

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
Frères Mentouri Constantin I University
Université Frères Mentouri Constantine I

N° d'ordre : 25/D3C/2020

N° de série : 02/MB/2020

THÈSE

En vue de l'obtention de doctorat 3^{ème} cycle

Option : Ecologie microbienne

Thème

Mise en évidence des Bactéries Nodulantes les
Légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum*
Desf., poussant dans différents écosystèmes de
l'Algérie

Présentée par :

BOUKAOUS Leyla

Le : 29/06/2020

Devant le jury :

Président : Kitouni Mahmoud

Pr. UFMC1, Constantine

Rapporteur : Benhizia Yacine

Pr. UFMC1, Constantine

Examineurs : Bendjemana Katia

Pr. Univ. Abbas Laghrour, Khenchela

Hamidechi M. Abdelhafid

Pr. UFMC1, Constantine

Invité : Benguedouar Ammar

Pr. UFMC1, Constantine -Retraité-

Année universitaire: 2019-2020

Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant pour m'avoir donné la force et le courage d'accomplir ce travail.

Au terme de ce parcours aussi passionnant qu'escarpé et avant d'exposer le fruit de ces années d'efforts, il m'est particulièrement agréable en ces quelques lignes de remercier et d'exprimer ma reconnaissance envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse Pr. Yacine BENHIZIA, pour la grande confiance qu'il m'a témoignée dès mon master jusqu'à aujourd'hui. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de ma reconnaissance pour ses conseils, son humanisme, ses encouragements et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail

Je voudrai remercier les membres de jury d'avoir accepté sans hésitation d'évaluer mon travail : Mr. Mahmoud KITOUNI de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Mme. Katia BENDJEMANA et Mr. Mohamed Abdelhafid HAMIDECHI, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr. Ammar BENGUEDOUAR d'avoir accepté notre invitation. Votre présence est un grand honneur pour moi.

Mes vifs remerciements vont à Mme Hadda Imene OUZARI, Professeur à l'université de Tunis El Manar et directrice du Laboratoire Microorganisme et Biomolécules Actives (LMBA) en Tunisie, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour l'aide compétente. Je la remercie également pour sa bienveillance, ses conseils qui m'ont apportés tout au long de stage.

Mention spéciale à la tutrice Raoudha FERJANI, docteur à l'université de Tunis El Manar, pour son soutien, sa qualité humaine et son aide précieuse pendant la période du stage et durant la rédaction de l'article. Qu'elle trouve ici le témoignage de mon estime et l'expression de ma profonde gratitude.

J'exprime aussi ma reconnaissance à toute l'équipe du laboratoire LMBA et plus particulièrement à Wajdi MIMOUNI, ingénieur de laboratoire LMBA, pour l'excellent accueil, les conseils avisés et la bonne humeur partagée.

Durant ces années de thèse, j'ai eu la chance de côtoyer de nombreuses personnes attachantes, que toutes soient remerciées pour les bons moments partagés, pour leur aide et pour leurs encouragements. Je pense notamment : à la fameuse équipe de mon laboratoire (Laboratoire 14) : Radja, Meriem, Basma, Wissem, Hanane, Maroua, Sabira, Maya, Asma, Mouna, Razika, Fatima et Rabeh pour l'ambiance familiale partagée et la bonne humeur contagieuse. À Yacine NASRI, Mohamed GANA, Brahim DJOUDI, Oualid MENADI, Mohamed BENJEBALLAH, Assia GUENDOUIZ, Samiha MEHASNI, Sami GUEDDOU et Moussa LOUATI pour leur soutien et leur disponibilité chaque fois que je leur ai demandé de l'aide. À Hadjer BENAMMAR avec qui j'ai partagé des moments inoubliables en Tunisie.

J'exprime également mes remerciements à Mr. Azzedine LHADEF, Dounia KEDDARI, et Mr. KADDEM pour m'avoir aidé dans l'analyse physico-chimique du sol.

Je ne saurais oublier de remercier la sécurité du bloc de sciences, mes collègues de département de Microbiologie, enseignants, personnel et les ingénieurs des laboratoires tout particulièrement Ammar BOUFRIOUA, Saddek SLOUGUI et Nabil BOUDERSA pour leur aide précieuse.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mes amies d'enfance Amani et Asma et toutes mes amies qui pendant toutes ces années étaient là pour me soutenir.

J'en oublie certainement et je vous prie de bien vouloir m'en excuser ...

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À Mes chers parents Larbi et Fahima Roukia pour tous leurs efforts, leurs soutiens inconditionnels dans les moments importants de ma vie qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs. Aucune dédicace ne saurait être assez expressive pour exprimer ma gratitude pour tous vos sacrifices pour moi.

Merci pour tout.

À mes très chères sœurs Lynda, Racha, Assia et son mari Lakfimi, Kamilia et son mari Nabil et mon cher frère Mouhamed, qui ont été très patients avec moi et qui m'ont toujours encouragé afin d'aller toujours plus loin.

À les prunelles de mes yeux, mes chères nièces : Roua, Layen, Miral et mon cher neveu Mounib.

Votre fierté de moi me vaut tous les diplômes du monde

Aux BNL....

je dédie ce travail

Leyla

“Rien de grand ne se fait sans patience”

Résumé

Une collection de 81 isolats a été obtenue à partir des nodules de la plante fourragère *Hedysarum pallidum* Desf. (Desfontaine) poussant dans six sites différents sur le plan géobioclimatique en Algérie. Une caractérisation préliminaire des isolats porte sur des tests phénotypiques et symbiotiques. L'amplification des régions intergéniques transcrites 16S-23S (ITS) et le séquençage partiel du gène ADNr 16S ont permis l'assignation des isolats représentatifs à la classe des *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* et le phylum des *Firmicutes*, ceci témoigne une diversité dans la population bactérienne associée aux nodules d'*Hedysarum pallidum*. Fait intéressant, cette étude a également signalé pour la première fois l'isolement des rhizobiums cultivables nodulant *Hedysarum pallidum*. De plus, l'Électrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant (DGGE) a mis en évidence la prédominance de l'espèce non cultivable *Mesorhizobium camelthorni* au niveau de tous les sites testés.

Mots clés : *Hedysarum pallidum* Desf., Nodules, Diversité, rhizobiums, DGGE, *Mesorhizobium camelthorni*

Abstract

A collection of 81 isolates was obtained from fodder plant *Hedysarum pallidum* Desf. (Desfontaine) nodules growing in six geobioclimatic sites in Algeria. A preliminary characterization of the isolates underwent phenotypic and symbiotic tests. The amplification of transcribed intergenic regions 16S-23S (ITS) and the partial 16Sr DNA gene sequencing allowing the assignment of representative isolates to the class of *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and the phylum of *Firmicutes*, which indicates a high bacterial diversity associated with *Hedysarum pallidum* nodules. Interestingly, this study reported for the first time the isolation of culturable rhizobiums nodulating *Hedysarum pallidum*. Moreover, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) highlighted the predominance of the non-culturable species *Mesorhizobium camelthorni* at all tested sites.

Key words: *Hedysarum pallidum* Desf., Nodules, Diversity, rhizobiums, DGGE, *Mesorhizobium camelthorni*

ملخص

تم الحصول على 81 عزلة من عقيدات النبتة العلفية (*Hedysarum pallidum* Desf. (Desfontaine) التي تنمو في ستة مواقع مناخية جغرافية مختلفة في الجزائر. التوصيف الأولي للعزلات تضمن اختبارات مظهرية و تكافلية. سمح التضخيم الداخلي لـ ANDr 16-23S وتسلسل الجين ADNr16S الى تعيين و توزيع ممثلات العزلات الى *Firmicutes*، مما يدل على التنوع البكتيري المرتبط بالعقد الجذرية *Hedysarum pallidum*. ومن المثير للاهتمام، أن هذه الدراسة أفادت أيضاً للمرة الأولى في عزل rhizobiums القابلة للزرع في العقد الجذرية لـ *Hedysarum pallidum* Desf. ومن ناحية أخرى ، لقد اثبت التشنت الكهربى للهلام (DGGE) ، غلبة النوع الغير قابل للزرع *Mesorhizobium camelthorni* في جميع المواقع التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية : *Hedysarum pallidum* Desf. ، العقد الجذرية ، التنوع ، rhizobiums ، DGGE ،

Mesorhizobium camelthorni

Table des Matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1. La fixation biologique de l'azote	3
2. La symbiose Légumineuse - BNL	4
2.1. Généralités	4
2.2. Le partenaire végétal : Les légumineuses	5
2.3. Le genre <i>Hedysarum</i>	5
2.3.1. Présentation de la plante hôte <i>Hedysarum pallidum</i> Desf.....	7
2.3.2. Classification	8
2.3.3. Description botanique.....	8
2.4. Le partenaire bactérien : Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL)	10
2.4.1. Taxonomie des BNL	10
2.4.2. Méthodes d'étude des BNL: Approches moléculaires	12
2.4.2.1. Les approches de cultures - dépendantes.....	13
2.4.2.2. Les approches de cultures-indépendantes	15
3. Mise en place de la symbiose	17
3.1. Formation de nodule	17
3.2. Types de nodosités	19
3.3. Les facteurs et les gènes impliqués dans la symbiose	20
4. Interaction bactéries Endophytes - plante	24
5. Les paramètres environnementaux influant la symbiose BNL-Légumineuses	27

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Échantillonnage, collecte et conservation des nodules	30
2. Étude de la diversité bactérienne cultivable	33
2.1. Isolement, purification et conservation des isolats	33
2.2. Caractérisation phénotypique des isolats	34
2.2.1. Caractères morphologiques et culturaux.....	34
2.2.2. Test de Bleu de Bromothymol (BTB).....	35
2.2.3. Caractères biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques).....	35
2.2.3.1. Réduction des nitrates	35
2.2.3.2. Hydrolyse de l'urée	35
2.2.3.3. Détection de l'activité endoglucanasique	36
2.2.4. Caractères physiologiques (Tolérance aux stress abiotiques).....	36
2.2.4.1. Effet de pH.....	36
2.2.4.2. Effet de la salinité.....	36
2.2.4.3. Effet de la température.....	36
2.3. Caractérisation génotypique et phylogénétique des isolats.....	37
2.3.1. Extraction de l'ADN bactérien.....	37
2.3.2. Amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	38
2.3.3. Séquençage et Analyse phylogénétique.....	40
2.4. Authentification des isolats (Test de nodulation).....	41
2.5. L'identification biochimique	44
2.5.1. Galerie API 20E.....	44
2.5.2. Galerie API 20NE	44
2.5.3. Galerie API 50CHB - Bacillus	44
3. Étude de la diversité bactérienne totale des nodules par DGGE (Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)	45
3.1. Extraction de l'ADN total à partir des nodules	45
3.2. Amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR-DGGE).....	45
3.3. Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)	46
3.4. Réamplification et séquençage des bandes DGGE.....	47
4. Analyses physico-chimiques du sol.....	47
4.1. La texture du sol	47

4.2. Dosage du calcaire total	47
4.3. Mesure du pH du sol	48
4.4. Mesure de la conductivité électrique (CE).....	48
4.5. L'Analyse statistique	49

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Étude de la diversité bactérienne cultivable.....	50
1.1. Caractérisation phénotypique des isolats.....	50
1.1.1. Caractères morphologiques.....	50
1.1.2. Caractères culturaux (Test de Bleu de Bromothymol)	52
1.1.3. Caractères biochimiques	52
1.1.3.1. Réduction des nitrates.....	52
1.1.3.2. Hydrolyse de l'urée.....	53
1.1.3.3. Détection de l'activité endoglucanasique.....	54
1.1.4. Caractères physiologiques	56
1.1.4.1. Effet de pH	56
1.1.4.2. Effet de la salinité	58
1.1.4.3. Effet de la température	61
1.2. Caractérisation génotypique et phylogénétique des isolats.....	62
1.3. Authentification des isolats (Test de nodulation)	68
1.4. Identification biochimique	71
2. Étude de la diversité bactérienne totale des nodules par DGGE.....	74
3. Analyses physico-chimiques du sol	76
3.1. Texture du sol	76
3.2. Calcaire total	77
3.3. pH du sol	78
3.3. La conductivité électrique	78
Conclusion et perspectives.....	82
Références bibliographiques.....	84

Annexes

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNL	Bactéries Nodulant les Légumineuses
BTB	Bleu de Bromothymol
CMC	Carboxy-méthyl-cellulose
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis
dNTPs	Desoxyribo nucleotid triphosphates
DO	Densité Optique
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
ITS	Internal Transcribed Spacer
pb	Paire de base
TBE	Tris – Acide borique – EDTA
YMA	Yeast Mannitol Agar

Liste des Figures

Figure 1 :	Schéma représente le processus de fixation biologique de l'azote	4
Figure 2 :	Pied, gousses et graines d' <i>Hedysarum pallidum</i>	9
Figure 3 :	Diagramme schématique de la distribution des espèces bactériennes nodulant les légumineuses appartenant aux classes α et β <i>proteobacteria</i>	11
Figure 4 :	Organisation de l'opéron de l'ADN ribosomique observé chez les procaryotes d'après El Hilali (2006).	14
Figure 5 :	Représentation schématique de la dénaturation progressive de fragments d'amplification dans un gel de DGGE (Massias, 2008).....	17
Figure 6 :	Mécanisme de formation de nodules dans la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse (Singh <i>et al</i> , 2019).....	19
Figure 7 :	Types de nodosité.....	20
Figure 8 :	Organisation des gènes <i>nodet nif</i> . D'après Madigan et Martinko (2007).....	22
Figure 9 :	Mode d'entrée des rhizobiums et des endophytes non rhizobiens à l'intérieur des racines des légumineuses (Ibañez <i>et al.</i> , 2017).....	26
Figure 10 :	Coupe transversale d'une racine (La complexité du microbiote bactérien (Cluà <i>et al.</i> , 2018)	27
Figure 11 :	Localisation géographique des sites de prélèvements.....	30
Figure 12 :	Nodules collectés à partir de différents sites de prélèvement	32
Figure 13 :	Conservation des nodules sous CaCl ₂ (Vincent, 1970).....	33
Figure 14 :	Appareillage utilisé dans l'amplification et la révélation des fragments d'ADN ciblés.....	39
Figure 15 :	Germination des graines	42
Figure 16 :	Test de nodulation d' <i>Hedysarum pallidum in vitro</i>	43
Figure 17 :	Dispositifs d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant	46
Figure 18 :	Dosage du calcaire total à l'aide du calcimètre de Bernard.....	48
Figure 19 :	Conductimètre utilisé dans la mesure de la conductivité électrique.....	49

Figure 20 :	Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques souches isolées à partir de différents sites.....	51
Figure 21 :	Test de Bleu de Brmotymol (BTB).....	52
Figure 22 :	Hydrolyse de l'urée.....	54
Figure 23 :	L'activité endoglucanase.	55
Figure 24 :	Pourcentage des souches isolées productrices d'enzymes (nirates réductase, uréase, endoglucanase).....	56
Figure 25 :	Effet du pH.....	58
Figure 26 :	Effet du NaCl.....	60
Figure 27 :	Effet de température.....	61
Figure 28 :	Comparaison des profils ITS utilisant le logiciel FP Quest.....	63
Figure 29 :	Profils électrophorétiques de l'amplification du gène ADNr 16S chez certains isolats (M : marqueur de taille 1KB, T : Témoin négatif).....	66
Figure 30 :	Arbre phylogénétique utilisant la méthode de Maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) établie sur la base des séquences partielles des ADNr16S des isolats et des souches de références.....	65
Figure 31 :	Observation sous binoculaire des racines latérales d' <i>Hedysarum pallidum</i> cultivée en solution hydroponique de Fahræus.....	70
Figure 32 :	Résultat de la galerie API 20 E après 24 h code n° 3305573, souche BA11....	72
Figure 33 :	Profils DGGE des fragments d'ADNr16S amplifiés de la communauté bactérienne totale des nodules racinaires d' <i>Hedysarum pallidum</i> dans différentes régions de l'Algérie	75
Figure 34 :	Normes d'interprétation du pH-eau du sol (Mathieu <i>et al.</i> , 2003).....	78
Figure 35 :	Analyse en composantes principales des sols en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques.....	79
Figure 36 :	Pourcentage de diversité au niveau des genres bactériens dans les différents sites étudiés.....	80

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Les espèces du genre <i>Hedysarum</i> développées en Algérie, rapportées par Quezel et Santa (1962) et Greuter (1989).....	7
Tableau 2 :	Caractéristiques écologiques des sites de prélèvement.	31
Tableau 3 :	Souches de référence utilisée dans notre étude.	34
Tableau 4 :	Séquences des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des différents fragments d'ADN.	41
Tableau 5 :	Identification biochimique et moléculaire des souches par le système API et le séquençage du gène ADNr16S.....	73
Tableau 6 :	Caractéristiques physico-chimiques des sols	76
Tableau 7 :	Normes d'interprétation du taux du calcaire du sol (proposées par Geppa in Baize, 1988).....	77
Tableau 8 :	Classes de salinité en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux à 25°C (Mathieu <i>et al.</i> , 2003).....	78

Introduction

Comme disait Antoine Laurent de Lavoisier « Dans la nature rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme » (1789). En effet, la biosphère perpétue un éternel échange de matière entre ses différents réservoirs qui sont l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère, c'est ce qu'on appelle les cycles biogéochimiques, dans ses cycles les éléments sont en constant déplacement. Parmi eux le quatrième élément essentiel à la vie ; l'azote.

L'air que nous inhalons est composé de 78 % de diazote, 21 % d'oxygène et 1 % des autres gazes. Cependant, l'azote moléculaire qui est en abondance considérable dans l'air n'est pas accessible à la plupart des êtres vivants car, les atomes qui le composent sont reliés par une liaison covalente triple très forte et n'ont aucune utilité sous cette forme pour les êtres vivants. Pour pouvoir être absorbé par la plante, l'azote présent dans l'atmosphère sous forme N_2 doit subir des processus de transformation biologique réalisés par des micro-organismes appelés bactéries fixatrices d'azote (Denis, 2000).

La fixation biologique d'azote présente des avantages économiques et environnementaux, ainsi qu'une alternative aux engrais chimiques coûteux et polluants (Ferguson *et al.*, 2010). Dans le bassin méditerranéen, la symbiose légumineuse-rhizobia est une composante importante vu ses intérêts agronomiques, économiques et écologiques (FAO, 2009). En effet, cette symbiose pourrait, lorsqu'elle fonctionne bien, assurer une nutrition azotée adéquate aux plantes et garantir une production convenable permettant ainsi aux agriculteurs d'épargner le coût des fertilisants chimiques et soulager l'environnement de leur pollution (Faghire *et al.*, 2011).

Les légumineuses fourragères présentent de nombreux avantages qui rendent leur utilisation justifiée dans l'amélioration des parcours et des productions fourragères. En revanche, un certain nombre d'études a été réalisé sur les rhizobiums et les légumineuses fourragères non cultivées, malgré leur importance agronomique et écologique (Bevan, 2006). Ce nombre reste en deçà de cette importance. *Hedysarum*, en fait partie de cette famille, constitue un patrimoine phytogénétique performant pour la production de fourrage, la protection contre l'érosion et la valorisation des sols dégradés (Abdelguerfi-berrekia *et al.*, 1988).

En Algérie on compte dix espèces du genre *Hedysarum* qui sont réparties dans diverses zones climatiques allant des zones semi désertiques aux zones à climat humide (Abdelguerfi-Berrekia *et al.*, 1991). Parmi ces espèces ; *Hedysarum pallidum* Desf. (Desfontaines), qui fait l'objet de notre travail.

Les données disponibles concernant la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum* sont très contrastées et ont été l'objet de controverses. En fait, l'idée nous est venue après les premiers résultats obtenus et publiés par Benhizia *et al.* (2004) dans lesquels sont revendiqués la découverte à l'intérieur des nodosités de trois espèces d'*Hedysarum* (*H. carnosum*, *H. spinosissimum* et *H. pallidum*) poussant en Algérie, de plusieurs genres bactériens appartenant à la classe *Gammaproteobacteria* et l'absence des résidents naturels (rhizobia), cependant, aucune preuve formelle de la capacité de ces bactéries à noduler leur plante hôte n'avait été apportée. Par la suite, d'autres études ont été menées sur diverses légumineuses sauvages poussant en Italie et en Algérie, notamment des espèces annuelles et vivaces appartenant à six genres répartis dans trois tribus (*Hedysareae*, *Psoraleae* et *Loteae*), ont révélé le caractère non cultivable des symbiotes rhizobiens et la présence des endophytes opportunistes (Muresu *et al.*, 2008; Tondello *et al.*, 2011 et Torche *et al.*, 2014).

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la diversité des bactéries associées aux nodules d'*Hedysarum pallidum* poussant dans six régions différentes sur le plan géobioclimatique en Algérie, afin de déterminer l'effet de la niche écologique sur le comportement et la distribution de ces bactéries, en utilisant des méthodes de cultures dépendantes ainsi que la mise en évidence des rhizobia non cultivables par une méthode de culture indépendante (DGGE).

Nous nous sommes fixés comme ligne directrice:

- i. Prospection et échantillonnage des nodules et des sols à partir de différentes régions de l'Algérie.
- ii. Isolement des bactéries à partir des nodules et constitution d'une collection de symbiotes indigènes de cette légumineuse.
- iii. Caractérisation phénotypique des isolats cultivables comprenant une série de tests morphologiques, biochimiques et physiologiques.
- iv. Détermination de la position taxonomique et caractérisation phylogénétique des isolats cultivable.
- v. Authentification des isolats cultivables par un test de nodulation *in vitro*.
- vi. Étude de la diversité bactérienne totale des nodules par DGGE (Électrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant).
- vii. Caractérisation physico-chimique du sol et analyse statistique des résultats par une ACP (Analyse en Composantes Principales).

Chapitre 1 :

Revue bibliographique

1. La fixation biologique de l'azote

L'azote (N) est un élément clé pour le vivant puisqu'il est fondamental dans la composition des protéines, des enzymes et des acides nucléiques. Sa forme la plus abondante, le diazote atmosphérique (N_2), représentant presque les 4/5^e de l'air (78,06 %, en volume), mais il n'est pas directement assimilable par la majorité des êtres vivants (Lide, 2009). L'incorporation de diazote dans une molécule organique s'effectue par un processus biologique (fixation biologique d'azote); physique (éclaircs, combustion, volcanisme) ou bien par synthèse industrielle (production d'engrais chimiques). La fixation biologique d'azote représente environ les deux tiers d'azote globalement fixé, tandis que le tiers restant est synthétisé par le procédé industriel Haber-Bosch (Halbleib et Ludden, 2000).

La fixation biologique de l'azote (BNF) est réalisée par un groupe spécifique de procaryotes. Ces organismes utilisent une enzyme appelée nitrogénase pour catalyser la transformation de l'azote atmosphérique (N_2) en azote ammoniacal (NH_4^+), forme azotée assimilable par la plante (Franche *et al.*, 2009). Certains genres bactériens fixent l'azote (N_2) en conditions libres c'est-à-dire non associés à un hôte (appelés en anglais «free-living bacteria») tels que *Azotobacter*, *Rhodospseudomonas* (Jiménez *et al.*, 2011). D'autres bactéries sont capables de fixer l'azote en établissant une symbiose avec la plante hôte comme les rhizobia associées aux plantes de la famille des légumineuses et de *Parasponia* (Op den Camp *et al.*, 2012), les bactéries du genre *Frankia* avec les plantes des genres *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Alnus*, etc. (Benson et Silvester, 1993) et les cyanobactéries avec les plantes des genres *Azolla* and *Gunnera* (Bocchi et Malgioglio, 2010). Parmi tous ces exemples, la BNF par les rhizobia a été plus particulièrement étudiée pour les caractéristiques des partenaires impliqués, leurs mécanismes régissant son fonctionnement et son impact sur le développement de la légumineuse associée et sur la fertilité des sols.

Au cours du processus de fixation biologique de l'azote dans les nodules, le diazote (N_2) est réduit en deux molécules d'ammoniac (NH_3) par la nitrogénase rhizobiale. L'hydrogène (H_2) est un sous-produit du processus de fixation symbiotique de l'azote selon la réaction élucidée dans la Figure 1. Les 16 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) représentent l'énergie minimale demandée pour le déroulement de la réaction. La source de cette énergie nécessaire est l'énergie solaire via le processus de photosynthèse. L'ammoniac

formé est transformé en acide aminé en vue d'être utilisé par la plante afin de synthétiser des protéines pour sa croissance et son développement (Teng *et al.*, 2015).

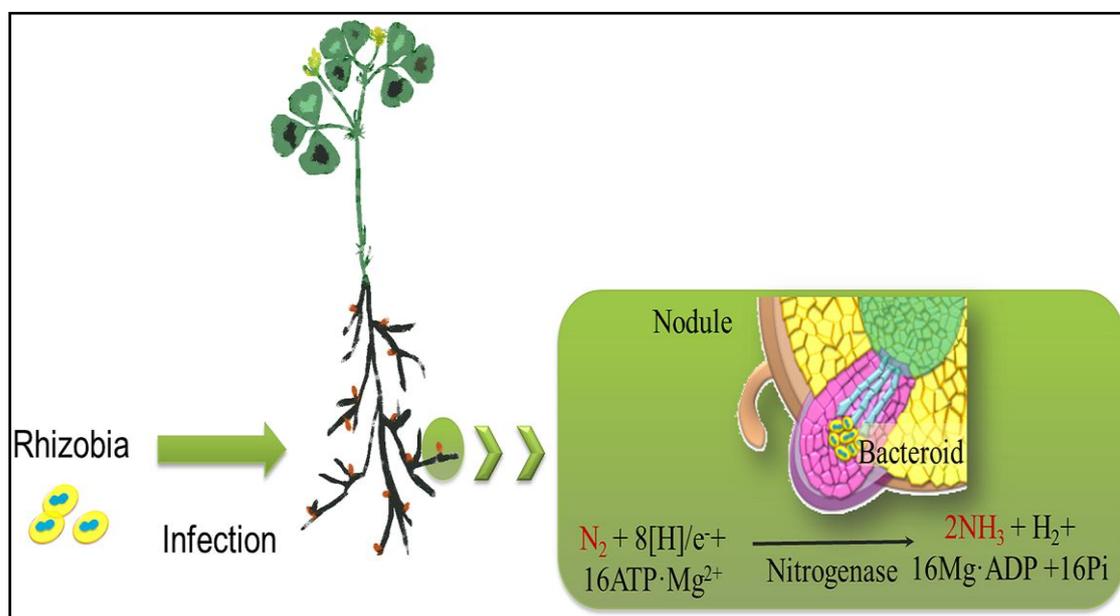


Figure 1: Schéma représente le processus de fixation biologique de l'azote (Teng *et al.*, 2015).

2. La symbiose Légumineuse – BNL

2.1. Généralité

L'existence d'une symbiose entre les légumineuses et les Bactéries Nodulantes des Légumineuses (BNL) permet à la plante d'acquérir la faculté de fixer directement l'azote atmosphérique, ce que ne peuvent pas faire les autres plantes supérieures (Macheix *et al.*, 2005). Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines ; le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie. C'est donc une véritable symbiose avec un échange bénéfique pour les deux partenaires (Raven *et al.*, 2000). Ce processus biologique joue un rôle essentiel dans l'agriculture durable, car il réduit l'apport en engrais azoté exogène tout en fournissant un moyen efficace de produire des aliments riches en protéines (Hirsch *et al.*, 1992).

2.2. Le partenaire végétal : Les légumineuses

Les légumineuses, caractérisées par un fruit en forme de gousse, sont très diversifiées. Elles font partie de la famille des *Fabaceae* (ou *Leguminosae*), de l'ordre des *Fabales*, de la classe des *Dicotyledonae* et de la sous classe des *Rosidaeae*. Les légumineuses constituent la troisième super famille par ordre d'importance chez les Angiospermes en terme de nombre d'espèces après les *Asteraceae* et les *Orchidaceae* (Cronk *et al.*, 2006), elles constituent un des groupes des végétaux supérieurs les plus abondants et les plus diversifiés (Broughton, 1983). Cette famille comporte 770 genres et plus de 19500 espèces et elle se subdivise actuellement en six sous familles au lieu de trois : *Papilionoidea*, *Caesalpinioidea*, *Cercidoidea*, *Detarioidea*, *Dialioidea*, *Duparquetioidea*. Les *Papilionoidea* représentent la sous famille la plus diversifiée, comprenant 478 genres et environ 14000 espèces tropicales et tempérées (Andrews et Andrews, 2017).

La famille des légumineuses constitue de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques comprend donc des candidates potentielles pour l'agriculture en tant qu'engrais vert azoté ou pour l'enrichissement des sols. En effet, parmi les 20 % de légumineuses étudiées, 97 % des espèces de la sous-famille des *Papilionoidea* (pois, haricot, fève, lentille, etc.), 90 % de la sous-famille des *Mimosoidea* (robinier, glycine, acacia, etc.) et 30 % de la sous-famille des *Caesalpinioidea* sont nodulées (flamboyant, barbade, séné d'Alexandrie, etc.) (Doyle et Luckow, 2003).

Compte tenu de leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, en association à des rhizobias du sol, les légumineuses constituent une source d'alimentation extrêmement importante (Giraud, 2007). En effet, dans de nombreuses régions pauvres de la planète, les espèces de légumineuses adaptées telles que: pois chiche, pois, haricot, fève, lentilles, arachide, constituent une importante source de nourriture humaine. Elles représentent pour les populations locales, un apport en protéines, source de fourrage pour les animaux (luzerne, trèfle, Sulla...) et de bois (Acacia, Dalbergia, Pterocarpus,...).

2.3. Le genre *Hedysarum*

Le genre *Hedysarum* appartient à la sous famille des *Papilionaceae* qui est très répandue dans le monde, pousse sur les sols variés et dans des conditions climatiques différentes, il renferme des espèces annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes,

autogames ou allogames. Grâce à son système racinaire puissant et pivotant, il a l'avantage de protéger et de lutter contre l'érosion des sols (Baattout, 1991 ; Boussaid *et al.*, 1995).

L'aire de distribution du genre *Hedysarum* couvre l'Europe tempérée, les régions méditerranéennes de l'Afrique du nord, l'Asie mineure, la Sibérie et l'Amérique du nord, à partir de l'Arizona jusqu'au Canada et les régions arctiques (Hyam et Pankhurst, 1995). Il est représenté par plus de 170 espèces dont la répartition géographique est très large (Wielgorskaya, 1995). Ces espèces d'intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Trifi-Farah *et al.*, 2002), ainsi que dans d'autres domaines comme l'apiculture et la protection des sols contre l'érosion (Abdelguerfi-Berrekia *et al.*, 1991). Certaines espèces spontanées sont déjà utilisées pour l'affouragement: *H. flexuosum*, *H. coronarium* et *H. carnosum*, cette dernière étant également employée pour la production du miel (Abdelguerfi-Berrekia *et al.*, 1991).

Les plantes de ce genre sont d'une manière générale constituée d'un appareil souterrain robuste portant de nombreuses nodosités fixatrices d'azote et d'un système aérien à rameaux dimorphes : tige principale "orthotrope" et ramification latérales "plagiotropes".

L'exploitation d'*Hedysarum*, en Algérie, en tant que plante de pâturage est restée très limitée. Cependant en Tunisie, Sulla est cultivé depuis plus de 4 décennies où il a été introduit de l'Italie dans les régions de Béja, Mateur et Aïn Draham (Trifi-Farah *et al.*, 1989) les superficies destinées à la culture de Sulla avoisinent les 4000 ha, ce qui représente 5,64 % des superficies cultivées en fourrages et 28,5 % des légumineuses fourragères (DGPA, 2009).

Les espèces du genre *Hedysarum* sont caractérisées par une diversité considérable qui concerne aussi bien la morphologie que les aires de répartition de leurs peuplements. En Algérie ce genre comporte dix espèces (Tableau 1), avec des endémiques comme: *Hedysarum pallidum*, *Hedysarum carnosum* et parfois très localisées comme *Hedysarum perrauderianum* et *Hedysarum naudinianum* qui ne se trouve qu'en Algérie (Quezel et Santa, 1962 ; Abdelguerfi-Berrekia *et al.*, 1991).

Tableau 1 : Espèces du genre *Hedysarum* poussant en Algérie, rapportés par Quezel et Santa (1962) et Greuter (1989).

Classification	Espèces
Embranchement: <i>Spermatophytes</i>	<i>H.pallidum</i> Desf. (Desfontaine)
Super Classe : <i>Angiospermes</i>	<i>H. aculeolatum</i> M. (Munby)
Classe : <i>Dicotylédones</i>	<i>H.carnosum</i> Desf.
Ordre : <i>Rosales</i>	<i>H.coronarum</i> L. (Litadière)
Famille : <i>Fabacées</i>	<i>H.flexuosum</i> L.
Genre : <i>Hedysarum</i>	<i>H. humile</i> L.
	<i>H.naudinanum</i> Coss. (Cosson)
	<i>H. boutignyanum</i> A. Camus
	<i>H.perrauderianum</i> Coss.
	<i>H. spinosissimum</i> subs <i>capitatum</i> L.

2.3.1. Présentation de la plante hôte *Hedysarum pallidum* Desf.

Hedysarum pallidum Desf., espèce décrite pour la première fois par DESFONTAINE. En Algérie, cette plante est connue sous l'appellation "السلة البيضاء" dans les régions de l'Est algérien et "قرن الكبش" dans les régions de l'Ouest algérien. C'est une légumineuse à vocation fourragère, endémique de l'Afrique du Nord, pousse spontanément en Algérie, au Maroc et en Tunisie. Elle a une écologie peu marquée à l'inverse des autres espèces du même genre qui sont répandues un peu partout dans le monde (Pottier-Alapetite, 1979; Quezel et Santa, 1962).

En Algérie, *Hedysarum pallidum* présente une répartition bien plus large (Est, Ouest et Centre) (Abdelguerfi-Berrekia *et al.*, 1991). Elle se rencontre dans l'Oranie de la côte jusqu'aux confins du Sahara, les Aurès, le Constantinois dans les terrains gypseux du plateau de Aïn El Bey et sur les pentes du Djebel d'Aïn Smara (Quezel et Santa, 1962). Cette espèce est également signalée dans la région de Tebessa (Abdelkrim, 1984), Tiaret, Nador et Garrouban (Pomel, 1874), elle se trouve généralement dans les forêts et les broussailles et dans les terrains salés de toute l'Algérie. Elle pousse sur des terrains caillouteux, souvent

calcaires, de texture très grossière et elle préfère les pluviométries moyennes (Abdelguerfi-Berrekia *et al.*, 1991).

Cette espèce préférentiellement allogame est soit annuelle diploïde ($2n=16$) très robuste, soit pérenne tétraploïde ($2n=4x=32$) (Beji *et al.*, 1991). Parmi les espèces diploïdes et tétraploïdes, elle est la plus répandue en Afrique du Nord. Sa tétraploïdie, liée à la multiplication végétative par drageons, lui permet sans doute une adaptation aux conditions défavorables du milieu, en particulier une altitude élevée et un climat froid (Trifi-Frah *et al.*, 2002).

2.3.2. Classification

Règne :	<i>Plantae</i>
Sous règne :	<i>Tracheobionta</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe :	<i>Rosidae</i>
Ordre :	<i>Fabales</i>
Famille :	<i>Fabaceae</i>
Genre :	<i>Hedysarum</i>
Espèce :	<i>Hedysarum pallidum</i> Desf.

2.3.3. Description botanique

Hedysarum pallidum est une plante vivace, cespiteuse, à longues tiges plus au moins prostrées. Elle présente des inflorescences en grappes plus au moins allongées atteignant 10-15 cm à la fructification, de grandes fleurs rosées ou blanches lavées de pourpre, parfois blanches et des calices entièrement hispides (Rached-Mosbah, 1993).

Selon Quezel et Santa (1962), la clé de détermination de l'espèce *Hedysarum pallidum* est basée sur les caractères suivants :

- Une fleur formée d'un calice en cloche, à cinq dents égales ou inégales, pétales à onglet très court, carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité et étamines diadelphes (9-1) à tube fendu en dessus (Figure 2b),

- Une gousse aplatie, divisée en articles monospermes ovales, orbiculaires ou quadrangulaires, se séparant à maturité (Figure 2c),
- Des feuilles imparipennées à deux stipules latérales (Figure 2a).

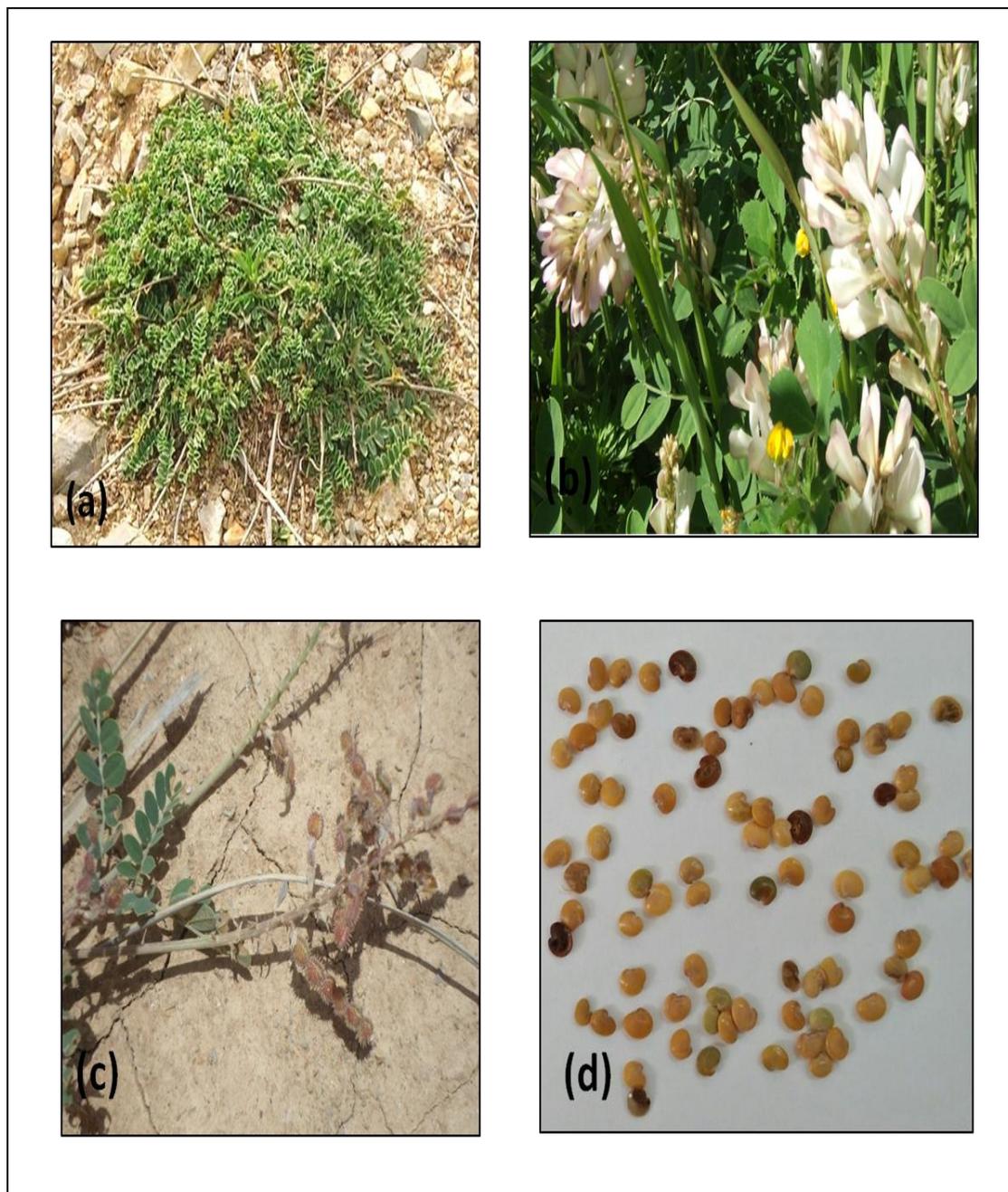


Figure 2 : Pied, gousses et graines d'*Hedysarum pallidum*

(a) Pied d'*Hedysarum pallidum* Desf., avant floraison ; (b) Pied d'*Hedysarum pallidum* Desf., après floraison ; (c) Gousses ; (d) Graines.

2.4. Le partenaire bactérien : Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL)

2.4.1. Taxonomie des BNL

Le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote est une bactérie communément appelée « rhizobium » (du grec rhiza : racine et bios : vie). Ce terme générique dérive du premier genre bactérien, *Rhizobium* décrit au XIX^{ème} siècle comme des bactéries qui vivent dans le sol avec le potentiel de noduler des légumineuses (Frank, 1889).

Les rhizobia sont des bactéries Gram négative aérobies dont l'oxygène est l'accepteur final des électrons d'une longueur de 1,2 à 3 µm et une largeur de 0,5 à 0,9 µm, asporulées (Jordan, 1984). Elles contiennent souvent des granules de poly-β-hydrox butyrate (PHB), mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou bien 2 à 6 flagelles péritriches (Somasegaran et Hoben, 1994).

La taxonomie moderne des rhizobiums inclus les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) et *Azorhizobium* (Sawada *et al.*, 2003) qui appartiennent à la classe des Alphaprotéobactéries. En outre, et grâce aux progrès des méthodes moléculaires, d'autres genres ont été découverts plus tard comme bactéries capables d'induire des nodules et sont décrites dans d'autres genres d'Alphaproteobactéria et Betaprotéobacteria, y compris *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005), *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001), *Microvirga* (Radl *et al.*, 2014), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2003), *Phyllobacterium* (Zakhia *et al.*, 2006), *Shinella* (Lin *et al.*, 2008) *Burkholderia*, *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (Moulin *et al.*, 2001).

Cependant le terme rhizobia pourrait prêter à confusion avec le nom du genre *Rhizobium* et en considérant la découverte d'une diversité grandissante des symbiotes associés aux légumineuses, il est préférable de les désigner sous le nom Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL) (Zakhia *et al.*, 2006).

Plus récemment, Shamseldin *et al.* (2017) ont décrit environ 238 espèces réparties en 18 genres des bactéries symbiotiques capables de noduler les racines des légumineuses et répertoriés dans les classes de α et β *proteobacteria* (Figure 3)

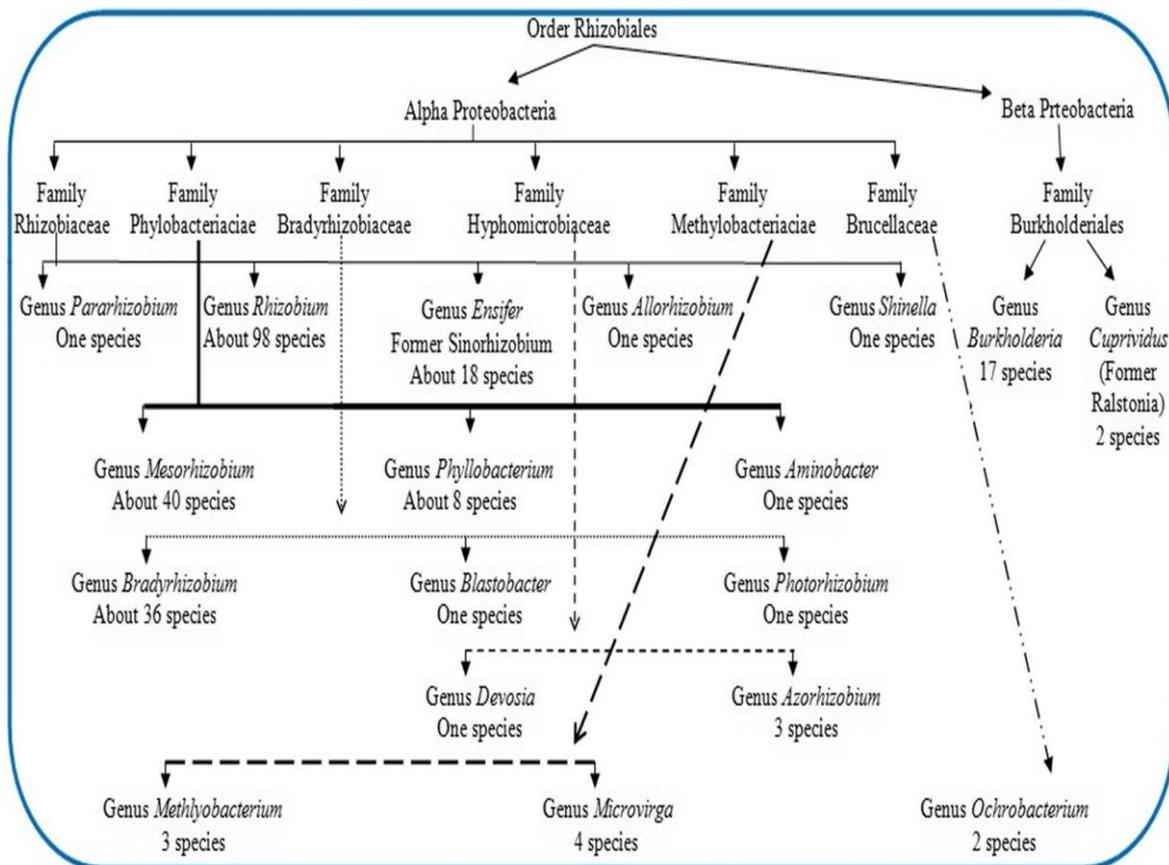


Figure 3 : Diagramme de la distribution des espèces bactériennes nodulant les légumineuses appartenant aux classes α et β *proteobacteria* (Shamseldin *et al.*, 2017).

