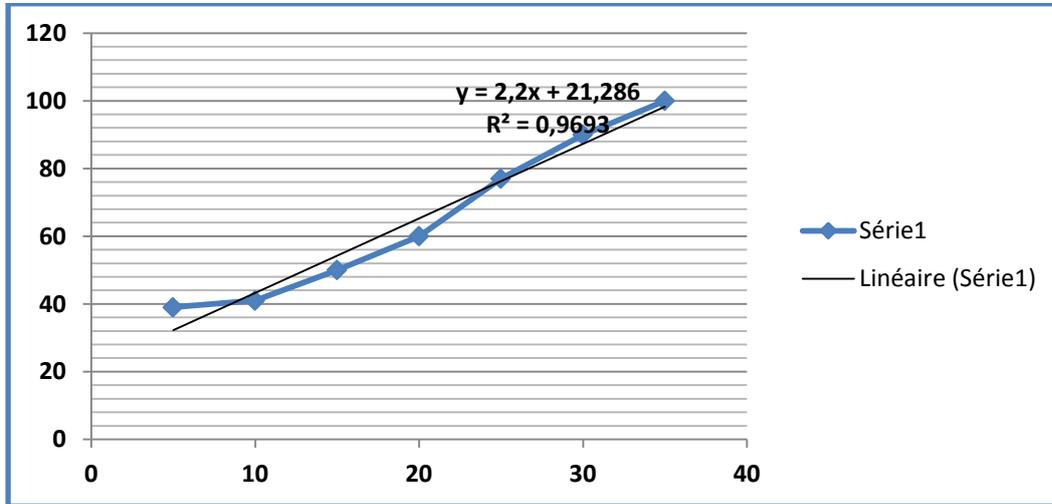
P : pois de la prise de terre.

12. Le courbe de étalonnage de sodium

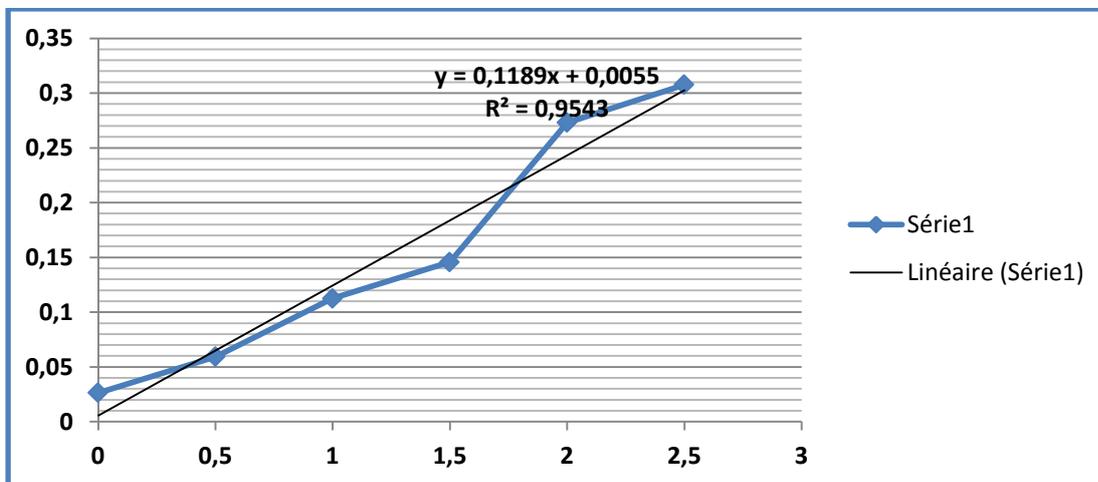


Annexe 4

13. Le courbe d'étalonnage de calcium



14. Le courbe d'étalonnage de phosphore



Annexe 5

15. Les compositions des milieux de culture

15.1. Tryptone-Yeast-Agar (TY) (BERINGER, 1974)

Tryptone 10

Extrait de levure 3

CaCl₂.6H₂O 0.1 (stérilisé séparément)

Eau distillée 1000 ml

PH: 6.8

15.2. Yeast-Mannitol-Broth (YMB)

K₂HPO₄ 0.5

MgSO₄.7H₂O 0.2

Nacl 0.1

Mannitol 10

Extrait de levure 0.4

Eau distillée 1000 ml

PH : 6,9

Résumé :

Une très grande majorité des légumineuses sont capables d'entrer en symbiose avec des bactéries du sol, principalement le *Rhizobium*, et forment des nodosités sur leurs racines.

La différence de production des nodules peut être liée à une adaptation des bactéries ou de plante hôte avec leur milieu.

Notre étude vis à évaluer l'impacte de l'inoculation par des bactéries symbiotiques et tester l'effet de certains paramètres physico-chimiques du sol sur la capacité de *Hedysarum coronarium L* à la formation des nodosités.

Les résultats obtenus montrent l'influence de ces facteurs tel que pH élevé, le stress salin et le carence en élément nutritif, sur la capacité de survie des BNL donc leur aptitude à former des nodules.

Mots clés : symbiose, *Rhizobium*, nodule, inoculation, *Hedysarum coronarium*. BNL

Abstract :

A vast majority of legume capable of entering into symbiosis with soil bacteria, *Rhizobium* mainly, and form nodules on their roots.

The difference of nodule production can be related to an adjustment of the host plant or bacteria with their environment.

Our study is evaluating the impact of inoculation with symbiotic bacteria and the effect of some physico-chemical parameters of soil and the ability of *Hedysarum coronarium* nodule formation.

The results show the influence of these factors such as high pH, salt stress and nutrient deficiency, the survivability of BNL hence their ability to form nodules.

Key Words: symbiosis, *Rhizobium*, nodule, inoculation, *Hedysarum coronarium*.

ملخص:

غالبية البقوليات لها القدرة على التعايش مع بكتيريا التربة، خاصة الريزوبيوم، وتشكيل عقد على جذورها.

الاختلاف في إنتاج العقد يمكن أن يرتبط بتكيف البكتيريا أو النبات مع الوسط.

دراستنا تهدف إلى تقييم اثر التلقيح ببكتيريا تعايشية، و اختبار تأثير بعض المعلمات الفيزيائية و الكيميائية للتربة على قدرة *Hedysarum coronarium* لتشكيل العقد الجذرية.

أظهرت النتائج المتحصل عليها تأثير هذه العوامل مثل: درجة الحموضة العالية، الملوحة و نقص المغذيات على قدرة BNL حية و بالتالي قدرتها على تشكيل العقد الجذرية.

الكلمات المفتاحية: التعايش، الريزوبيوم، العقد الجذرية، بكتيريا تعايشية، *Hedysarum coronarium* ، BNL