En plus des souches capables d'induire des nodules fixatrices d'azote, ces dernières peuvent également accueillir diverses bactéries non rhizobiennes et qui sont considérées comme des endophytes non rhizobiens (NRE) appartiennent aux phylums des *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Actinobacteria* (De Meyer *et al.*, 2015). Dans la plupart des cas, ils ont été isolés sur le même milieu au mannitol que les rhizobia. Au début, les bactéries endophytes étaient considérées comme des contaminants résultants d'une désinfection superficielle déficiente des nodules racinaires. Plus tard, il a été constaté qu'ils étaient capables de coloniser efficacement l'intérieur des nodules induits par des souches rhizobiennes (Ibáñez *et al.*, 2009, 2017).

2.4.2. Méthodes d'étude des BNL: Approches moléculaires

L'identification bactérienne se fait traditionnellement à partir des caractères phénotypiques de la bactérie : coloration (de Gram par exemple), morphologie, aptitude à croître sur certains milieux de culture, caractères biochimiques détectés par diverses techniques commerciales (galeries API, systèmes Vitek, Phoenix, Biolog...). Toutefois certaines bactéries sont mal identifiées phénotypiquement pour diverses raisons. En effet, certaines bactéries expriment peu de caractères phénotypiques. Pour d'autres espèces, une situation de stress peut avoir altéré les caractères phénotypiques. Une identification basée exclusivement sur des caractères phénotypiques peut donc mener à un résultat erroné. Par ailleurs, les bactéries rares ne sont pas répertoriées dans les bases de données des systèmes commercialisés et en conséquence, les techniques basées sur les caractères phénotypiques ne permettront pas de les identifier (Renovoisé, 2012) ; la biologie moléculaire simplifie dans ce cas l'identification (Petti *et al.*, 2005).

Dans les années 1980, il a été montré que les relations phylogéniques entre les êtres vivants pouvaient être déterminées en comparant leurs séquences nucléiques (Clarridge, 2004). Des travaux préliminaires ont pu montrer que le gène ARNr16S code pour un ARN ribosomal de fonction constante dans l'évolution ; ce gène peut donc servir d'horloge moléculaire pour suivre les changements dans l'évolution bactérienne (Janda et Abbott, 2007).

Depuis que Woese (1984) a placé les bactéries nodulantes dans la subdivision alpha des protéobactéries en utilisant l'analyse de la séquence du gène ARNr16S, plusieurs chercheurs l'ont utilisé comme une approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de rhizobiums (Laguerre *et al.*, 1994 ; Nour *et al.*, 1994b).

La classification des BNL basée sur l'infection des plantes a été largement critiquée, en particulier après avoir montré les limites d'utilisation des séquences d'ARNr16S dans la différenciation entre les espèces proches (Ramírez-Bahena *et al.*, 2013). Il est bien montré que deux organismes ayant moins de 97% d'homologie de séquence d'ADNr16S appartiennent à deux espèces différentes (Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014).

En raison des limites d'utilisation du gène ADNr16S, l'introduction d'autres techniques moléculaires se sont imposés comme outil pour la description de nouveaux genres et espèces de BNL incluant : l'hybridation ADN-ADN, RFLP (Polymorphisme de Longueur

des Fragments de Restriction), les méthodes d'empreintes d'ADN basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) : RAPD-PCR (Amplification aléatoire d'ADN polymorphe), REP-PCR (PCR répétitive extragénique palindromique) (Ramírez-Bahena *et al.*, 2013), l'application des nouvelles techniques basées sur l'analyse des séquences multicocus (MultiLocus Sequence Typing, MLST ou MultiLocus Sequence Analysis, MLSA) comprenant trois ou plusieurs gènes de ménage où elles sont couramment utilisées pour la description de nouveaux genres et espèces de rhizobiums (Berrada et Friki-Benbrahim, 2014), la MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis) (Mousavi, 2016) et la MALDI-TOF MS ; qui est parmi les méthodes les plus utilisées et qui s'est avéré être une plateforme rapide et fiable pour l'identification des espèces de la famille des *Rhizobiaceae* (Jia *et al.*, 2015).

En plus du gène d'ARN ribosomique, d'autres gènes ont été également analysés : les gènes de ménage qui sont qualifiés comme gènes de base : *recA*, *atpD*, *glnA*, *glnII*, *rpoB*, *dnaK* et *gyrB*, ainsi que l'analyse d'autres gènes accessoires ou symbiotiques y compris ceux qui sont responsables à la fixation de l'azote (*nif*, *fix*) ainsi que les gènes nécessaires à la nodulation (*nod*, *noe*, *nol*) dont les gènes *nodD*, *nodA*, *nodC* et *nifH* sont les plus étudiés (Perret *et al.*, 2000), les gènes *exo* codent pour les Exopolysaccharides et les gènes *lps* codent pour les lipoolysaccharides (Shamseldin, 2013). Par conséquent, ces gènes symbiotiques ne sont pas utiles dans la taxonomie rhizobienne, car ils sont portés par des plasmides transmissibles (Ramírez-Bahena *et al.*, 2013).

Graham *et al.* (1991) ont rapporté que la description de toute nouvelle espèce doit se baser sur l'analyse traditionnelle (phénotypique, biochimique et symbiotique) et l'analyse génétique (séquence de l'ADNr, hybridation ADN/ADN) ainsi que sur l'analyse numérique. La combinaison de ces analyses a été ensuite reconnue sous le nom de l'approche polyphasique qui est retenue jusqu'à nos jours pour établir la taxonomie des BNL.

2.4.2.1. Les approches de cultures-dépendantes

Les approches de culture-dépendante reposent généralement sur la culture des micro-organismes sur des milieux plus ou moins sélectifs, suivi de l'identification phénotypique ou moléculaire des isolats (Bashan *et al.*, 1993). L'étude de la diversité est plus souvent réalisée par l'amplification de l'ADNr16S et /ou des espaces intergéniques transcrites (ITS 16S-23S) à partir de l'ADN extrait (Ferjani, 2016).

Le gène d'ARN ribosomique est un marqueur moléculaire classique utilisé pour tracer les relations génétiques et pour identifier rapidement les souches. C'est la présence de zones très conservées et de zones hypervariables qui rend ce gène très intéressant dans l'étude de populations (Huybens *et al.*, 2009). À ce jour la classification des BNL est basée majoritairement sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S (Willems, 2006). Or, il est prouvé qu'un même génome peut renfermer plusieurs copies divergentes de ce gène et que ce dernier peut être le sujet à des phénomènes de conversion et de recombinaison. Dans ces conditions, l'étude parallèle de l'ITS et de l'ADNr23S permet parfois de confirmer l'affiliation à un genre (Zakhia *et al.*, 2006).

Le ribosome bactérien est constitué de deux sous unités: 50S et 30S. Les gènes codant pour les trois ARN ribosomiaux sont appelés respectivement ADNr16S, ADNr 23S et ADNr 5S. Ces trois gènes sont très conservés au sein de toutes les eubactéries, ils sont situés sur le même opéron au sein du génome bactérien (Figure 4). En fonction des espèces bactériennes, ces gènes sont séparés par des zones plus ou moins longues, codantes ou non, que l'on appelle les espaces intergéniques transcrits (ITS) (Jensen *et al.*, 1993).

Les ITS sont des séquences très variables en taille et en composition dans l'opéron des trois ARNr (16S, 23S, 5S). Le premier qui se trouve entre l'extrémité 3' de l'ADNr 16S et l'extrémité 5' de l'ADNr 23S est le plus utilisé (Gonzalez *et al.*, 2003). Sa taille varie de 400 à 1600 pb (Fisher et Triplett, 1999). Les régions conservées du gène 16S et 23S l'entourant permettent l'appariement des amorces universelles ou plus spécifiques et donc l'amplification des ITS. L'analyse de l'espace intergénique de l'ADN ribosomique ou RISA est le nom donné à l'étude par PCR puis électrophorèse des ITS (Nocker *et al.*, 2007).

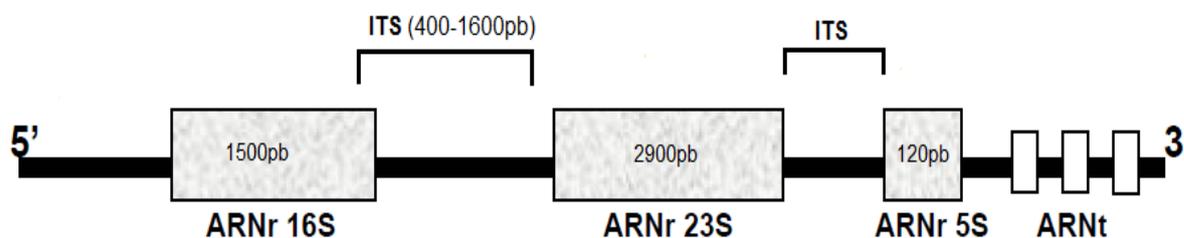


Figure 4 : Organisation de l'opéron de l'ADN ribosomique observé chez les procaryotes d'après El Hilali (2006).

2.4.2.2. Les approches de cultures-indépendantes

Les méthodes indépendantes de la culture permettent de déterminer la diversité des populations bactériennes sans avoir à les isoler et les mettre en culture. Elles permettent aussi de détecter les éventuelles cellules bactériennes viables mais non cultivables (VNC).

La proportion de bactéries cultivables dans les milieux naturels est très faible. En effet, les raisons de cette « non cultivabilité » sont multiples. Il peut s'agir d'un état physiologique viable non cultivable ou de l'inadéquation des milieux de culture conventionnels à la physiologie de la bactérie. Ainsi, lorsque les bactéries sont à l'état de viabilité mais non cultivable elles échappent à la détection lorsque l'on applique des tests microbiologiques conventionnels (Lleò *et al.*, 2001)

Les approches moléculaires peuvent potentiellement permettre de détecter une plus grande proportion des communautés bactériennes que la microbiologie classique, limitée aux bactéries cultivables et aux organismes capables de répondre rapidement à la gamme étroite des types de substrat et les concentrations dosées. Les approches basées sur l'ADNr 16S comme ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis), DGGE (électrophorèse sur gel à gradient dénaturant), ou TGGE (électrophorèse sur gel à gradient de température), peuvent être utilisés pour augmenter la vitesse de collecte des données, en permettant l'analyse de l'ensemble des produits de l'amplification de l'ADNr, ou la simplification du criblage de clones (Mccaige *et al.*, 2001). L'ensemble de ces approches débute par une amplification par PCR ciblant des marqueurs génomiques.

Dans notre étude, nous avons utilisé une Électrophorèse sur gel en Gradient Dénaturant (DGGE) des fragments d'ADNr16S amplifiés pour déterminer la diversité génétique des populations bactériennes complexes à la fois cultivables et non cultivables présentes dans les nodules d'*Hedysarum pallidum*.

La DGGE est mise au point pour la première fois par Fischer et Lerman (1983) qui permet de séparer par électrophorèse les fragments amplifiés de l'ADNr16S selon leur point de fusion (T_m). En effet, les fragments d'ADN ayant la même taille peuvent être séparés selon leurs séquences nucléotidiques (composition en bases AT et GC). Elle consiste à amplifier les régions hypervariables des gènes codant l'ARNr 16S, ou d'autres gènes tels que le gène *rpoB* (codant la sous-unité β de l'ARN polymérase).

Cette technique permet de discriminer les fragments d'ADN de taille identique ou quasi-identique mais de composition différente. Elle est couramment utilisée pour comparer les ADNr 16S d'échantillons naturels (Muyzer *et al.*, 1993).

La séparation est basée sur les changements de mobilité électrophorétique des fragments amplifiés migrant dans un gel vertical de polyacrylamide et contenant un gradient dénaturant (formamide et/ou urée). Lorsque les fragments d'ADN migrent au sein de ce gel d'électrophorèse, une fusion partielle du double brin d'ADN se produit dans des régions discrètes de celui-ci, retardant sa migration. Afin d'éviter la séparation complète des deux brins d'ADN ; l'emploi d'une séquence riche en guanine et cytosine, appelée queue GC (en anglais, GC clamp), a été proposé par Myers *et al.* (1985) avec une taille de 300 Nt puis, par Sheffield *et al.* (1989) avec une taille plus faible de 40 Nt. Le point auquel le fragment d'ADN double-brin est dénaturé dans le gel et devient simple-brin dépend de la séquence nucléotidique et la teneur en GC (%).

La dénaturation progressive des fragments au fur et à mesure de leur progression dans le gel entraîne une nouvelle conformation ouverte des molécules qui ralentit leur migration. Il en résulte que la conformation la plus dénaturé d'un fragment amplifié est une sorte de « Y » qui freine considérablement sa progression dans le maillage du gel ; ouvrant alors les « bras » dans le maillage du gel, la vitesse de migration du fragment devient alors quasi-null (Figure 5).

L'un des avantages de cette méthode très sensible est que les bandes individuelles d'ADN peuvent être excisées du gel, réamplifiées puis séquencées. Un fragment de 550 pb de l'ADNr 16S situé dans une région hypervariable (région V3) du gène est couramment utilisé (Muyzer *et al.*, 1993). L'intensité relative de chaque bande et sa position représentait probablement l'abondance relative d'une espèce particulière dans la population analysée.

La validation de la DGGE comme technique d'étude de population a été confirmé par Muyzer et collaborateurs (1993). Cette une technique rapide, reproductible, peu couteuse et peu être appliquée simultanément sur un nombre important d'échantillons. En revanche, elle peut présenter des inconvénients : la pince GC diminue la rentabilité de la PCR et favorise la formation de dimère, les fragments d'ADN peuvent avoir la même mobilité et en fin, la manipulation du gel demande de l'expérience (Muyzer, 1993 ; Huybens *et al.*, 2009).

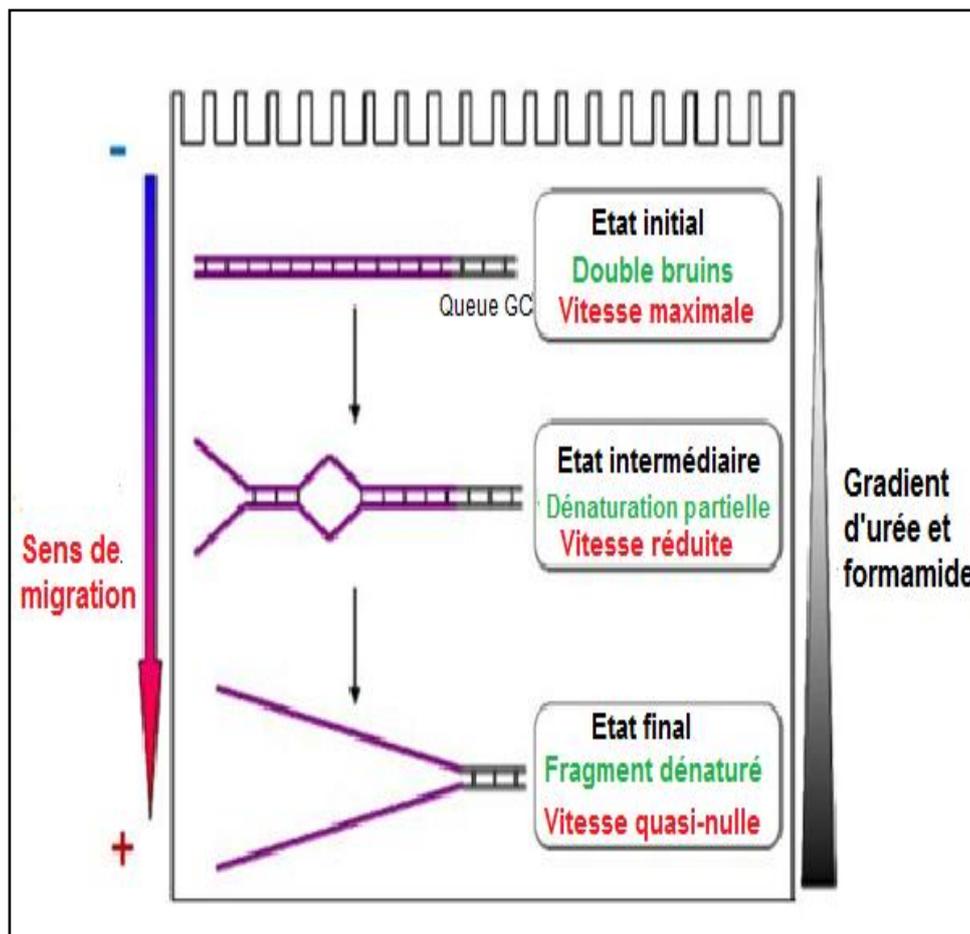


Figure 5: Représentation schématique de la dénaturation progressive de fragments d'amplification dans un gel de DGGE (Massias, 2008).

3. Mise en place de la symbiose

3.1. Formation de nodule

Le déclenchement de l'organogénèse nodulaire est une conséquence de la reconnaissance mutuelle effectuée par l'intermédiaire des signaux chimiques. En effet, les racines des légumineuses sécrètent des composés de type flavonoïdes, chimioattractifs et détectés par les bactéries (Gulash *et al.*, 1984). Les rhizobia reconnaissent ces flavonoïdes et sont attirés vers la plante. Plusieurs molécules telles que des lectines sont produites par la légumineuse et peuvent lier des carbohydrates, afin d'attacher les bactéries au niveau des racines (Van Damme *et al.*, 2004). La présence des flavonoïdes va induire chez les rhizobia la synthèse de lipochitoooligosaccharides (facteurs Nod) (Figure 6).

Quelques secondes après contact avec les facteurs Nod, des flux d'ions traversent la membrane plasmique de l'épiderme racinaire et entraînent une dépolarisation membranaire, accompagnée d'une alcalinisation du cytoplasme et d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, sous forme d'oscillations de calcium, ainsi que de l'expression de gènes de la plante impliqués dans les étapes précoces du cycle cellulaire (Kawaharada *et al.*, 2015).

Les rhizobia colonisent l'intérieur des poils absorbants de la plante. Ces poils absorbants se replient (Wood et Newcomb, 1989) et un cordon d'infection se forme puis il pénètre dans le cortex racinaire et se ramifie (Rae *et al.*, 1992). Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire (Cullimore *et al.*, 2001). Quand le cordon d'infection atteint le primordium, certaines cellules cessent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréduplication (L'endo-reduplication : implique une ou plusieurs séries de synthèse de l'ADN nucléaire sans des divisions chromosomiques ou cellulaires (Traas *et al.*, 1998). Elles sont alors envahies par des rhizobia qui sont relâchés des cordons d'infection (Brewin, 2004). Ensuite, la pénétration de la bactérie est faite par endocytose.

Finalement, les cellules végétales infectées et les bactéries infectantes se différencient en cellules capables de fixer et d'assimiler l'azote. La structure néoformée, qui se compose des bactéries qui se différencient dans des bactéroïdes entourés d'un espace pér bactéroïdien limité par une membrane pér bactéroïde, l'ensemble est appelé symbiosome. Après une période de fixation active de l'azote pour laquelle la durée dépend du stade de développement de la plante et des conditions environnementales, les nodosités vieillissent, une fraction des rhizobia différenciés à l'intérieur de la nodosité est capable de se diviser et revenir à un mode de vie saprophyte lorsqu'ils sont libérés dans la rhizosphère (Paa *et al.*, 1980).

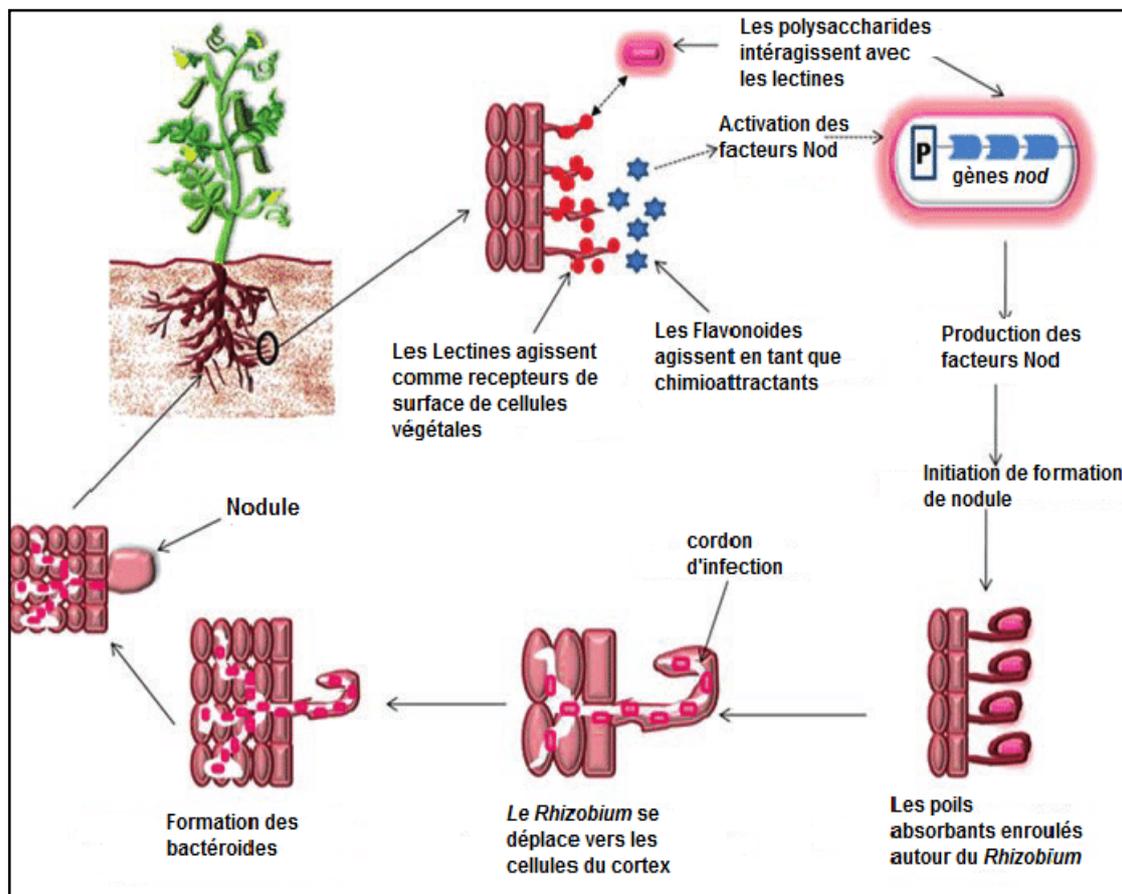


Figure 6 : Mécanisme de formation de nodules dans la symbiose *Rhizobium*-légumineuse (Singh *et al*, 2019).

3.2. Types de nodosités

La morphologie et la structure de la nodosité sont contrôlées par la plante hôte, alors que l'efficacité de la BNF (Fixation biologique de l'azote) est contrôlée essentiellement par le symbiote bactérien qui varie génétiquement et phénotypiquement (Sprent, 2009).

Dépendant de la légumineuse, les nodosités déterminées, ou bien indéterminées ont pour différence majeure l'origine de la couche cellulaire qui est impliquée dans la prolifération des cellules dans le cortex de la racine et la perte ou le maintien de l'activité mitotique (Foucher et Kondorosi, 2000) (Figure 7). Les nodosités indéterminées trouvent leur origine dans le cortex interne et maintiennent un méristème apical persistant qui aboutit à des nodules de forme allongée ou en forme de bâton sur les racines de certaines légumineuses comme *Medicago sativa* (la luzerne), *Pisum sativum* (le pois).

Le développement des nodosités déterminées débute par une division cellulaire dans le cortex externe et la perte rapide de l'activité mitotique donne naissance à des nodosités sphériques sur des légumineuses comme *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (haricot blanc) et *Lotus* spp. (Foucher et Kondorosi, 2000). Cependant, certaines plantes comme *Sesbania rostrata* peuvent former des nodules des deux types selon les conditions environnementales (Fernandez-Lopez *et al.*, 1998), comme c'est le cas de l'espèce (*Hedysarum pallidum*).

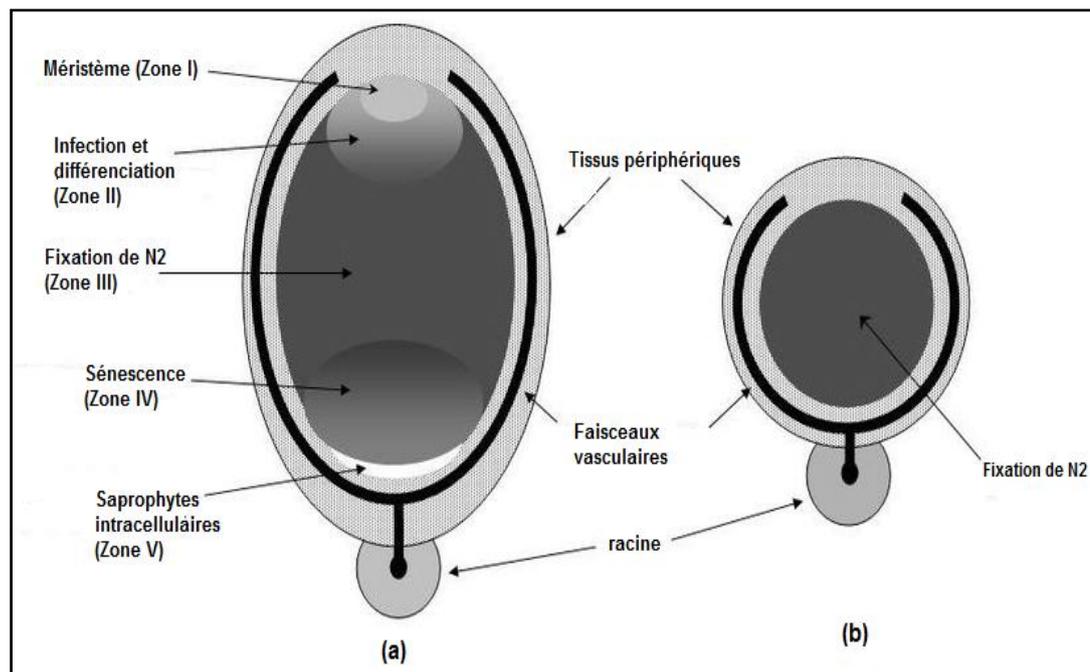


Figure 7 : Types de nodosité : (a) nodule indéterminé ; (b) nodule déterminés.

Adapté par Maunoury *et al.* (2008).

3.3. Les facteurs et les gènes impliqués dans la symbiose

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires produits par la plante. Leur structure comprend des flavones, flavonols, flavanols, flavanones, isoflavonoïdes et isoflavans (Hassan et Mathesius, 2012), qui sont capables d'activer la transcription des gènes *nod* chez les rhizobia.

- **Les facteurs Nod (FNs)**

Se sont des molécules de signalisation composées de lipochitolysaccharides sécrétés par le rhizobium pour induire la formation des nodosités sur les racines de la plante et qui répondent de façon spécifique selon l'espèce végétale (Geurts *et al.*, 2005). Ces réponses ne requièrent pas toutes d'un même niveau de spécificité par rapport aux décorations des facteurs Nod contrôlées essentiellement par d'autres gènes de nodulation (*nod*, *nol* ou *noe*) (Miklashevichs *et al.*, 2001).

- **Le gène régulateur (*nodD*)**

Le gène *nodD* est le premier gène transcrit lors du processus de nodulation (Moulin, 2006). Le gène *nodD* exprime une protéine régulatrice NodD dont l'activation de ce produit conduit à l'expression coordonnée des gènes de nodulation (*nod*, *noe* et *nol*) par l'intermédiaire des boîtes régulatrices (*nod box*) (Goedhard *et al.*, 2002).

- **Les gènes *nod* communs (*nod ABCIJ*)**

Ces gènes sont présents dans le génome de tous les rhizobia et ils sont impliqués dans la synthèse du squelette de base des facteurs Nod (Hopkins, 2003). La synthèse des lipochitooligosaccharides est sous le contrôle de *nodA* (acyl transférase), *nodB* (déacétylase) et *nodC* (N-acetylglucosaminyl transférase), (Downie, 1998). Les *nodI* et *nodJ* sont situés en aval de *nodC* et semblent faire partie du même opéron (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995) (Figure 8). Ils codent pour des protéines intra-membranaires impliquées dans le transport de petites molécules (Vazquez *et al.*, 1993).

- **Les gènes *nod* spécifiques *hsn* (host specific nodulation gene)**

Les gènes *nod* spécifiques comme les gènes *nodFE*, *nodH*, *nodG*, *nodPQ*, *nodM*, ect., ne sont pas conservés structurellement et fonctionnellement et ne se retrouvent pas chez tous les rhizobia. Ces gènes déterminent le spectre d'hôte des microsymbiotes et conditionnent le taux et la fréquence de la formation des nodosités. Ils codent pour des enzymes intervenant dans le greffage des décorations chimiques sur le squelette de base, ils confèrent des ornements variables aux facteurs Nod et jouent donc directement un rôle dans la spécificité (Perret *et al.*, 2000).

- **Les gènes *nif***

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le rhizobium libre, ils sont au nombre de 20 (Dupuy et Nougier, 2005). Ils comportent des gènes structuraux de la nitrogénase dont *nifH*, *nifD*, *nifK* ; *nifH* codent pour la réductase alors que *nifD* et *nifK* le font pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (Crossman, 2004). Les *NifB*, *E* et *N* codent, eux, pour la synthèse du cofacteur FeMo de la dinitrogénase et enfin le *nifS* pour la maturation de la dinitrogénase (Werner, 1992).

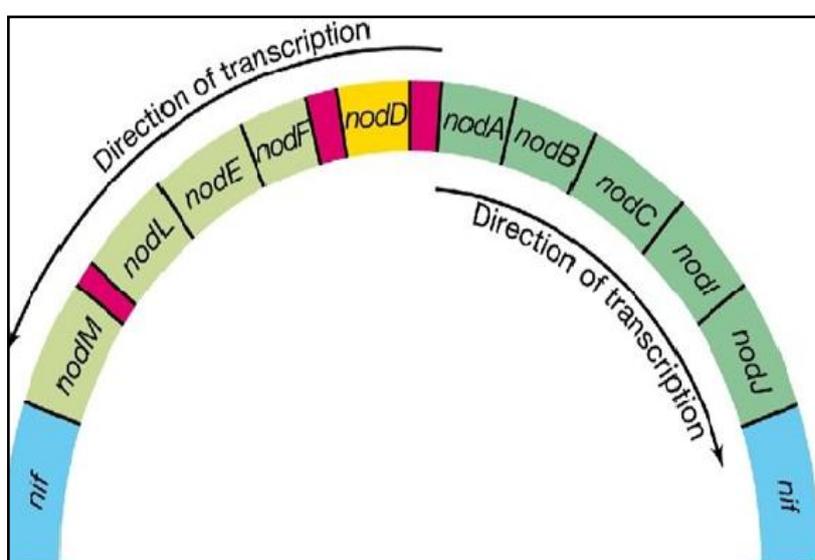


Figure 8 : Organisation des gènes *nod* et *nif* D'après Madigan et Martinko (2007).

- **Les gènes *fix* et gènes *dct***

La distinction entre les gènes *nif* et *fix* n'est pas toujours claire, sauf que, comme dans les bactéries libres du sol, les gènes *nif* sont impliqués dans la synthèse et la régulation de la dinitrogénase. Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques (Noel, 2009).

Les gènes *fixN*, *O*, *Q*, *P* codent pour le cytochrome oxydase, *fixG*, *H*, *I*, *S* codent pour la pompe cationique, *fixA*, *B*, *C*, *X* codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase (Crossman, 2004).

Les gènes *dct* (*Dicarboxylate transport genes*) sont nécessaires à l'assimilation par les bactéries des acides dicarboxyliques (succinate, malate) issus des composés carbonés

(glucose, fructose) apportés par la plante au cours de la fixation azotée. La mutation de ces gènes chez les bactéries entraîne une faible prolifération des bactéroïdes et une déficience de ceux-ci lors de la fixation de l'azote (Noel, 2009).

- **Les lectines**

Ces protéines sont secrétées par la plante et qui sont impliquées lors de l'attachement des rhizobia aux poils absorbants (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007).

- **Les polysaccharides**

Plusieurs études ont montré l'importance des polysaccharides de surface chez les rhizobia dans l'établissement de la relation symbiotique et des mécanismes de spécificité entre les deux partenaires de symbiose (Frayssé *et al.*, 2003).

Les expolysaccharides (EPS) semblent être essentiels dans la reconnaissance des partenaires symbiotiques et le processus de l'invasion des rhizobia inhibant la réponse défensive de la plante (Frayssé *et al.*, 2003).

Les lipopolysaccharides (LPS) ont un rôle spécifique dans les étapes tardives du processus de la nodulation comme la pénétration du cordon d'infection dans les cellules de cortex ou dans la réalisation d'un phénotype fixateur de l'azote (Becker *et al.*, 2005).

- **Les récepteurs kinases**

L'interaction légumineuse/*Rhizobium* est initiée par la reconnaissance des facteurs Nod par les récepteurs de la plante hôte. Les structures des FNs (résidus de glucose N acétyl amines) sont capables de se lier à des récepteurs kinases grâce à leurs domaines LysM (lysin motif), ces récepteurs kinases sont dénommés LysM-RLKs pour «LysM receptor-like kinase» (Masson- Boivin *et al.*, 2009; Gust *et al.*, 2012).

- **Les systèmes de sécrétion**

Des études récentes ont montré que les bactéries bénéfiques qui vivent dans la rhizosphère ou qui forment des symbioses avec la plante ont aussi développé différents systèmes de sécrétion qui leur permettent de s'adapter aux conditions environnementales extrêmes et faciliter la colonisation de leurs hôtes (Nelson et Sadowsky, 2015). En effet, certaines souches de rhizobia, telles que *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 et *Bradyrhizobium*

sp. STM6978, est capable de délivrer dans la plante des effecteurs bactériens *via* leur système de sécrétion T3SS. En absence de facteur Nod, ces effecteurs sont capables d'activer la voie de signalisation symbiotique commune et d'établir une symbiose fixatrice d'azote (Okazaki *et al.* 2013, 2016).

- **Les gènes de la plante hôte (ENOD)**

Ce sont des gènes spécifiques qui codent les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités, les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule; c'est le cas du gène de la globine de leghémoglobine ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005).

4. Interaction bactéries Endophytes - plante

Le mot endophyte vient de deux mots grecs: "Endon" signifie à l'intérieur et "phyton" signifie plante. Les endophytes sont les microorganismes qui colonisent le tissu végétal vivant sans causer aucun effet négatif sur la plante (Hirsch, 1992). Anton de Bary a d'abord introduit le terme "épiphytes" pour les champignons qui vivent à la surface de leur hôte et "Endophytes" pour ceux qui vivent à l'intérieur des tissus de plantes (De Bary, 1866). Plus tard, ce terme a été étendu aux champignons et bactéries, y compris les actinomycètes, qui passent toute ou une partie de leur cycle de vie à coloniser l'intérieur des tissus sains et vivants de l'hôte, ne causant généralement aucune maladie.

Les endophytes sont des procaryotes associés aux tissus internes des plantes, ce qui a rendu leur présence précieuse pour l'agriculture (Azevedo *et al.*, 2000). Actuellement, la colonisation des nodules de légumineuses par les endophytes est un domaine prometteur pour identifier les souches bactériennes présentant des nouvelles activités PGP (Plant Growth Promoting) (Ibañez *et al.*, 2017).

Les études taxonomiques portant sur les rhizobactéries ont révélé une diversité dans ce groupe qui comprend diverses espèces comme : *Arthrobacter*, *Variovorax*, *Azosprillum*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Azobacter*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (Bashan *et al.*, 2014 ; Ahemad *et al.*, 2015). Ces bactéries ont des effets bénéfiques sur leurs plantes hôtes notamment ; la croissance des plantes, la fixation de l'azote et la solubilisation

des phosphates, augmentant ainsi la disponibilité des nutriments pour synthétiser des biomolécules telles que les acides nucléiques, les acides aminés, les protéines, la lutte biologique contre les phytopathogènes par la production d'antibiotiques et des enzymes lytiques (De Meyer *et al.*, 2015 ; Singh, 2018).

Plusieurs études ont montré que les bactéries endophytes ne colonisent pas seulement la rhizosphère et le rhizoplan (interface racine/sol) mais aussi pénètrent dans les plantes et colonisent les tissus internes (Compant *et al.*, 2010). En effet, pour entrer à l'intérieur du système racinaire, le processus de pénétration d'endophytes ne nécessite pas automatiquement de mécanisme actif et presque toutes les bactéries de la rhizosphère peut être en effet endophytiques à n'importe quel stade de leur vie (Hardoim *et al.*, 2008). La pénétration peut avoir lieu à des fissures, comme ceux qui se produisent sur les sites d'émergence des racines ou créé par les microorganismes nuisibles, ainsi que par l'extrémité des racines (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998). Lorsque les bactéries colonisent les racines, ils peuvent envahir les cellules par voie inter et / ou intracellulaire et peuvent pénétrer dans les tissus central (Figure 9). De cette façon, ils pourraient atteindre les couches centrales avant la différenciation de l'endoderme bien que l'endoderme est également accessible via la sécrétion de enzymes dégradant la paroi cellulaire (Compant *et al.*, 2010). Une autre voie d'entrée par la sécrétion des enzymes de dégradation (enzymes hydrolytiques: les endoglucanases, cellulases, pectinases...) de la paroi cellulaire peuvent être impliqués dans la propagation et la pénétration bactérienne à l'intérieur de la plante. (Hallmann *et al.*, 1997).

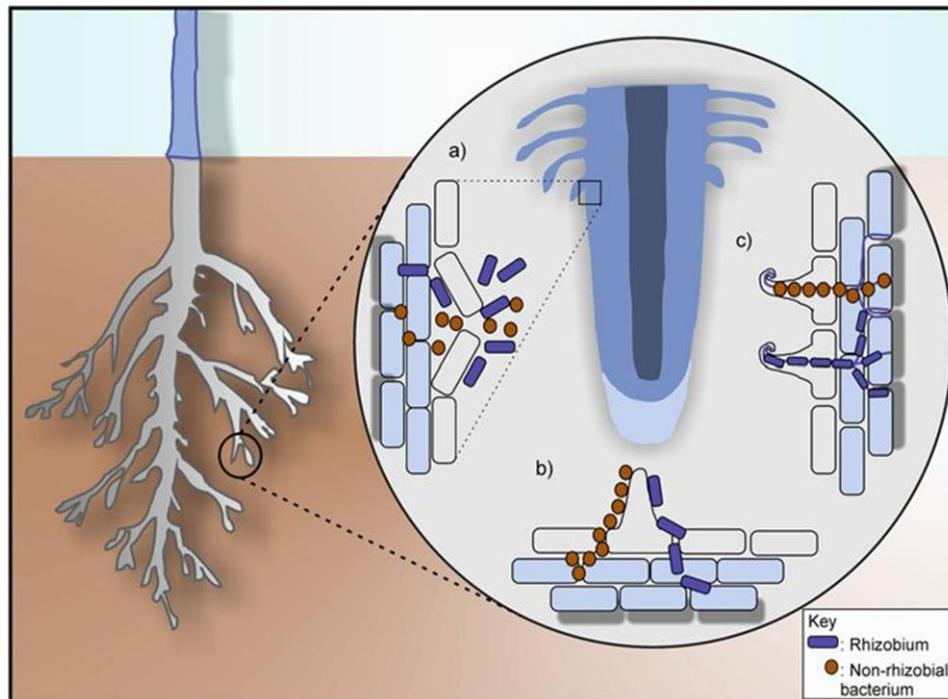


Figure 9: Mode d'entrée des rhizobiums et des endophytes non rhizobiens à l'intérieur des racines des légumineuses (Ibañez *et al.*, 2017).

a) l'infection se fait généralement au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales (Crack entry), **b)** sans induction de changements morphologiques, et invasion ultérieure à travers les espaces intercellulaires, **c)** colonisation des cordons d'infection précédemment induites par les souches rhizobiales.

Bien que le nodule racinaire soit généralement considéré comme un habitat exclusif de la fixation symbiotique de l'azote, il héberge une population diverse de bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques incluant des bactéries nodulantes et fixatrices d'azotes (Zakhia et De Ladjudie, 2001; Sawada *et al.*, 2003 ; Willems, 2006 ; Peix *et al.*, 2015b) et des bactéries non nodulantes appelées endophytes non rhizobiens NRE (De Meyer *et al.*, 2015) (Figure 10).

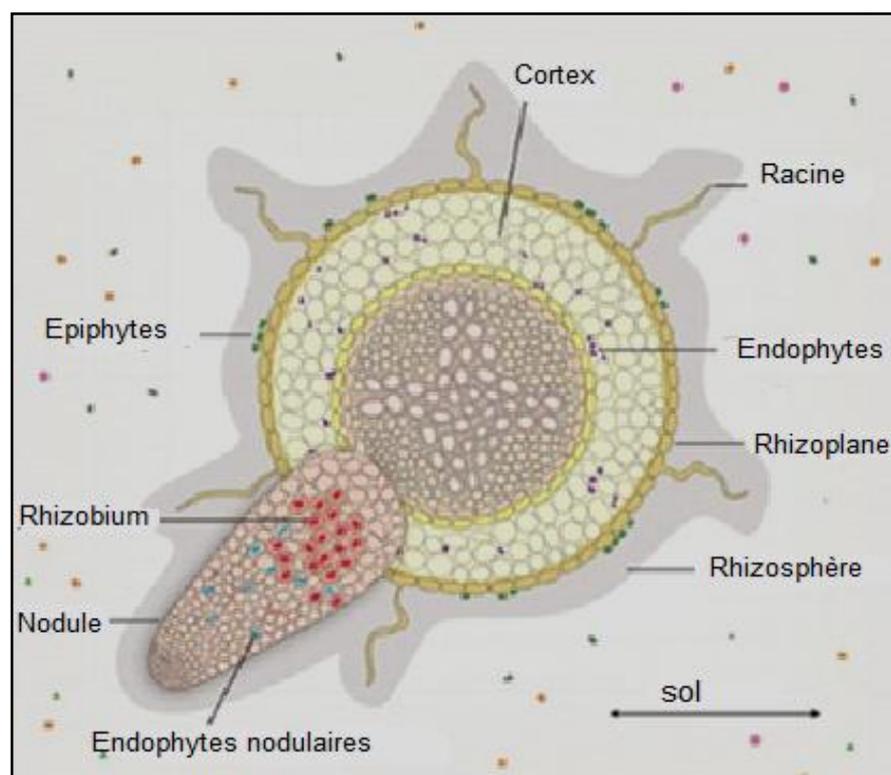


Figure 10 : Coupe transversale d'une racine (La complexité du microbiote racinaire bactérien). (Cluà *et al.*, 2018).

La rhizosphère est colonisée par un sous-ensemble de la communauté du sol. Le rhizoplan héberge des épiphytes fermement attachés à la surface de la racine. L'endosphère (intérieur des racines) est habitée par les endophytes. Le nodule racinaire est l'habitat des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, appelées rhizobiums, et abrite également une diversité de bactéries non fixatrices appelées endophytes nodulaires.

5. Les paramètres environnementaux influant la symbiose BNL-Légumineuses

Les principaux facteurs limitant l'activité biologique dans les sols sont la sécheresse, la salinité, les températures élevées, les pH extrêmes acides ou alcalins et les carences en éléments nutritifs (Henzell, 1988), avec les facteurs abiotiques, il faut encore ajouter les facteurs biotiques négatifs comme la compétition, la prédation, etc.. En effet, Les divers stress biotiques et abiotiques peuvent agir à différents niveaux et réduire le taux de croissance ainsi que la capacité de survie des rhizobia à l'état saprophytique (en absence de la plante hôte). Ces stress peuvent interférer avec les processus d'infection ou de nodulation, ou encore influencer l'activité fixatrice d'azote après établissement de la symbiose (Hirsch, 1996).

▪ L'alcalinité et l'acidité du sol

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficace dans le sol (Bordeleau et Prévost, 1994). L'acidité élevée du sol, influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobiums et engendre par conséquent une diminution de la nodulation (Munns, 1977). Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour les rhizobia que pour la plante hôte (Bordeleau et Prévost, 1994).

▪ Le stress salinité

La salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il est montré que la Fixation Symbiotique de l'Azote est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (Rao *et al.*, 2002). Généralement l'activité des nodules est plus touchée par le sel que la nodulation, mais l'étape la plus sensible à la présence du sel est le processus infectieux (Payakapong *et al.*, 2006). L'effet néfaste du sel est essentiellement dû à l'augmentation de l'osmolarité du milieu environnant la bactérie. Cette osmolarité entraîne un efflux d'eau entraînant une diminution du volume du cytoplasme. Cette plasmolyse affecte le métabolisme de la cellule et le fonctionnement des macromolécules et finalement conduit à l'arrêt de la croissance (Le Rudulier, 2005).

▪ Le stress hydrique

Le stress hydrique affecte la fixation symbiotique de l'azote à différents niveaux: (i) La formation et la croissance nodulaire; (ii) le métabolisme du carbone et de l'azote; (iii) l'activité de la nitrogénase; (iv) la perméabilité nodulaire à l'oxygène (Fitouri, 2011).

▪ Le stress thermique

Les températures élevées inhibent généralement la croissance des micro-organismes, ainsi chez les rhizobia les hautes températures peuvent empêcher la nodulation et inhiber la fixation d'azote (Cacciari *et al.*, 2003) engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent

la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes. La température optimale pour la croissance des rhizobia varie selon la zone climatique où ils sont isolés (Day *et al.*, 1978).

▪ **Les antibiotiques et les toxines**

Le sol représente une niche écologique où différents microorganismes peuvent sécréter des antibiotiques ou bien des toxines. En effet, Schwinghamer (1967) et Brockwell *et al.* (1977) ont rapporté que les antibiotiques exogènes peuvent affecter extrêmement la capacité des rhizobiums à infecter leur plante hôte voire même entraîné la perte de leur capacité symbiotique. Les toxines microbiennes affectent les terres nouvellement mises en culture (Bushby *et al.*, 1982).

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

1. Échantillonnage, collecte et conservation des nodules

Une étude prospective a été effectuée sur tout le territoire national et nous avons pu recenser 06 sites situés dans des régions de l'Est et de l'Ouest algérien différents sur le plan géobioclimatique (Figure 11).

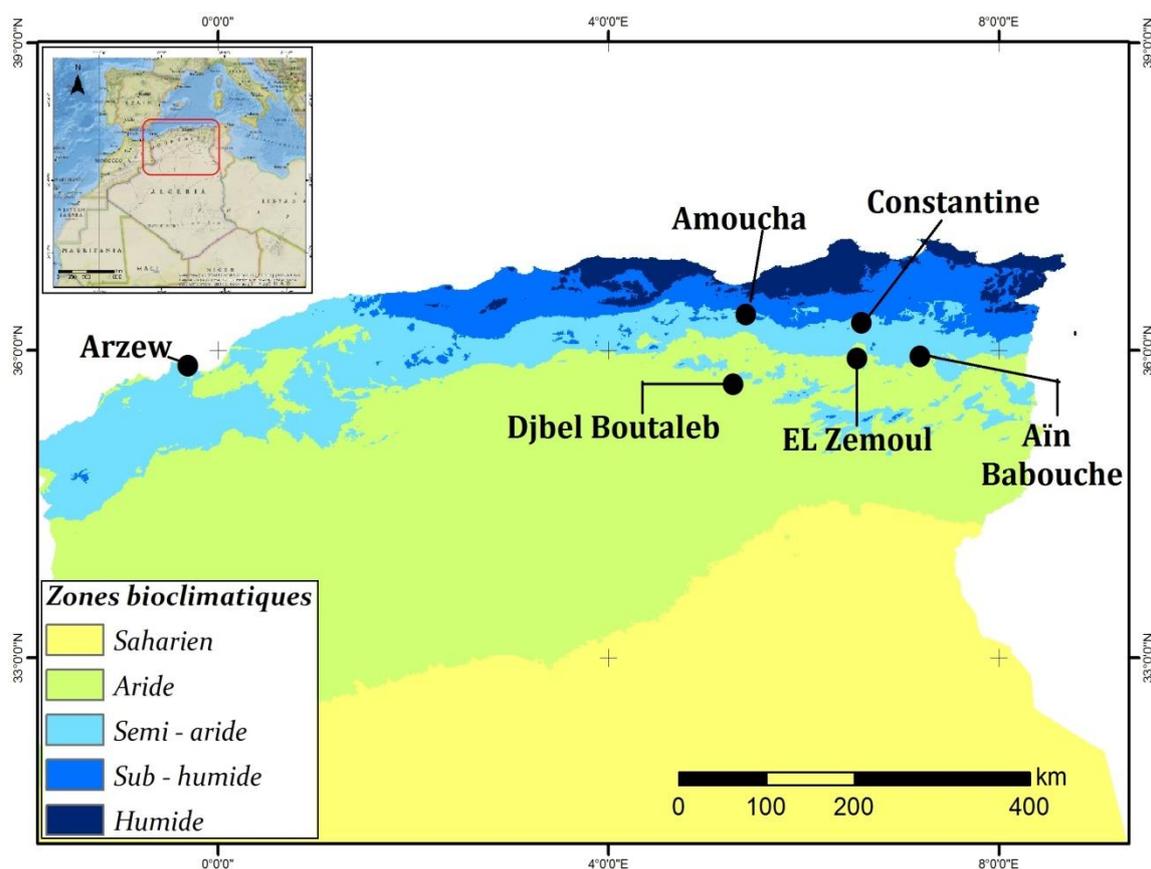


Figure 11: Localisation géographique des sites de prélèvements.

La récolte des échantillons a été réalisée en période de floraison des plantes entre 2012 et 2016. Les coordonnées géographiques et les étages bioclimatiques des sites d'échantillonnage sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques écologiques des sites de prélèvement

Site de prélèvement	Localisation	Coordonnées géographiques	Altitude (m)	Étage bioclimatique	Date de prélèvement
Site contaminé par l'antimoine	Aïn Babouche (Oum El Bouaghi)	35°56'31"N 7°11'35"E	850 à 950	Semi -aride	2012-2012
Site salin (Sebkha el Zemoul)	Aïn M'lila (Oum El Bouaghi)	35°54'60"N 6°31'43"E	821	Semi-aride	2013
Site littorale	Arzew (Oran)	35°51'3725"N 0°18'3146"E	330	Semi- aride	2014
Site chaud	Djbel Boutaleb (Sétif Sud)	35°40'13"N 5°16'53"E	887	Semi- aride à aride	2014
Site humide (en bord de route)	Amoucha (Sétif Nord)	36°21'1" N 5°24'32"E	1115	Sub-humide	2014
Site située en bord de route	Aïn El Bey (Constantine)	36°14'3"N 6°36'28"E	802	Semi- aride	2015-2016

Quatre à six plantes séparées d'au moins 3 à 10 m l'une de l'autre ont été choisies au hasard et ont été déracinées. La collecte des nodules est réalisée selon le protocole décrit par Vincent (1970) ; Somasegaran et Hoben (1994). La technique consiste à creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm dans le sol pour atteindre aisément l'appareil racinaire de celle-ci. Par la suite, la terre entourant les racines est délicatement enlevée et les racines sont rincées à l'eau de robinet tout en faisant attention à ne pas endommager les nodules. Les nodules sont détachés, puis rincés et séchés avec du papier absorbant (Figure 12).



Figure 12: Nodules collectés à partir de différents sites de prélèvement.

a) nodules déterminés ; **b)** nodules indéterminés multilobés ; **c)** nodules indéterminés ramifiés, **d)** nodules déterminés et indéterminés portés sur la même racine.

Pour un usage immédiat, les nodules sont directement mis au réfrigérateur à 4 °C. Si toute fois il s'agit d'une longue conservation pouvant atteindre les 12 mois, il est préférable de conserver les nodules dans de petits flacons contenant un agent dessiccateur (CaCl_2) et du coton (Date, 1982). Sur chaque flacon, il faut noter le lieu et la date de prise de l'échantillon (Figure 13).

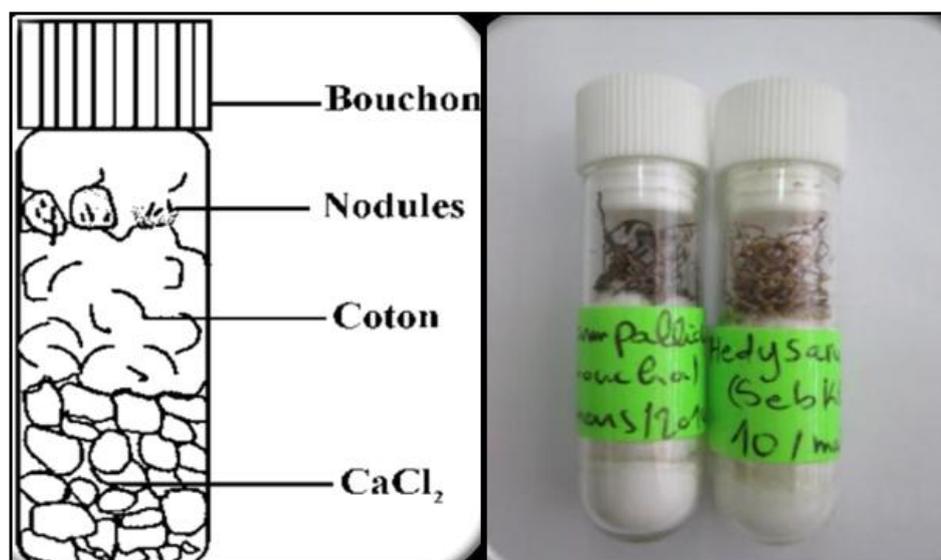


Figure 13: Conservation des nodules sous CaCl_2 (Vincent, 1970).

2. Étude de la diversité bactérienne cultivable

2.1. Isolement, purification et conservation des isolats

Les nodules fraîchement lavés sont utilisés directement, alors que celles qui sont conservés par dessiccation sont réhydratées dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur puis laissées pendant une heure à température ambiante (Vincent, 1970).

Une fois les nodosités ont repris leur volume initial ; celles-ci ont été désinfectées par immersion 10 sec dans l'éthanol à 95 %, puis par le HgCl_2 (0,1 % w/v) pendant 3 min et rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile (Vincent, 1970). Les nodosités ont été aseptiquement écrasées à l'aide d'une pince stérile et le jus nodulaire est étalé par striation directement sur des boîtes contenant le milieu YMA (Yeast Extract Mannitol Agar) (Fred and Waskman, 1928) additionné du rouge Congo (Annexe 1), en appliquant la technique des quatre quadrants préconisée par Vincent (1970). L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie sous la hotte à flux laminaire (Kottermann 8511, Tu V, Norddeutschland (GS) geprüfte Sicherheit).

Les différentes boîtes ont été par la suite placées dans un incubateur à 28 ± 2 °C. Les nodules stérilisés ont été passés sur la gélose en boîte de Pétri contenant le milieu YMA pour s'assurer la technique de stérilisation utilisée.

La purification est réalisée par une série de repiquage des colonies sur le même milieu (Vincent, 1970). Les isolats purifiés sont mises à -20 °C sur milieu YMB additionné de 30 % (v/v) de glycérol pour une longue durée de conservation et sur des boites et des tubes en gélose inclinée à 4 °C pour une durée de six à douze mois (Vincent, 1970; Somasegaran et Hoben, 1994).

2.2. Caractérisation phénotypique des isolats

Une série de tests phénotypiques a été réalisée afin de déterminer la diversité phénotypique entre nos isolats en présence de souches de référence représentant différents genres: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Enterobacter* et *Pantoea* (Tableau 3).

Tableau 3 : Souches de référence utilisées dans notre étude.

	Souche	Plante hôte	Origine géographique	Source
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp. nov. RHA6	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine. Algérie	Benguedouar (1997)
SAM12	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Cicer arietinum</i> L.	Batna. Algérie	Dekkiche <i>et al.</i> , (2017)
76T	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Cicer arietinum</i> L.	Batna. Algérie	Dekkiche <i>et al.</i> , (2017)
HP10b	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Hedysarum pallidum</i> Desf.	Sétif. Algérie	Benhizia <i>et al.</i> , (2004)
HS6	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Hedysarum spinosissimum</i> sbsp <i>capitatum</i> . Desf.	Constantine. Algérie	Benhizia <i>et al.</i> , (2004)

2.2.1. Caractères morphologiques et cultureux

L'étude des caractères morphologiques des bactéries est réalisée par une analyse visuelle de l'aspect des colonies. Les critères choisis sont relatifs à la forme, diamètre, transparence, la couleur, la taille et la consistance des colonies après 2 à 8 jours de croissance sur milieu YMA à 28 °C et par observation au microscope optique (coloration de Gram).

2.2.2. Test de Bleu de Bromothymol (BTB)

La vitesse de croissance des isolats est mise en évidence dans des boîtes de milieu YMA additionné du Bleu de Bromothymol (BTB) (Annexe1) qui a une couleur verte à pH 6,8. Les bactéries à croissance lente montrent une réaction alcaline dans ce milieu et la couleur vire vers le bleu. Cependant les bactéries à croissance rapide donnent une réaction acide modifiant la couleur verte du milieu en jaune (Somasegaran et Hoben ,1994).

2.2.3. Caractères biochimiques (Recherche des enzymes spécifiques)

Les bactéries nodulant les légumineuses synthétisent certaines enzymes jouant un rôle fondamental lors des différents stades de la symbiose tels que la nitrate réductase, l'uréase et la cellulase (endoglucanase).

2.2.3.1. Réduction des nitrates

La nitrate réductase est mise en évidence par l'inoculation du milieu liquide TY (Annexe 1) contenant une source d'azote sous forme de KNO_3 à 0.1 % (w/v). Après 4 jours d'incubation quelques gouttes des réactifs I et II du nitrate réductase sont ajoutés au milieu :

Réactif I : Acide sulfanilique à 3 % dans l'acide dilué à 25 %.

Réactif II : α naphthylamine à 0.5 % dans l'acide dilué au même temps.

Une réaction positive se manifeste par une coloration rouge indique la réduction des nitrates en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition du poudre de zinc métallique et l'observation est instantanée (la couleur rouge signifie la non réduction des nitrates, alors qu'un milieu incolore indique que les nitrates ont été réduit en azote gazeux) (Delarras, 2007).

2.2.3.2. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence d'uréase, les isolats ainsi que les souches témoins sont cultivées sur le milieu YMA contenant 2 % (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH (Jarvis, 1977).

Le milieu solide sans l'urée est autoclavé à 120 °C pendant 20 min puis refroidi jusqu'à environ 45 °C. La solution d'urée est stérilisée par filtration (0.22 μm) et ajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire puis incubation à 28 °C pendant 48 heures. Une couleur rouge représente l'alcalinisation du milieu ce qui indique l'hydrolyse de l'urée (Lindstrom et Lehomarki, 1988)

2.2.3.3. Détection de l'activité endoglucanasique

Pour mettre en évidence leur activité endoglucanasique, les isolats sont mis en culture sur le milieu YMA contenant 0.25 % (w/v) de CMC (Carboxy-Methyl-Cellulose) puis incubées pendant 5 jours à 28 °C.

Les boîtes de cultures sont inondées d'une solution de rouge de Congo (1 mg/ml) et incubées 30 min dans l'étuve à 28 °C (Theather et Wood, 1982). La solution colorante est remplacée par une solution de NaCl 1N puis, les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 min. Les colonies apparaissent sur fond rouge, avec un halo jaune orangé mettant en évidence l'activité endoglucanasique (Struffi *et al.*, 1998).

2.2.4. Caractères physiologiques (Tolérance aux stress abiotiques)

2.2.4.1. Effet de pH

Afin d'étudier le caractère acidophile et basophile des isolats, le pH du milieu de culture YMB est ajusté à différents pH (4, 4.5, 5, 5.5, 6.8, 7.8, 8.8, 9.8, 10,11). Chaque tube est inoculé avec 200 µl d'une pré-culture en phase exponentielle de croissance ($\sim 10^8$ cell/ml qui correspond à DO= 0.9). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. La croissance des isolats est estimée par la mesure de la DO à 600 nm après 24 et 48 heures d'incubation à 28 °C sous agitation (Struffi *et al.*, 1998 ; Benhizia, 2006).

2.2.4.2. Effet de la salinité

La tolérance des souches isolées à la salinité a été évaluée par des cultures sur milieu liquide Lactate aspartate de sodium (Gloux et Le Rudulier, 1989) (Annexe 1) avec différentes concentrations de NaCl (0.01M, 0.1M, 0.2M, 0.5M, 1M, 1.5M, 2M) (Benhizia, 2006). Chaque tube est inoculé avec 350 µl d'une pré-culture en phase exponentielle de croissance ($\sim 10^8$ cell/ml qui correspond à DO= 0.9). La croissance des isolats est estimée par la mesure de la DO à 600 nm après 24 et 48 heures d'incubation à 28 °C sous agitation.

2.2.4.3. Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, nos isolats ont été ensemencés sur le milieu YMA (Annexe 1) par la méthode des stries simples et incubés à différentes températures : 4 °C, 20 °C, 28 °C, 37 °C, 44 °C et 50 °C. (Struffi *et al.*, 1998 ; Benhizia, 2006). La lecture des résultats sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation. Pour la température 4 °C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

2.3. Caractérisation génotypique et phylogénétique des isolats

2.3.1. Extraction de l'ADN bactérien

L'ADN des souches isolées a été récupéré selon deux méthodes :

a) Méthode de bowling lysis (ébullition) : cette méthode a été utilisée pour les bactéries fortement productrices d'EPS. Des colonies bactériennes fraîchement isolées sont mises en suspension dans 200 µl de TE [10 mM (pH 8) Tris, 0.1 mM EDTA], puis agitées à l'aide d'un vortex et mises dans l'eau bouillante (100°C) pendant 10 min. L'extrait est incubé par la suite dans la glace pendant 5 min, puis centrifugé 10 min à 12000 tpm (Ferjani *et al.*, 2015). Le surnageant a été récupéré et conservé à -20 °C pour usage ultérieur dans les différentes réactions de PCR.

b) Extraction au phénol-chloroforme "modifiée" Wilson (1987): Cette méthode est utilisée pour obtenir une forme d'ADN plus pure.

À partir de cultures pures obtenues sur milieu YMA, des colonies bactériennes sont prélevées et mises en suspension dans 550 µl de TES (Annexe 1) additionnées de 17 µl lysozyme (35 mg/ml), puis incubées 10min à 37 °C. L'hydrolyse des protéines est assurée par 6 µl de protéinase K (10 mg/ml) et 30 µl de SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium) à 10 %. Après agitation à l'aide d'un vortex, le tout est incubé à 37 °C pendant 30 min. 100 µl de NaCl 5M et 80 µl de CTAB (Bromure de Cétyltriméthyl Ammonium) sont ajoutés au mélange et incubés par la suite à 65 °C pendant 10 min. Après l'incubation, une séparation des protéines de la phase aqueuse est réalisée par précipitation avec 700 µl de CAI (Chloroforme Alcool isoamylique 24:1(v/v)) suivie d'une centrifugation à 12000 tpm pendant 15min. Le surnageant est récupéré et transféré dans un nouveau tube eppendorf dans lequel 700 µl de CAI sont rajoutés. Après centrifugation à 12000 tpm pendant 15min, le surnageant est récupéré à nouveau.

L'ADN est par la suite précipité par l'ajout de 300 µl d'isopropanol et incubé à -20 °C pendant une nuit. Une centrifugation de 15 min à 12000 tpm (de préférence à froid) permet de récupérer le culot des acides nucléiques. Le culot est lavé en ajoutant 300 µl d'éthanol à 70 %. Les tubes sont ensuite centrifugés 5 min à 13000 tpm. Le surnageant est jeté et le culot est séché (à l'air libre, ou bien à l'aide de speed Vacuum pendant une demi-heure). L'ADN obtenu est suspendu dans 50 à 100 µl de TE (selon la quantité du culot récupéré).

La quantité et la qualité de l'ADN génomique sont estimées par spectrophotométrie (NanoDrope 2000 (Thermo Scientific). Scientific Nano DropTM8000). La quantité d'ADN est estimée par absorbance à 260 nm et la pureté de l'ADN est évaluée par le rapport de deux densités optiques (DO), mesurées (DO_{260} / DO_{280}).

2.3.2. Amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Dans notre étude nous avons procédé à l'étude de la diversité génétique des souches isolées par: une amplification d'une région inter génique 16S-23S (ITS), amplification du gène ribosomique (ADNr 16S) et amplification des deux gènes symbiotiques (*nodC* et *nifH*). Une analyse phylogénétique est ensuite réalisée sur la base de ces marqueurs génétiques.

- **Amplification PCR-ITS**

L'amplification de la séquence intergénique située entre le 16S et 23S de l'ADNr, nous a permis de grouper les différents genres bactériens en haplotypes selon les différents profils électrophorétiques obtenus. En effet, Les isolats présentant les mêmes profils ont été regroupés dans le même haplotype ITS.

L'amplification est réalisée en utilisant les amorces universelles S-D-Bact-1494-a-S-20 et L-D-Bact-0035-a-A-15 (Daffonchio *et al.*, 1998) (Tableau 4). 1 µl de l'ADN est ajoutée à un mélange réactionnel de 24 µl par micro tube. Ce mélange contient le tampon de réaction (1X), du dNTP (0.2 mM), de MgCl₂ (1.5 mM), 0.3 µM de chacune des deux amorces et 1U de Taq Polymérase (Fermentas) (Fhoula *et al.*, 2013). Le programme d'amplification comporte une étape de dénaturation initiale de 3 min à 94 °C, suivi par 35 cycles PCR (dénaturation 45 sec à 94 °C, hybridation 1 min à 55 °C, extension 2 min à 72 °C) et un cycle final d'extension 7 min à 72 °C (Fhoula *et al.*, 2013). Les micros tubes contenant les amplifias obtenus sont placés à 4 °C.

Les fragments de différentes tailles obtenus allant de 400 jusqu'à 1600 pb sont visualisés sur gel d'agarose 2 % . Le gel est placé à 100V dans une solution tampon de TBE (Tris Borate EDTA) 0,5X pendant 45 min. 5 µl du marqueur de taille (GeneRuler DNA Ladder) est aussi déposée sur le gel dont la taille est variante (100 pb). La visualisation du gel a été réalisée sous UV dans un transilluminateur Bio-Rad Gel Doc 2000.

• Amplification PCR-16S

Deux à trois isolats représentants de chaque haplotype-ITS sont sélectionnés pour une amplification ciblant l'ADNr 16S en utilisant les mêmes conditions et le même programme d'amplification PCR-ITS (Fhoula *et al.*, 2013). Les deux amorces utilisées pour l'amplification du fragment d'environ (1500 pb) sont : S-D-Bact-0008-a-S-20 et S-D-Bact-1495-a-A-20 (Daffonchio *et al.*, 1998) (Tableau 4). Les réactions d'amplification ont été réalisées dans le thermocycleur (Biometra T3000 Thermocycler 48.Germany et Bio Rad (My cycler™ Thermal cycler.USA) (Figure 14a).

À fin de vérifier l'amplification, 5 µl de chaque amplifias ont été migrés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose 1,5 % dont lequel sont ajoutés deux gouttes de Bromure d'Ethidium (BET). Le gel est placé à 100V dans une solution tampon de TBE (Tris Borate EDTA) 0,5X pendant 45 min. 5 µl du marqueur de taille (GeneRuler DNA Ladder) est aussi déposée sur le gel dont la taille est variante (1 KB). La visualisation du gel a été réalisée sous UV dans un transilluminateur Bio-Rad Gel Doc 2000 (Figure 14c).

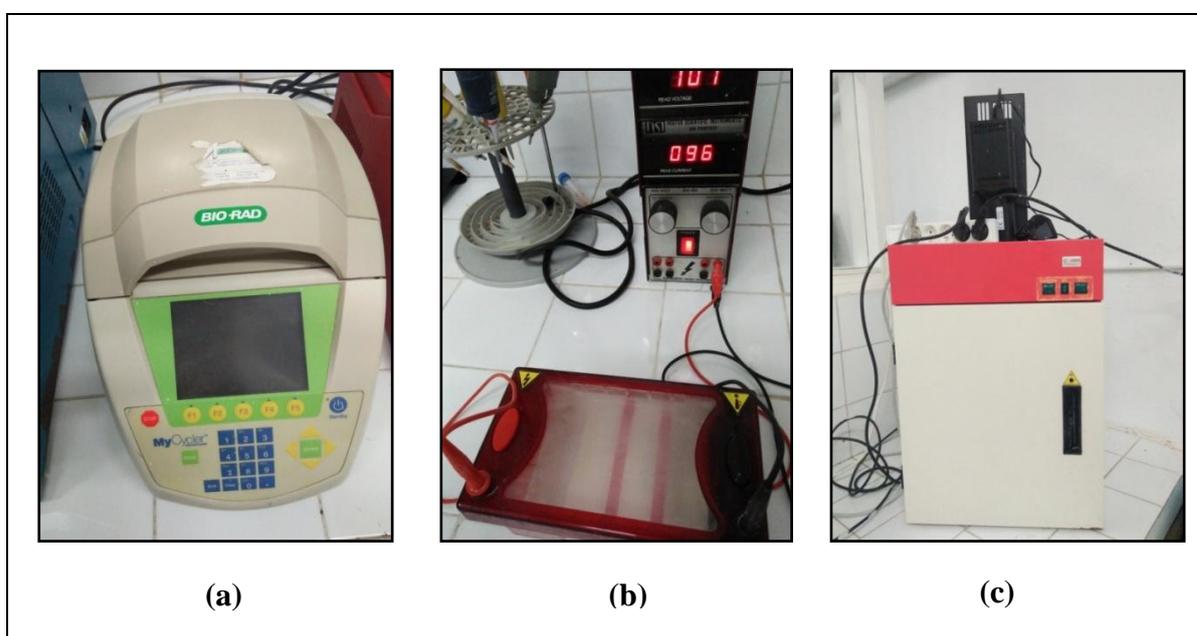


Figure 14: Appareillage utilisé dans l'amplification et la révélation des fragments d'ADN ciblés : **a)-** Thermocycleur, **b)-** Chambre d'électrophorèse et générateur de courant ; **c)-** Transilluminateur UV.

- **Amplification PCR-*nodC***

Un fragment d'environ 930 pb du gène *nodC* a été amplifié en utilisant les amorces *nodCFu* et *nodCI* (Laguerre *et al.*, 2001) (Tableau 4). La PCR a été mise en place dans un volume réactionnel de 50 µl contenant le tampon de réaction PCR (1X), MgCl₂ (1,5 mM), chaque désoxynucléotide triphosphate à une concentration de 200 µM, chaque amorce à une concentration de 0,4 µM, 100 ng d'ADN et 1,25U du Taq polymérase (Fermentas) (Sylwia et Wanda, 2010). L'amplification a été réalisée avec le protocole suivant: préchauffage à 95 °C pendant 300 sec; 35 cycles dont chacun contient une étape de dénaturation de l'ADN à 94 °C pendant 60 sec; hybridation à 55 °C pendant 60 sec et extension à 72 °C pendant 120 sec. Ces cycles sont suivis d'une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 300 sec (Sylwia et Wanda, 2010). Les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % à 80 V pendant 1 heure.

- **Amplification PCR-*nifH***

L'amplification du gène *nifH* a été réalisée dans un volume de 25 µl contenant un tampon de réaction 1X, 1,75 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP et 0,25 µM de chaque amorce (*nifH1/nifH2*) pour l'amplification du fragment d'environ 780 pb du gène *nifH* (Perret et Broughton, 1998) (Tableau 4), 100 ng d'ADN et 1U du Taq polymérase (Fermentas). L'amplification de l'ADN a été effectuée en utilisant un profil de température comprenant : 30 sec à 95 °C; 5 cycles (dénaturation 30 sec à 94 °C, hybridation 30 sec à 55 °C et extension 60 sec à 72 °C), suivies de 30 cycles (dénaturation 30 sec à 94°C; hybridation 30 sec à 65 °C et extension 60 sec à 72 °C), ainsi qu'une extension finale de 300 sec à 72 °C (Perret et Broughton, 1998). Les amplifias ont été migrés dans un gel d'agarose à 2,5 %, puis la bande attendue a été excisée à partir du gel et purifiée en utilisant le kit d'extraction innuPREP (jena analytique. Biometra). Les fragments ont été ré-amplifiés en utilisant les mêmes amorces et les conditions décrites précédemment.

2.3.3. Séquençage et Analyse phylogénétique

Les produits de PCR ont été purifiés tout d'abord, par Exonuclease-I et l'alcaline Phosphatase (Exo-Sap, Fermentas, Life Sciences), puis séquencés sur un séquenceur capillaire 3130XL (Applied Biosystems) en utilisant les mêmes amorces d'amplifications de PCR correspondantes (Tableau 4). Les réactions de séquençage de l'ADN ont été réalisées selon la méthode de Sanger (1977), à l'aide du Kit de séquençage "Big Dye Terminator v 3.1" (Applied

Biosystems). Les séquences partielles ou complètes ont été corrigées et assemblées à l'aide du logiciel Chromas Pro (version 1.4), puis comparées avec les séquences nucléotidiques des banques de données internationales NCBI ([http //www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) et Ez Biocloud (Yoon *et al.*, 2017).

L'analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant le logiciel MEGA version 7 (Kumar *et al.*, 2016). L'arbre phylogénétique est construit par la méthode de Maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) en utilisant le model Kimura à deux paramètres (Kimura, 1980). Les séquences obtenues ont été soumises dans la base de données GenBank.

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des différents fragments d'ADN.

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	Référence
S-D-Bact- 1494-a-S-20	GTCGTAACAAGGTAGCCGTA	Daffonchio <i>et al.</i> ,1998
L-D-Bact-0035- a-A-15	CAAGGCATCCACCGT	Daffonchio <i>et al.</i> ,1998
S-D-Bact-0008-a-S-20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Daffonchio <i>et al.</i> ,1998
S-D-Bact-1495-a-A-20	CTACGGCTACCTTGTTACGA	Daffonchio <i>et al.</i> ,1998
nodCFu	AYGTHGTYGAYGACGGITC	Laguerre <i>et al.</i> , 2001
nodCI	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	Laguerre <i>et al.</i> , 2001
nifH1	CGTTTTACGGCAAGGGCGGTATCGGCA	Perret et Broughton,1998
nifH2	TCCTCCAGCTCCTCCATGGTGATCGG	Perret et Broughton ,1998

Y= C ou T; H= A, C ou T; R= A ou G; S= C ou G; K= G ou T; N= A, C, G ou T; I= inosine.

2.4. Authentification des isolats (Test de nodulation)

Le test de nodulation vise à vérifier la capacité d'une souche bactérienne à former des nodules sur les racines de la plante hôte sous des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent, 1970 ; Beck *et al.*, 1993).

Les graines sont stérilisées en surface avec de l'éthanol à 95 % pendant 30 sec, puis à l'acide sulfurique concentré pendant 3 min et rincées 10 fois à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite laissées pour gonfler pendant 3 heures lors du dernier rinçage.

Les graines sont mises à germer sur des boîtes de Tryptone Yeast Agar (TYA) (Beringer, 1974) ou bien dans le sable stérile, et incubées à l'obscurité à température ambiante pendant 3 à 7 jour jusqu'à l'apparition des radicelles (Figure 15).

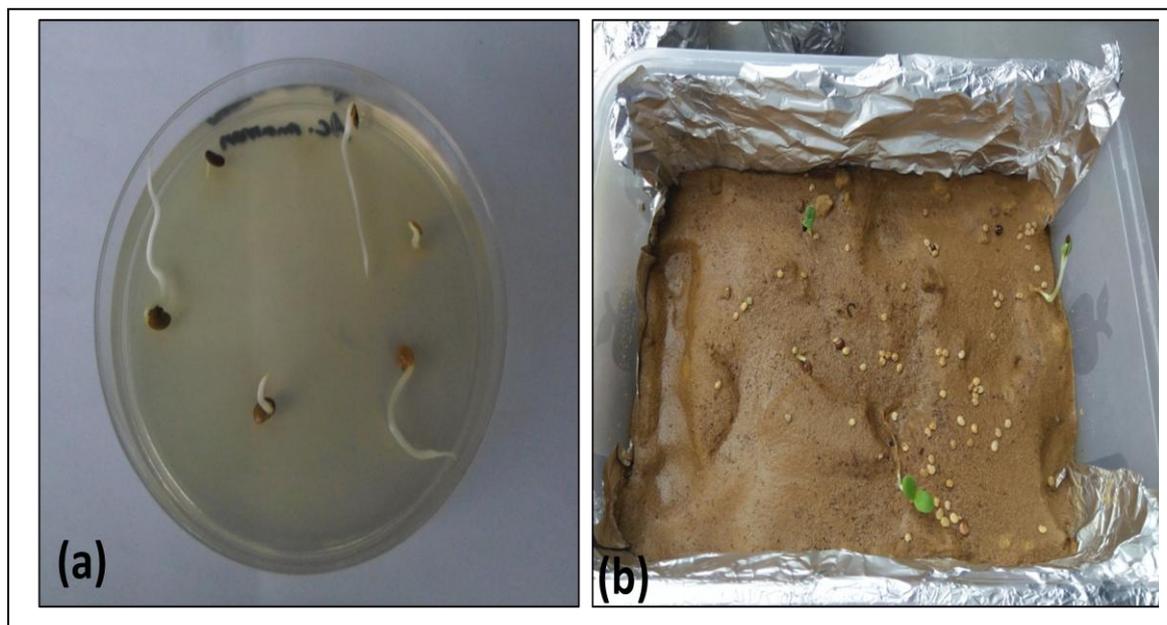


Figure 15 : Germination des graines.

(a) sur milieu gélosé TYA ; (b) sur sable stérile.

La culture des plantes a été effectuée selon deux méthodes :

a) Culture en flacons (hydroponique)

Après germination, les graines sont transférées aseptiquement dans des flacons de 250 ml remplis d'une solution nutritive de Fahraeus (Vincent, 1970) (Annexe 1) additionnée de CaCO_3 à 1 % et fermés par du papier aluminium sous forme de bouchons perforés par deux trous, l'un par lequel on introduit la radicelle de la graine germée et l'autre permettant l'introduction de l'inoculum (Riah *et al.*, 2014). La suspension bactérienne a été apportée à raison de 1 ml ($\sim 10^8$ cellules /ml) (Figure 16a).

b) Culture en pots

Des pots en plastiques ont été utilisés comme unité expérimentale, Ils ont en un premier temps été perforés à leur base, de trois trous de 1 cm de diamètre pour une bonne aération, ils étaient ensuite lavés puis désinfectés par une solution d'éthanol à 95 %. Les pots

ont été tapissés au fond par les graviers stérilisés préalablement à l'autoclave à 121 °C pendant plus de 30 minutes. Un trou a été foré dans chaque pot à une profondeur de 3-4 cm pour un bon enracinement et une meilleure aération. Les graines pré germinées étaient placées dans les trous en utilisant une pince stérilisée, une graine était placée avec la radicelle orientée vers le bas (Figure 16b).

Après le semis, les pots étaient arrosés par intermittence à l'eau stérilisée et à la solution de nutriments trois fois par semaine à intervalle d'un jour sans arrosage. La solution nutritive utilisée est celle de Broughton et Dilworth (1971), sans azote. La composition et le mode de préparation de cette solution sont présentés dans l'Annexe 1.

Les plantes sont inoculées 48 heures après la mise en tube ou en pot avec 1ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ($\sim 10^8$ cell/ml). Les plantes sont cultivées en chambre de culture équipée d'un système de lumière discontinue (16 h de jour à 23 °C et 8 h pendant la nuit à 18 °C). Des plantes non inoculées sont incluses en tant que témoin négatif. Les plantes et nodules ont été récoltés huit semaines après la plantation.

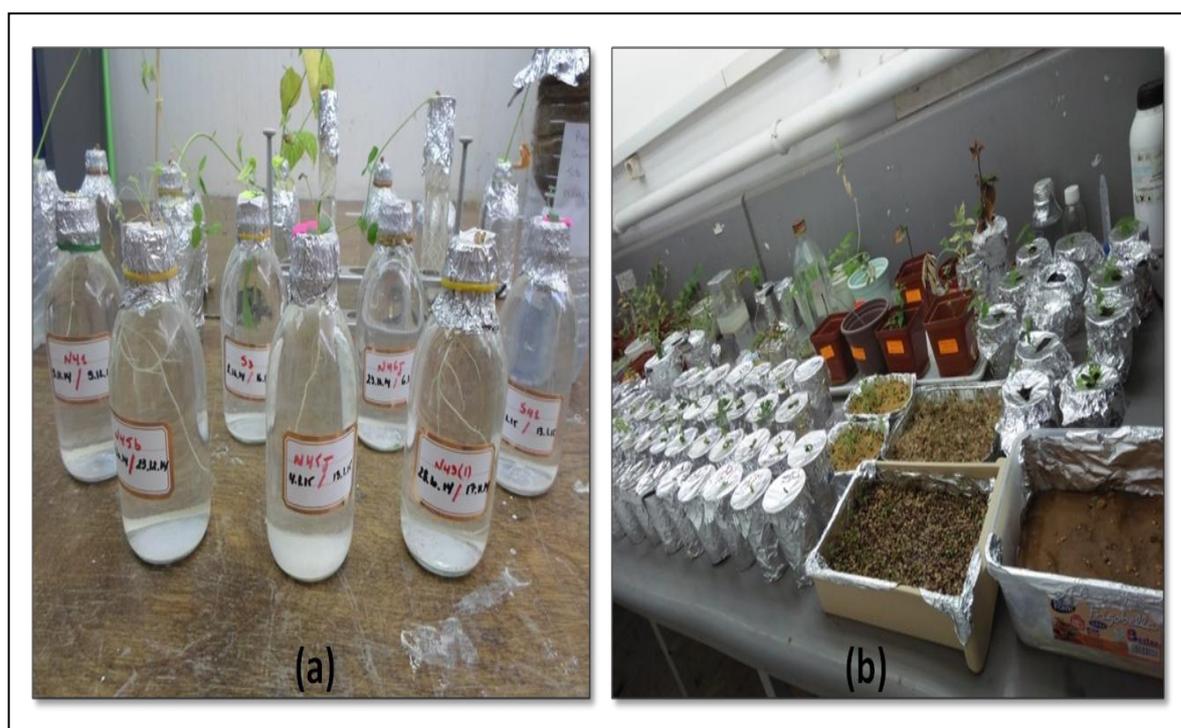


Figure 16: Test de nodulation d'*Hedysarum pallidum* *in vitro*.

(a) culture hydroponique, (b) culture en pots.

2.5. L'identification biochimique

Pour faciliter l'identification bactérienne, plusieurs systèmes d'identification miniaturisés ont été commercialisés à la fin des années 1960. Ils contiennent différents substrats permettant d'établir un profil métabolique qui est comparé ensuite aux profils établis dans une base de données. Ils présentent de nombreux avantages : ils sont faciles à utiliser, nécessitent un espace de stockage restreint, leur durée de conservation est relativement longue et ils font l'objet de contrôles de qualité standardisés.

2.5.1. Galerie API 20 E

La galerie API 20 E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés. 16 microtubes testent la fermentation d'hydrates de carbone, les quatre autres testant l'hydrolyse de l'esculine, la production d'indole, l'hydrolyse de l'urée et l'hydrolyse de la gélatine. L'indicateur de pH est le bromocrésol pourpre. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification, du catalogue Analytique ou du logiciel d'identification *apiweb*TM.

2.5.2. Galerie API 20 NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification, des bactéries à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieuses (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, ect..) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification *apiweb*TM.

2.5.3. Galerie API 50 CHB - *Bacillus*

Le milieu API 50 CHB Medium prêt à l'emploi, permet l'étude de la fermentation de 49 sucres de la galerie API 50 CHB. Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu puis inoculé dans chaque tube de la galerie. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides produit des acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique de la souche et servent à son identification ou à son typage.

hybridation à 56 °C pendant 1 min et extension à 72 °C pendant 1 min) et une extension finale à 72 °C pendant 7 min (Mapelli *et al.*, 2013).

3.3. Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)

Pour l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant, un gel de polyacrylamide à 7 % (acrylamide/bisacrilamide 37.5 :1 dans le tampon TAE [Tris Acétate EDTA] 1X) avec un gradient dénaturant de 40 % (formamide 16 ml et urée 16.8 g) à 60 % (formamide 24 ml et urée 25.2 g) a été préparé. Avant dépôt, le tampon de charge (bleu de bromophénol 0.05 g, xylène-cyanol 0.05 g, tampon TAE (1×) 10 ml) a été ajouté aux produits PCR, la migration a été réalisée dans deux cuves (cuve du système INGENY phorU-2" Ngeny, Leiden, Netherlands" (ancien modèle) et mini cuve BIO-RAD DCode™ System) (Figure 17) à un voltage constant de 90V pendant 17 h à 60 °C. Après migration le gel est coloré au bromure d'éthyidium (BET 1mg/ml) pendant 30 min, puis rincé dans un bain d'eau distillée stérile et photographié sous lampe UV (Mapelli *et al.*, 2013).

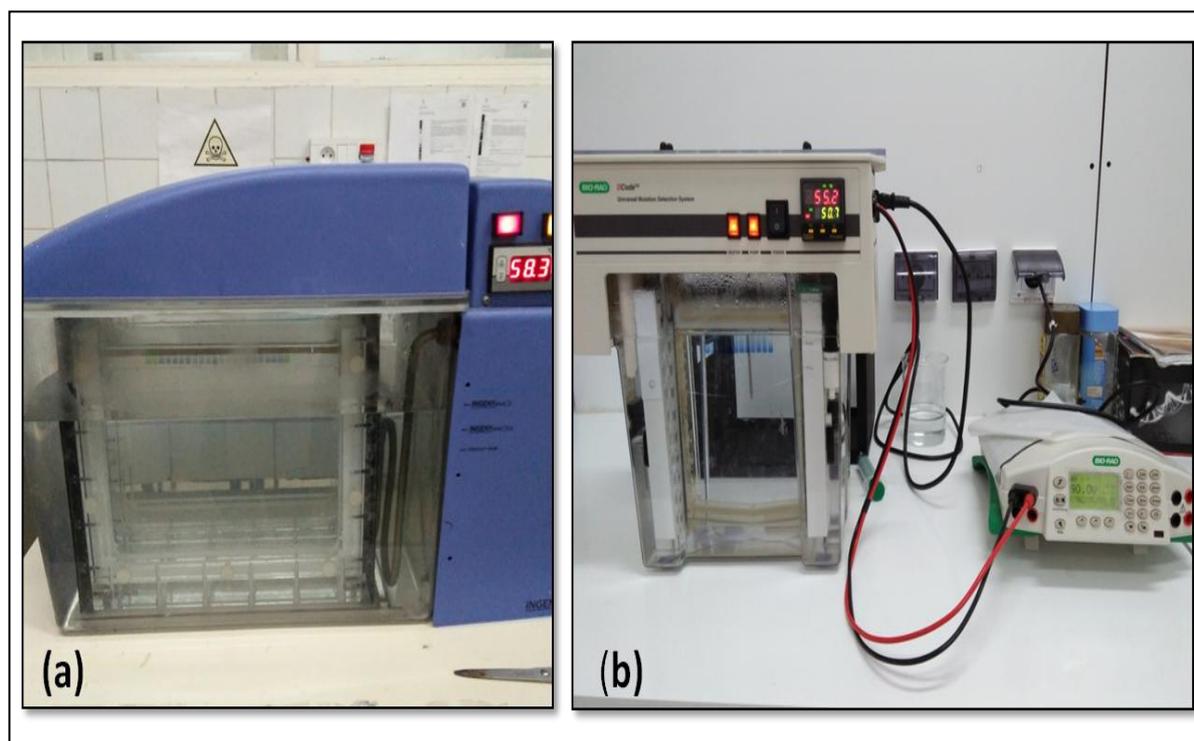


Figure 17 : Dispositifs d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant.

(a)- Grande cuve, (b)- Mini cuve.

3.4. Réamplification et séquençage des bandes DGGE

Les bandes d'intérêt ont été découpées du gel à l'aide d'un scalpel stérile, puis l'ADN est élué dans 50 µl d'eau MiliQ stérile et incubé à 37 °C pendant 6 h. 8 µl d'ADN élué a été réamplifié en utilisant le couple d'amorces (907R/357F sans GC-clamp) selon les conditions décrites précédemment (PCR-DGGE). Le programme d'amplification comporte une étape de dénaturation pendant 4 min à 94 °C, suivi de 30 cycles (dénaturation 30 sec à 94 °C, hybridation, 1 min à 64 °C, extension 1 min à 72 °C), puis une extension finale à 72 °C pendant 7 min (Ferjani, 2016). Les amplifias positifs ont été séquencés partiellement (comme il a été mentionné précédemment) en utilisant l'amorce 357F. Les séquences obtenues sont comparées avec celles des banques de données NCBI en utilisant le programme BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast/>) et Ez Biocloud (Yoon *et al.*, 2017).

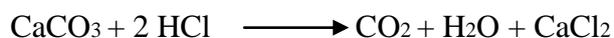
4. Analyses physico-chimiques du sol

4.1. La texture du sol

Afin de déterminer la texture des sols étudiés, nous avons utilisé une méthode classique (test du boudin) (Annexe 2).

4.2. Dosage du calcaire total

La calcimétrie est une méthode d'analyse permettant de transformer facilement le carbone inorganique total (CIT), essentiellement constitué de carbonates et de bicarbonates, par attaque de l'acide chlorhydrique (HCl, 6N), en dioxyde de carbone (CO₂), selon la réaction:



Le calcaire total du sol est déterminé au moyen du calcimètre de Bernard (Figure 18), préalablement étalonné avec des quantités connues de CaCO₃ (Mathieu *et al.*, 2003) (Annexe 2).



Figure 18: Dosage du calcaire total à l'aide du calcimètre de Bernard.

4.3. Mesure du pH du sol

La mesure du pH-eau ou acidité effective (1/2.5) a été déterminée à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre préalablement étalonné à par les solutions tampons de pH connu (Mathieu *et al.*, 2003) (Annexe 2).

4.4. Mesure de la conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique (CE) d'un sol renseigne sur sa teneur globale en sels dissous sur un extrait aqueux dont le rapport sol/eau égal à 1/5 (Mathieu *et al.*, 2003) (Annexe 2). La CE a été mesurée à l'aide d'un conductimètre (ino Lab Cond 720). (Figure 19).



Figure 19: Conductimètre utilisé dans la mesure de la conductivité électrique.

4.5. L'Analyse statistique

Pour le traitement des résultats nous avons utilisé l'ACP, qui est une méthode statistique multivariée de l'analyse des données, basée sur la corrélation entre les variables en utilisant le logiciel XLSTAT (Addinsoft, version 2016.05.34949) (Annexe 3).

Chapitre 3 :

Résultats et discussion

1. Étude de la diversité bactérienne cultivable

L'isolement des bactéries à partir des nodules d'*Hedysarum pallidum* collectés des différents sites prospectés a permis la constitution d'une collection de 81 isolats. Le nombre et les codes des isolats sont illustrés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Nombre et code des souches isolées associées aux nodules d'*Hedysarum pallidum* dans six régions de l'Algérie.

Site d'échantillonnage	Nombre d'isolats	Code
Aïn Babouche (Oum El Bouaghi)	13	BA
Aïn M'lila (Oum El Bouaghi)	25	ML
Amoucha (Sétif)	10	AM
Djbel Boutaleb (Sétif)	6	DJ
Arzew (Oran)	14	OR
Aïn El Bey (Constantine)	13	CA

1.1. Caractérisation phénotypique des isolats

Notre étude phénotypique a été basée sur des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques des souches isolées (Graham *et al.*, 1991).

Le test de stérilité a permis de vérifier l'efficacité de la technique utilisée pour la stérilisation des nodules et ceci c'est manifestera par l'absence de croissance de bactéries sur milieu YMA+RC.

1.1.1. Caractères morphologiques

Les résultats obtenus révèlent que nos isolats diffèrent dans leur absorption du rouge Congo. Ils ont bien poussé sur le milieu YMA au bout de 2 à 3 jours jusqu'à 8 jours à 28 °C. L'aspect des colonies apparaît différent d'une souche à une autre, en effet, Elles ont une forme circulaire à bord régulier, d'une couleur blanche, jaune, crème ou légèrement rose avec un aspect lisse brillant et leur taille varie entre 1 à 4 mm. Elles présentent une texture translucide, transparente et parfois opaque et une consistance visqueuse ou crémeuse. Certaines de ces souches isolées produisent des quantités importantes d'exopolysaccharides

qui confèrent un aspect mucoidal aux colonies. (Figure 20). Chaque souche a été purifiée et conservée.

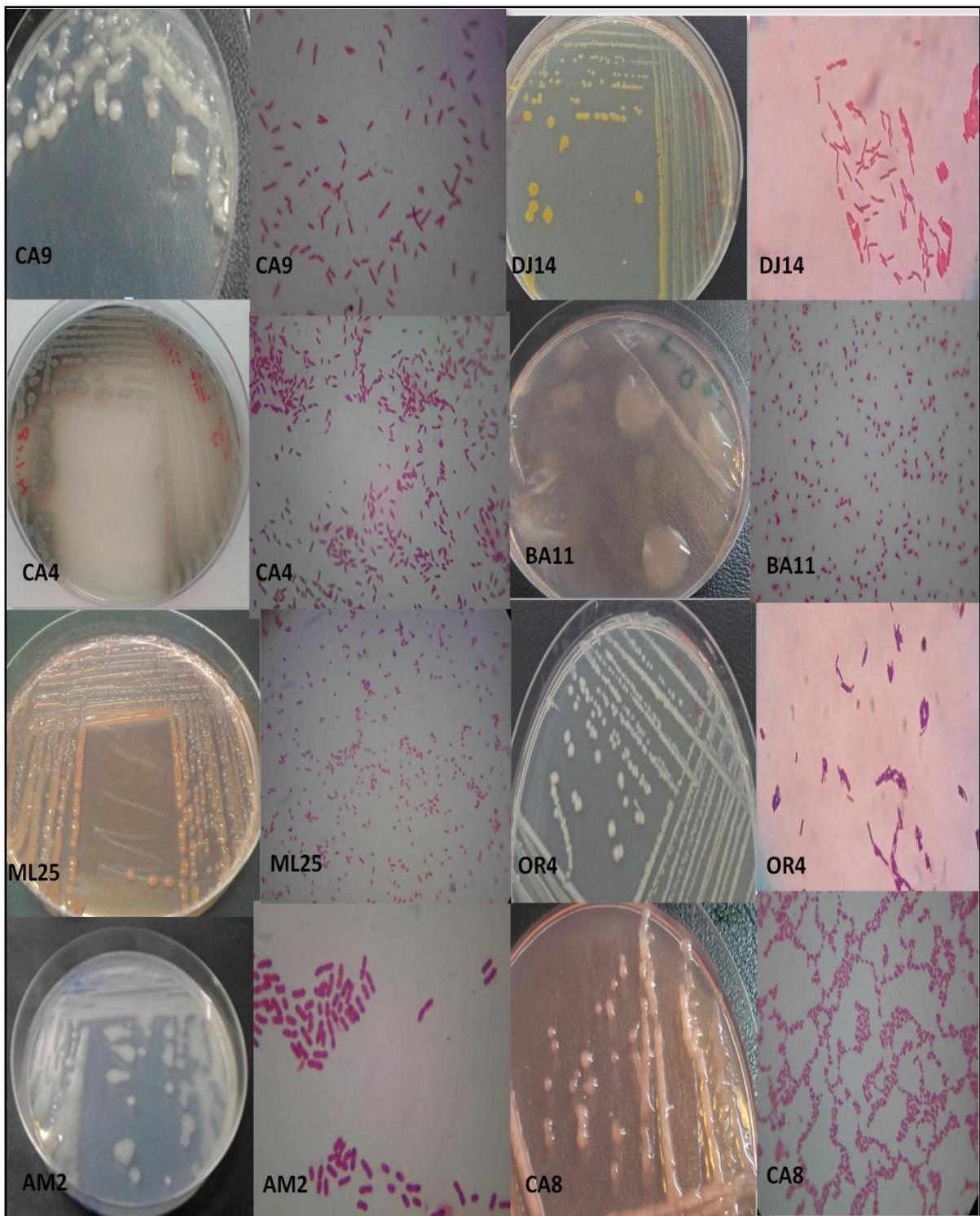


Figure 20 : Aspects macroscopiques et microscopiques de quelques souches isolées à partir de différents sites.

L'examen microscopique nous a révélé l'existence de bâtonnets et des coccobacilles à Gram négatif de taille différente ainsi que des bacilles à Gram positif.

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, l'aspect des colonies et l'examen microscopique montre que les isolats ont la description des Bactéries Nodulant les Légumineuses (Vincent, 1970; Zakhia *et de* Ladjudie, 2001; Benhizia *et al.*, 2004).

1.1.2. Caractères cultureux (Test de Bleu de Bromothymol)

La majorité de nos isolats modifient le pH sur milieu YMA+BTB après 24 à 72 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boîtes (Figure 21). Ce qui indique que ces souches présentent une croissance rapide (Beck *et al.*, 1993). À l'exception de quelques souches qui ont produit une alcalinisation du milieu, ce qui indique leur croissance lente.

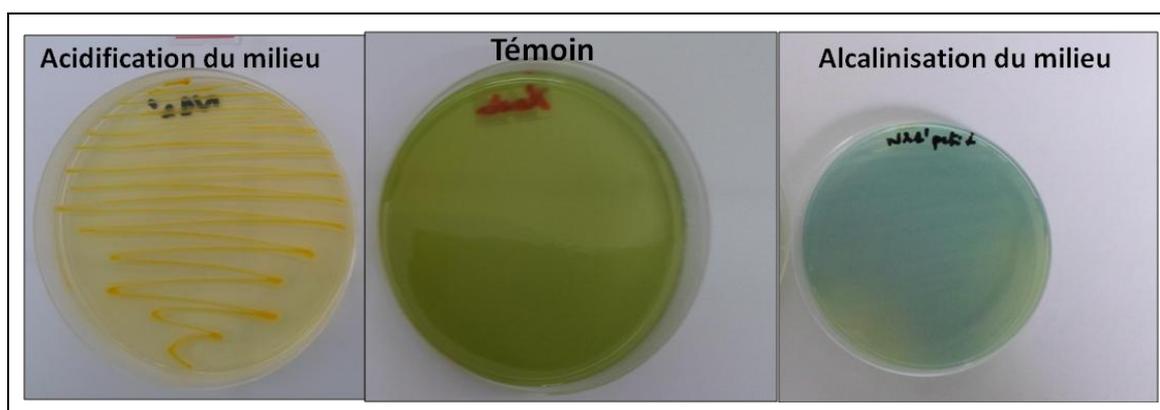


Figure 21 : Test de Bleu de Bromotymol (BTB)

1.1.3. Caractères biochimiques

1.1.3.1. Réduction des nitrates

Dans le sol, l'azote est présent principalement sous forme d'ions ammonium (NH_4^+) et sous formes d'oxydes d'azote, ions nitrates (NO_3^-) ou nitrites (NO_2^-). Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leur plantes hôtes. Le nitrate est réduit en nitrite par la nitrate réductase qui catalyse la réaction suivante :



La majorité de nos isolats (93 %) ainsi que les souches de références ont pu réduire le nitrate (Figure 24).

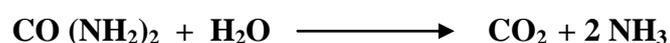
Les effets négatifs provoqués par les nitrates sur l'établissement de la symbiose et son fonctionnement sont amplement documentés (Stephens et Neyra, 1983 ; Drevon *et al.*, 1988). L'augmentation de la teneur en nitrate interrompt le développement des nodosités de type indéterminé, c'est-à-dire le fonctionnement de leur méristème et donc, lorsque la nodosité est active, le nitrate entrave les mécanismes biochimiques de la fixation d'azote à différents niveaux (Minchin *et al.*, 1986).

Luciński *et al.* (2002) ont rapporté que les associations symbiotiques des souches de *Rhizobium* qui sont caractérisées par une activité élevée de nitrate réductase sont moins susceptibles d'être inhibées par les nitrates. De même, et selon Mantelin et Touraine (2003), les bactéries endophytes associées aux nodules ont un grand impact dans la nutrition azotée des plantes par l'absorption des nitrates et leur capacité à le réduire et par conséquent en stimulant le développement du système racinaire chez les plantes.

1.1.3.2. Hydrolyse de l'urée

La mise en évidence de la capacité des BNL à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis *et al.* (1977) chez les souches rhizobiennes en utilisant le rouge de phénol comme indicateur de pH.

Après incubation, presque la totalité de nos isolats (98 %) ainsi que toutes les souches de référence ont donné un résultat positif vis-à-vis l'hydrolyse de l'urée en alcalinisant le milieu vers le rose fuchsia (Figure 22) et par conséquent la dégradation de l'urée en ammoniac puis en ions d'ammonium (Guiraud, 1998), selon la réaction qui suit :



Peu de travaux ont été réalisés sur les uréases des bactéries endosymbiotiques. En effet, Toffanin *et al.* (2002) ont été déterminés l'activité uréasique chez la souche *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 dans différentes conditions sous sa forme végétative et en bactéroïdes et ils sont constatés des niveaux significatifs de l'activité uréasique chez cette souches dans les bactéroïdes.

La capacité d'hydrolyser l'urée par les bactéries endophytes a été prouvée par plusieurs travaux (UmaMaheswari *et al.*, 2013; Singh, 2018).

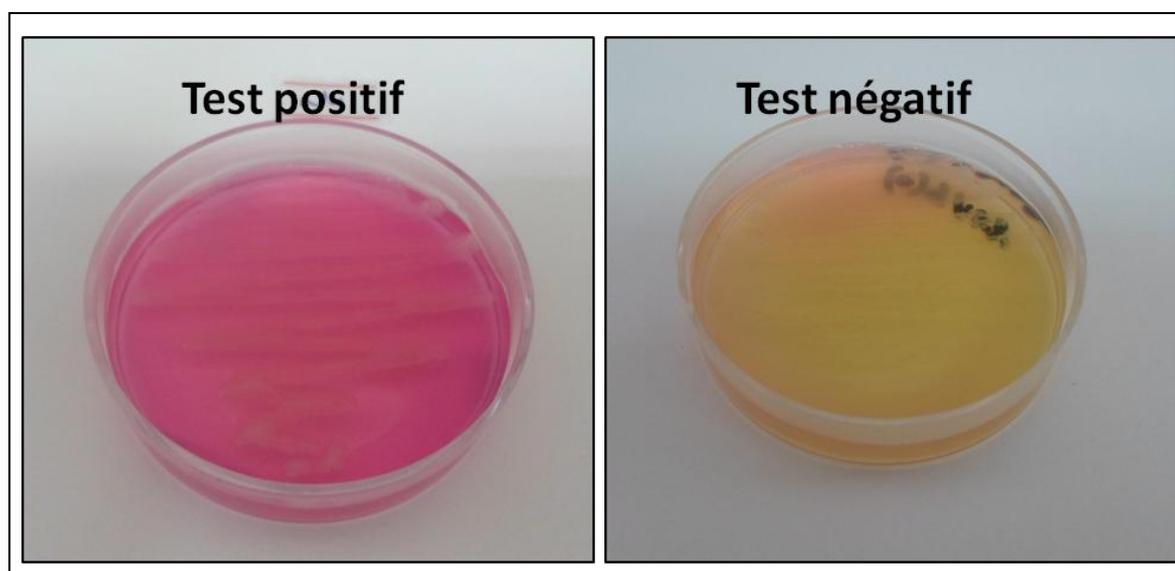


Figure 22 : Hydrolyse de l'urée.

1.1.3.3. Détection de l'activité endoglucanasique

Quatre vingt-huit pour cent (88%) de nos isolats ainsi que les souches de référence (rhizobia) possèdent une activité endoglucanasique (endoglucanase) qui se manifeste par l'apparition d'un halo jaune orange au tour des colonies (Figure 23). Un résultat négatif a été noté chez les deux souches de références (Gammaprotéobacéries) et les isolats suivants : (DJ14, ML12, BA11, OR4, OR11, BA3, CA4). Ces résultats sont en concordance avec ceux de Benhizia (2006) et Torche (2014) ; ce qui suggère que ces isolats peuvent appartenir à la classe des *Gammaproteobacteria*.

La carboxyméthylcellulase (CMCase) ou endo-1,4- β -D-glucanase est l'une des enzymes clés impliquées dans le processus précoce de la symbiose (stade initial de l'infection) (Bhat et Bhat, 1997). Plusieurs travaux ont été réalisés afin de déterminer l'activité de la cellulase. En effet, Robledo *et al.* (2008) ont rapporté que l'enzyme cellulase (CelC₂) liée aux cellules de la souche *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ; "l'endosymbiote nodulant le trèfle " créant un trou localisé de taille suffisante pour faciliter sa pénétration en traversant la paroi du poil racinaire.

De plus, Hu *et al.* (2003) ont prouvé que les CM-cellulases de la souche *Sinorhizobium* CCRC15769 sont principalement situées entre la membrane externe et la cytomembrane et que les déterminants antigéniques de l'enzyme sont exposés vers l'espace périplasmique.

À propos des bactéries endophytes associées aux nodules des légumineuses, l'activité CMCase a été trouvée chez *Paenibacillus* (Pooyan et Shamalnasab, 2007) et *Bacillus circulans* (Kim, 1995).

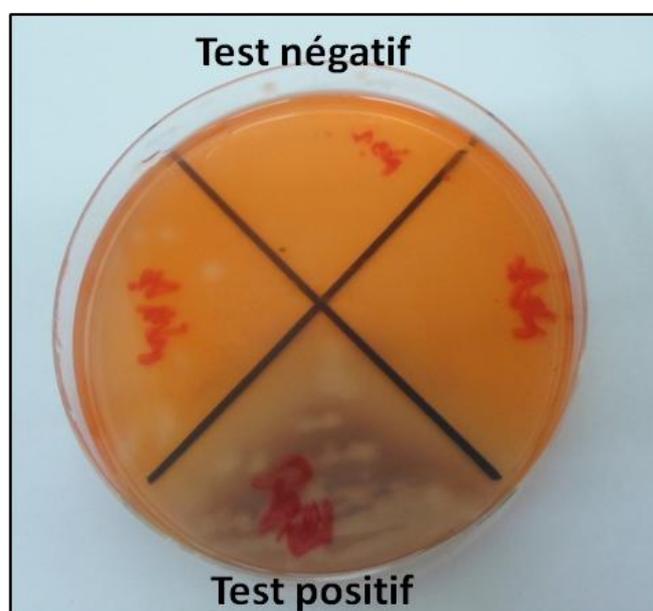


Figure 23 : L'activité endoglucanase.

La figure 24 représente le pourcentage des isolats qui sont capables de produire la nitrate réductase, l'uréase et l'endoglucanase.

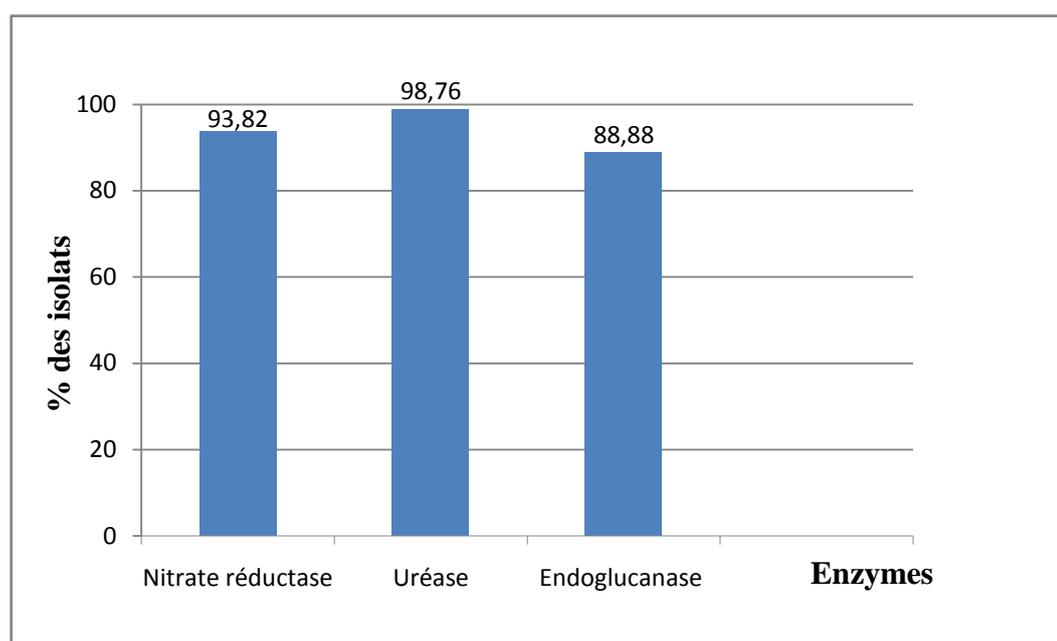


Figure 24 : Pourcentage des souches isolées productrices d'enzymes (nitrates réductase, uréase, endoglucanase).

1.1.4. Caractères physiologiques

1.1.4.1. Effet du pH

L'effet du pH montre que la majorité des souches isolées ainsi que les souches de références sont capables de pousser dans une gamme de pH allant de 4 à 11. L'optimum de croissance varie d'une souche à une autre ce qui suggère une diversité entre les isolats.

Dans notre étude, la tolérance aux différents pH est mieux observée après 48 heures d'incubation (Figure 25). Face à l'acidité, sauf 10 % des souches isolées ont tendance de tolérer la valeur du pH la plus basse (pH 4). Certains isolats préfèrent les milieux légèrement acides à neutres où la meilleure croissance est observée chez la souche BA11 (site contaminé par l'antimoine de Aïn Babouche) et la souche DJ1 (site aride de Djbel Boutaleb) à pH 6.8 avec une densité optique maximale égale à (DO= 0.761) et (DO= 0.631), chez la souche ML21 (site salin de Aïn M'lila) à pH 5 avec DO égale à 0.930 et chez la souche AM3 (site subhumide de Amoucha) à pH 5.5 avec DO égale à 0.966.

En outre, d'autres isolats préfèrent les milieux basiques et leur croissance maximale est notée avec la souche BA3 à pH 7.8 (DO= 0.790), la souche CA4 à pH 8.8 (DO= 0.715) et avec la souche OR11 à pH 9.8 (DO= 0.557).

Les rhizobiums sont en général neutrophiles mais leur réponse face à une fluctuation du pH varie d'une souche à une autre (Jordan, 1984; Glenn et Dilworth, 1994). En effet, Graham et Parker (1964) ont montré qu'un pH bas critique pour la croissance de *Rhizobium japonicum* et de *Rhizobium lupini* est compris entre 4 et 6. *Sinorhizobium meliloti* a été rapporté être sensible au pH acide (Brockwell *et al.*, 1991). De plus, Yadav et Vyas (1973) ont prouvé que certaines souches rhizobiennes peuvent même supporter un pH très bas de l'ordre de 3,5.

El Boutari (2009) a rapporté une tolérance des rhizobiums isolés à partir de l'espèce *Hedysarum coronarium* L., aux valeurs de pH comprises entre 9 et 9,5. De même Benhizia (2006) a montré que les souches isolées à partir de trois espèces du genre *Hedysarum* poussant en Algérie et qui appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria* sont capables de croître dans une gamme de pH allant de 4 jusqu'à 9.8. Ces résultats corroborent avec les seuils de tolérance de pH obtenus dans notre étude.

La tolérance à pH 11 s'est révélée variable selon les souches et en fonction du temps d'incubation. En effet, il existe des souches qui ne peuvent pas supporter cette valeur de pH (BA6, ML14, OR3, CA11), alors que d'autres sont très tolérantes au pH 11 (BA11, ML23, DJ4, CA4, OR11) présentant ainsi une absorbance appréciable arrivant jusqu'à (DO= 0.760) chez la souche ML23. Ces résultats sont en concordance avec ceux enregistrés par Glenn et Dilworth (1994) qui ont rapporté que le groupe des souches bactériennes à croissance rapide a tendance de tolérer des milieux basiques allant jusqu'à un pH 10. Dans ce sens, Singh *et al.* (2006) ont isolé des souches rhizobiennes à partir des nodules du pois chiche pouvant tolérer un pH trop alcalin (pH 11).

Les mécanismes d'adaptation physiologiques et biochimiques des rhizobiums sous les conditions acides sont nombreux (O'Hara et Glenn, 1994 ; Graham *et al.*, 1994). Ces mécanismes incluent entre l'exclusion et l'expulsion des protons H⁺ (Chen *et al.*, 1993), le changement de la composition du LPS (Chen *et al.*, 1993) et l'accumulation de polyamines (Fujihara et Yoneyama, 1993).



Figure 25 : Effet du pH

1.1.4.2. Effet de la salinité

Les résultats obtenus montrent une variabilité relative de tolérance vis-à-vis à la salinité chez les souches étudiées suggérant une diversité entre les isolats. La tolérance aux différentes concentrations du NaCl est mieux observée après 48 heures d'incubation (Figure 26).

Les mesures de la densité optique montrent que jusqu'à une concentration de 0.2 M (200 mM) de NaCl, la croissance de tous les isolats ainsi que les souches témoins n'est pas affectée avec un optimum de croissance noté pour les souches suivantes : BA11 (DO= 0.198), ML1 (DO= 0.354), AM3 (DO= 0.109), OR4 (DO= 0.164), DJ4 (DO= 0.254), CA4 (DO= 0.158).

À partir de la concentration 0.5M (500 mM) la tolérance s'est révélée variable et 55 % des souches arrive à croître à la concentration 1M (1000 mM). Les souches témoins sont sensibles aux fortes concentrations du sel, elles peuvent tolérer des concentrations du sel variant entre 0.01 M à 0.5 M.

Les souches isolées à partir du site salin et le site aride peuvent tolérer jusqu'à une concentration de 2M (2000 mM) de NaCl, ce qui suggère que ces souches sont hautement tolérantes. La tolérance au sel qui caractérise les souches étudiées pourrait être en rapport avec le taux de salinité du site d'isolement. En outre, certaines souches isolées à partir des autres sites non salin (site de Aïn Babouche et site d'Oran) sont capables de supporter cette concentration, cela est peut être dû à leur adaptation au stress osmotique. Ces résultats nous ont permis de constater qu'il n'y a pas une relation obligatoire entre la tolérance des souches et leur site d'échantillonnage.

La croissance des rhizobiums sous des conditions salines varie d'une espèce à autre et d'un type de sel à l'autre (El Sheikh et Wood, 1989). En effet, avec *Rizobium sullae*, El Boutari (2009) a rapporté des niveaux de tolérance de cette espèce au sel entre 170 à 850 mM de NaCl. Cependant, Squartini *et al.* (2002) ont trouvé des spectres de tolérance plus limités, compris entre 290 à 548 mM de NaCl. De plus, Benhizia (2006) a prouvé que la croissance des souches isolées à partir de quatre espèces d'*Hedysarum* en Algérie n'est pas affectée dans un intervalle de salinité de 0.01 à 1M de NaCl, mais elles sont inhibées à 1.5 M suggérant que les souches soient halotolérantes. Des niveaux de tolérance à la salinité beaucoup plus élevés (1190-1700 mM NaCl) ont été notés avec des souches rhizobiennes nodulant le lupin (Zahran *et al.*, 1994; Raza *et al.*, 2001).

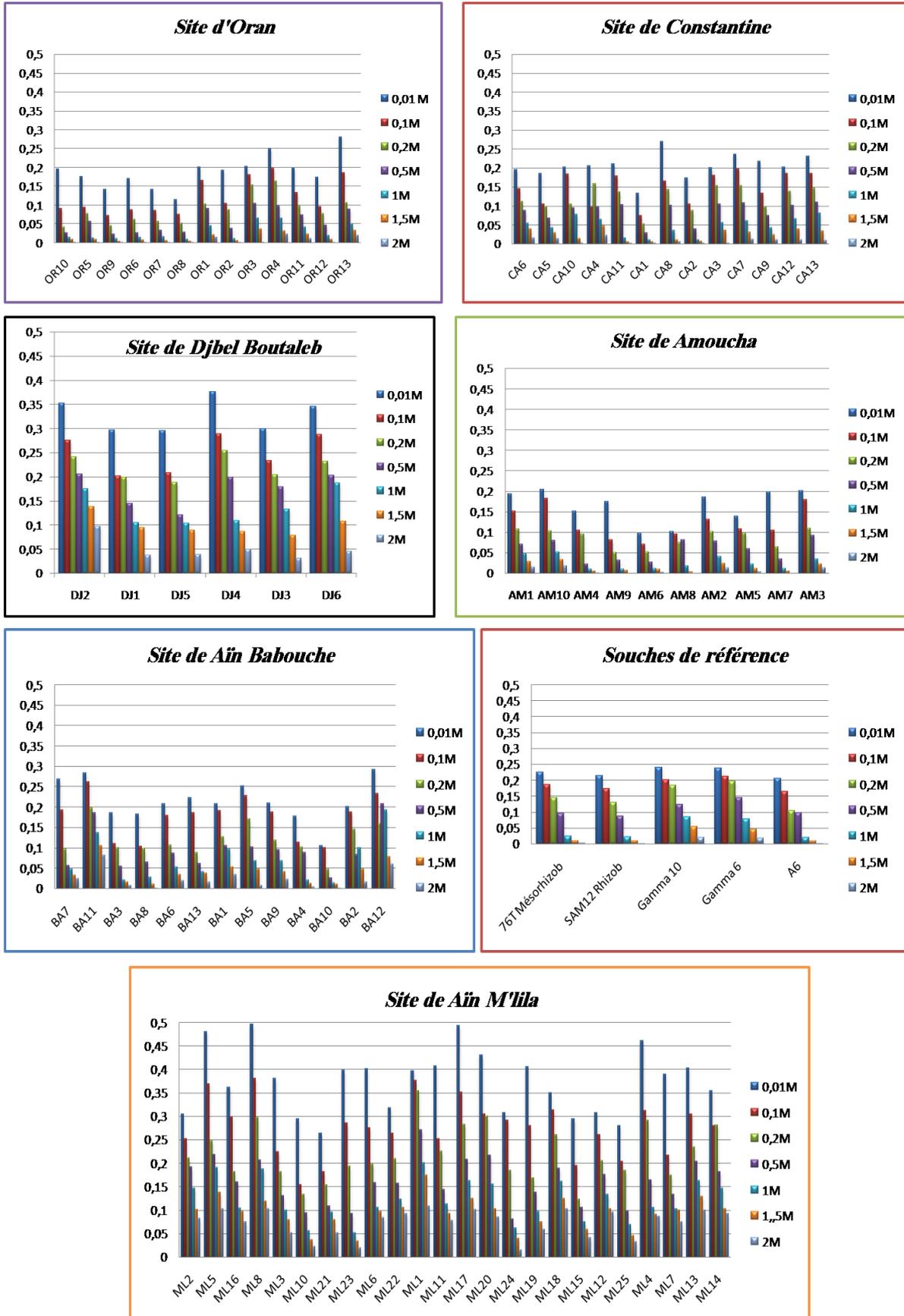


Figure 26: Effet du NaCl

Les légumineuses sont plus sensibles au sel et au stress osmotique que leur rhizobia (Zahran, 1999). La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Saadallah *et al.*, 2001). Beaucoup d'espèces bactériennes ainsi que les rhizobia s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes (Zahran, 1999), ou plus encore la modification dans l'expression des exopolysaccharides (EPS) et les lipopolysaccharides (Zahran, 1994).

1.1.4.3. Effet de la température

La tolérance à la température s'est révélée variable selon les isolats. En effet, tous les isolats présentent une bonne croissance entre 28 °C et 37 °C et les résultats montrent que la meilleure température d'incubation correspond à 28 °C en donnant une très bonne croissance (Figure 27). 55 % de l'ensemble de nos isolats peuvent croître à des températures élevées atteignant les 44 °C qui leur confèrent les propriétés des bactéries thermo-tolérantes (Figure 27). À 50 °C aucune souche n'arrive à croître correspond à celui qui a été indiqué par Benhizia en 2004.

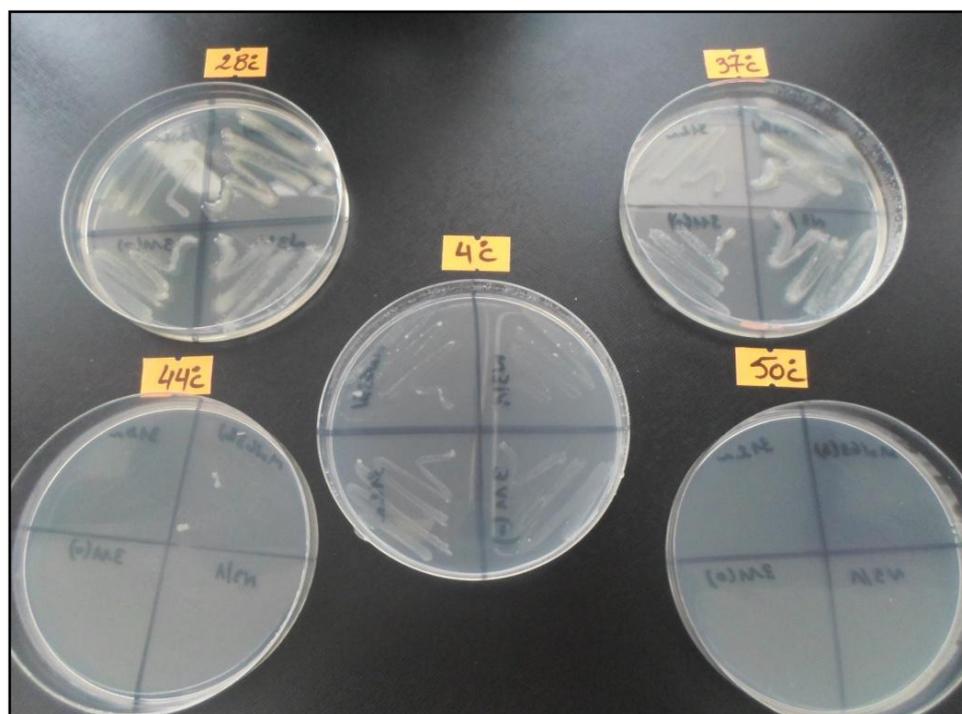


Figure 27 : Effet de la température

La température optimale de la croissance des rhizobiums est située entre 28 °C et 31 °C (Graham, 1992). Cependant, beaucoup d'études ont prouvé la capacité des rhizobiums à tolérer les températures élevées grâce à des Heat Shock Proteins (HSPs) qui jouent un rôle important dans la protection des organismes contre le stress thermique (Michiels *et al.*, 1994 ; Wallington et Lund, 1994).

L'ensemble des résultats de la caractérisation phénotypique de la collection des isolats cultivables est récapitulé dans l'annexe 4. Une diversité phénotypique a été observée entre les isolats, mais cette caractérisation a été insuffisante pour arriver à déterminer le statut taxonomique de nos isolats, pour cela une approche moléculaire s'est imposée.

1.2. Caractérisation génotypique et phylogénétique des isolats

• Amplification PCR-ITS

Dans le but de déterminer le polymorphisme et la structure de communauté bactérienne, les régions intergéniques transcrites ITS 16S-23S ont été amplifiées pour la totalité des souches isolées (81 isolats).

L'étude des structures bactériennes utilisant un criblage des amplifications des régions ITS s'est avérée avantageuse dans plusieurs études pour la discrimination des genres bactériens (Gürtler et Stanisich, 1996 ; Daffonchio *et al.*, 1998).

L'analyse des différents profils électrophorétiques obtenus a permis de grouper les différents genres bactériens en 20 haplotypes. En effet, Les isolats présentant les mêmes profils ont été regroupés dans le même haplotype ITS. Ces résultats montrent une importante diversité des BNL au niveau des nodules de la plante *Hedysarum pallidum*.

Les profils électrophorétiques obtenus ont été par la suite traités par le logiciel FP Quest qui a permis de regrouper les souches les plus proches en des clusters selon leurs profils ITS (Figure 28). À partir de chaque haplotype (n= 20), un à trois isolats ont été sélectionnés pour une PCR-ADNr 16S.

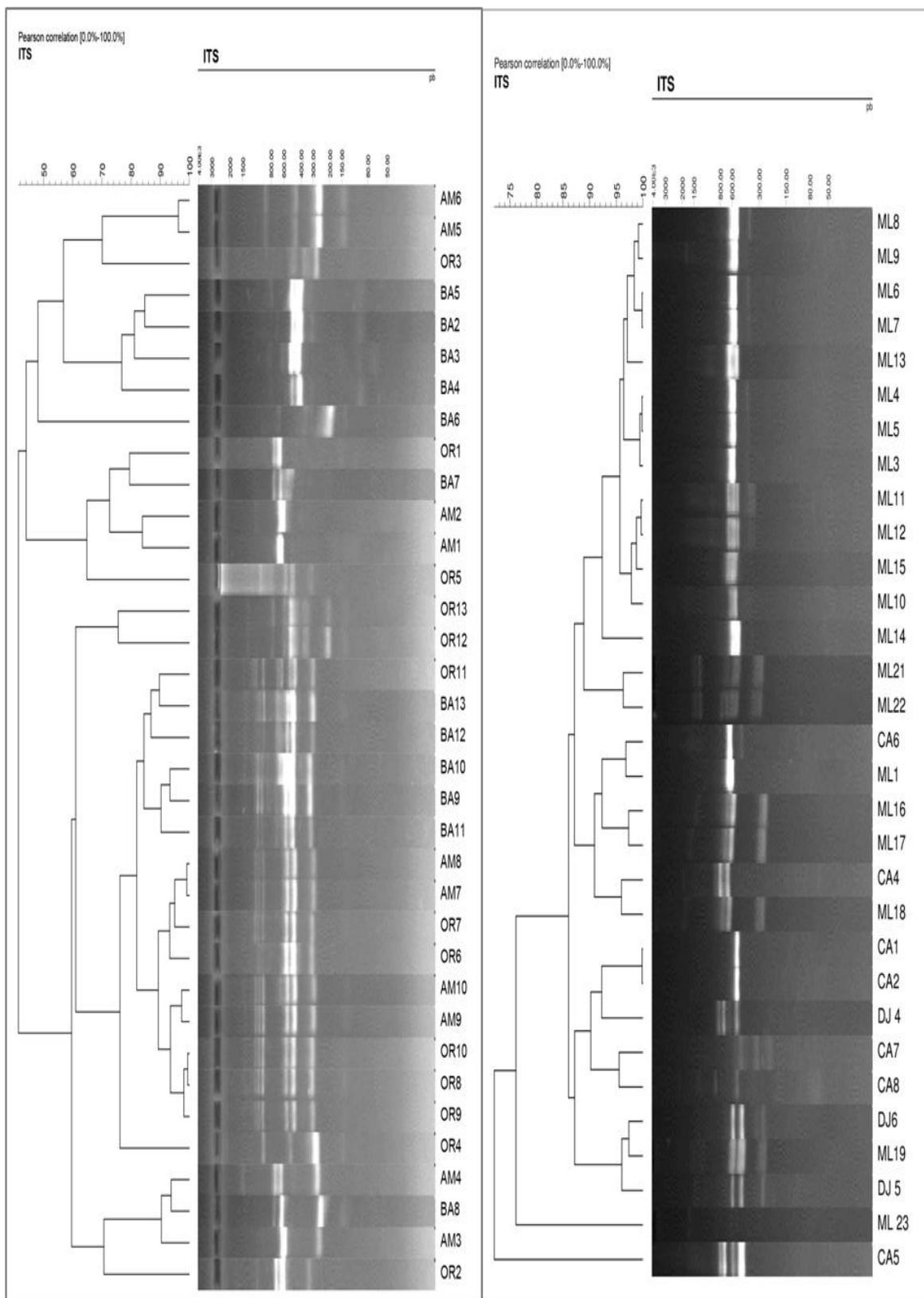


Figure 28 : Comparaison des profils ITS utilisant le logiciel FP Quest.

• Amplification et séquençage du gène ADNr16S

Au total, 32 isolats représentatifs ont été sélectionnés pour une amplification PCR-ADNr16S et le séquençage partiel de l'ADNr 16S a été effectué. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles disponibles dans la banque de donnée NCBI.

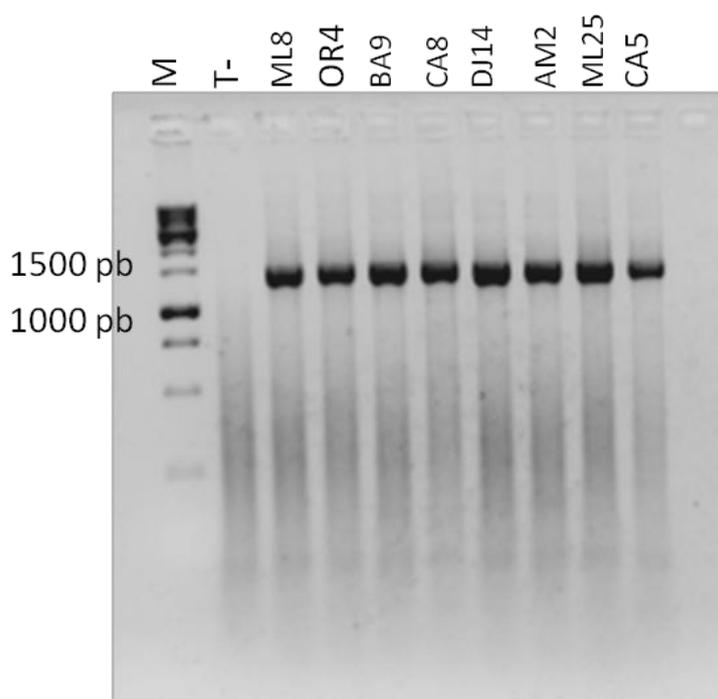


Figure 29: Profils électrophorétiques de l'amplification du gène ADNr 16S chez certains isolats (M: marqueur de taille 1KB, T- : Témoin négatif).

L'identification taxonomique a permis l'affiliation de nos isolats en deux phylums : *Proteobacteria* [*Gammaproteobacteria* (59%), *Alphaproteobacteria* (18%), *Betaproteobacteria* (3%)] et *Firmicutes* (18%). Ces résultats témoignent une diversité bactérienne importante associée aux nodules d'*Hedysarum pallidum*.

Les fragments séquencés de l'ADNr 16S, ont été utilisés pour la construction de l'arbre phylogénétique de nos isolats avec les souches de références apparentées (Figure 30). Les séquences ont été soumises à GenBank avec les numéros d'accès allant de MN945240 à MN945272 (Annexe 5).

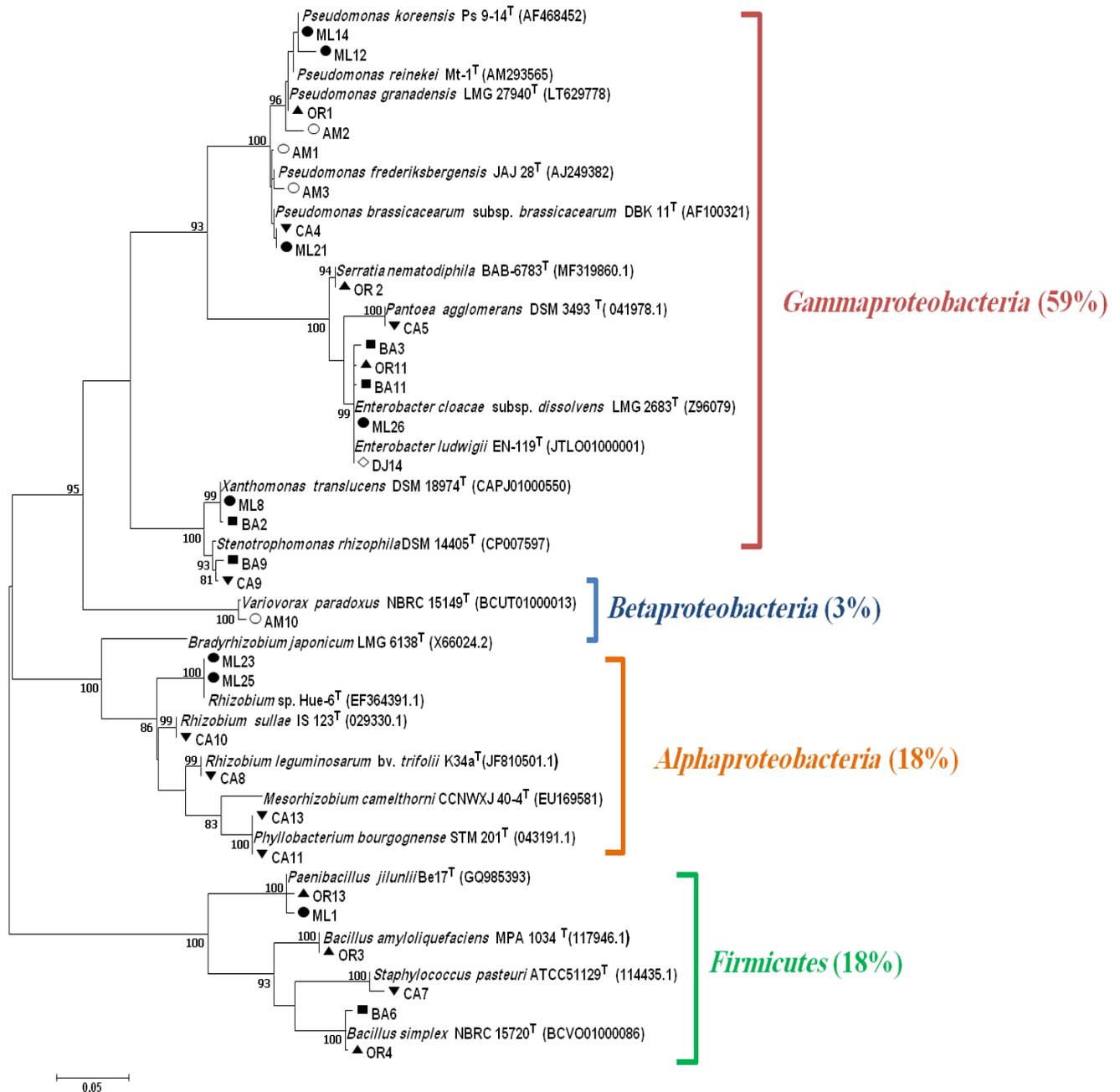


Figure 30: Arbre phylogénétique utilisant la méthode de Maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) établie sur la base des séquences partielles des ADN_r16S des isolats et des souches de références. Les valeurs de bootstrap sont obtenues à partir de 1000 répliques à l’aide du logiciel MEGA 7. AM(○ Site d’Amoucha), BA(■ Site d’Aïn Babouche), DJ(◇ Site de Djbel Boutaleb), CA(▼ Site de Constantine), ML(● Site d’Aïn M’lila), OR(▲ Site d’Oran). L’arbre est enraciné avec *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138^T (X66024.2) et *Mesorhizobium camelthorni* CCNWXJ 40-4^T (EU169581). T: souche type.

Le groupe des *Gammaproteobacteria* est le groupe majoritaire et il est représenté par les genres suivants : *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont indiqué que ces genres étaient couramment isolés à partir des tissus des végétaux, y compris les nodules de légumineuses en tant qu'endophytes avec des rhizobiums associés aux légumineuses sauvages et cultivables (Benhizia *et al.*, 2004; Ourarhi *et al.*, 2011; Peix *et al.*, 2012, 2015; Ibañez *et al.*, 2017).

Pseudomonas est le genre dominant obtenu à l'intérieur des nodules de notre plante hôte, les souches sélectionnées ont été affiliées à différentes espèces de *Pseudomonas* isolées à partir du sol et des racines des légumineuses. En fait, ce genre a été largement retrouvé dans les nodules de différentes espèces d'*Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004) en Algérie; puis, à partir de nodules de *Medicago truncatula* (Zakhia *et al.*, 2006) en Tunisie et plus tard; à partir des nodules *Sphaerophysa salsula* en Chine (Deng *et al.*, 2011).

Sept souches représentatives ont présenté une similitude plus élevée avec les souches cliniques qui ne provoquent pas de maladie chez les plantes appartenant à la famille des entérobactéries [*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Serratia nematophila* et *Pantoea agglomerans*]. D'ailleurs, des études antérieures ont rapporté la présence de souches enterobactériales dans les nodules de *Vicia faba* (Kan *et al.*, 2007); Glycine max (Li *et al.*, 2008). De même, Indiguez *et al.* (2005) ont prouvé que la réponse de défense des plantes régule la colonisation endophytique entérique en réduisant la virulence des souches. En effet, la colonisation par les endophytes peut être modulée pour réduire les niveaux de bactéries nocives ou augmenter les niveaux de bactéries bénéfiques en modifiant les génotypes des bactéries endophytes et de leurs plantes hôtes.

Conformément à nos résultats, une étude menée par De Meyer *et al.* (2015) ont signalé la présence de *Stenotrophomonas* et *Xanthomonas* en tant que NRE associées aux légumineuses indigènes dans la région flamande de Belgique.

Le groupe des *Betaprotéobactéria* est représenté par une seule souche (AM10), qui présente une séquence identique à celle de *Variovorax paradoxus* (100 % d'homologie). Cette espèce est trouvée pour la première fois chez les nodules racinaires d'*Hedysarum pallidum* poussant dans la région d'Amoucha (Sétif). Par contre, elle a été signalée en tant

qu'endophytes chez *Zea mays* et en tant qu'agent favorisant la croissance des plantes dans les sols dégradés par des métaux (Pereira et Castro, 2014).

Le groupe des Alphaprotéobactéries est représenté par deux genres: *Rhizobium* et *Phyllobacterium*. Dans le cadre de ce travail et à notre connaissance, ces deux genres sont signalés pour la première fois avec les nodules racinaires d'*Hedysarum pallidum* (Boukaous *et al.*, 2020).

Selon des études antérieures menées sur diverses légumineuses sauvages, notamment des espèces annuelles et vivaces appartenant au genre *Hedysarum* : en Italie les deux espèces (*H. spinosissimum* et *H. glomeratum*) (Muresu *et al.*, 2008) ; *H. confertum* (Tondello *et al.*, 2011) ; *H. naudinianum* et *H. perrauderianum* en Algérie (Torche *et al.*, 2014), ont révélé le caractère non cultivable des symbiotes rhizobiens et la présence des endophytes opportunistes

Dans d'autres cas, l'analyse des souches isolées à partir des nodules de trois espèces d'*Hedysarum* (*H. carnosum*, *H. spinisissimum* subsp. *capitatum* et *H. pallidum*) examinées en Algérie par la technique Analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr16S (ARDRA) et l'analyse par PCR-direct de l'extrait nodulaire de ces mêmes espèces indique la présence des groupes non-rhizobiens appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*, et met en évidence l'absence des rhizobiums, les « vrais résidents » cultivables des nodules (Benhizia *et al.*, 2004). L'analyse des oligonucléotides des gènes *nodC* et *nifH* par Bontemps *et al.* (2005) de deux souches isolées à partir des nodules d'*H. pallidum* et *H. spinisissimum* n'indique aucune détermination génétique de nodulation ou de la fixation d'azote.

Par conséquent, un séquençage de l'ARNr16S presque complet a été effectué sur les quatre souches représentatives du genre *Rhizobium* (CA8, CA10, ML23, ML25) afin de confirmer leur identité. En effet, les résultats du BLAST les ont classés en tant que : *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (100 %), *Rhizobium sullae* (99,38 %), *Rhizobium* sp. (98,89 %) respectivement, indiquant que la cultivabilité de l'occupant rhizobial est possible.

À propos du genre *Phyllobacterium* qui appartient à la classe *Alphaproteobacteria* est également représenté par deux souches (CA11, CA13), leur séquences sont identiques à celle de *Phyllobacterium bourgognense*. Selon Willems et Collins (1993), *Phyllobacterium* est étroitement apparenté sur le plan phylogénétique avec les *Rhizobiaceae*.

Le phylum des *Firmicutes* est représenté par les genres : *Bacillus*, *Paenibacillus* et *Staphylococcus*. Diverses études ont rapporté la capacité de ces genres à héberger différentes racines de plantes, citant, différentes légumineuses sauvages en Tunisie (Zakhia *et al.*, 2006) et de *Glycine max* (soja) en Chine (Li *et al.*, 2008).

- **Amplification et séquençage des gènes symbiotiques (*nifH* et *nodC*)**

Les gènes symbiotiques ou gènes accessoires, sont couramment inclus dans la description des espèces rhizobiennes (Rivas *et al.*, 2009). L'analyse de ces gènes symbiotiques est généralement utile pour identifier des espèces non-*Rhizobium* capables de noduler des légumineuses et de mener des études sur la biogéographie des endosymbiotes des légumineuses à gousses (Berrada et Fikri-benbrahim, 2014 ; Tak *et al.*, 2017).

Le gène *nodC* est un gène de nodulation commun, impliqué dans la détermination de la spécificité de l'hôte, il est fortement utilisé dans les études récentes, car il est essentiel à la définition des biovariétés symbiotiques dénommées symbiovars (Ramíre-Behana *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

L'amplification du gène *nodC* a été réussie et en donnant lieu à une bande unique révélée par électrophorèse chez 4 souches testées (CA8, CA10, ML23, ML25). La taille de la bande (930 pb) a été évaluée visuellement par comparaison au marqueur utilisé (100 pb), ce qui confirme l'appartenance de ces souches au genre *Rhizobium*.

L'amplification du gène *nifH* a échoué en donnant lieu à des bandes non spécifiques, ce qui nécessite des optimisations ultérieures.

1.3. Authentification des isolats (Test de nodulation)

La croissance des plantes s'est déroulée normalement jusqu'à la fin du test qui a duré environ huit semaines. La partie aérienne est bien développée ainsi que la partie racinaire présente une bonne stimulation même en absence des nodules.

Les souches testées n'ont pas toutes induit la formation des nodules (Annexe 4). En effet, dans les pots ou bien dans les flacons inoculés avec les souches affiliées à la classe des *Alphaproteobacteria* représentées par (CA8, CA10, CA11, CA13, ML23, ML25), nous avons observé la formation de petits bossés ressemblant à des nodules (Figure 31).

Les tentatives de ré-isolément de ces rhizobiums n'ont pas été concluantes. Car, cela pourrait être dû au fait que la stérilisation de la surface des nodules qui sont de très petite taille et trop fragiles est nocive pour les bactéries. Ou bien, les structures obtenues n'étaient pas de véritables nodules et cet effet est souvent dû au phénomène de spécificité entre les souches et la plante. En fait, les deux souches (CA8 et CA10) représentent une forte homologie avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (100 %), *Rhizobium sullae* (99,38 %) respectivement, ces dernières, sont les symbiotes spécifiques des légumineuses du genre *Trifolium* et de l'espèce *Hedysarum coronarium* donc, leur présence pourra être expliquée par d'autres voies d'interactions à l'intérieur des nodules de notre plante hôte.

L'association symbiotique est généralement très spécifique chez l'espèce *Hedysarum coronarium*. En fait, les études réalisées par Glatzle et al. en 1986 ont montrés que l'inoculation de *Rhizobium hedysari* (*Rhizobium sullae*) sur d'autre légumineuses (*Trifolium repens*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Glycine max*, *Cicer arietinum*) n'a donné aucune nodulation même avec les espèces légumineuses appartenant au même genre sauf chez *Hedysarum flexuosum* où il a été possible d'observer la formation de nodules mais qui étaient non fixateurs d'azote atmosphérique. Squartini *et al.*, (2002) ont également remarqué un haut niveau de spécificité d'hôte des *Rhizobium* isolés à partir du *sulla*.

La cooccurrence des rhizobiums cultivables en tant qu'endophytes avec un occupant rhizobien primaire non cultivable (le véritable inducteur de nodules) a été démontrée par des études antérieures sur des espèces végétales apparentées (Muresu *et al.*, 2008, 2013 ; Peix *et al.*, 2012). En effet, Sturtz *et al.* (1997) ont montré que la combinaison de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* et de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* en tant qu'endophytes a favorisé la croissance du trèfle (*Trifolium pratense*). De même, différentes études ont rapporté que la sélection ou la préférence d'une plante hôte pour une souche donnée de rhizobium dans la formation des nodules diffèrent entre les espèces ou les cultivars et que les rhizobiums sont soumis à un processus de sélection lors de l'invasion et la colonisation des tissus végétaux en subissant une pression sélective de la plante hôte (Hynes *et al.*, 1990; Laguerre *et al.*, 1993 ; Rangin *et al.*, 2008).

La majorité des souches appartenant à la classe *Bêta* et *Gammaproteobacteria* n'ont pas pu réinfecter leur hôte dans les conditions axéniques et qui sont représentées par les souches (AM10, DJ14, CA4) (Figure 31). Néanmoins, nous avons noté la formation de ramifications ou de courbures en forme de palettes à l'extrémité des racines des plantes inoculées avec des souches appartenant aux différents genres: (OR4, BA11, ML21) (Figure 31).

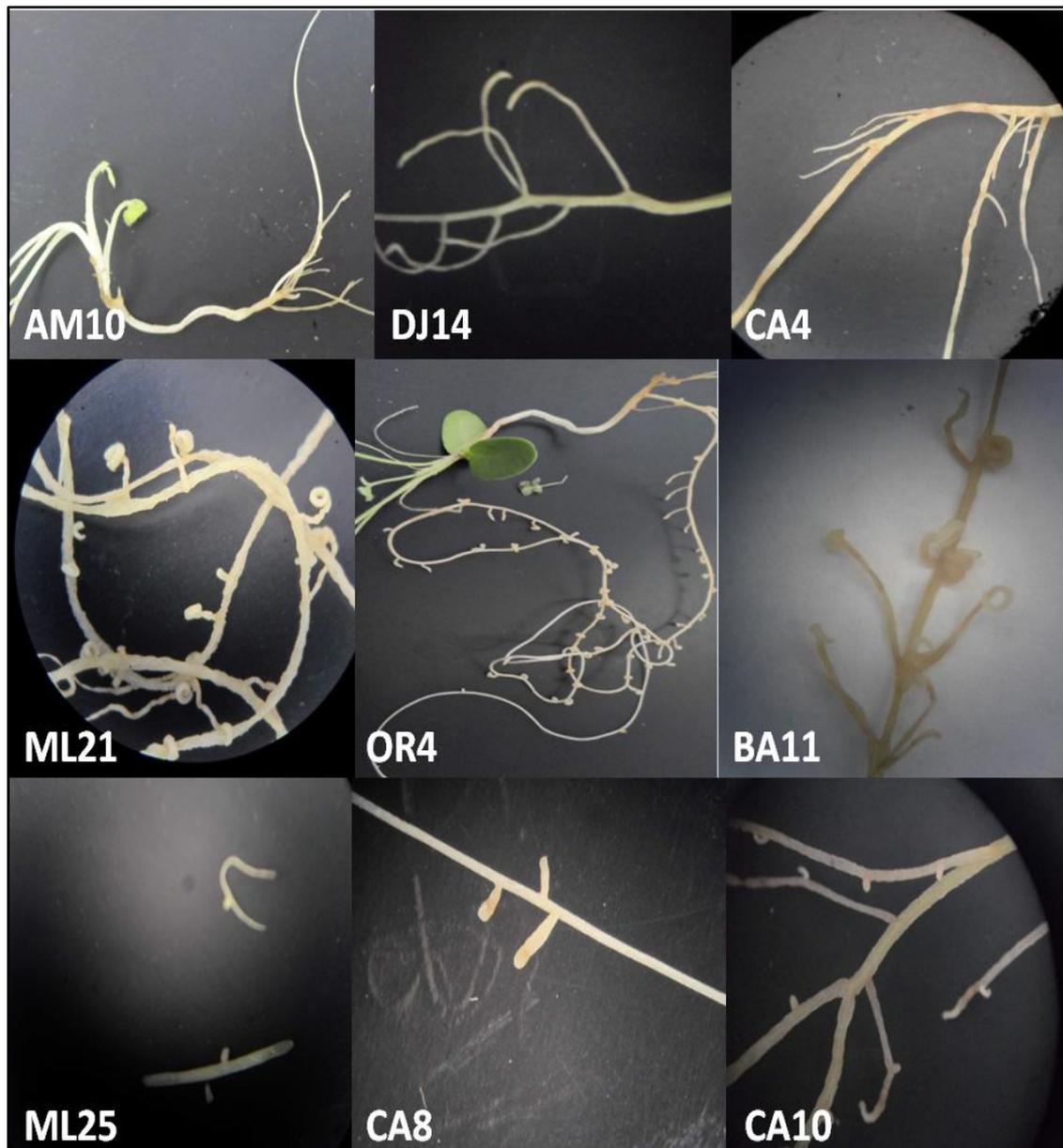


Figure 31 : Observation sous binoculaire des racines latérales d'*Hedysarum pallidum* cultivée en solution hydroponique de Fahræus.

Ce constat a été décrit depuis des décennies par Mottareale (1898) et Severini (1908) et plus tard par Tola *et al.* (2009), montrant ainsi un phénomène unique et mal connu observé chez les espèces du genre *Hedysarum* (*H. carroarium*, *H. glomeratum* et *H. spinosissimum*) qui, sous certaines conditions du sol entraînent un changement dans leur système racinaire par la formation des structures aplaties et gonflées nommées palettes ou "shovels" en anglais ; en raison de leur forme incurvée et aplatie semblable à une pelle (Mottareale, 1898). Ces structures jouent un rôle primordial dans l'absorption du calcium et l'accumulent sous forme de cristaux insolubles, ce qui conduit à une neutralisation du pH du sol (capacité tampon) et par conséquent une solubilisation local du fer qui va être facilement adsorbé par les poils absorbants présents autour des palettes (Tola *et al.*, 2009).

L'incapacité des souches à réinfecter leur plante hôte pourrait être suggérée comme étant probablement endophytiques ou opportunistes dans les nodules racinaires. En effet, la partie aérienne des plantes inoculées avec ces souches était mieux développée par rapport aux plantes témoins (non inoculées).

Diverses études ont souligné que la présence de différents endophytes non rhizobiens à l'intérieur des nodules racinaires a des effets bénéfiques et pourraient être des PGPR "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria" qui colonisent la rhizosphère et stimulent les interactions entre la microflore symbiotique et la plante-hôte (Masciarelli *et al.*, 2014). Certaines souches renforcent la nodulation des légumineuses et la fixation d'azote en augmentant la solubilisation et la minéralisation du phosphore du sol, la production de sidérophore, augmentant ainsi la disponibilité des nutriments pour synthétiser des biomolécules telles que les acides nucléiques, les acides aminés, les protéines, la lutte biologique contre les phytopathogènes par la production d'antibiotiques et des enzymes lytiques (Ahemad, 2015; Ibañez *et al.*, 2017 ; Singh, 2018).

1.4. Identification biochimique

Parmi les 32 souches identifiées par le biais de l'analyse moléculaire (ADNr16S), 10 souches représentatives ont été soumises à une identification biochimique approfondie (mise en évidence d'activités enzymatiques et la fermentation d'hydrates de carbone), de même, afin de confronter les résultats de la caractérisation moléculaire.

Les résultats de la caractérisation biochimique sont consignés dans l'Annexe 6. Les tests de la galerie API 20 E montrent que les deux souches représentatives du groupe des *Enterobacteriaceae* (CA5 et BA11) sont capables de fermenter tous les glucides sauf l'inositol. Elles sont dépourvues du gélatinase, uréase, lysine décarboxylase (LDC-), tryptophane désaminase (TDA-) et tryptophanase. Elles sont incapables de réduire H₂S. Cependant, l'arginine est hydrolysée par ces deux souches (ADH+), elles possèdent la β-galactosidase (ONPG+), elles sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, et de produire l'acétoïne (VP+) (Figure 32).

Les tests sur galerie API 20 NE (Annexe 6) montrent qu'il existe des préférences pour la fermentation des hydrates de carbone par les souches testées. La plupart des souches étudiées possèdent la nitrate réductase, mais elles sont dépourvues du tryptophane hydrolase (TRP-). L'arginine et l'urée sont hydrolysées par la majorité des souches à l'exception de ML8. Les résultats du test de l'hydrolyse d'esculitine révèlent que toutes les souches sont capables de produire le glucose et l'esculitine sauf OR1 et ML12. La présence d'une gélatinase a été révélée par la diffusion du pigment, le résultat est positif pour toutes les souches à part les deux souches ML21 et AM10. Le test de PNPG montre que les souches AM10, ML8, OR1 et ML12 ne possèdent pas la β-galactosidase.

Les tests de la galerie API 50 CHB (Annexe 6) montrent que la souche OR3 ne fermentent pas tous les glucides.

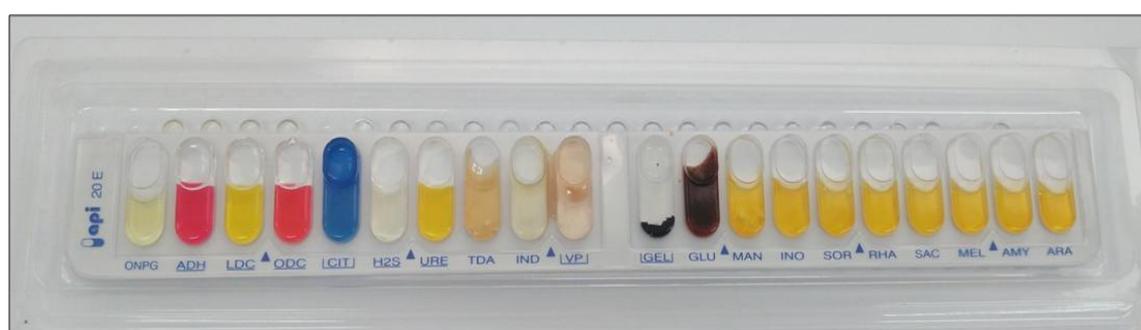


Figure 32 : Résultat de la galerie API 20 E après 24 h code n° 3305573, souche BA11.

L'identification est obtenue grâce au logiciel d'identification *apiweb*TM après saisie manuelle du profil numérique obtenu à partir du profil réactionnel en donnant l'espèce la plus probable (Tableau 6).

Les résultats de la caractérisation biochimique basée sur le système API sont en concordance avec ceux de l'analyse moléculaire basée sur les séquences partielles du gène ADNr 16S en terme de genre, ceci explique également que l'analyse phylogénique basée sur les séquences de l'ADNr 16S ne suffit pas pour définir la position taxonomique des souches isolées ; il serait donc intéressant d'utiliser d'autres techniques moléculaires afin de déterminer le statut taxonomique de nos isolats, en l'occurrence des gènes de ménage qui sont qualifiés comme gènes de base (Zahia et De Lajudi, 2001), ou bien la technique MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) qui est largement utilisée pour évaluer la diversité, la phylogénie et pour une identification relativement rapide et précise des espèces bactériennes (Rivas *et al.*, 2009).

Tableau 6 : Identification biochimique et moléculaire des souches par le système API et le séquençage du gène ADNr 16S.

Souche	Type galerie	Identification biochimique	Identification moléculaire
CA5	API 20 E	<i>Pantoea spp3</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> (99 %)
BA11	API 20 E	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> (99 %)
ML12	API 20 NE	<i>Pseudomonas fluorescen:</i>	<i>Pseudomonas Koreensis</i> (99 %)
AM3	API 20 NE	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (98 %)
OR1	API 20 NE	<i>Pseudomonas fluorescen:</i>	<i>Pseudomonas granadensis</i> (98 %)
ML21	API 20 NE	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (98 %)
ML8	API 20 NE	<i>Xanthomonas sp.</i>	<i>Xanthomonas translucens</i> (99 %)
BA9	API 20 NE	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (98 %)
AM10	API 20 NE	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Variovorax paradoxus</i> (99 %)
CA8	API 20 NE	<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (99 %)
OR3	API 50 CHL	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (98 %)

2. Étude de la diversité bactérienne totale des nodules par DGGE

Les profils électrophorétiques de l'analyse DGGE obtenus ont mis en évidence l'apparition d'une bande intense et dominante dans tous les sites (a, b, c, d, e, f) avec quelques bandes de faible intensité (Figure 33). En effet, l'intensité des bandes reflète l'abondance relative des espèces correspondantes au niveau de l'échantillon.

Les séquences partielles de l'ARNr 16S des bandes dominantes (b et d) ont montré 100 % d'homologie avec *Mesorhizobium camelthorni* CCNWXJ 40-4^T (EU169581). Cependant, nous n'avons pas pu exciser et analyser les bandes restantes car elles sont de très faibles intensités.

L'approche DGGE pourrait représenter une stratégie importante pour déterminer la communauté bactérienne non cultivable associée aux racines d'*H. pallidum*. En fait, ces profils ont permis l'apparition des bandes correspondantes à des espèces non détectées par les méthodes de culture dépendantes, notant que les bandes faibles non identifiées {c1, c2, c3, c4 et c5} du site Djbel Boutaled (Figure 33), pourraient correspondre à d'autres espèces différentes de l'espèce *Enterobacter ludwigii* isolé sur milieu standard YMA.

Mesorhizobium camelthorni CCNWXJ 40-4T (EU169581), est une espèce isolée pour la première fois par Chen *et al.* (2011) à partir des nodules de la plante légumineuse *Alhagi sparsifolia* en Chine. L'apparition abondante du taxon *Mesorhizobium* non cultivable par analyse des profils DGGE dans tous les sites testés est en accord avec des résultats précédents sur les espèces spontanées du genre *Hedysarum* poussant en Italie (*H. spinosissimum* et *H. glomeratum*) (Muresu *et al.*, 2008) ; ainsi que les deux espèces endémiques de l'Algérie (*H. naudinianum* et *H. perrauderianum*) (Torche *et al.*, 2014) et qui ont considéré *Mesorhizobium* sp. comme le véritable inducteur de l'organogenèse des nodules en utilisant une méthode de culture indépendante basée sur le clonage d'amplicon 16S. Cependant, la même espèce "*M. camelthorni*" a été isolée à partir des nodules d'une autre légumineuse fourragère (*Astragalus glombiformis*) poussant dans l'Est du Maroc (Guerrouj *et al.*, 2013) en utilisant des méthodes de culture dépendante standards (classique).

L'incapacité à isoler ce taxon à partir de différentes espèces endémiques d'*Hedysarum* testées jusqu'à présent poussant en Algérie et en Italie par des méthodes standards ; semble être un phénomène largement répandu chez les légumineuses sauvages méditerranéennes y inclus les espèces spontanées du genre *Hedysarum* (Muresu *et al.*, 2008, 2013; Tondello *et al.*,

2011). Cette inculturabilité pourrait être due à une mutation du génome sous l'influence de facteurs environnementaux. La culture sous un milieu d'enrichissement additionné d'exsudats de racines ou d'autres composants pourrait permettre de surmonter cette limite de capacité de culture.

Chen *et al.* (2011) ont rapporté que l'espèce *Mesorhizobium camelthorni* peut noduler les légumineuses : *Sophora alopecuroides*, *Glycyrrhiza inflata* et *Medicago sativa* dans les tests de nodulation croisée. Par conséquent, il nous semble intéressant d'appliquer cette stratégie pour isoler les symbiotes rhizobiens non cultivables de notre plante hôte puis inoculer l'extrait nodulaire aux espèces *Medicago sativa* ou *Astragalus glombiformis*.

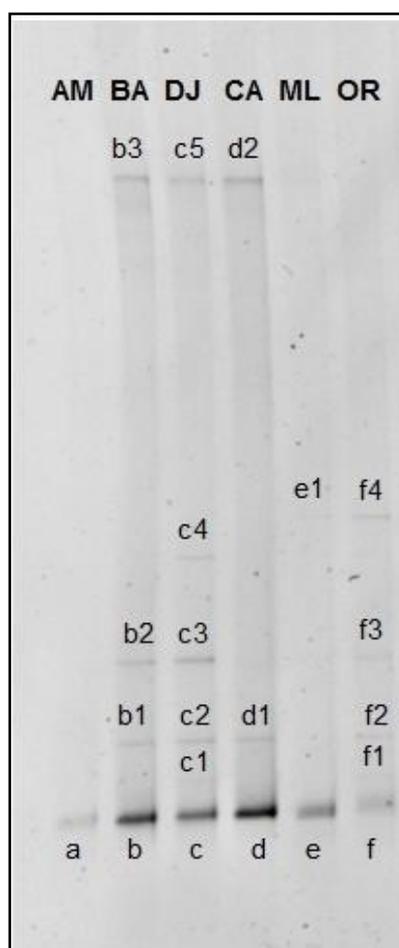


Figure 33 : Profils DGGE des fragments d'ADNr16S amplifiés de la communauté bactérienne totale des nodules racinaires d'*Hedysarum pallidum* dans différentes régions de l'Algérie : AM (Amoucha), BA (Aïn Babouche), DJ (Djbel Boutaleb), CA (Constantine), ML (Aïn M'lila), OR (Oran).

3. Analyses physico-chimiques du sol

Les résultats des caractéristiques physico-chimiques des 9 échantillons provenant de six régions différentes de l'Algérie figurent dans le tableau 7.

Tableau 7: Caractéristiques physico-chimiques des sols

Site	Prélèvement	Couleur du sol	CaCO ₃ (%)	EC (dS/m)	pH	Texture
Aïn Babouche 1	Loin de l'oued	Vert d'âtre	15.07	0.16 T°: 23.3°C	7.85 T°: 23.5°C	Sableuse
Aïn Babouche 2	À l'oued	Vert d'âtre	11.84	0.15 T° :21.7°C	7.65 T° : 23.7°C	Sableuse
Aïn M'lila 2	À la bordure du lac	Marron foncée	39.84	0.19 T° : 22.7°C	7.54 T° : 23.5°C	Argilo-limoneuse
Aïn M'lila 2	Loin du lac	Marron foncée	33.07	0.17 T°:23.46°C	7.91 T° : 23.0°C	Argilo-limoneuse
Arzew 1(Oran)	Au bord de la mer	Rouge	18.3	0.45 T° : 22.6°C	7.83 T° : 23.0°C	Limoneuse, soyeuse, talqueuse
Arzew 2(Oran)	Au bord de la mer	Rouge foncée	15.22	0.30 T° : 22.2°C	7.57 T° : 23.7°C	Limono-argileuse
Djbel boutaleb	Sur un haut plateau	Ocre goethite FeO(OH)	18.07	1.95 T° :22.1°C	7.35 T° : 23.0°C	Talqueuse-soyeuse
Amoucha	Au bord de route	Brune à noire	9.1	0.18 T° : 22.7°C	7.95 T° : 23.1°C	Limoneuse
Aïn el Bey (Constantine)	Au bord de route	Brune	21.5	0.20 T° :22.6°C	7.83 T° : 23.7°C	Argilo-limoneuse

3.1. Texture du sol

Les sols de Aïn M'lila (prélèvement 1 et 2, la distance entre les deux prélèvements est de 800 m) et de Aïn El Bey présentent une texture Argilo-limoneuse ; le sol d'Arzew 1 est

Limono-talqueux-soyeux et celui d'Arzew 2 est Limono-argileuse (la distance entre les deux prélèvements est de 7 Km) ; le sol de Amoucha est Limoneuse ; le sol de Aïn Babouche est sableux, tandis que de Djbel Boutaleb est Talqueux-soyeux.

Morel (1996) a rapporté que la texture et la structure du sol agissent sur l'activité microbienne. En fait, l'argile forme avec les substances organiques des complexes organo-minéraux qui deviennent moins accessibles aux microorganismes.

La texture du sol est très importante parce qu'elle détermine en grande partie le mouvement de l'eau dans le sol. En général, la percolation (mouvement vertical descendant) de l'eau dans un sol sableux est beaucoup plus grande que dans un sol argileux. Avec cette percolation des nutriments descendent dans les couches inférieures du profil du sol, parfois hors de portée des racines de la plante. Un sol sableux ne peut pas stocker beaucoup d'eau, mais l'absorption est facile et l'eau est évacuée rapidement vers le bas. Ceci peut être un problème car cela occasionne des pertes en nutriments. Le sable ne contient pas beaucoup de nutriments. Un sol argileux peut stocker beaucoup plus d'eau à cause de la finesse des pores entre les particules. L'absorption d'eau dans ce type de sol est facile dans un état sec, mais devient faible ou presque nul si le sol commence à être saturé. L'argile est en général fertile, elle retient bien les nutriments (Wopereis *et al.*, 2008).

3.2. Calcaire total

Les sols du site salin (Aïn M'lila 1 et 2) présentent les taux les plus élevés en CaCO_3 (**39.84 %** et **33.07 %** respectivement), tandis que le sol de Amoucha est celui qui a le taux le plus faible en calcaire total (**9.10 %**).

En comparant les valeurs obtenues à celles signalées par Baize (1988) (Tableau 8), nous constatons que tous les sols testés sont modérément calcaire à part le site d'Aïn M'lila qui est fortement calcaire.

Tableau 8 : Normes d'interprétation du taux du calcaire du sol (proposées par Geppa in Baize, 1988).

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

3.3. pH du sol

Selon l'échelle d'interprétation du pH-eau du sol signalé par Mathieu *et al.* (2003) (Figure 34), Le pH des sols testés est légèrement alcalin et varie entre **7.35** (Djbel Boutaleb) et **7.95** (Amoucha). Ce résultat correspond à celui indiqué par Cherni *et al.* (2019).

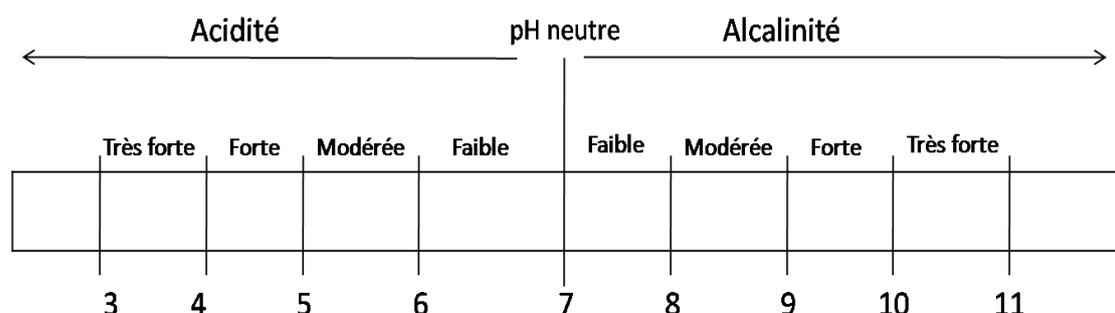


Figure 34 : Normes d'interprétation du pH-eau du sol (Mathieu *et al.*, 2003)

3.3. La conductivité électrique

En comparant les valeurs de CE ($CE_{1/5}$) obtenues à celles signalées par Mathieu *et al.* (2003) (Tableau 9), nous constatons que tous les sols testés ne sont pas salés (< 0.6 dS/m) à part le sol du site Djbel Boutaleb qui présente la valeur la plus élevée (1.95 dS/m) donc il est considéré comme un sol salin. Nous avons constaté une valeur de CE inférieure à 1 pour le site de Sebkha (Aïn M'lila), alors qu'il est considéré comme un site salin, cela pourrait être dû au phénomène de lessivage et la période de prélèvement (printemps). En outre le site de Djbel Boutaleb est un site non salin mais il a présenté une valeur de CE supérieur à 1, Ceci explique l'origine du chlorure de sodium qui est libéré par l'altération de la roche mère sodique.

Tableau 9 : Classes de salinité en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux à 25 °C (Mathieu *et al.*, 2003).

MmhoS/cm dS/m	0.6		1	2	3	4
$CE_{1/5}$	Non salé	Légèrement salé	salé	Très salé		Extrêmement salé
$CE_{1/10}$	Non salé	Légèrement salé	salé	Très salé	Extrêmement salé	

Pour une discrimination des sols, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été effectuée sur tous les paramètres mesurés (Figure 35). Cette analyse a permis de décrire et de représenter les ressemblances entre les différents sites d'expérimentations par rapport à l'ensemble des variables mesurées.

L'ACP a montré que les sols échantillonnés dans les six régions sont différents, ce qui peut expliquer la diversité de la communauté bactérienne des nodules.

L'ACP montre que les deux premières composantes F1 et F2 sont les plus importantes avec une variabilité cumulée de 90.72 %. Le premier axe **F1** contribue avec **56.15 %** dans la variabilité, il permet de distinguer le sol de Amoucha avec la valeur de pH la plus élevée et le sol de Djbel Boutaleb avec la valeur de CE la plus élevée. Le deuxième axe **F2** contribue avec **34.57 %** de variabilité, il permet de distinguer le sol de Aïn M'lila1 avec le pourcentage le plus élevé en calcaire total.

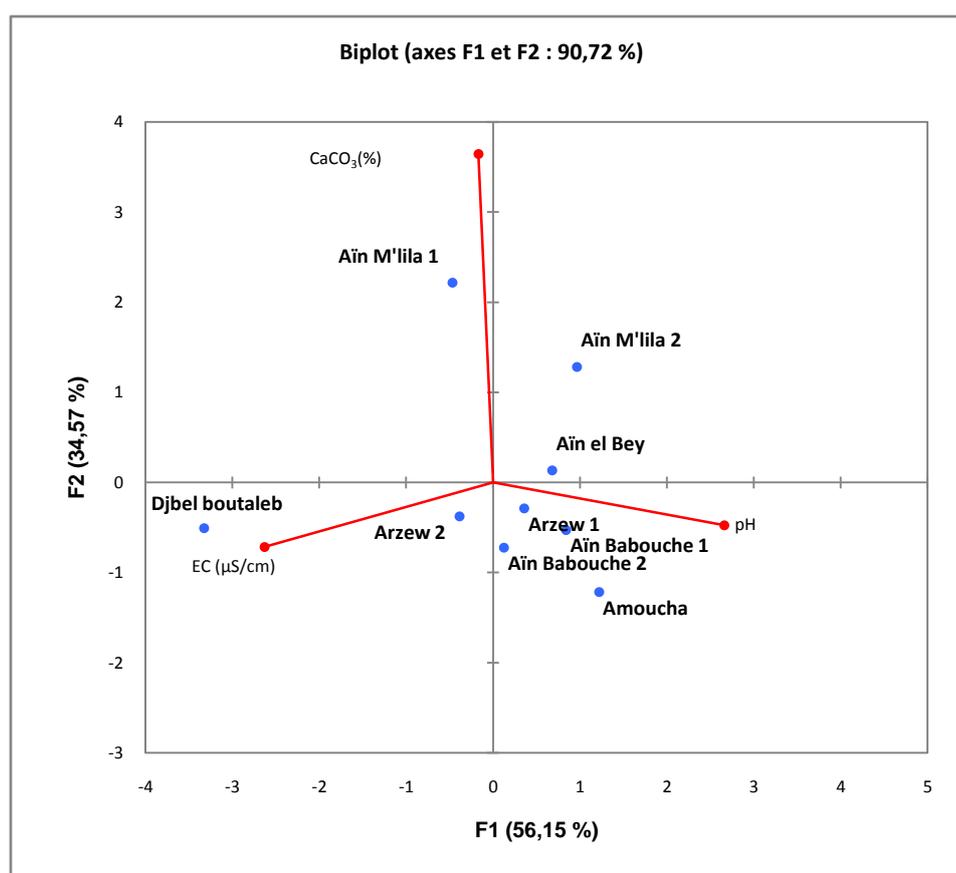


Figure 35 : Analyse en composantes principales des sols en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Plusieurs études suggèrent que les caractéristiques des sols qui conditionnent la distribution spatiale sont les facteurs les plus importants dans le modelage de la structure des communautés microbiennes (Girvan *et al.*, 2003 ; Ritz, 2004 ; Singh, 2006). En effet, Le pH est l'un des forts prédicateurs de la composition des communautés bactériennes et de la diversité bactérienne (Fierer *et al.*, 2007), mais suivant le type de sol d'autres facteurs peuvent agir sur la structure des communautés comme la disponibilité des nutriments, le contenu en carbone (Asuming-Brempong, 2008 ; Gaiero *et al.*, 2013) et en azote (Fierer *et al.*, 2007), la salinité (Rajendhran et Gunasekaran, 2008), les variations climatiques (Lauber, 2009).

En terme de genres bactériens, la figure 36 montre le pourcentage de diversité au niveau des genres bactériens cultivables associés aux nodules racinaires d'*Hedysarum pallidum* dans les différents sites étudiés.

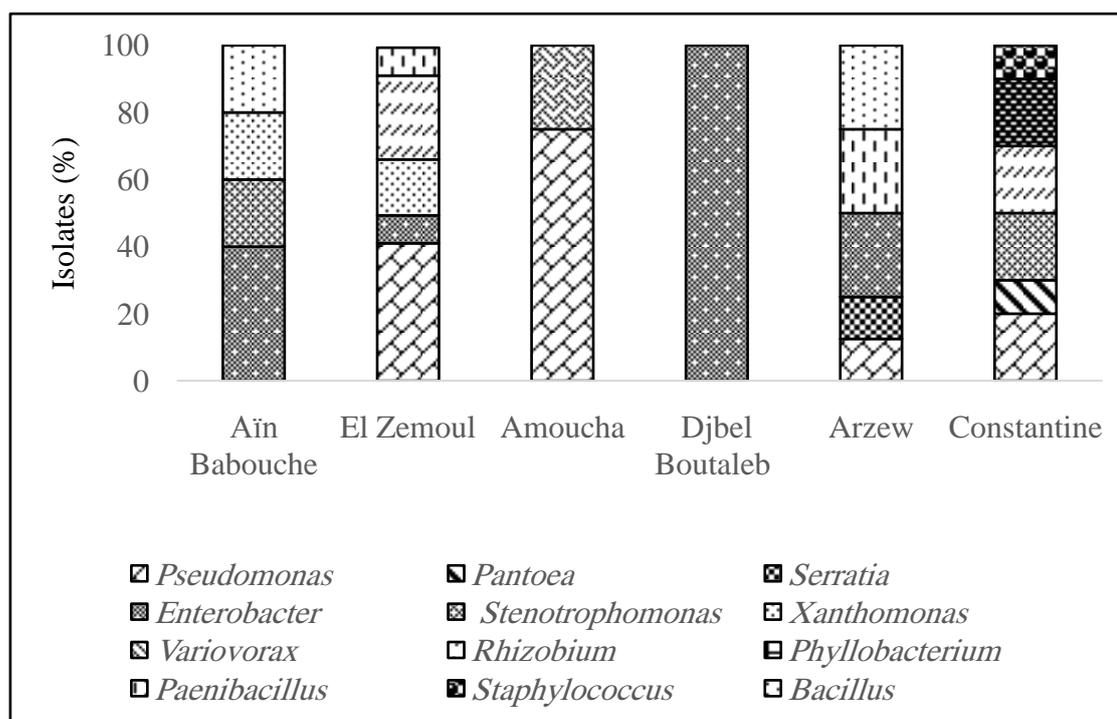


Figure 36: Pourcentage de diversité au niveau des genres bactériens dans les différents sites étudiés.

À travers l'analyse de la diversité phénotypique et génétique des bactéries associées aux nodules d'*Hedysarum pallidum*, nous avons constaté que la diversité pourrait être principalement dépendante des facteurs géo-climatiques et édaphiques. En effet, nous avons observé des différences (une variabilité) dans la répartition selon la zone éco-climatique. Les quatre sites semi-arides (Aïn Babouche, El Zemoul, Arzew et Constantine) présentent une

diversité dans leurs populations par rapport à celles des deux autres sites à savoir le site aride de Djbel Boutaleb et le site sub-humide de Amoucha. De même, cette variabilité pourrait être due à l'influence des paramètres physico-chimiques du sol. Un résultat probablement lié à la salinité du sol du site Djbel boutaleb qui présente la valeur de CE la plus élevée (1.95 dS/m) et le site de Amoucha avec la valeur du pH la plus élevée (7.95).

*Conclusion et
perspectives*

La diversité des bactéries associées aux nodules racinaires de la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans six régions différentes sur le plan géobioclimatique en Algérie, a été étudiée selon des méthodes de cultures dépendantes et indépendantes.

La caractérisation phénotypique a montré que nos isolats avaient la description des rhizobia et/ou des BNL. En effet, les aspects culturels, morphologiques et microscopiques de nos isolats sont attribués à ce groupe de bactéries symbiotiques. Ceci est confirmé par l'aptitude des isolats à produire des enzymes en relation avec le processus d'infection et de nodulation.

Une diversité phénotypique a été observée entre les isolats, mais cette caractérisation a été insuffisante pour arriver à déterminer le statut taxonomique de nos isolats, pour cela une approche moléculaire s'est imposée.

La caractérisation phylogénétique par séquençage partiel du gène ADN_r 16S a permis l'affiliation des isolats aux phylums de *Firmicutes* et *Proteobacteria*. Du fait, il a été possible de cultiver pour la première fois des rhizobiums à partir des nodules de cette plante dans des conditions standards.

L'amplification du gène *nodC* de quatre souches représentatives a été réussie en donnant lieu à une bande unique, ce qui confirme l'appartenance de ces souches au genre *Rhizobium*. En revanche, l'amplification du gène *nifH* a échoué en donnant lieu à des bandes non spécifiques, ce qui nécessite des optimisations ultérieures.

D'autre part, l'approche DGGE pourrait représenter une stratégie importante pour révéler la communauté bactérienne non cultivable associée aux racines d'*H. pallidum*. L'apparition du taxon *Mesorhizobium* réaffirme les résultats précédents effectués sur des espèces d'*Hedysarum* autre qu'*H. pallidum* et qui prouvent une autre fois que *Mesorhizobium* est le véritable inducteur de l'organogenèse des nodules chez les espèces d'*Hedysarum* étudiées jusqu'à présent en Algérie et en Italie. La diversité observée chez les espèces bactériennes associées à *Hedysarum pallidum* nous laisse croire qu'une diversité beaucoup plus importante serait présente si l'étude est étendue sur d'autres régions de l'Algérie à contraste pédoclimatique variable.

Les résultats de la caractérisation phénotypique et génotypique nous a permis de constater que la biodiversité est principalement dépendante des facteurs géo-climatiques et édaphiques. Bien que l'analyse en composante principale (ACP) des paramètres physico-chimiques des sols montre une variabilité entre les sites étudiés.

En perspectives, il serait intéressant de :

- i. Compléter la caractérisation génotypique par d'autres marqueurs phylogénétiques, en l'occurrence l'hybridation ADN/ADN, séquençage des gènes de ménage, ainsi que le recours à des techniques plus avancées telles que la métagénomique pour mettre en évidence les rhizobiums non cultivables.
- ii. Effectuer des études complémentaires ciblant la cultivabilité du taxon *Mesorhizobium* ; La culture sur un milieu d'enrichissement additionné d'exsudats racinaires ou d'autres composants pourrait permettre de surmonter cette limite de culture. Ainsi que, des essais de nodulation croisés avec d'autres plantes semblent être une stratégie pour isoler les symbiotes rhizobiens non cultivables associées à notre plante hôte.
- iii. Étudier la corrélation entre la distribution des espèces bactériennes et leurs sites d'échantillonnage.
- iv. Comprendre les phénomènes des interactions entre les rhizobiums et les souches endophytiques cohabités ainsi que, l'étude *in vitro* de leurs activités PGP (Promotrice de croissance des plantes) et la sélection des candidats efficaces pour la formulation des biofertilisants.

Enfin, il est fortement souhaitable d'élargir la collection à d'autres espèces et à différents sites écologiques et géographiques pour apporter d'autres informations et enrichir la base de données actuelle sur les *Hedysareae* et leur population indigène ; ainsi que de protéger et de sauvegarder ces deux partenaires symbiotiques pour une éventuelle application dans le futur.

*Références
bibliographiques*

-A-

- Abdelguerfi –Berrekia, R., Abdelguerfi, A., Bounaga, N., Guittonneau, G.G. (1988). Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* en Algérie. III- Dénombrement chromosomique chez 29 populations de huit (8) espèces. *Annales de l'institut national agronomique El- Harrach*, 12 (1), 233-247.
- Abdelguerfi-Berrekia, R. (1991). Contribution à l'étude du genre *Hedysarum* L. en Algérie. Thèse de Magister, option phytotechnie. I. N.A. Algérie.
- Abdelkrim, H. (1984). Approche phytoécologique et phytosociologique de quelques nappes alfatières des régions de Djelfa et Tebessa. Thèse de Magister. INA. Algérie.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–181.
- Ahemad, M. (2015). Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. *3 Biotechnology*, 5, 111–121.
- Andrews, M., Andrews, M.E. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 1(705), 1-39.
- Asuming-Brempong, S., Gantner, S., Adiku, S.G.K., Archer, G., Edusei, V., Tiedje, J.M. (2008). Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2811-2818.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, J.W., Pereira, J.O., Luiz de Araujo, W. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances in tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1), 40-65.

-B-

- Baattout, H. (1991). Le complexe d'espèces *Hedysarum spinosissimum* L. dans le bassin méditerranéen occidental: analyse de la structure génétique des populations, conséquences au niveau de la systématique des deux sous espèces *capitatum* et *H. spinosissimum* dans le genre *Hedysarum*. Thèse d'état. Orsay. France, Université de Paris.
- Baize, D. (1988). Guide des analyses courantes en pédologie. Ed. INRA, p.171. Paris.
- Bashan, Y., Holguin, G., and Lifshitz, R. (1993). Isolation and characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* Press.

- Bashan Y., De-Bashan L. E., Prabhu S., Hernandez J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 378, 1–33.
- Beck, D.P., Materon, L.A. and Afandi, F. (1993). Practical *Rhizobium* - Legume Technology Manual. ICARDA, Syria.
- Becker, A., Fraysse, N., and Sharypova, L. (2005). Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(9), 899-905.
- Beji, M., Combes D., Marrachi M., Kchouk M.L. (1991). Interaction espèce-tétraploïdie dans le genre *Hedysarum* L. AL Biruniya. *Review of Molecular and Pharmacy*, 7(1), 21-36.
- Benguedouar, A., Corich, V., Giacomini, A., Squartini, A., Nuti, M.P. (1997). Characterization of symbiotic bacteria from the Mediterranean legume crop *Hedysarum coronarium* (Sulla) by multilocus enzyme electrophoresis. *AGR Medical*, 127, 173-177.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., & Squartini, A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), 462–468.
- Benhizia, Y. (2006). Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum*: *H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum* Desf., et *H. pallidum* Desf: Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliquée. Université de Constantine, Algérie.
- Benson, D. R., & Silvester, W. B. (1993). Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Reviews*, 57(2), 293–319.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84(1), 188–198.
- Berrada, H., and Friki- Bnbrahim, K. (2014). Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. *British Microbiology Research Journal*, 4(6), 616–639.
- Brewin, N.J. (2004). Plant cell remodelling in the Rhizobium-Legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23, 293-316.
- Bevan, W. 2006. Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia. School of Biological Sciences: Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. University of Auckland, New Zealand.
- Bhat, M. K., & Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15(3–4), 583–620.

- Bocchi, S., & Malgioglio, A. (2010). Azolla-Anabaena as a Biofertilizer for Rice Paddy Fields in the Po Valley, a Temperate Rice Area in Northern Italy . *International Journal of Agronomy*, 2010, 1–5.
- Bontemps, C., Golfier, G., Gris-Liebe, C., Carrere, S., Talini, L. & Boivin-Masson, C. (2005) Microarray-based detection and typing of the Rhizobium nodulation gene nodC: potential of DNA arrays to diagnose biological functions of interest. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, 8042–8048.
- Bordeleau, L., M., and Prevost, D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*, 161, 15-124.
- Boukaous, L., Ferjani, R., Mellal, H., Mimouni, W., Tir, R., Gaci, M., Cherni, M., Squartini, A., Ouzari, H.I., Benhizia, Y. (2020). Diversity of bacteria associated with root nodules of *Hedysarum pallidum* Desf., growing in different regions of Algeria. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 22 (1), 217-227.
- Boussaid, M., Benfadhel, N., Balazsy, S., Kecskes, M. (1995). Les espèces méditerranéennes du genre *Hedysarum*. In : BRG/NRA, (Ed). Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. France.
- Bousquet, J., Simon, L., & Lalonde, M. (1990). DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forest Research*, 20 (2), 254-257.
- Brockwell, J.E., Schwinghamer, A., and Gault, R.R. (1977). Ecological studies of root nodule bacteria introduced into field environments. A critical examination of the stability of antigenic streptomycin resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry*, 9, 19-24.
- Brockwell, J., A. Pilka, and Holliday R. A. (1991). Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 31, 211-219.
- Broughton, W.J., Dilworth, M.J. (1971). Control of Laeghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemistry Journal*, 125, 1075-1080.
- Broughton, W.J. (1983). Nitrogen fixation Oxford University Press, Oxford, Angleterre.
- Bushby, H.V.A. (1982). Ecology. In: Nitrogen Fixation, Vol. 2: *Rhizobium*, W.J. Broughton (Ed), Clarendon Press Oxford. pp. 35-75.

-C-

- Cacciari, E., Di Mattia, P., Quatrini, M.C., Moscatelli, S., Grego, D., Lippi, M.R., De paolis, (2003). Réponses adaptatives des isolats de *Rhizobium* aux stress. In : Un arbre au désert. Grouzis M., Le Floch E. IRD ORSTOM. pp.183-200.
- Chen, H., Richardson, A. E. and Rolfe, B. G. (1993). Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarumbiovar trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1798-1804.
- Chen, W. M., Zhu, W. F., Bontemps, C., Young, J. P. W., & Wei, G. H. (2011). *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(3), 574–579.
- Cherni, M., Ferjani, R., Mapelli, F., Boudabous, A., Borin, S., & Ouzari, H. I. (2019). Soil parameters drive the diversity of *Citrus sinensis* rhizosphere microbiota which exhibits a potential in plant drought stress alleviation. *Applied Soil Ecology*, 135 (182–193).
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4),840–862.
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M.E., Blanco, F.A. (2018). Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis, *Genes*, 9 (125), 1-21.
- Compant, S., Clement, C., Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678.
- Cronk, Q., Ojeda, I., & Pennington, R. T. (2006). Legume comparative genomics: Progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (2), 99–103.
- Crossman, L.C. (2004). Plasmid replicons of *Rhizobium*. *Biochemical Society Transactions*. Volume 33, part 1.
- Cullimore, J.V., Ranjeva, R., and Bono, J.J. (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sciences*, 6, 24–30.

-D-

- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P. L., & Sorlini, C. (1998). Erratum: PCR fingerprinting of whole genomes, the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of

- Bacillus cereus and Bacillus licheniformis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48 (3), 107-116.
- Daffonchio, D., Cherif, A., & Borin, S. (2000). Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the “Bacillus cereus group.” *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5460–5468.
- Date, R.A. (1982) Collection, Isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*. In: Vincent, J.M (Ed). Nitrogen fixation in legumes, Academic Press, pp. 95- 109.
- Day, M., White, S.R. (1978). Effect of high soil temperatures on modulation of cowpea, *Vigna utiguiculata*. *Annals of Applied Biology*, 88, 476-481.
- De Bary, A. 1866. Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten. Hofmeister’s Handbook of Physiological Botany. Vol. 2. Leipzig.
- Dekkiche, S., Benguedouar, A., Sbabou, L., Taha, K., Filali-Maltouf, A. and Bena, G.(2017) Chickpea (*Cicer arietinum*) is nodulated by unexpected wide diversity of *Mesorhizobium* species in Eastern Algeria. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2017, 1-13.
- Delarras, C. (2007). Milieux de culture et tests biochimiques pour l’identification bactérienne. In. Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyses ou de contrôle sanitaire. *TEC & DOC, EM inter*, pp. 126-172.
- De Meyer, S. E., De Beuf, K., Vekeman, B., & Willems, A. (2015). A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 83, 1–11.
- Den Camp, R. H. M. O., Polone, E., Fedorova, E., Roelofsen, W., Squartini, A., Den Camp, H. J. M. O., Bisseling, T., & Geurts, R. (2012). Nonlegume Parasponia andersonii deploys a broad rhizobium host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(7), 954–963.
- Deng, Z. S., Zhao, L. F., Kong, Z. Y., Yang, W. Q., Lindström, K., Wang, E. T., & Wei, G. H. (2011). Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(3), 463–475.
- Denis, J.F. (2000) : la fertilisation de l'olivier : 1- l'Azote, Comité économique Agricole de l'Olivier.
- DGPA. (2009). Note de service. Département des grandes cultures. Direction générale de la production agricole. Ministère de l'Agriculture, de l'Environnement et des Ressources Hydrauliques, Tunis, Tunisie.

- Downie, J.A. (1998). Functions of rhizobial nodulation genes. In: *The Rhizobiaceae* (eds. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ). Kluwer academic publishers, Dordrecht, Boston, London. 387-402.
- Doyle, J. J., & Luckow, M. A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, 131(3), 900–910.
- Drevon, J.J., Heckmann, M.O., Soussana, J.F., Salsac, L. (1988). Inhibition of nitrogen fixation by nitrate assimilation in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant physiology and Biochemistry*, 26,197-203.
- Dupuy, Y., Nougier P. (2005). Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses.Paris.

-E-

- El Boutari, N. (2009). Etude phénotypique et génotypique d'une collection de *Sinorhizobium meliloti* et de *Rhizobium sultae*. Thèse de doctorat en biologie. Université Mohammed V Agdal, Faculté des Sciences, Rabat. <http://hdl.handle.net/123456789/3635>.
- El-Hilali, I. (2006). La symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.
- El Sheikh, E. A. and Wood, M. (1989) . Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: influence of carbon source, temperature and pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 883-887.

-F-

- Faghire, M., Bargaz, A., Farissi, M., Palma, F., Mandri, B., Lluch, C., García, N.A.T., Herrera-Cervera, J.A., Oufdou, K., & Ghoulam, C. (2011). Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55(2), 69–75.
- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology*, 16(2), 374–381.
- FAO. (2009). The state of food and Agriculture 2009. Rome.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76.

- Ferjani, R., Marasco, R., Rolli, E., Cherif, H., Cherif, A., Gtari, M., Boudabous, A., Daffonchio, D., Ouzari., H.I. (2015). The Date Palm Tree Rhizosphere Is a Niche for Plant Growth Promoting Bacteria in the Oasis Ecosystem. *BioMed Research International*, 2015, 1-10.
- Ferjani, R. (2016). Caractérisation et application des inocula bactériens pour la protection et la promotion de la croissance des plantes. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université de Tunis El Manar. Tunisie.
- Fernandez-Lopez, M., Goormachtig, S., Gao, M., D'Haese, W., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1998). Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12724-12728.
- Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., & Ouzari, H. (2013). Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *BioMed Research International*, 2013, 1-14.
- Fierer, N., Morse, J.L., Berthrong, S.T., Bernhard, E.S., and Jackson, R.B. (2007). Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology*, 88, 2162-2173.
- Fischer, S.G, Lerman, L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80, 1579-1583.
- Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4630–4636.
- Fitouri, S.D., Trabelsi, D., Saïdi, S., Zribi, K. Ben Jeddi, F., Mhamdi, R. (2011). Diversity of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium* L. and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. *Annals of Microbiology*, 62, 77–84.
- Foucher, F., & Kondorosi, E. (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant molecular biology*, 43 (5-6), 773-786
- Franche, C., Lindstrom, K., and Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321, (1-2), 35-59.
- Frank, B. (1889). Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges*, 7, 332–346.

- Frayse, N., Couderc, F., and Poinot, V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, 270, 7, 1365-1380.
- Fred, E.B., Waskman, S.A. (1928) Laboratory manual of general microbiology, McGraw-Hill, p.145, New York.
- Fujihara, S., and Yoneyama, T. (1993). Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1104-1109.

-G-

- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100 (9), 1738–1750.
- Geurts, R., Fedorova, E., Bisseling, T. (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. *Current opinion in plant biology*, 8 (4), 346-352.
- Giraud, E. (2007). Symbiose rhizobium/légumineuse : Un nouveau sésame. *Medecine/Sciences*, 23(6–7), 663–666.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., & Ball, A.S. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1800-1809.
- Glatzle, A. (1986). Symbiotic incompatibility between two forage species of *Hedysarum*, grown in Morocco, and their homologous rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 37(1), 39–43.
- Glenn, A. R., and Dilworth M. J. (1994). The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiology Letter*, 123, 1-10.
- Gloux, K., & Le Rudulier, D. (1989). Transport and catabolism of proline betaine in salt-stressed *Rhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, 151(2), 143–148.
- Goedhart, J., Bono, J.J., and Gadella, T.W.Jr. (2002). Rapid colometric quantification of lipochitooligosaccharides from *Mesorhizobium loti* and *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 15(9), 65-859.
- González, N., Romero, J., & Espejo, R. T. (2003). Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1), 91–97.

- Graham, H.C. (1991) A proton-NMR study of a site-directed mutation (His388----Glu) in the interdomain region of yeast phosphoglycerate kinase. Implications for domain movement. *European Journal of Biochemistry*, 196 (2), 9-261.
- Graham, P.H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal Microbiology*, 38, 475-484.
- Graham, P.H and Parker, C.A. (1994). Diagnostic features in characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant and Soil*, 3, 383-396.
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3), 872–877.
- Greuter, W., Burdet, H., & Long, G. (1989). Med-Checklist: a critical inventory of vascular plants of the circum-Mediterranean countries. 3. Dicotyledones (*Convolvulaceae-Labiatae*). Editions des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève.
- Guerrouj, K., Pérez-Valera, E., Chahboun, R., Abdelmoumen, H., Bedmar, E. and Missbah El Idrissi, M. (2013). Identification of Rhizobial symbiont of *Astragalus Glombiformis* in Eastern Morocco as *Mesorhizobium camelthorni*. *Antonony Leeuwenhoek*, 104: 187-198.
- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.
- Gulash, M., Ames, P., Larosilliere, R.C., Bergman, K. (1984). Rhizobacteria are attracted to localized sites on legume root. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1),149-152.
- Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142 (1), 3–16.
- Gust, A.A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M., and Nurnberger, T. (2012) Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Science*, 17. 8: 495-502.
- H-**
- Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1081–1084.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W., Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 895–914.
- Hardoim , P.R. , van Overbeek , L.S. and van Elsas , J.D. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth . *Trends Microbiology*, 16, 463) – 471.
- Hassan, S., and Mathesius, U. (2012) The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of experimental botany*, 63 (9), 3429-3444.

- Henzell, E.R. (1988). The role of biological nitrogen fixation research in solving problems in tropical agriculture. *Plant and Soil*, 108, 15-21.
- Hirsch, A.M., Broun, K. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122(2), 211–237.
- Hirsch, P. R. (1996). Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytology*, 133, 159-171.
- Hopkin, W.G. (2003). Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. 99-120.
- Hu, C.Y., et Lin, L.P. (2003). Characterization and purification of hydrolytic enzymes in *Sinorhizobium fredii* CCRC15769. *World Journal of microbiology and biotechnolog*, 19 (5), 515-522.
- Huybens, N., Mainil, J., & Et Marlier, D. (2009). Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Annales de Medecine Veterinaire*, 153(2), 112–128.
- Hyam, R., Pankhurst, R. (1995). *Plants and Their Names: A Concise Dictionary*. Oxford University Press, Oxford.
- Hynes, M. F., Connel, M.P.O. (1990). Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 36, 864–869.

-I-

- Ibañez, F., Angelini, J., Taurian, T., Tonelli, M.L., Fabra, A. (2009). Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic *Gammaproteobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 49–55
- Ibañez, F., Tonelli, M.L., Muñoz, V., Figueredo, M.S. and Fabra, A. (2017). Bacterial Endophytes of Plants: Diversity, Invasion Mechanisms and Effects on the Host *In*: D.K. Maheshwari (Ed). *Endophytes: Biology and Biotechnology. Sustainable development and biodiversity 15*: Springer, Cham. pp.25-40.
- Iniguez, A. L., Dong, Y., Carter, H. D., Ahmer, B. M. M., Stone, J. M., & Triplett, E. W. (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(2), 169–178.

-J-

- Janda, J.M, Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-4.

- Jarvis, B. D. W., Jarvis, B. D. W., Robertson, I. G. C., & Fanning, G. R. (1977). Phenetic similarity and DNA base sequence homology of root nodule bacteria from New Zealand native legumes and rhizobium strains from agricultural plants. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 20(2), 235–248.
- Jensen, M. A., Webster, J. A., & Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 945–952.
- Jia, R.Z., Zhang, R.J., Wei, Q., Chen, W.F., Cho, I.K., Chen, W.X., and Li, Q.X. (2015). Identification and classification of rhizobia by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, 8,98.
- Jiménez, D. J., Montaña, J. S., & Martínez, M. M. (2011). Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 846–858.
- Jordan, D.C. (1984). Family III Rhizobiaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 234-242.

-K-

- Kan, F. L., Chen, Z. Y., Wang, E. T., Tian, C. F., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2007). Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, 188(2), 103–115.
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M.W., Hjuler, C.T., Gysel, K., Muszyński, A., Carlson, .W., Thygesen, M.B., Sandal, N., Asmussen, M.H., et al. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*. 523, 308–312.
- Kim, C. H. (1995). Characterization and substrate specificity of an endo- β -1,4-D-glucanase I (avicelase I) from an extracellular multi-enzyme complex of *Bacillus circulans*, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 959–965.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.

-L-

- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S. I., Casartelli, R. R., & Amarger, N. (1993). Conformity and diversity among field isolated of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(4), 412–419.
- Laguerre, G., Ligottier-Gois, L L., & Lemanceau, P. (1994). Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. *Molecular Ecology*, 3(5), 479–487.
- Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147, 981–993.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale: a pyrosequencing-based assessment. *Applied Environmental and Microbiology*, 75 (15), 20-5111.
- Le Rudulier, D. (2005). Osmoregulation in rhizobia : The key role of compatible solutes. *Grain Legume*, 42, 18 - 19.
- Li, W., Zheng, D., Van, K., Lee, S. (2008). QTL mapping for major agronomic traits across two years in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 11, 171–190.
- Lide, D.R. (2009). CRC Handbook of Chemistry and Physics. p. 2804. CRC Press 90th Edition.
- Lin, D. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T. X., He, Y. R., Guan, S. H., & Chen, W. X. (2008). *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1409–1413.
- Lindstrom, K., and Lehtomaki, S. (1988). Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*Galega*) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 50(2–3), 277–287.
- Lleo, M.M., Bonato, B., Tafi, M.C., Signoretto, C., Boaretti, M. and Canepari, P. (2001) Resuscitation rate in different enterococcal speies in the viable but non culturble state *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1095-1102.
- Luciński, R., Polcyn, W., Rotayczak, L. (2002). Nitrate reduction and nitrogen in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimia Polonia*, 49 (2), 537-546.

-M-

- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Allemand, C.J., (2005). Les composées phénoliques des végétaux (Un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques. Presses polytechniques et universitaires romandes de Lausanne.
- Madigan, M., & J. Martink, O. (2007). Brock. Biologie des micro-organismes. Pearson Education France, Paris, 11^e édition américaine traduite sous la dir. de D. PRIEUR.
- Mantelin, S. and Touraine, B. (2003). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 1-8.
- Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Ouzari, I., Daffonchio, D., & Borin, S. (2013). Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. *BioMed Research International*, 2013, 1-13.
- Marzorati, M., Alma A., Sacchi, L., Pajoro, M., Palermo, S., Brusetti, L., and Daffonchio, D. (2006). A Novel *Bacteroidetes* Symbiont Is Localized in *Scaphoideus titanus*, the Insect Vector of Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*. *Applied Environmental Microbiology*, 72(2), 1467–1475.
- Masciarelli, O., Llanes, A., Luna, V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiology Research*, 169, 609–615.
- Massias, B. (2008). Développement et mise au point d'outils moléculaires pour l'identification des flores complexes bactériennes. Thèse de doctorat. Spécialité microbiologie. l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes. *Trends in microbiology*, 17, 10, 458-466.
- Mathieu, C., & Pieltain, F. (2003). Analyse chimique des sols : méthodes choisies. TEC & DOC. , Lavoisier, Paris.
- Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E., Mergaert, P. (2008). Cell biology of nodule infection and development. In: James EK, Sprent JI, Dilworth MJ, Newton WE, (Eds). Nitrogen-fixing leguminous symbioses. New York, NY, USA: Springer-Verlag. pp. 153–189.

- Mccaig, A.E., Grayston, S.J., Prosser, J.I., Glover, L.A. (2001). Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(1), 37-48.
- Michiels, J., Verreth, C., Vanderleyden, J. (1994). Effect of Temperature Stress on Bean Nodulating *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1206-1212.
- Miklashevichs, E.H., Rohrig, J., Schmidt, S.J. (2001). Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 20, 373-394.
- Minchin, F.R., Minguez, M.I., Sheehy, J.E., Willy, F.J., Skot, L. (1986). Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic fixation by white clover. *Journal of Experimental Botany*, 37, 13-1103.
- Morel, R. (1996). Les sols cultivés. Ed. Lavoisier. p.389. Paris.
- Mottareale, G. (1898). Di alcuni organi particolari delle radici tubercolifere dello *Hedysarum coronarium* in relazione al *Bacillus radicolica* e alla *Phytophthora leguminosarum*. *Atti Regio Ist Incoraggiamento Napoli*, 11,1-7.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950.
- Moulin, L., Avarre, J.C, Jaubert, M., Barbe, V., Béna, G., Cartiaux, F., Delajudie, P., Dreyfus, B., Elmerich, D., Fardoux, J., Hannibal, L., Kojadinovic, M., Lajus, A., Mangenot, S.G., Medigue C, and Giraud, E. (2006). Absence de genes nod chez certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques révélée par l'analyse de la séquence de leurs génomes. In : SFP. 7emes Rencontres plantes-bacteries, 20-23 mars 2006, Aussois, France. Resumes. Angers : INRA, Rencontres plantes bacteries. 7, 2006-03-20/2006-03-24, Aussois, France. pp.39.
- Mousavi, S. A., Li, L., Wei, G., Räsänen, L., & Lindström, K. (2016). Evolution and taxonomy of native mesorhizobia nodulating medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(4), 260-265.
- Munns, D.N. (1977). Soil acidity and related factors. In: J. M. Vincent, A. S. Whitney and J. Bose (Eds.) pp. 211-236.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F. B., & Squartini, A. (2008). Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS*

Microbiology Ecology, 63(3), 383–400.

Muresu, R., Tondello, A., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., & Squartini, A. (2013). Antioxidant treatments counteract the non-culturability of bacterial endophytes isolated from legume nodules. *Archives of Microbiology*, 195(6), 385–391.

Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.

Myers, A.M, et al. (1985). Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Jourlan*, 4(8),2087-92.

-N-

Nelson, M.S., and Sadowsky, M.J. (2015) Secretion systems and signal exchange between nitrogenfixing rhizobia and legumes. *Frontiers in plant science* 6.

Nocker, A., Burr, M., Camper, A. (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbiology and Ecology*, 54, 276-289.

Noel, K.D. (2009). Rhizobia. In: Encyclopedia of Microbiology, 3rd edition, ed. Schaechter M. Oxford: Elsevier. pp, 261-277.

Nour, S.M., Cleyet-Marel, J.C., Beck, D., Effosse, A., & Fernandez, M.P. (1994). Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 40(5), 345–354.

-O-

O'Hara, G. W., and Glenn, A. R. (1994). The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 161, 286-292.

Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., and Saeki, K. (2013) Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 42, 17131-17136.

Okazaki, S., Okabe, S., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S. et al. (2016) Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(2), 223-234.

Op den Camp, R.H., Polone, E., Fedorova, E., Roelofsen, W., Squartini, A., Op den Camp, H.J., Bisseling, T. and Geurts, R. (2012) Non-legume *Parasponia andersonii* deploys a broad rhizobium host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2 (7), 954-963.

Ourarhi, M., Abdelmoumen, H., Guerrouj, K., Benata, H., Muresu, R., Squartini, A., & Missbah El Idrissi, M. (2011). *Colutea arborescens* is nodulated by diverse rhizobia in Eastern Morocco. *Archives of Microbiology*, 193(2), 115–124.

-P-

Paau, A.S., Bloch, C.B., and Brill, W.J. (1980) Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology*, 143(3): 1480-1490.

Payakapong, W., Tittabutr, P., Teaumroong, N., Boonkerd, N., Singleton, P.W. and Borthakur, D. (2006). Identification of Two Clusters of Genes Involved in Salt Tolerance in *Sinorhizobium sp.* Strain BL3. *Symbiosis*, 41, 47-51.

Peix, A., Carro, L., Cerda-Castillo, E., Tejedor, C., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2012). New research on the genetic diversity of non-rhizobial endophytes inhabiting legume nodules. In: Amaya and Jimenez (Eds). *Genetic Diversity: New Research*. pp. 191–202.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 17–42.

Pereira, S. I. A., & Castro, P. M. L. (2014). Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(24), 14110–14123.

Perret, X., & Broughton, W. J. (1998). Rapid identification of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. *Plant and Soil*, 204(1), 21–34.

Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180–201.

Petti, C. A., Polage, C. R., & Schreckenberger, P. (2005). The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6123–6125.

Pomel, A. 1874 Nouveaux matériaux pour la flore atlantique, p.399. Savy.libraire éditeur (i-iii) III. Parie

Pooyan, G. M. and Shamalnasab, M. (2007). Cellulase activities in nitrogen fixing *Paenibacillus* isolated from soil in N-free media, *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(5), 602–608.

Pottier-Alapetite, G. (1979). Flore de la Tunisie Angiospermes-Dicotylédones, Apétales Dialypétales. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture. Tunis.

-Q-

Quezel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2 (9). Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.

-R-

Rached, O., Mosbah, R. (1993). Action de l'antimoine sur la végétation en zone steppique et étude de l'adaptation d'une espèce tolérante *Hedysarum pallidum* Desf. Thèse de Doctorat.

Radl, V., Simões-Araújo, J. L., Leite, J., Passos, S. R., Martins, L. M. V., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., Baldani, J. I., & Zilli, J. E. (2014). *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(3), 725–730.

Rae, A.L., Bonfante-Fasolo, P., Brewin, N.J. (1992). Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Journal*, 2, 385–395.

Rajendran, G., Sing, F., Desai, A. J., & Archana, G. (2008). Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresource Technology*, 99(11), 4544–4550.

Ramírez-Bahena, M.H., Valverde, A., Robledo, M., Rivera, L.P., Menéndez, E., Medina-Sierra, M., Mateos, F., Igual, J.M., Rivas, R. (2013). Nitrogen Fixing Endosymbiotic Bacteria: Old Chaps and New Findings. In: Rodelas González MB.; González-López J (Eds). *Beneficial Plant-microbial Interactions Ecology and Applications*. CRC Press Taylor & Francis Group 1ère édition. Boca Raton, FL, USA, pp.1-19.

Rangin, C., Brunel, B., Cleyet-Marel, J.C., Perrineau, M.M., Béna, G. (2008). Effects of *Medicago truncatula* genetic diversity, rhizobial competition, and strain effectiveness on the diversity of a natural *Sinorhizobium* species community. *Applied Environmental and Microbiology*, 74(18), 5653-61.

Rao, D.L.N, Giller, K.E., Yeo, A.R., and Flowers, T.J. (2002). The effect of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Annals of Botany*, 89, 563- 570.

Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E., Bouharmont, J., & Evrard, C.M. (2000). Biologie végétale. De Boeck Université.

- Raza, S., Jornsgard, N., Abou-Taleb, B.H., and Christiansen, J.L. (2001). Tolerance of *Bradyrhizobium sp.* (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 12-19.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (1998). Life in Grasses: Diazotrophic Endophytes. *Trends Microbiology*, 6(4), 44-139.
- Riah, N., Béna, G., Djekoun, A., Heulin, K., de Lajudie, P., & Laguerre, G. (2014). Genotypic and symbiotic diversity of rhizobium populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(5), 368–375.
- Ritz, K., McNicol, W., Nunan, N., Grayston, S., Millard, P., Atkinson, D., Gollotte, A., Habeshaw, D., Boag, B., Clegg, C.D., Griffiths, B.S., Weatley, R.E., Glover, L.A., McCaig, A.E., & Prosser, J.I. (2004). Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in an upland grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 191-205.
- Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Dazzo, F. B., Kroppenstedt, R. M., Martínez-Molina, E., Gillis, M., & Velázquez, E. (2003). Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 47–53.
- Rivas, R., Garcia-Fraile, P., and Velesuez, E. (2009). Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights*, 2, 51-69.
- Robledo, M., Jimenez-Zurdo, J.I., Velazquez, E., Trujillo, M.E., Zurdo-Pinheiro, J.L., Rodriguez-Navarro, C., Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, A., Gonzalez-Munoz, M.T., Rodriguez-Gallego, M. (2007). Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 1197–1213.
- S-
- Saadallah, K., Drevon, J.J., Abdelly, C. (2001). Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie*, 21, 627-634. INRA, EDP Sciences.
- Sanger, F., Nicklen, S., And Coulsonar, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Proceedings National Acad.emy of Sciences. USA*, 74 (1) ,5463-5467, December 1977 Biochemistry.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D., & Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. In. *Journal of General and Applied Microbiology*, 49, (3), 155–179.

- Schwinghamer, E.A. (1967). Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology and Serology*, 33, 121-136.
- Severini, G. (1908). Ricerche fisiologiche e batteriologiche sull' *Hedysarum coronarium* L. (volg. Sulla). *Annals of Botany* (Lond), 8:33–70.
- Shamseldin, A. (2013). The Role of Different Genes Involved in Symbiotic Nitrogen Fixation-Review. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 8(4), 84–94.
- Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., & Sadowsky, M. J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, 71(2), 91–109.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R, Lerman, L.S., Myers, R.M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G + C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction. results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 232-236.
- Singh, B.K., Nazarie, L., Munro, S., Anderson, I., & Campbell, C.D. (2006). Use of multiplexterminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7278-7285.
- Singh, I. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: a review. *European Journal of Biological Research*, 8(4), 191–213.
- Singh, G. (2019). Plant systematics. An Integrated Approach. CRC Press. Taylor & Francis group. Boca Raton.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Handbook for Rhizobia. Methods in Legumes-Rhizobium Technology. Springer-Verlag. Springer New York.
- Sprent, J. (2009). Legume Nodulation (John Wiley & Sons).
- Squartini, A., Struffi, P., Döring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velázquez, E., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Dazzo, F. B., Casella, S., & Nuti, M. P. (2002). *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly 'Rhizobium hedysari'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4), 1267–1276.
- Stephens, B.D., and Neya, C.A. (1983). Nitrate and nitrite reduction to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant physiology*, 71,35-731.

- Struffi, P., Corich, V., Giacomini, A., Benguedouar, A., Squartini, A., Casella, S., & Nuti, M. P. (1998). Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 81–89.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., & Nowak, J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25(1), 13–19.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., & Dreyfus, B. (2001). Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 214–220.
- Sylwia, W.W., Wanda, M. (2010) Following phylogenetic tracks of *Astragalus cicer* microsymbionts, *Antonie van Leeuwenhoek*, 97, 21–34.

-T-

- Tak, A., Gehlot, P., Pathak, R., and Singh, S.K. (2017). Species diversity of rhizobia. In: *Rhizobium Biology and Biotechnology* (Ed). Springer, Cham, Switzerland. pp 215-245.
- Teather, R.N. and Wood, P.J. (1982) Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied Environmental Microbiology*, 43, 777-780.
- Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z., & Luo, Y. (2015). Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. In: *Frontiers in Plant Science*, pp.6 (FEB).
- Toffanin, A., Cadahia, E., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. (2002). Characterization of the urease gene cluster from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *Archives of Microbiology*, 177, 290–298.
- Tola, E., Henriquez-Sabà, J. L., Polone, E., Dazzo, F. B., Concheri, G., Casella, S., & Squartini, A. (2009). Shovel roots: A unique stress-avoiding developmental strategy of the legume plant *Hedysarum coronarium* L. *Plant and Soil*, 322 (1), 25–37.
- Tondello, A., Villani, M., Alessandrini, A., Baldan, B., & Squartini, A. (2011). Identification of the root nodule symbiont of the rare legume species *hedysarum confertum* Desf. (*Hedysarum humile* L.) in its Italian relictual site. *Plant Biosystems*, 145(4), 901–905.
- Torche, A., Benhizia, H., Rosselli, R., Romoli, O., Zanardo, M., Baldan, E., Alberghini, S., Tondello, A., Baldan, B., Benguedouar, A., Squartini, A., & Benhizia, Y. (2014). Characterization of bacteria associated with nodules of two endemic legumes of

- Algeria, *Hedysarum naudinianum* and *H. perrauderianum*. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1065–1071.
- Traas, J., Hülskamp, M., Gendreau, E., and Hofte, H. (1998) Endoreduplication and development: rule without dividing. *Current opinion in plant biology*, 1(6), 498-503.
- Trifi-Farah, N., Chatti, W. S., Marrakchi, M., & Pernèst, J. (1989). Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium* L. en Tunisie. *Agronomie*, 9(6), 591–598.
- Trifi-Farah, N., Baatout, H., Boussaid, M., Combes, D., Figier, J., Hannachi-Salhi, A., Marrakchi, M. (2002). Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. *Plant Genetic Resources Newsletter FAO Biodiversity*, 130, 65 - 72.
- Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A. M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1318–1327.
- U-
- UmaMaheswari, T., Anbukkarasi, K., Hemalatha, T., and Chendrayan, K. (2013). Studies on phytohormone producing ability of indigenous endophytic bacteria isolated from tropical legume crops *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(6), 127-136.
- V-
- Van Damme, E.J.M., Barre, A., Rougé, P., Peumans, W.J. (2004). Cytoplasmic/nuclear plant lectins : a new story. *Trends Plant Sciences*, 9, 484–489.
- Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*. 59: 124-142.
- Vázquez, M., Santana, O., & Quinto, C. (1993). The NodI and NodJ Proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Strains are Similar to Capsular Polysaccharide Secretion Proteins from Gram- Negative Bacteria. *Molecular Microbiology*, 8, 369-377.
- Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria, . I.B.P. Handbook. *Blackwell scientific publisher*, Oxford, UK.
- Vlassak, K. M., & Vanderleyden, J. (1997). Factors Influencing Nodule Occupancy by Inoculant Rhizobia. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(2), 163–229.

-W-

- Wallington, E.J, Lund, P.A. (1994). *Rhizobium leguminosarum* Contains Multiples Chaperonain (cpn 60), *Genes.Microbiology*, 140,133-122.
- Wang, L., Cao, Y., Wang, E.T., Qiao, Y.J., Jiao, S., Liu, Z.S., Zhao, L., and Wei, G.H. (2016). Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. *Systematic Applied Microbiolgy*, 39, 211-219.
- Werner, D. (1992). Symbiosis of plants and microbes. Edition chapman & Hall.Germany.
- Wielgorskaya, T., & Takhtadzhian, A. L. (Armen L. (1995). *Dictionary of generic names of seed plants*. Columbia University Press.
- Willems, A., Collins, M.D. (1993). Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Bacteriology*,43 (2), 13-305.
- Willems, A. (2006). The taxonomy of rhizbia: an overview. *Plant and soil*, 287, 3-14.
- Wilson, K. (2001). Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 56 (1), 2.4.1-2.4.5.
- Wilson, K. (1987). Preparation of genomic DNA from bacteria. *In: Ausubel FM (Eds) Current Protocols in Molecular*, pp. 2. 4. 1–2. 4. 5.
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, VJ., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H., & Fox, G. E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(3), 315–326.
- Wood, S.M, Newcomb, W. (1989). Nodule morphogenesis : the early infection of *Alfalfa* (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Botany*, 67, 3108–3122.
- Wopereis, M.C.S., Defoer, T., Idinoba, P., Diack, S., Dugué M.J. (2008). Curriculum APRA-GIR : Manuel technique. Pragati Offset Pvt. Ltd., Hyderabad, Inde.

-Y-

- Yadav, N., K. and Vyas, S. R. (1973). Salt and pH tolerance of rhizobia. *Folia Microbiologica*, 18, 242-247.
- Yoon, S. H., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-

genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*, 67, 1613-1617.

-Z-

- Zahran, H.H., Rasanen, L.A., Karsisto, M. and Lindström, K. (1994). Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 100-105.
- Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968–989.
- Zakhia, F., & De Lajudie, P. (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*, 21(6–7), 569–576.
- Zakhia, Frédéric, Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J. C., Gillis, M., Dreyfus, B., & De Lajudie, P. (2004). Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), 380–395.
- Zakhia, Frédéric, Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., & De Lajudie, P. (2006). Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology*, 51(3), 375–393.

Annexes

ANNEXE 1

Milieux de Culture et Solution Nutritive

Milieu: Yeast Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extrait de levure	0.5 g
L'eau distillée	1.0 litre

pH 6.8 - 7.2

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes.

Milieu: Yeast Mannitol Agar (YMA)

YMB	1.0 litre
Agar	15 g

pH 6.8 - 7.2

Ajouter l'agar, autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Milieu YMA+ rouge Congo

YMB	1.0 litre
Solution stock de rouge Congo	10 ml
Agar	15 g

pH 6.8 - 7.2

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10 ml du rouge Congo (0.25 g rouge Congo dans 100 ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

Milieu YMA + bleu de Bromothymol

YMB	1.0 litre
Solution stock de bleu de bromothymol	5 ml
Agar	15 g

pH 6.8 - 7.2

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes.

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5 g BTB dans 100 ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Milieu: Tryptone-Yeast (TY) (Beringer, 1974)

Tryptone	5.0 g
Extrait de levure	3.0 g
CaCl ₂ . H ₂ O	0.87 g
L'eau distillée	1.0 litre

pH 6.8 - 7.2

Autoclave 120 °C pendant 20 minutes

Pour le milieu TYAgar, on rajoute 15 g d'agar avant autoclavage.

Le Milieu de Gloux et Le Rudilier (1989)

Solution A:

KH ₂ PO ₄	0.3 g
NaHPO ₄	0.3 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.05 g
Eau distillée	1.0 litre

Solution B:

H ₃ BO ₃	10 mg
ZnSO ₄	1 mg
CuSO ₄	1 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	1 mg
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.5 mg
Eau distillée	1.0 litre

En plus :

Biotine	2 µg
Acide aspartique	100 mg
Acide lactique	0.74 g
Agar	10 g

Mélanger 100 ml de la solution A avec 20 ml de la solution B

Ajouter l'acide lactique et l'acide aspartique, compléter le volume à 1000 ml et ajuster le pH à 7.0

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

La biotine est stérilisée par filtration est additionnée au milieu.

On ajoute dans chaque cas la concentration désirée du NaCl.

Solution TES

Tris HCl (ci : 1 M)	1 ml (cf :10 mM) (pH 7.4)
EDTA (ci : 0.5 M)	200 µl (cf : 1 mM) (pH 8)
NaCl (ci : 0.5 M)	2 ml (cf :100 mM)
Eau distillée	100 ml

Solution nutritive Fåhræus (1957)

CaCl ₂	0.1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.120 g
KH ₂ PO ₄	0.100 g
Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	0.150 g
Citrate ferrique	0.005 g
Solution stock des Microéléments*	1.0 ml

* Solution stock des Microéléments :

H ₃ BO ₄	2.86 g
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.03 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.22 g
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.08 g
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.14 g

Milieu Broughton et Dilworth (1971)

Solution 1:	CaCl ₂	2M (294 g/l)	0.5 ml
Solution 2:	KH ₂ PO ₄	1M (136 g/l)	0.5 ml
Solution 3:	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5M (123 g/l)	
	K ₂ SO ₄	0.5 M (587 g/l)	0.5 ml
	MnSO ₄ H ₂ O	2M (0.34 g/l)	
Solution 4:	Na ₂ EDTA	(7.45 g/l)	
	FeSO ₄	(5.57 g/l)	1.25ml
Solution 5:	H ₃ BO ₃	(0.247 g/l)	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	(0.24 g/l)	
	CuSO ₄ 5H ₂ O	(0.288 g/l)	0.5 ml
	CaSO ₄ 7H ₂ O	(0.100 g/l)	
	NaMo ₂ H ₂ O	(0.048 g/l)	

ANNEXE 2

Analyse physico-chimique du sol

1- Dosage du calcaire total

On utilise la propriété de carbonates de calcium de se décomposer sous l'action d'un acide.

a- Principe

On décompose par un acide fort (acide chlorhydrique) le carbonate de calcium contenue dans l'échantillon de terre et on mesure le volume de gaz carbonique dégagé par la réaction à la température et à la pression atmosphérique :



Le volume de gaz carbonique dégagé lors de la réaction est mesuré à l'aide de calcimètre de Bernard. En comparant les deux volumes, on détermine le taux de carbonates exprimé en carbonate de calcium de l'échantillon de sol.

b- Réactifs

- HCl (6N)
- CaCO₃ pur
- Eau distillée saturée en NaCl (300g/l).

c - Appareillage

- Calcimètre de Bernard.
- Balance technique.
- Capsule.
- Eprouvette graduée de 10ml
- Pissette.
- Pince.

d- Mode opératoire

➤ Etalonnage du calcimètre de Bernard

- Remplir le tube en U d'eau salée de manière à ce que le niveau correspond à l'origine des mesures.
- Peser 0,3 g de CaCO₃ pur et sec et le déposer dans l'erenmeyer, il va servir à étalonner l'appareil.

- Remplir le petit tube à essai d'HCl (6N) que l'on place délicatement dans l'erlenmeyer au moyen de pinces en ayant soin, qu'aucune goutte ne tombe sur le CaCO₃.
- Boucher soigneusement l'erlenmeyer.
- Faire la lecture du niveau de la burette : soit V₀ le volume lu.
- Renverser l'acide sur le CaCO₃ en ayant soin de ne pas échauffer le mélange avec la main.
- Laisser la réaction se faire et attendre la stabilisation du niveau de l'eau dans le tube, marquant la fin du dégagement gazeux.
- Faire la lecture soit V₁ le volume lu, le volume réel est donc V₁ - V₀ = V_r

➤ **Dosage du calcaire total dans le sol** (Mathieu *et al.*, 2003)

Renouveler l'opération en remplaçant le CaCO₃ par les échantillons de sol tamisés à 2 mm (prise d'essai de 0,5 g à 1 g selon la richesse en calcaire), soit V_R le volume dégagé par l'échantillon de sol. Déterminer V₁ ; V₀ et V_R pour le sol.

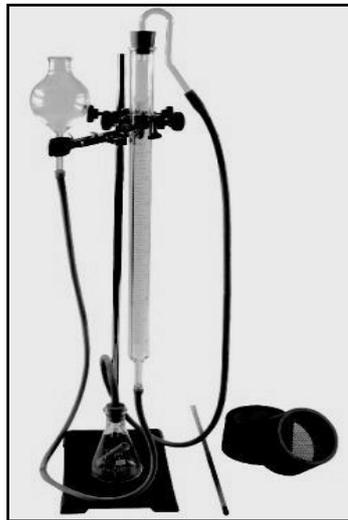
c- Calcul et expression des résultats

$$\text{CaCO}_3\% = \left[\frac{V_R \times 0,3}{V_r \times P} \right] \times 100 \quad \text{30 } V_R / V_r P$$

V_r = volume de CO₂ produit par 0,3 g de CaCO₃ pur et sec.

V_R = volume de CO₂ produit par x g de CaCO₃ contenu dans un poids P de sol.

P = poids de la prise d'essai de terre en gramme.



Calcimètre de Bernard

2- Détermination du pH du sol

a- Mode opératoire

□ Etalonnage du pH-mètre

Suivre les indications propres à chaque appareil.

□ Mesure du pH-eau ou acidité effective (1/2.5) (Mathieu *et al.*, 2003)

- Peser 10 g de sol (<2 mm)
- Verser dans un flacon de 500 ml
- Ajouter 25 ml d'eau distillé et agiter le mélange pendant 30minute avec un agitateur culbuteur.
- Verser le mélange dans une pellicule.
- Laisser le mélange se reposer quelques minutes.
- Plonger l'électrode dans le liquide surnageant et effectuer la mesure.
- Laisser la lecture se stabiliser durant plusieurs secondes, noter la valeur.

3- Détermination de la conductivité électrique CE d'un sol (Mathieu *et al.*, 2003)

➤ Principe de la conductivité électrique du sol

La conductivité électrique d'une solution du sol est un indice des teneurs en sels solubles dans ce sol, elle exprime approximativement la concentration des solutés ionisables présents dans l'échantillon c'est-à-dire son degré de salinité.

En science du sol, la conductivité électrique (CE) est exprimée en (S/cm, μ S/cm ou mS/cm) à une température de 25 °C. La (CE) est la conductance mesurée dans des conditions spécifiées entre les faces opposées d'un cube unité matérialisé par une cellule conductimétrique composée de deux électrodes de 1 cm² de surface distantes de 1cm.

➤ Mesure

On mesure la conductivité en faisant passer un courant alternatif de très basse tension entre deux électrodes. On plonge la cellule de mesure dans l'eau ou la solution du sol et on lit la valeur. Le résultat de mesure est le plus souvent indiqué en μ S/cm. Une élévation de la température augmente la mobilité des ions dans l'eau, la valeur mesurée est alors plus élevée. Le résultat de la mesure doit toujours comporter l'indication de la température à laquelle elle a été faite, surtout si elle est différente de la température de référence de 20°C. L'instrument de mesure qui possède une sonde de température incorporée, corrige automatiquement la valeur obtenue en fonction de la température de l'eau.

➤ **Mode opératoire**

- Peser 20 g de sol sec tamisé à 2 mm.
- Introduire dans un flacon de 500 ml.
- Ajouter 100 ml d'eau distillé (utiliser une fiole de 100 ml)
- Agiter 1 heure dans l'agitateur culbuteur.
- Laisser reposer jusqu'à ce qu'il y ait sédimentation de la terre.
- Transvaser le liquide surnageant dans une pellicule ou dans un bêcher.
- Faire la lecture par le conductimètre, vous notez aussi la température.

4- La texture du sol (Granulométrie)

La répartition des proportions de sable, de limon et d'argile détermine *la texture* du sol. La texture du sol donne donc une indication du pourcentage des particules larges et fines. Un sol sableux contient beaucoup de sable, un sol argileux-limoneux surtout de l'argile et du limon, etc....(Wopereis *et al.*, 2008).

La texture du sol est très importante parce qu'elle détermine en grande partie le mouvement de l'eau dans le sol. En général, la percolation (mouvement vertical descendant) de l'eau dans un sol sableux est beaucoup plus grande que dans un sol argileux. Avec cette percolation des nutriments descendent dans les couches inférieures du profil du sol, parfois hors de portée des racines de la plante. Un sol sableux ne peut pas stocker beaucoup d'eau, mais l'absorption est facile et l'eau est évacuée rapidement vers le bas. Ceci peut être un problème car cela occasionne des pertes en nutriments. Le sable ne contient pas beaucoup de nutriments. Un sol argileux peut stocker beaucoup plus d'eau à cause de la finesse des pores entre les particules. L'absorption d'eau dans ce type de sol est facile dans un état sec, mais devient faible ou presque nul si le sol commence à être saturé. L'argile est en général fertile, elle retient bien les nutriments (Wopereis *et al.*, 2008).

Comment observer et déterminer la texture du sol ?

Il faut :

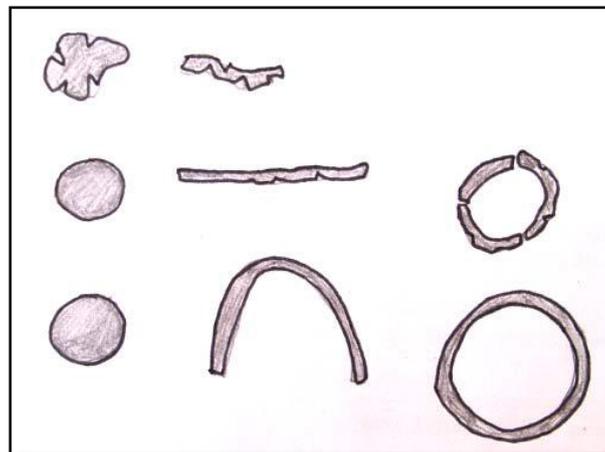
- Prélever un échantillon du sol suffisamment grand pour remplir environ un quart de la paume de la main ;
- Enlever les corps étrangers (racines, semences, insectes) et les matériaux supérieurs à 2 mm (du gravier) ;
- Ajouter un peu d'eau sur l'échantillon et malaxer le sol pour ainsi obtenir une pâte. Le sol doit être uniformément mouillé, sans présence d'agréments ;

• Rouler d'abord la pâte entre le pouce et l'index pour former « une boule » ou un « cylindre » en faisant aller et venir la pâte de la paume de la main vers l'extrémité des doigts et vice-versa; ceci permettra de distinguer s'il s'agit principalement de :

- *sable* : on sent les grains de sable entre les doigts et le sol ne colle pas aux doigts ; il n'a pas de cohésion et la boule casse facilement quand on exerce une pression avec les doigts ; le cylindre ne se forme pas facilement,

- *limon* : on sent que la pâte colle partiellement aux doigts ; on peut bien faire une boule qui ne casse pas facilement quand on la presse entre les doigts ; on peut former un cylindre qui, courbé en forme de U, laisse apparaître des fissures,

- *argile* : la pâte est très souple et colle aux doigts ; on peut facilement faire une boule et faire un creux dedans ou donner une forme à la pâte ; il est facile de former un cylindre qui ne présente pas de fissure quand il est courbé en forme de U.



- Sable
- Limon
- Argile



Argiles

Limons

Sables

ANNEXE 3

Analyse statistique

- Analyse en Composantes Principales (ACP) XLSTAT 2016.05.34949

Type d'ACP : Pearson (n)

Type de biplot : Biplot de distance / Coefficient = Automatique

Valeurs propres :

	F1	F2	F3
Valeur propre	1,684	1,037	0,278
Variabilité (%)	56,148	34,571	9,281
% cumulé	56,148	90,719	100,000

ANNEXE 4

Caractérisation phénotypique des isolats cultivables

Effet du pH : DO à 600 nm

Site de Aïn Babouche

Souche/pH	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
BA11	0,290	0,336	0,436	0,469	0,447	0,761	0,401	0,393	0,417	0,370	0,481
BA12	0,473	0,615	0,566	0,663	0,587	0,549	0,654	0,590	0,493	0,464	0,470
BA7	0,357	0,304	0,502	0,480	0,578	0,600	0,740	0,612	0,629	0,520	0,371
BA2	0,227	0,150	0,248	0,235	0,196	0,196	0,276	0,306	0,277	0,296	0,073
BA3	0,255	0,257	0,298	0,323	0,486	0,521	0,79	0,411	0,293	0,551	0,215
BA13	0,386	0,565	0,728	0,673	0,662	0,662	0,692	0,682	0,420	0,686	0,100
BA9	0,194	0,184	0,394	0,245	0,228	0,227	0,294	0,304	0,314	0,272	0,014
BA10	0,277	0,190	0,236	0,236	0,217	0,204	0,279	0,307	0,305	0,303	0,014
BA4	0,266	0,223	0,310	0,334	0,357	0,304	0,392	0,298	0,407	0,342	0,335
BA1	0,207	0,324	0,487	0,346	0,332	0,307	0,346	0,326	0,284	0,289	0,274
BA5	0,430	0,409	0,008	0,477	0,454	0,387	0,478	0,419	0,394	0,254	0,102
BA8	0,056	0,127	0,164	0,176	0,208	0,554	0,539	0,581	0,290	0,532	0,026
BA6	0,510	0,491	0,302	0,341	0,388	0,383	0,407	0,199	0,110	0,108	0,080

Site de Amoucha

Souche/pH	4	4,5	5	5,5	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
AM10	0,288	0,428	0,404	0,445	0,456	0,661	0,477	0,449	0,362	0,430
AM4	0,501	0,610	0,452	0,667	0,591	0,662	0,771	0,557	0,536	0,168
AM2	0,517	0,625	0,488	0,688	0,513	0,492	0,517	0,538	0,578	0,125
AM1	0,515	0,551	0,684	0,779	0,618	0,622	0,603	0,657	0,501	0,108
AM3	0,415	0,289	0,506	0,966	0,799	0,668	0,724	0,582	0,685	0,140
AM5	0,303	0,329	0,395	0,618	0,516	0,398	0,536	0,357	0,391	0,062
AM7	0,414	0,399	0,251	0,378	0,380	0,350	0,318	0,451	0,451	0,494
AM8	0,368	0,418	0,281	0,374	0,377	0,394	0,383	0,427	0,342	0,537
AM9	0,363	0,398	0,236	0,321	0,341	0,382	0,361	0,324	0,302	0,536
AM6	0,422	0,403	0,652	0,479	0,357	0,357	0,498	0,452	0,434	0,113

Site de Aïn M'lila

Souche / pH	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
ML16	0,405	0,358	0,619	0,589	0,432	0,255	0,501	0,257	0,305	0,284	0,169
ML6	0,645	0,521	0,783	0,671	0,631	0,616	0,589	0,360	0,391	0,451	0,438
ML9	0,565	0,331	0,776	0,634	0,490	0,401	0,570	0,280	0,485	0,337	0,181
ML10	0,439	0,452	0,744	0,731	0,558	0,546	0,693	0,342	0,336	0,466	0,352
ML8	0,438	0,245	0,589	0,665	0,404	0,329	0,468	0,441	0,006	0,383	0,191
ML19	0,711	0,658	0,800	0,698	0,706	0,653	0,743	0,596	0,447	0,503	0,367
ML3	0,783	0,551	0,805	0,663	0,675	0,630	0,664	0,485	0,439	0,442	0,463
ML7	0,446	0,505	0,735	0,629	0,686	0,488	0,641	0,524	0,361	0,491	0,310
ML17	0,485	0,400	0,331	0,384	0,475	0,501	0,460	0,280	0,201	0,102	0,038
ML23	0,560	0,497	0,580	0,599	0,554	0,671	0,666	0,708	0,682	0,656	0,760
ML15	0,491	0,362	0,260	0,325	0,321	0,391	0,356	0,398	0,352	0,333	0,037
ML20	0,732	0,529	0,532	0,696	0,592	0,547	0,586	0,675	0,513	0,628	0,695
ML18	0,504	0,012	0,337	0,439	0,352	0,371	0,311	0,420	0,392	0,573	0,631
ML5	0,015	0,015	0,006	0,751	0,542	0,215	0,288	0,781	0,007	0,527	0,063
ML2	0,764	0,571	0,560	0,747	0,641	0,679	0,669	0,669	0,658	0,708	0,693
ML1	0,564	0,585	0,704	0,657	0,652	0,772	0,770	0,741	0,702	0,679	0,088
ML13	0,844	0,816	0,830	0,847	0,779	0,721	0,693	0,728	0,683	0,805	0,644
ML12	0,009	0,663	0,171	0,041	0,496	0,578	0,795	0,277	0,281	0,479	0,040
ML11	0,510	0,455	0,353	0,311	0,469	0,452	0,179	0,252	0,107	0,136	0,069
ML14	0,209	0,263	0,271	0,320	0,496	0,578	0,795	0,277	0,281	0,107	0,040
ML24	0,750	0,451	0,570	0,560	0,580	0,671	0,666	0,708	0,752	0,656	0,660
ML22	0,802	0,735	0,830	0,693	0,671	0,680	0,628	0,689	0,651	0,594	0,435
ML21	0,802	0,735	0,930	0,693	0,671	0,680	0,628	0,689	0,651	0,594	0,435
ML25	0,126	0,152	0,210	0,352	0,551	0,861	0,795	0,601	0,402	0,304	0,211
ML26	0,133	0,176	0,204	0,223	0,401	0,782	0,715	0,687	0,525	0,284	0,126

Site de Djbel Boutaled

Souche/pH	4	4,5	5	5,5	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
DJ2	0,203	0,264	0,219	0,302	0,323	0,320	0,246	0,440	0,359	0,278
DJ1	0,399	0,450	0,362	0,423	0,631	0,375	0,340	0,485	0,467	0,393
DJ5	0,296	0,269	0,220	0,264	0,236	0,186	0,294	0,349	0,332	0,012
DJ14	0,369	0,367	0,458	0,402	0,410	0,475	0,458	0,430	0,423	0,401
DJ3	0,202	0,340	0,289	0,300	0,327	0,401	0,324	0,316	0,280	0,005
DJ6	0,369	0,367	0,458	0,402	0,410	0,395	0,378	0,350	0,330	0,318

Site de Constantine

Souche/pH	4	4,5	5	5,5	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
CA6	0,487	0,535	0,552	0,629	0,393	0,632	0,690	0,657	0,526	0,086
CA5	0,524	0,361	0,531	0,454	0,421	0,292	0,387	0,405	0,329	0,072
CA10	0,362	0,353	0,455	0,368	0,344	0,531	0,548	0,603	0,666	0,086
CA4	0,506	0,593	0,54	0,669	0,475	0,582	0,715	0,614	0,548	0,501
CA11	0,347	0,396	0,479	0,355	0,344	0,450	0,434	0,478	0,323	0,070
CA1	0,380	0,570	0,400	0,367	0,436	0,520	0,592	0,504	0,365	0,138
CA8	0,362	0,353	0,455	0,468	0,744	0,631	0,548	0,403	0,366	0,186
CA2	0,380	0,57	0,400	0,367	0,436	0,520	0,592	0,504	0,365	0,138
CA3	0,230	0,336	0,436	0,447	0,761	0,401	0,393	0,417	0,370	0,481
CA7	0,400	0,570	0,550	0,467	0,636	0,520	0,592	0,504	0,365	0,138
CA9	0,380	0,401	0,490	0,493	0,608	0,615	0,510	0,480	0,210	0,120
CA12	0,388	0,405	0,480	0,499	0,620	0,630	0,500	0,430	0,290	0,190
CA13	0,370	0,420	0,500	0,515	0,700	0,660	0,620	0,400	0,387	0,213

Site d'Arzew

Souche/pH	4	4,5	5	5,5	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
OR11	0,355	0,334	0,392	0,367	0,440	0,473	0,200	0,557	0,546	0,466
OR5	0,258	0,406	0,454	0,363	0,350	0,435	0,440	0,408	0,427	0,251
OR4	0,240	0,280	0,295	0,360	0,232	0,320	0,219	0,109	0,199	0,091
OR3	0,457	0,387	0,224	0,433	0,236	0,184	0,140	0,052	0,086	0,018
OR1	0,524	0,361	0,531	0,454	0,421	0,292	0,387	0,405	0,329	0,072
OR2	0,506	0,593	0,540	0,669	0,475	0,582	0,715	0,614	0,548	0,301
OR6	0,258	0,406	0,454	0,363	0,350	0,435	0,440	0,408	0,427	0,251
OR7	0,258	0,306	0,354	0,393	0,395	0,465	0,450	0,418	0,437	0,241
OR8	0,258	0,406	0,464	0,383	0,359	0,495	0,444	0,428	0,307	0,151
OR9	0,324	0,370	0,412	0,467	0,554	0,473	0,422	0,357	0,216	0,166
OR10	0,215	0,334	0,392	0,400	0,494	0,503	0,401	0,277	0,246	0,146
OR12	0,390	0,415	0,480	0,513	0,715	0,645	0,578	0,478	0,366	0,212
OR13	0,387	0,399	0,412	0,480	0,691	0,564	0,512	0,415	0,312	0,199
OR14	0,221	0,262	0,421	0,467	0,689	0,598	0,471	0,361	0,264	0,103

Souches de références

Souche/pH	4	4,5	5	5,5	5,8	6,8	7,8	8,8	9,8	10	11
Mésorhizo 76T	0,266	0,274	0,281	0,281	0,288	0,338	0,244	0,309	0,365	0,250	0,257
Rhizob SAM12	0,244	0,286	0,398	0,325	0,381	0,490	0,336	0,474	0,466	0,356	0,269
Gamma 10	0,251	0,216	0,265	0,365	0,261	0,342	0,277	0,403	0,291	0,283	0,289
Gamma 6	0,168	0,319	0,324	0,293	0,280	0,394	0,290	0,353	0,375	0,316	0,283

Effet du NaCl : DO à 600 nm

Site de Aïn Babouche

Souche/NaCl	0,01M	0,1M	0,2M	0,5M	1M	1,5M	2M
BA7	0,269	0,192	0,096	0,056	0,047	0,032	0,024
BA11	0,284	0,262	0,198	0,186	0,137	0,104	0,081
BA3	0,185	0,109	0,099	0,055	0,021	0,015	0,007
BA8	0,183	0,103	0,098	0,064	0,028	0,01	0,001
BA6	0,207	0,179	0,106	0,086	0,052	0,034	0,019
BA13	0,222	0,186	0,088	0,061	0,041	0,038	0,015
BA1	0,208	0,191	0,126	0,105	0,097	0,052	0,034
BA5	0,252	0,228	0,171	0,102	0,067	0,047	0,007
BA9	0,209	0,188	0,118	0,095	0,067	0,041	0,022
BA4	0,178	0,113	0,102	0,088	0,021	0,012	0,003
BA10	0,105	0,099	0,047	0,026	0,013	0,01	0,001
BA2	0,201	0,188	0,146	0,083	0,099	0,047	0,015
BA12	0,292	0,233	0,158	0,208	0,193	0,077	0,059

Site de Amoucha

Souche/NaCl	0,01M	0,1M	0,2M	0,5M	1M	1,5M	2M
AM1	0,194	0,151	0,107	0,071	0,047	0,029	0,015
AM10	0,205	0,183	0,103	0,079	0,051	0,033	0,018
AM4	0,152	0,104	0,096	0,022	0,010	0,005	0,001
AM9	0,175	0,082	0,050	0,032	0,010	0,007	0,000
AM6	0,097	0,071	0,052	0,026	0,011	0,009	0,002
AM8	0,101	0,096	0,075	0,082	0,018	0,003	0,000
AM2	0,185	0,131	0,101	0,078	0,040	0,023	0,012
AM5	0,139	0,107	0,097	0,059	0,022	0,011	0,003
AM7	0,198	0,104	0,064	0,034	0,011	0,005	0,000
AM3	0,201	0,179	0,109	0,092	0,034	0,022	0,013

Site de Aïn M'lila

Souche/NaCl	0,01M	0,1M	0,2M	0,5M	1M	1,5M	2M
ML2	0,305	0,252	0,211	0,192	0,146	0,101	0,082
ML5	0,481	0,369	0,247	0,218	0,191	0,138	0,102
ML16	0,362	0,299	0,182	0,159	0,104	0,096	0,075
ML8	0,496	0,381	0,298	0,207	0,187	0,119	0,102
ML3	0,381	0,224	0,182	0,131	0,099	0,079	0,051
ML10	0,295	0,154	0,133	0,094	0,056	0,036	0,022
ML21	0,264	0,181	0,154	0,108	0,095	0,079	0,052
ML23	0,398	0,286	0,194	0,093	0,051	0,033	0,019
ML6	0,401	0,275	0,197	0,158	0,105	0,096	0,083
ML22	0,318	0,264	0,209	0,156	0,123	0,105	0,092
ML1	0,397	0,376	0,354	0,271	0,201	0,174	0,109
ML11	0,407	0,252	0,225	0,143	0,113	0,092	0,078
ML17	0,493	0,352	0,282	0,208	0,163	0,124	0,101
ML20	0,431	0,305	0,2995	0,217	0,155	0,103	0,085
ML24	0,308	0,291	0,185	0,081	0,061	0,039	0,014
ML19	0,405	0,279	0,169	0,138	0,096	0,075	0,059
ML18	0,35	0,314	0,261	0,189	0,161	0,124	0,102
ML15	0,295	0,195	0,123	0,105	0,075	0,058	0,041
ML12	0,308	0,261	0,205	0,176	0,134	0,103	0,095
ML25	0,279	0,203	0,184	0,098	0,069	0,045	0,032
ML4	0,461	0,312	0,291	0,164	0,105	0,091	0,087
ML7	0,389	0,217	0,174	0,133	0,102	0,099	0,075
ML13	0,402	0,305	0,235	0,203	0,162	0,129	0,1
ML14	0,355	0,279	0,281	0,182	0,146	0,103	0,092
ML25	0,397	0,267	0,189	0,087	0,042	0,028	0,009
ML26	0,315	0,217	0,128	0,065	0,034	0,015	0,002

Site de Djbel Boutaled

Souche/NaCl	0,01M	0,1M	0,2M	0,5M	1M	1,5M	2M
DJ2	0,352	0,275	0,241	0,205	0,175	0,138	0,097
DJ1	0,297	0,201	0,198	0,145	0,105	0,094	0,037
DJ5	0,295	0,208	0,188	0,12	0,103	0,089	0,039
DJ14	0,376	0,288	0,254	0,198	0,109	0,086	0,049
DJ3	0,299	0,233	0,204	0,179	0,133	0,078	0,031
DJ6	0,345	0,287	0,232	0,203	0,187	0,108	0,045

Site de Constantine

Souche/NaCl	0,01M	0,1M	0,2M	0,5M	1M	1,5M	2M
CA6	0,195	0,145	0,112	0,087	0,054	0,039	0,015
CA5	0,185	0,105	0,098	0,067	0,043	0,029	0,013
CA10	0,202	0,183	0,105	0,094	0,078	0,014	0,002
CA4	0,205	0,097	0,158	0,097	0,064	0,048	0,022
CA11	0,211	0,178	0,137	0,103	0,016	0,006	0,002
CA1	0,133	0,075	0,052	0,029	0,01	0,005	0,001
CA8	0,269	0,165	0,143	0,101	0,035	0,011	0,005
CA2	0,173	0,104	0,087	0,039	0,011	0,007	0,001
CA3	0,201	0,18	0,153	0,105	0,055	0,036	0,002
CA7	0,235	0,197	0,154	0,108	0,06	0,031	0,012
CA9	0,217	0,133	0,098	0,074	0,042	0,023	0,011
CA12	0,203	0,186	0,138	0,101	0,065	0,039	0,01
CA13	0,231	0,185	0,146	0,109	0,081	0,033	0,009

Site d'Arzew

Souche/NaCl	0,01 M	0,1M	0,2M	0,5M	1M	1,5M	2M
OR10	0,195	0,091	0,042	0,026	0,014	0,009	0,001
OR5	0,175	0,095	0,078	0,057	0,013	0,009	0,001
OR9	0,142	0,073	0,045	0,024	0,011	0,004	0,002
OR6	0,171	0,087	0,062	0,027	0,014	0,008	0,001
OR7	0,141	0,085	0,057	0,033	0,016	0,006	0,002
OR8	0,114	0,075	0,052	0,029	0,01	0,005	0,001
OR1	0,2	0,165	0,103	0,091	0,045	0,021	0,015
OR2	0,193	0,104	0,087	0,039	0,011	0,007	0,001
OR3	0,203	0,18	0,154	0,105	0,065	0,036	0,002
OR4	0,25	0,197	0,164	0,098	0,066	0,031	0,023
OR11	0,197	0,133	0,098	0,074	0,042	0,023	0,011
OR12	0,173	0,096	0,062	0,047	0,019	0,009	0,001
OR13	0,281	0,185	0,106	0,089	0,051	0,033	0,019
OR14	0,251	0,165	0,102	0,068	0,047	0,023	0,002

Souches de références

Souche/NaCl	0,01	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
Rhizob SAM12	0,017	0,08	0,072	0,023	0,033	0,037	0,036
Gamma 10	0,03	0,086	0,11	0,025	0,042	0,045	0,029
Gamma 6	0,021	0,083	0,118	0,02	0,036	0,04	0,025
Mésorhizob 76T	0,039	0,091	0,119	0,004	0,019	0,026	0,034

Tableau récapitulatif des tests phénotypiques et le test de nodulation (Site contaminé par l'Antimoine de Aïn Babouche)

Test Isolat	Caractère morphologique		Tests biochimiques			Tests physiologiques (Température)					Test de nodulation (Description de la partie racinaire)
	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Nitrate Réductase	Uréase	Cellulase	4 °C	28 °C	37 °C	44 °C	50 °C	
BA2	Colonies jaunes, rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 mm, translucides, visqueuses (production d'EPS)	Petits bâtonnets fines à Gram négatif	+	+	+	+ (6j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 18 Cm <u>racine secondaires</u> : 2cm Absence de nodules Courbure et enroulement des petites racelles sur les racines sous forme des nœuds (1-5mm)
BA4	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1mm, translucides, visqueuses.	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	-	+ (4j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 18 Cm <u>racine secondaires</u> : 6 cm Absence de nodules Absence de palettes
BA5	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2mm, translucides, visqueuses	Petits bâtonnets fines à Gram négatif	+	+	+	+ (3j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 10 Cm <u>racine secondaires</u> : 2mm à 3 cm Absence de nodules Absence de palettes
BA6	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, <1mm, opaques, crémeuse	Bacilles Gram positif	+	+	+	+(3j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 12 Cm <u>racine secondaire</u> : 3 mm à 2 cm Absence de nodules Courbure et enroulement des petites racelles sur les racines sous forme des nœuds (1.5mm)

BA9	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses (productrice d'EPS)	Petits Coccobacilles bien arrondis à Gram négatif	+	+	+	+ (3j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 9 Cm <u>racine secondaires</u> : 1 cm Absence de nodules Courbure et enroulement des petites radicelles sur les racines sous forme des nœuds (2mm)
BA11	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 à 3mm, translucides, visqueuses.	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+ (3j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	<u>racine principale</u> : 18 cm <u>racine secondaire</u> : 2 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement des petites radicelles sur les racines sous forme des nœuds (1mm)
BA3	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses	Petits bâtonnets à Gram négatif	+	+	+	+ (3j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 25 Cm <u>racine secondaire</u> : 0.5 cm à 2 cm Absence de nodules Courbure et enroulement des petites radicelles sur les racines sous forme des nœuds (2mm)
BA12	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 3mm, translucides, visqueuses mucilagineuses (avec forte production d'EPS en formant un tapis).	Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+ (6 j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 23 Cm <u>racine secondaire</u> : 0.5 cm 10 cm Absence de nodules Absence de palettes
BA7	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses (avec production d'EPS).	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	-	+	+ (6 j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 40 Cm <u>racine secondaire</u> : 1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes

BA1	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses (production d'EPS)	Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+(6j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 45 Cm <u>racine secondaire</u> : 1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement de la partie terminale des racines secondaires, elle est colorée en marron
BA10	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1-2mm, translucides, visqueuses.	Petits bâtonnets à Gram négatif	+	+	+	+(6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 40 Cm <u>racine secondaire</u> : 1 cm à 1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes
BA13	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 3mm, translucides, visqueuses mucilagineuses (avec forte production d'EPS en formant un tapis).	Coccobacilles moyennes à Gram négatif	+	+	+	+(3j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 16 cm <u>racine secondaire</u> : 1 cm à 1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement des petites racines sur la racine principale.
BA10	Colonies blanches, contour régulier, semi bambées, 1 à 2 mm, translucides, visqueuses.	Bâtonnets à Gram négatif	-	+	+	+(3j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 23 Cm <u>racine secondaire</u> : 0.5 cm à 10 cm Absence de nodules Absence de palettes

+ : Test positif

- : Test négatif

++ : Bonne pousse

j : jour / EPS : Exopolysaccharides

Tableau récapitulatif des tests phénotypiques et le test de nodulation (Site Sub-humide de Amoucha)

Test phénotypique Isolat	Caractère morphologique		Tests biochimiques			Tests physiologiques (Température)					Test de nodulation (Description de la partie racinaire)
	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Nitrate Réductase	Uréase	Cellulase	4°C	28°C	37°C	44°C	50°C	
AM7	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides visqueuses	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	-	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	racine principale : 50 cm racine secondaires : 0.5 cm -1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes courbure de la partie terminale des racines secondaires
AM8	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(avec production d'EPS)	Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+ (5j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	racine principale : 56 Cm racine secondaires : 0.5cm -2 cm Absence de nodules Absence de palettes
AM9	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(avec production d'EPS)	Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+ (10 j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	racine principale : 20 Cm racine secondaires : 0.5 cm à 1.5 cm Absence de nodules Présence des palettes : palette ronde (0.5 mm) palettes allongées (4mm)
AM5	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, plates , 1 à 2 mm, opaques, visqueuses	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	-	-	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	racine principale : 28 Cm racine secondaire : 0.5 cm-3 cm Absence de nodules Absence de palettes Coloration des racines secondaires en marron

AM1	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, petites 1 mm, translucides, visqueuses	Petits bâtonnets fines à Gram négatif	+	+	+	+(5j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	<u>racine principale</u> :30 Cm <u>racine secondaires</u> : 1 cm à 5 cm Absence de nodules Absence de palettes
AM3	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (production d'EPS)	Coccobacilà Gram négatif	+	+	-	+(5j)	+++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 25Cm <u>racine secondaires</u> : 1 cm à 2cm Absence de nodules Absence de palettes
AM10	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides , visqueuses (avec production d'EPS).	Coccobacilles bien arrondis à Gram négatif	+	+	-	+(5j)	+++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> :26 Cm <u>racine secondaires</u> : 1 cm à 1.8 cm Absence de nodules Absence de palettes
AM6	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 1 à 2 mm, translucides, visqueuses	Coccobacilles ponctiformes à Gram négatif	+	+	+	+(5j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	<u>racine principale</u> :23 Cm <u>racine secondaires</u> : 2 cm Absence de nodules Absence de palettes
AM4	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 1 à 2 mm, translucides , visqueuses	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	-	+(6j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> :28 Cm <u>racine secondaires</u> : 2.2 cm Absence de nodules Absence de palettes
AM2	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides , visqueuses (avec production d'EPS).	Coccobacilles ponctiformes à Gram négatif	+	+	-	+(6j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 20Cm <u>racine secondaires</u> : 1 cm Absence de nodules Absence de palettes

+ : Test positif

- : Test négatif

++ : Bonne pousse

j : jour

EPS : Exopolysaccharides

Tableau récapitulatif des tests phénotypiques et le test de nodulation (Site halophile de Aïn M'lila)

Test phénotypique Isolat	Caractère morphologique		Tests biochimiques			Tests physiologiques (Température)					Test de nodulation (Description de la partie racinaire)
	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Nitrate Réductase	Uréase	Cellulase	4°C	28°C	37°C	44°C	50°C	
ML25	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 à 3 mm, translucides, visqueuses (avec forte production des EPS)	Petits bâtonnets à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	+ (5j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	racine principale : 15 Cm racine secondaire : 1 cm à 7 cm Absence de nodules Présence de palettes (3 petites bosses de 1 à 5mm)
ML7	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses (avec forte production des EPS)	Coccobacilles bien arrondi à Gram négatif	-	+	-	+ (8j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	racine principale : 13 Cm racine secondaire : 0.5 cm à 1 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement des racines secondaires La couleur de la partie terminale est blanche
ML6	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses.	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+ (8j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	racine principale : 11 Cm racine secondaire : 3.5 cm à 7 cm Absence de nodules Absence de palettes
ML8	Colonies Jaunes, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (avec production d'EPS)	Petits coccobacilles à Gram négatif	+	+ (5j)	+	+ (5j)	++	++	-	-	racine principale : 46 Cm racine secondaire : 1 cm Absence de nodules Présence de palettes (3 palettes 0.5 mm) Courbure de la partie terminale sous forme des nœuds colorés en marron

ML19	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides mais sont opaques au centre, visqueuses (avec production d'EPS)	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	-	-	+(5j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 78 Cm <u>racine secondaire</u> : 4 mm à 2 cm Absence de nodules Présence de palettes
ML5	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (avec production d'EPS)	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	-	-	+++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 20 Cm <u>racine secondaire</u> : 0.5 cm à 2 cm Absence de nodules Absence de palettes
ML16	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 1 à 2mm, translucides, visqueuses.	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+(8j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 21 Cm <u>racine secondaire</u> : 1.5 cm Absence de nodules Présence de palette (1 palette).
ML9	Colonies Jaunes, rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (production d'EPS)	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	++ (8 j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 15 Cm Absence de nodules Présence de palettes (1 palette) Courbure des racines secondaires sur la racine
ML11	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2 mm, translucides, visqueuses.	Petits bâtonnets à bord arrondi à Gram négatif	-	+	+	+(5j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	La partie racinaire est moins développée Absence de nodules
ML20	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à mm, translucides, visqueuses.	Petits bâtonnets à Gram négatif	+	+(5j)	+	+(8j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> 48 cm <u>racine secondaire</u> : 1m- 2 cm Absence de nodules Présence de palettes Courbure des racines secondaires (les racines secondaires sont

												colorées en marron).
ML23	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 à mm, très brillante, translucides, visqueuses (production d'EPS)	Bâtonnets moyennes à Gram négatif	+	+	+	+ (8jrs)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-		racine principale : 56 cm racine secondaire : 2 mm Absence de nodules L'apparition des petites bosses
ML10	Colonies jaunes , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 2mm, translucides, visqueuses.	Petits bâtonnets fines à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	+ (8 j)	++	++	-	-		racine principale : 52 cm Absence de nodules Absence de palettes
ML1	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 mm, crémeuses ,	Petits bâtonnets à Gram positif	+	+ (5j)	+	+ (5j)	++	++	-	-		racine principale : 97 cm racine secondaire : 1mm- 2 mm Absence de nodules Absence de palettes
ML26	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2 mm, translucides , visqueuses.	Petits bâtonnets à Gram négatif	+	+	-	+ (8j)	++	++	-	-		racine principale : 50 cm La partie souterraine est colorée en marron
ML2	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses(avec production d'EPS).	Petits Coccobacilles à Gram négatif	-	+	+	+ (8j)	++	++	+	-		racine principale : 30 cm racine secondaire : 1mm- 2 mm Absence de nodules Présence de palettes (1palettes) Courbure des racines secondaires Coloration de la partie souterraine en marron
ML3	Colonies blanches ,rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 2mm, translucides, visqueuses (avec production	Petits Coccobacilles bien arrondis à Gram négatif	+	+	-	+ (8j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-		racine principale : 42 cm racine secondaire : 1cm- 2 cm Absence de nodules Présence de palettes : 2 palettes rondes sur la racine principale

	d'EPS)											2 palettes allongées sur les racines secondaires.
ML15	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2 mm, translucides, visqueuses.	Petits bâtonnets à Gram négatif	+	+	+	+ (5j)	+++	+++	-	-		<u>racine principale</u> : 20 cm <u>racine secondaire</u> : 1cm Absence de nodules Absence de palettes
ML22	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(avec production d'EPS)	Petits bâtonnets à Gram négatif	+	+	-	+ (8jrs)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-		<u>racine principale</u> : 15 cm <u>racine secondaire</u> : 1cm- 2 cm Absence de nodules Absence de palettes
ML4	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (d'EPS production)	Coccobacilles moyennes à Gram négatif	+	+	+	+ (5j)	++	++	-	-		<u>racine principale</u> : 23 cm <u>racine secondaire</u> : 1cm- 1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes
ML13	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2 mm, opaques , visqueuses	Gros coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+ (9jrs)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-		<u>racine principale</u> : 25 cm <u>racine secondaire</u> : 1cm-2.5 cm Absence de nodules Absence de palettes
ML21	Colonies blanches , rondes, Contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2 mm, opaques , visqueuses	coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	++	++	++	-	-		<u>racine principale</u> : 10 Cm <u>racine secondaire</u> : 1 cm à 7 cm Absence de nodules Présence de palettes (3 petites bosses). Apparition de forme de bourgeons (1-5mm)

ML12	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2 mm, opaques , visqueuses	Petits bâtonnets à Gram négatif	+	+	+/-	+	+++	+++	-	-	<u>racine principale</u> : 25 cm <u>racine secondaire</u> : 1cm-2.5 cm Absence de nodules Absence de palettes
ML14	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2 mm, translucides, visqueuses.	Petits bâtonnets à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	+	+++	+++	-	-	<u>racine principale</u> : 19 cm <u>racine secondaire</u> : 2cm Absence de nodules Absence de palettes

+ : Test positif

- : Test négatif

++ : Bonne pousse

j : jour

EPS : Exopolysaccharides

Tableau récapitulatif des tests phénotypiques et le site de nodulation (Site aride de Djbel Boutaleb)

Test phénotypique Isolat	Caractère morphologique		Tests biochimiques			Tests physiologiques (Température)					Test de nodulation (Description de la partie racinaire)
	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Nitrate Réductase	Uréase	Cellulase	4°C	28°C	37°C	44°C	50°C	
DJ6	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(production d'EPS)	Coccobacilles ponctiformes à Gram négatif	+	+	+	-	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	racine principale : 20 Cm Absence de nodules Absence de palettes
DJ14	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 3 mm, translucides , visqueuses (avec forte d'EPS en formant un tapis)	Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+ (5j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	racine principale : 8 Cm racines secondaires : 11 cm – 17 cm Absence de nodules Absence des palettes
DJ5	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(production d'EPS)	Coccobacilles ponctiformes à Gram négatif	+	+	+	+	++	++	-	-	racine principale : 18Cm racine secondaires : 0.9 cm Absence de nodules Absence de palettes
DJ2	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(production d'EPS)	Coccobacilles bien arrondis à Gram négatif	+	+	+	+ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	racine principale 25Cm racine secondaires :1.8 cm Absence de nodules Absence de palettes
DJ3	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(production d'EPS)	Coccobacilles bien arrondis à Gram négatif	+	+	+	+ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	racine principale : 26Cm racine secondaires : 1.9 cm Absence de nodules Absence de palettes

DJ1	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(forte production d'EPS)	Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	+(7j)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	racine principale :16Cm racine secondaires : 0.8 cm Absence de nodules Absence de palettes
------------	--	------------------------------	---	---	---	-------	---------	---------	---	---	---

+ : Test positif

- : Test négatif

++ : Bonne pousse

j : jour

EPS : Exopolysaccharides

Tableau récapitulatif des tests phénotypiques et le test de nodulation (Site de Constantine)

Test phénotypique Isolat	Caractère morphologique		Tests biochimiques			Tests physiologiques (Température)					Test de nodulation (Description de la partie racinaire)
	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Nitrate Réductase	Uréase	Cellulase	4°C	28°C	37°C	44°C	50°C	
CA1	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 3mm, translucides, visqueuses (avec forte production d'EPS)	Coccobacilles Gram négatif	+	+	+	-	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	<u>racine principale</u> : 26 Cm <u>racine secondaire</u> : 2 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement des racines secondaires
CA7	Colonies jaunes , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1mm, crèmeuse	Petits bâtonnets fines à bord arrondi à Gram positif	+	+	+	+ (5j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	<u>racine principale</u> : 26 Cm <u>racine secondaire</u> : 2 cm Absence de nodules Absence de palettes
CA6	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 3mm, translucides, visqueuses (avec production d'EPS)	Coccobacilles Gram négatif	+	+	+	+ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 21 Cm <u>racine secondaire</u> : 2 cm Absence de nodules Absence de palettes
CA2	Colonies orange, rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, petites 1mm, translucides, visqueuses	Petits bâtonnets fines à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	+ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 19 Cm <u>racine secondaire</u> : 1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes
CA3	Colonies blanches absorbent faiblement le rouge Congo, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses	Batonnets à Gram Gram négatif	+	+	+	+ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 13 Cm <u>racine secondaire</u> : 1 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement des racines secondaires

CA4	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 à 3mm, transparente, visqueuses (avec production d'EPS)	Coccobacilles Gram négatif	+	+	+	+(7j)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 11 Cm <u>racine secondaire</u> : 3.5 cm Absence de nodules Absence de palettes
CA9	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (avec production d'EPS)	Petits bâtonnets à bord non arrondi à Gram négatif	+	+	+	+(12j)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 14 Cm <u>racine secondaire</u> : 0.5 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement des racines secondaires
CA10	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 1mm, translucides, visqueuse (production d'EPS)	Petits bâtonnets à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	++(8jrs)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 25 Cm <u>racine secondaire</u> : 1 cm à 4 cm Absence de nodules Présence de palettes (petites bosses de 1 à 3mm)
CA5	Colonies orange clair , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2mm, translucides, visqueuses	Bâtonnets trop petites à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	+(13j)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 15 Cm <u>racine secondaire</u> : 2 cm Absence de nodules Absence de palettes
CA8	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 à 3 mm, translucides, visqueuses (avec forte production des EPS)	Bâtonnets moyennes non arrondis à Gram négatif	+	+	+	+(5j)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 26 cm <u>racine secondaire</u> : 1 cm à 7 cm Absence de nodules Présence de palettes (petites bosses de 1 à 4mm)
CA12	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, plates, 2mm, translucides presque transparentes, visqueuses(production d'EPS)	Petits bâtonnets fines à Gram négatif	+	+	+	+(11j)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 42 cm <u>racine secondaire</u> : 1cm- 2 cm Absence de nodules

CA11	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (avec production d'EPS)	Bâtonnets moyennes fines à Gram négatif	+	+	+	+(11j)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 21 Cm <u>racine secondaire</u> : 1 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement des racines secondaires
CA13	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (avec production d'EPS)	Petits bâtonnets à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	+(12j)	++(EPS)	++(EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 29 Cm <u>racine secondaire</u> : 0.5 cm à 1 cm Absence de nodules Absence de palettes Courbure et enroulement des racines secondaires

+ : Test positif

- : Test négatif

++ : Bonne pousse

j : jour

EPS : Exopolysaccharides

Tableau récapitulatif des tests phénotypiques et le site de nodulation (Site littorale d'Arzew)

Test phénotypique Isolat	Caractère morphologique		Tests biochimiques			Tests physiologiques (Température)					Test de nodulation (Description de la partie racinaire)
	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Nitrate Réductase	Uréase	Cellulase	4°C	28°C	37°C	44°C	50°C	
OR5	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses(avec production d'EPS)	Petits Coccobacilles ponctiformes à Gram négatif	+	+	+	++ (6 j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	racine principale : 46 Cm Pas de racines secondaires Développement d'une seule palette sur la racine principale
OR14	Colonies blanches, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm crèmeuse	Petits bâtonnets à Gram positif	+	+	+	++ (3j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	racine principale : 42 Cm racine secondaires : 0.5cm -2 cm Absence de nodules Absence de palettes
OR7	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 1 à 2 mm, , visqueuses(production d'EPS)	Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	++ (6 j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	racine principale : 57 Cm racine secondaires : 2mm à 3 cm Absence de nodules Présence de palettes (1 palette ; 1mm) Enroulement des petites racelles sur la racine principale. Coloration de toute la partie racinaires en marron .
OR9	Colonies jaunes clair, rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (production d'EPS)	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	++ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	racine principale : 9 Cm racine secondaire : 18 cm Absence de nodules présence de palettes

OR10	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses (production d'EPS)	Petits Coccobacilles à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	++ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> :8 Cm Absence des racines secondaires Absence de nodules Absence de palettes
OR8	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 1 à 2 mm, translucides, visqueuses (production d'EPS)	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	++ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	<u>racine principale</u> : 10Cm <u>racine secondaires</u> : 3 cm Absence de nodules Présence de palettes Enroulement des petites racelles sur la racine principale.
OR1	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, petites 1 à 2 mm, translucides visqueuses.	Petits bâtonnets à bord arrondi à Gram négatif	+	+	+	++ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 12 Cm <u>racine secondaire</u> : 0.9 cm Absence de nodules Courbure et enroulement des racines secondaires
OR3	Colonies blanches, rondes, contour irrégulier, lisses, semi bambées, 2 mm, opaques, crémeuses.	Bâtonnets moyennes à Gram positif	+	+	+	-	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 14 Cm <u>racine secondaire</u> : 0.8 cm Absence de nodules Courbure et enroulement des racines secondaires
OR6	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, semi bambées, 1 à 2 mm, transparentes, visqueuses.	Petits bâtonnets à Gram négatif	+	+	+	+ (6j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 27 Cm <u>racine secondaire</u> : 1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes
OR12	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, brillantes transparentes, visqueuses.	Bâtonnets moyennes à Gram négatif	+	+	+	++ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	+	-	<u>racine principale</u> : 15 Cm <u>racine secondaire</u> : 1cm Absence de nodules Absence de palettes

OR13	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 1 mm, crèmeuses	Bâtonnets moyennes à Gram positif	-	+	+	++ (10 j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 25 Cm <u>racine secondaire</u> : 1 à 1.5 cm Absence de nodules Absence de palettes
OR11	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 à 3 mm, translucides, visqueuses (forte production d'EPS)	Gros Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	++ (6j)	++ (EPS)	++ (EPS)	-	-	<u>racine principale</u> : 20Cm <u>racine secondaire</u> : 1.5cm Absence de nodules Absence de palettes
OR2	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, bambées, 2 mm, translucides, visqueuses.	Petits Coccobacilles à Gram négatif	+	+	+	++ (7j)	++	++	-	-	<u>racine principale</u> : 30Cm <u>racine secondaire</u> : 2 cm Absence de nodules Absence de palettes
OR4	Colonies blanches , rondes, contour régulier, lisses, plates, 1 à 2mm, translucides, visqueuses.	Petits Coccobacilles à Gram positif	+	+	+	++ (4j)	++	++	+	-	<u>racine principale</u> : 24Cm <u>racine secondaire</u> : 1cm à 2 cm Absence de nodules Absence de palettes

+ : Test positif

- : Test négatif

++ : Bonne pousse

j : jour

EPS : Exopolysaccharides

ANNEXE 5

Numéros d'accessions des séquences des souches identifiées par séquençage du gène ADNr 16S

Code souche	Site d'échantillonnage	Affiliation NCBI (98%-100%)	Taille des séquences (pb)	Numéros d'accessions
ML1	Aïn Mlila (Oum El Bouaghi)	<i>Paenibacillus</i> sp.	713	MN945240
OR13	Arzew (Oran)	<i>Paenibacillus</i> sp.	740	MN945241
CA7	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Staphylococcus</i> sp.	724	MN945242
BA6	Aïn Babouche (Oum El Bouaghi)	<i>Bacillus</i> sp.	708	MN945243
OR4	Arzew (Oran)	<i>Bacillus</i> sp.	853	MN945244
OR3	Arzew (Oran)	<i>Bacillus</i> sp.	781	MN945245
ML8	Aïn Mlila (Oum El Bouaghi)	<i>Xanthomonas</i> sp.	763	MN945246
BA2	Aïn Babouche (Oum El Bouaghi)	<i>Xanthomonas</i> sp.	721	MN945247
AM10	Amoucha (Sétif)	<i>Variovorax</i> sp.	744	MN945248
CA9	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	761	MN945249
BA9	Aïn Babouche (Oum El Bouaghi)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	722	MN945250
BA11	Aïn Babouche (Oum El Bouaghi)	<i>Enterobacter</i> sp.	738	MN945251
ML26	Aïn Mlila (Oum El Bouaghi)	<i>Enterobacter</i> sp.	746	MN945252
BA3	Aïn Babouche (Oum El Bouaghi)	<i>Enterobacter</i> sp.	798	MN945253
DJ14	Djbel Boutaleb (Sétif)	<i>Enterobacter</i> sp.	767	MN945254
OR11	Arzew (Oran)	<i>Enterobacter</i> sp.	809	MN945255
OR2	Arzew (Oran)	<i>Serratia</i> sp.	714	MN945256
CA5	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Pantoea</i> sp.	801	MN945257
AM1	Amoucha (Sétif)	<i>Pseudomonas</i> sp.	772	MN945258
CA4	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Pseudomonas</i> sp.	738	MN945259
ML12	AïnMlila (Oum El Bouaghi)	<i>Pseudomonas</i> sp.	757	MN945260
ML21	AïnMlila (Oum El Bouaghi)	<i>Pseudomonas</i> sp.	758	MN945261
ML14	AïnMlila (Oum El Bouaghi)	<i>Pseudomonas</i> sp.	750	MN945262
OR1	Arzew (Oran)	<i>Pseudomonas</i> sp.	771	MN945263
AM3	Amoucha (Sétif)	<i>Pseudomonas</i> sp.	785	MN945264
AM2	Amoucha (Sétif)	<i>Pseudomonas</i> sp.	735	MN945265
CA13	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Phyllobacterium</i> sp.	1287	MN945266
CA11	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Phyllobacterium</i> sp.	675	MN945267
CA10	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Rhizobium</i> sp.	1282	MN945268
CA8	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Rhizobium</i> sp.	1274	MN945269
ML23	Aïn Mlila (Oum El Bouaghi)	<i>Rhizobium</i> sp.	1254	MN945270
ML25	Aïn Mlila (Oum El Bouaghi)	<i>Rhizobium</i> sp.	1253	MN945271
DGE4	Aïn El Bey (Constantine)	<i>Mesorhizobium</i> sp.	507	MN945272

Tableau 3 : Résultats de la galerie Api 50CH

		OR3																		
			o	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN
	24H	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
	48H	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
		SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AAMD	
	24H	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+		
	48H	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
		GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG						
	24H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
	48H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						

*Productions
scientifiques*

Publications

Leyla Boukaous, Raoudha Ferjani, Hanane Mellal, Wajdi Mimouni, Radja Tir, Meriem Gaci, Marwa Cherni, Andrea Squartini, Hadda Imene Ouzari, Yacine Benhizia. 2020. Diversity of bacteria associated with root nodules of *Hedysarum pallidum* Desf., growing in different regions of Algeria. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences .Vol. 22, No. (1) 217-227.

Prix

- Premier LAUREAT de département des Doctoriales 2014 à l'université de Constantine. Algérie.
- Attestation de Prix des Quatre Meilleurs présentations affichées. (Deuxième Prix) Le 3^{ème} Congrès International Biodiversité Végétale. Marrakech 2015.

Communications scientifiques

- Radja Tir, **Leyla Boukaous**, Hanane Mellal, Meriem Gaci, Benguedouar Ammar. Caractérisation phylogénétique et symbiotique de bactéries rhizobia nodulant *Argyrolobium uniflorum* et ou *Ononis angustissima* dans les sols arides algériens. Les troisièmes journées des Sciences de la Nature et de la Vie du 11 et 12 Novembre 2014, Algérie. Présentation affichée.
- **Leyla Boukaous**, Radja Tir Meriem Gaci, Hannane Mellal, Benguedouar Ammar et Yacine Benhizia. Mise en évidence des B.N.L chez *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes algériens. Le 3^{ème} Congrès International de la Biodiversité Végétale. Marrakech (09- 11 Octobre 2015). Présentation affichée.
- Radja Tir, **Leyla Boukaous**, Meriem Gaci, Benguedouar Ammar. Isolement et caractérisation des bactéries rhizobia nodulant les légumineuses du genre *Ononis*. Le 3^{ème} Congrès International de la Biodiversité Végétale. Marrakech (09- 11 Octobre 2015). Présentation affichée.
- Meriem Gaci, Radja Tir, **Leyla Boukaous**, Ammar Benguedouar et Yacine Benhizia. Effet d'inoculation des rhizobia piégées à partir du sol, sur la croissance du pois fourrager. Séminaire International des Biotechnologies (SIBC) .Constantine. Algérie ; 19, 20,21 Octobre 2015.Présentation affichée.
- **Leyla Boukaous**, Radja Tir, Meriem Gaci, Benguedouar Ammar et Yacine Benhizia. Mise en évidence des B.N.L chez *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents

écosystèmes algériens. Séminaire International des Biotechnologies (SIBC). Constantine. Algérie ; 19, 20, 21 Octobre 2015. Présentation affichée.

- **Leyla Boukaous**, Radja Tir, Meriem Gaci, Hannane Mellal et Yacine Benhizia. Étude comparative du contenu nodulaire de l'espèce *Hedysarum pallidum* dans deux sites différents (site contaminé par l'antimoine et un site non contaminé). Conférence Internationale sur les Symbioses Végétales et leurs Applications Biotechnologiques, Agronomiques et Environnementales Khemis Miliana. Algérie ; 19 – 20 Avril 2016. Présentation affichée.
- Meriem Gaci, **Leyla Boukaous**, Radja Tir, Yacine Benhizia et Ammar Benguedouar. Isolation and characterization of bacteria nodulating *Pisum sativum* by their sensibility to rhizobiophage. Conférence Internationale sur les Symbioses Végétales et leurs Applications Biotechnologiques, Agronomiques et Environnementales Khemis Miliana. Algérie ; 19 – 20 Avril 2016. Présentation affichée.
- Yacine Nasri, Azeddine Belhamri, **Leyla Boukaous**, Radja Tir, Chafia Abdenour. Analyse microbiologique des tranches de la pomme de terre séchées et soumises à différents prétraitement dans un séchoir solaire. The first International Congress on Biotechnologies for Sustainable Development CIBSDD 24-25 Octobre 2017. Boumerdes, Algeria.
- **Leyla Boukaous**. Diversity of bacteria nodulating *Hedysarum* growing in different region of Algeria. Third International Conference on Microbial Ecology and the 19th International meeting on Frankia and Actinorhizal plants. Tunisia February 25th, 2018. Présentation affichée.
- **Leyla Boukaous**, Meriem Gaci, Hanane Mellal, Imene Ouzari, Ahmed Dekak et Yacine Benhizia. Analyse par Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant de la communauté bactérienne des nodules d'*Hedysarum pallidum* en Algérie. La première journée scientifique sur la biodiversité des gènes aux écosystèmes, méthodes innovantes d'évaluation. Université de Larbi TEBESSI. Le 6 Octobre 2019. Tebessa, Algérie. Présentation affichée.

DIVERSITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH ROOT NODULES OF *HEDYSARUM PALLIDUM* DESF. GROWING IN DIFFERENT REGIONS OF ALGERIA

LEYLA BOUKAOUS^{1*}, RAOUDHA FERJANI², HANANE MELLAL¹, WAJDI MIMOUNI²,
RADJA TIR¹, MERIEM GACI¹, MARWA CHERNI², ANDREA SQUARTINI³,
HADDA IMENE OUZARI² AND YACINE BENHIZIA¹

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Département de Microbiologie, Faculté des Science de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria.

²Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives (LR03ES03), Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092, Tunis, Tunisia.

³Department of Agronomy Animals, Food, Natural Resources and Environment, DAFNAE, University of Padova, Viale de l'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy.

(Received 10 Novemebr, 2019; accepted 16 December, 2019)

Key words : *Hedysarum pallidum*, Nodules, Diversity, DGGE, *Mesorhizobium camelthorni*.

Abstract – This work deals with the study of the bacterial diversity associated with the wild legume *Hedysarum pallidum* nodules collected from six different sites of Algeria along a geobioclimatic level transect. A total of eighty-one bacterial isolates were retrieved from harvested plants nodules. Isolates were subjected to preliminary sorting through internal transcribed spacer 16S-23S rRNA amplification, which allowed the distinction of 20 different polymorphic haplotypes. Thirty-two representative isolates were subjected to species identification using partial 16S rRNA gene sequencing. The identified strains were affiliated to *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Firmicutes* with an uneven distribution between the different sites indicating an important bacterial diversity. The phenotypic characterization carried out illustrated the diversity of the isolates. Principal Component Analysis (PCA) of soil parameters showed a differentiation between soil samples. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis (DGGE), highlighted the presence of a band across all investigated samples that showed 100% nucleotide identity to *Mesorhizobium camelthorni*. Such uncultured taxon is envisaged as the responsible of nodule induction in *Hedysarum pallidum* but the role and possible contribution to the symbiosis exerted by culturable bacteria are discussed.

INTRODUCTION

Leguminous plants were considered as an effective pioneer of agriculture in many developing countries. The importance of legumes is evidenced by their capacity to form nitrogen-fixing symbiotic relationship with soil bacteria known as rhizobia, as well as, legumes present an essential source of plant proteins for human and animal nutrition (Graham and Vance, 2003).

Rhizobia are Gram negative bacteria known to occupy root nodule tissues and perform biological nitrogen fixation (BNF), but they are not the unique microbial nodular inhabitant. Several reports indicate that nodules may harbor a wide diversity of

symbiotic bacteria and non-symbiotic endophytes known as Non-Rhizobial Endophytes (NRE) (Peix *et al.*, 2012; De Meyer *et al.*, 2015). These endophytic bacteria are able to benefit their host through different mechanisms includes phytohormones synthesis, enhancing nutrient availability, phosphate solubilization, controlling phytopathogens and conferring biotic and abiotic stresses resistance and tolerance, they were described as Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) (Stagkovic *et al.*, 2009; Ibañez *et al.*, 2017; Singh, 2018).

Symbiotic nitrogen fixation relationship contributes to enhance crop and pasture growth and limit the use of chemical fertilizers. In contrast, few studies have been made in rhizobia and non-crop

forage legumes of agricultural significance, despite their agronomic and ecological importance (Bevan, 2006).

Hedysarum pallidum Desf., (Syn: *Sulla pallida*) is an endemic fodder of *Fabaceae* growing in North Africa, which presents an important agro-economic interest due to its ability to improve soil fertility through the nitrogen fixation process (Hannachi-Sahli *et al.*, 2004). However, this species was little exploited, particularly in Algeria (Benhizia, 2006).

Previous studies reported the unculturability of rhizobial symbionts of Mediterranean wild species of *Hedysarum* including *Hedysarum pallium* and the occurrence of a vast array of opportunistic endophytes (Benhizia *et al.*, 2004), but their symbiotic properties have not yet been demonstrated.

The 16S rRNA gene and internal transcribed spacer (ITS) were developed for the identification and the classification of microorganisms (Huybens *et al.*, 2009). In fact, several studies have reported the usefulness of ITS analysis in the discrimination of bacterial isolates at the genus/species level (Gürtler and Stanisich, 1996). Moreover, fingerprint profiling and analyses, as cultivation-independent techniques, were commonly used to study the microbiome of environmental samples and to unravel the 16S rRNA gene diversity among different microbial communities (Muyzer *et al.*, 1993; Fisher and Triplett, 1999). Among these methods denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was efficiently used to detect environmental

microbiomes fluctuations (Muyzer *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2005).

This study aimed to identify and compare the bacterial community structures of *Hedysarum pallidum* nodules from different areas of Algeria along a geobioclimatic level transect, using culture-independent and-dependent methods.

MATERIALS AND METHODS

Sites description and sampling

The sampling was carried from sub-humid and arid climatic zones in Algeria: two semi-arid sites located in Oum El Bouaghi: Aïn Babouche (35°56'31"N, 7°11'35"E) and Sebkh EL Zemoul of Aïn M'lila (35°54'60"N, 6°31'43"E), two sites in Setif : the sub humid site of Amoucha (36°21'1" N, 5°24'32"E) and the arid site of Djbel Boutaleb (35°40'13"N, 5°16'53"E), a littoral site in Oran (35°51'3725"N, 0°18'3146"E) and a semi-arid site of Aïn El Bey in Constantine (36°14'3"N, 6°36'28"E) (Figure 1). Nodules were detached from roots for bacterial isolation and dry stored in tubes containing CaCl₂ at 4 °C (Date, 1982).

Physico-chemical soil characteristics

Nine sampled soil were tested from the six sites: Aïn Babouche, Aïn M'lila, Arzew, Djbel boutaleb, Amoucha and Aïn el Bey along latitude ranging from 35°56'31" to 36°14'3"N and longitude from 7°11'35" to 6°36'28"E (Table 1). Soil samples were sieved through a 2mm sieve, then, they were

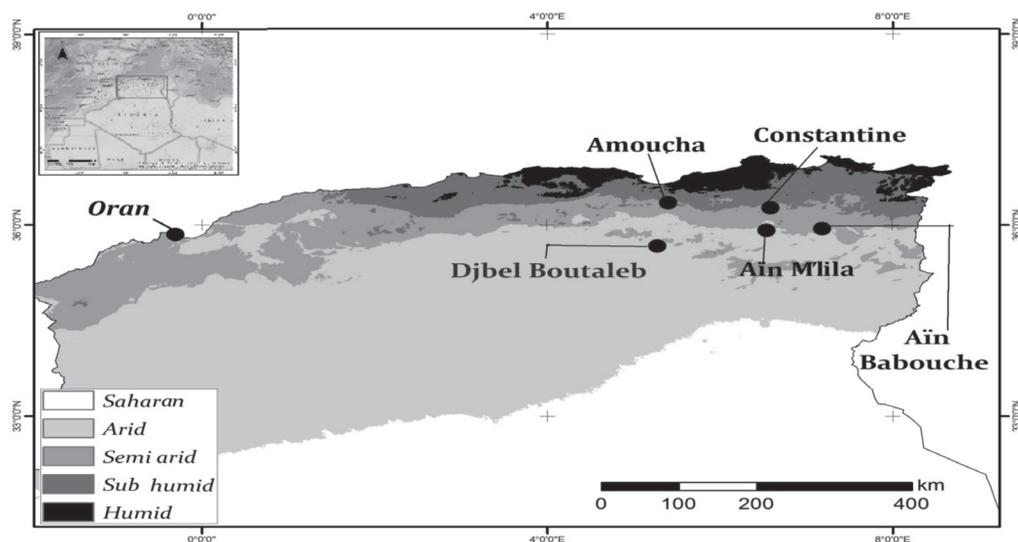


Fig. 1. Bioclimatic zones of Algeria with the collection sites: semi-arid sites (Aïn Babouche, Constantine, Aïn M'lila, Oran) sub humid site (Amoucha), arid site (Djbel Boutaleb)

analyzed for texture, pH, calcium carbonate (CaCO_3) and electrical conductivity (EC) as described by Mathieu *et al.* (2003).

Total DNA extraction from nodules

DNA was extracted directly from root nodules using the method modified of Bousquet *et al.* (1990). The nodules of *Hedysarum pallidum* were surface sterilized in 30% H_2O_2 for 10 min and washed with distilled water. Each lobe was crushed with sterile plastic pestle in 600 μL of Cetyltrimethylammonium bromide buffer extraction (2% Cetyltrimethylammonium bromide, 100mM Tris (pH8), 20mM EDTA, 1.4M NaCl) and incubated overnight at 65°C, then centrifuged at 8.000×g for 10 min to remove cell debris. The supernatant was then extracted twice with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1 vol/vol) and centrifuged at 10.000×g for 15 min. DNA from the aqueous phase was precipitated with 1 volume of isopropanol, incubated overnight at -20 °C and centrifuged at 10.000×g for 45min in 4 °C. The DNA pellet was washed with 70% of ethanol, centrifuged at 10.000×g for 10 min, vacuum dried, suspended in 30 μL of TE [10mM (pH8) Tris, 0.1Mm EDTA] and stored at -20 °C.

PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis (PCR-DGGE)

The hypervariable V3 region of 16S rRNA gene (~550 bp) was amplified using primers 907R and 357F containing GC-clamp extension (Muyzer *et al.*, 1993). The reaction mixture was prepared with 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl_2 , 0.12 mM deoxynucleoside triphosphate, 0.3 μM of each primer and 1U Taq DNA polymerase. The PCR cycles used were as follows : 94°C for 4min, followed by 10 cycles of 94°C for 30s, 61°C for 1min, and 72 °C for 1 min; followed by further 20 cycles of 94 °C for 30s, 56 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 7min. The PCR products were verified by electrophoresis in 1%w/v agarose gel. PCR products were applied on 7% (w/v) polyacrylamide gel in 1X TAE pH 7.4 with denaturing gradient (40-60%) according to Muyzer *et al.* (1993). Gels were run at 90V for 17h at 60 °C. Gels were incubated for 30 min in ethidium bromide solution, rinsed with sterile distilled water and photographed on a UV transillumination table (Mapelli *et al.*, 2013).

DGGE bands were cut from the gel using a sterile scalpel and eluted in 50 μL milliQ water at 37 °C for

6 hours. The eluted DNA was used for amplification using 907R and 357F primers (without the GC-clamp). Positive amplifications were partially sequenced using the primer 357F and they were subjected to a NCBI BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast/>) algorithm and Ez Biocloud (Yoon *et al.*, 2017).

Bacterial isolation

Bacterial strains were isolated from plant root nodules following the standard method described by Vincent (1970). The nodules were surface-sterilized by immersion in 95% ethanol for 10 sec, followed by 0.1% HgCl_2 for 3 min and were rinsed ten times, successively, with sterile distilled water to eliminate the toxic traces of HgCl_2 . The sterilized nodules were transferred on Yeast Extract Mannitol Agar (YMA) plate (Fred and Waskman, 1928) to check the sterilization efficiency. Each nodule was crushed in a drop of sterile distilled water and the suspension was streaked on YMA medium in Petri dishes. The isolates were grown at 28±2 °C for 2-8 days and conserved at 4 °C for short-term storage or at -20°C for long-term storage.

DNA extraction, Ribotyping and identification of isolates

DNA was extracted from bacterial cultures using SDS/CTAB lysis and a phenol/chloroform extraction method (Wilson, 1987) modified by using of 30mg/ml of lysozyme. ITS-PCR amplification was carried using S-D-Bact-1494-a-S-20 (5'- GTCGTAACAAG GTAGCCGTA-3') and L-D-Bact-0035-a-A-15 (5'- CAAGGCATCCACCGT-3') universal primers (Daffonchio *et al.*, 1998). PCR amplification consisted of 1X PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM of dNTPs mixture, 0.3 5M of each primer, 1U Taq polymerase (Fermentas) and 250 ng of total DNA, using the following program: 94 °C for 3min, followed by 35 cycles of 94 °C for 45s, 55 °C for 1min and 72 °C for 2min, and a final extension step at 72 °C for 7min. PCR products were checked by electrophoresis in 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. Bacteria redundancy was reduced by checking the ITS-PCR pattern. One to three isolates per each different ITS haplotype was subjected to phylogenetic analysis. Representative's strains were characterized by partial 16S rRNA gene sequencing using the primers S-D-Bact-0008-a-S-20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and S-D-Bact-1495-a-A-20 (5'- CTACGGCTACCTTGTTA CGA-3') (Daffonchio *et al.*, 1998). PCR amplification

was carried as previously procedure using a thermal cycler (Biometra T3000 Thermocycler.48.Germany). The 16S rRNA PCR amplicons were purified with Exonuclease-I and Shrimp Alkaline Phosphatase (Exo- Sap, Fermentas, Life Sciences). The obtained sequences were compared with those available at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) algorithm and Ez Biocloud (Yoon *et al.*, 2017). Phylogenetic analysis was performed with Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software, version 7 (Kumar *et al.*, 2016) A phylogenetic tree was constructed using Maximum likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980). The 16S rDNA sequences were submitted to the NCBI nucleotide database under the accession number MN945240 to MN945272.

Biochemical and physiological characteristics of culturable bacteria

Bacterial isolates were evaluated for their abilities to produce nitrate reductase (Delarras, 2007), urease (Lindstrom and Lehtomaki, 1988) and endoglucanase (Struffi *et al.*, 1998). Moreover, the tolerance of strains to different abiotic factors was assessed on Yeast-Mannitol Broth at different pH values ranging from 4 to 11 (Struffi *et al.*, 1998; Benhizia, 2006), on sodium lactate aspartate medium (Gloux and Le Rudulier, 1989) in the presence of different concentrations of NaCl ranging from 0.01 to 2M (Benhizia, 2006) and on YMA incubated at different temperatures (4 °C to 50 °C) (Struffi *et al.*, 1998; Benhizia, 2006).

Nodulation Test

The isolates were tested for their ability to re-infect their host plant in axenic conditions. Seeds of *Hedysarum pallidum* were surface sterilized in 95% ethanol for 30s, then transferred in concentrated

sulfuric acid for 3 min and rinsed thoroughly with sterile distilled water, maintained in sterile water 3 hours and germinated on Tryptone yeast agar (TYA) (Beringer, 1974) in Petri dishes for 2-7 days. Seedlings were aseptically transferred to 250ml flasks containing the N-free Fahraeus nutriment solution (Vincent, 1970; Beck *et al.*, 1993) supplemented with 1% (w/v) CaCO₃ and closed with two hole perforated plastic caps, one for inserting the sprout rootlet and the other for inoculation of the seedlings, as previously described by Riah *et al.* (2013). Each seedling was inoculated with 1 mL of a bacterial suspension (10⁸-10⁹ cells ml⁻¹) and an un-inoculated flask was included as a control. Plants were placed in a growth chamber under bacteriological controlled conditions (16h daylight photoperiod at 23 °C, 8h at 18°C night temperature and 60% constant relative humidity). Plants were harvested eight weeks after planting.

Statistical analysis

Soil parameters were subjected to PCA (Principal Component Analysis) using XLSTAT (Addinsoft, version 2016.05.34949).

RESULTS

Physico-chemical soil characteristics

Nine sampled soil were obtained from the six sites and were physico-chemically characterized by analyzing (EC), pH and Calcium carbonate (CaCO₃). The soil texture of six sites studied was variable (Table 1). The soil pH showed values comprised between 7.35 and 7.95, signifying a weakly alkaline soil in the six regions according to Cherni *et al.* (2019). The electrical conductivity varied between 0.15dS/m and 1.95dS/m. Calcium carbonate was variable between the stations, ranging between 9.1% and 39.84%. In fact, Amoucha soil was distinguished

Table 1. Physico-chemical soil characteristics. CaCO₃: Calcium carbonate; EC: Electrical conductivity, pH

Samples	CaCO ₃ (%)	EC (dS/m)	pH	Texture
Aïn Babouche 1	15.07	0.16	7.85	Sandy
Aïn Babouche 2	11.84	0.15	7.65	Sandy
Aïn M'lila 1	39.84	0.19	7.54	Silty-clay
Aïn M'lila 2	33.07	0.17	7.91	Silty- clay
Arzew 1(Oran)	18.3	0.45	7.83	Silty, silky, talc
Arzew 2(Oran)	15.22	0.30	7.57	Silty- clay
Djbel boutaleb	18.07	1.95	7.35	silky, talc
Amoucha	9.1	0.18	7.95	Silty
Aïn el Bey (Constantine)	21.5	0.20	7.83	Silty-clay

with the highest value of pH, the soil of Djbel Boutaleb with the most important value of EC and Ain M'lila1 soil with the highest percentage of Calcium carbonate (Table 1).

A principal component analysis (PCA) showed that soils in the nine locations were different. The first two components were the most important by a cumulative variability of 90.72%. The first axis F1 contributes with 56.15% in the variability, it possible to distinguish the soil of Amoucha with the highest pH value and the soil of Djbel Boutaleb with the highest EC value. The second axis F2 contributes with 34.57% in the variability, it possible to distinguish the soil of Ain M'lila1 with the highest percentage of Calcium carbonate (Figure 2).

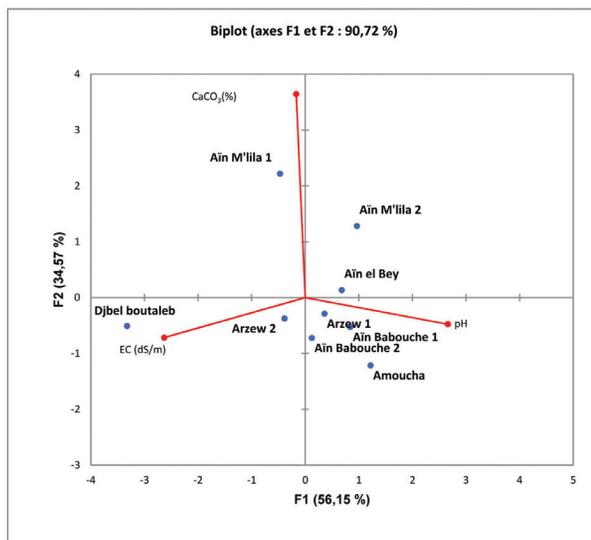


Fig. 2. Principal Component Analysis (PCA) of soils according to their physico-chemical characteristics

Culture-independent analysis of the bacterial Community based on PCR-DGGE

The bacterial diversity of all samples was investigated by DGGE analysis of amplified partial 16S rRNA gene. The obtained DGGE patterns highlighted the presence of a dominant band in all sites (a, b, c, d, e, f) with some faint bands (Figure 3). Partial 16S rRNA gene sequences of the dominant bands (b and d) showed 100% of homology with *Mesorhizobium camellthorni* CCNWXJ 40-4^T (EU169581). However, we were not able to analyze the remaining faint bands because they were very weak.

Analysis and characterization of culturable bacteria

A total of eighty-one bacterial strains were isolated for 2-8 days from the root nodules of *Hedysarum*

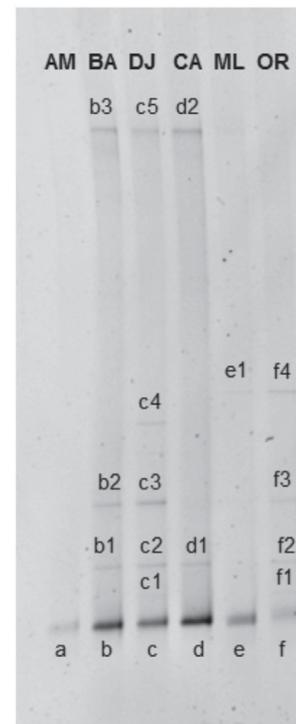


Fig. 3. DGGE patterns of 16S rDNA fragments amplified from nodules roots of *Hedysarum pallidum* in six regions of Algeria: AM (Amoucha), BA (Ain Babouche), DJ (Djbel Boutaleb), CA (Constantine), ML (Ain M'lila), OR (Oran)

pallidum harvested from six regions of different geo-climatic areas of Algeria.

The sterility test was positive suggesting that the isolated strains were indigenous symbionts of *Hedysarum pallidum* nodules.

The isolates were classified into 20 groups based on ITS- PCR fingerprinting analysis using FPQuest software. Strains presenting the same profile were grouped in the same ITS haplotype. The suitability of ITS ribotyping for the discrimination of bacterial isolates according to the species and subspecies level was thoroughly reported (Gürtler and Stanisich, 1996; Daffonchio *et al.*, 2000). From each haplotype (n=20) 1 to 3 isolates were selected for partial 16S rRNA gene sequencing. A total of 32 representative isolates were identified, taxonomic identification as detailed in the phylogenetic tree (Figure 4), grouped the bacterial community associated to the nodules of *Hedysarum pallidum* into two phyla *Proteobacteria* [*Gammaproteobacteria* (59%), *Alphaproteobacteria* (18%), *Betaproteobacteria* (3%)] and *Firmicutes* (18%). Culturable bacteria diversity was observed between the different sites suggesting an influence of the geo-

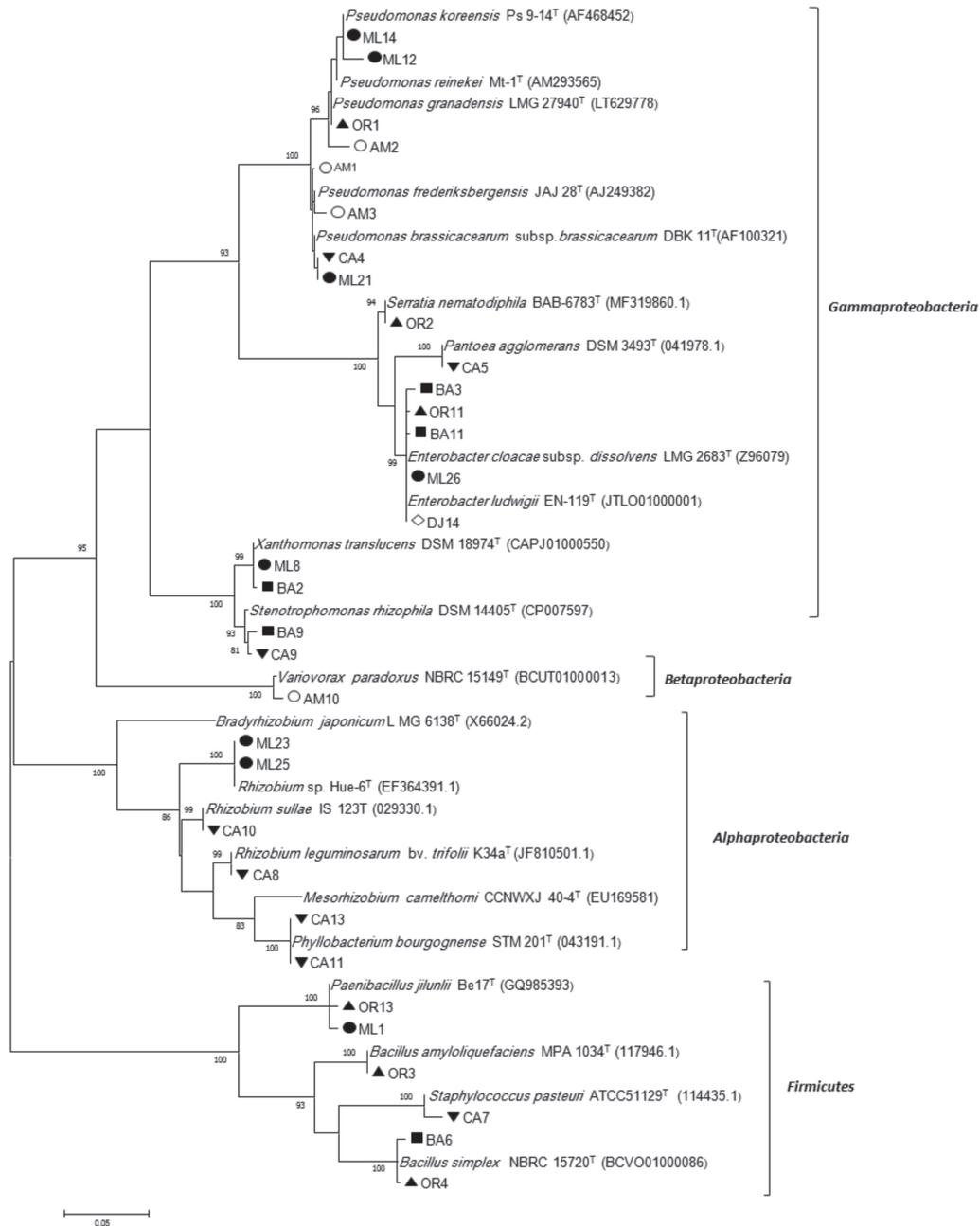


Fig. 4. Maximum Likelihood phylogenetic tree based on partial 16S rRNA sequences of representative strains isolated from nodules of *Hedysarum pallidum* growing in six different geo-climatic areas of Algeria: AM (Amoucha site), BA (■Aïn Babouche site), DJ (Djbel Boutaleb site), CA (▼Constantine site), ML (●Aïn M'lila site), OR (▲Oran site). Bootstrap values are indicated as percentages derived from 1,000 replications. The tree is rooted with *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138^T (X66024.2) and *Mesorhizobium camelthorni* CCNWXJ 40-4^T (EU169581). T: type strain.

climatic factors in shaping the bacterial diversity of *Hedysarum pallidum* (Fig. 5).

The results of biochemical tests showed that the majority of strains were positive for nitrate reductase (93%), urease (98%) and endoglucanase (88%). Moreover, tested strains were able to

withstand a wide range of pH from 4 to 11 and they were able to tolerate up to 1.5M of NaCl.

Nodulation test

After two months of plant culture, in the jars inoculated with the strains affiliated to

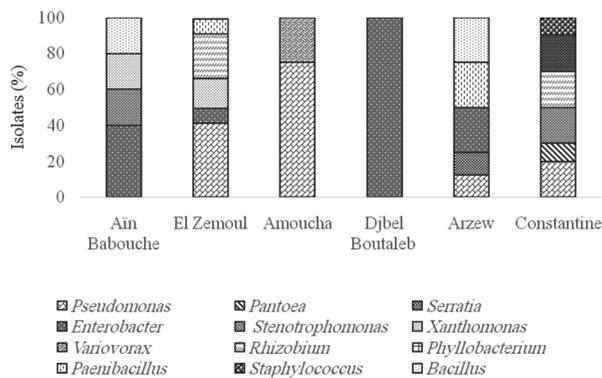


Fig. 5. Diversity percentage at the genus level of culturable bacteria associated with root nodules of *Hedysarum pallidum*.

Alphaproteobacteria represented by (CA10, CA11, ML25, ML23, CA8) the formation of bumps like small nodules was observed.

Among the remaining isolates, strains belonging to the class of *Gamma* and *Beta*-*proteobacteria* were not able to reinfect their original host in axenic conditions. Nonetheless, we noted the formation of shovel-like branchings or bends in lateral roots that acquire a curved and flattened shape inoculated with strains belonging to different genera: BA2, BA11, ML21, ML8, AM10, CA9, OR13, further, the aerial part of inoculated plants with the most strains was better developed compared to the control plants (not inoculated).

DISCUSSION

This work was carried out to evaluate the phenetic and genetic diversity of isolated bacteria from *Hedysarum pallidum* root nodules grown in six eco climatic different zones in Algeria. Phylogenetic analysis of partial 16SrDNA sequences grouped isolated strains into *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Firmicutes*.

Gammaproteobacteria was the most abundant group from nodule bacteria isolates represented by *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* genera. These results are in agreement with previous studies which reported that these genera are commonly isolated from plant tissues including legume nodules as endophytes with rhizobia from several wild and culturable legumes (Benhizia *et al.*, 2004; Ourarhi *et al.*, 2011; Peix *et al.*, 2012, 2015; Ibañez *et al.*, 2017).

In fact, *Pseudomonas* was the dominant genera obtained inside nodules of our host plant, the

selected strains were affiliated to different *Pseudomonas* species isolated from soil and legume roots. Indeed, this genus was widely found in nodules of different species of *Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004) in Algeria; Later, from nodules of *Medicago truncatula* (Zakhia *et al.*, 2006) in Tunisia and from *Sphaerophysa salsula* nodules in China (Deng *et al.*, 2011).

Seven representative strains presented higher similarity with clinical strains that does not cause disease in plants belonging to *Enterobacteriaceae* family [*Enterobacter cloacae* E. *ludwigii*, *Serratia nematophila* and *Pantoea agglomerans*]. Besides, previous studies reporting the occurrence of *Enterobacteriaceae* strains in nodules of *Vicia faba* (Kan *et al.*, 2007); *Glycine max* (Li *et al.*, 2008). Similarly, Indiguez *et al.* (2005) proved that plant defense response regulate enteric endophytic colonization, reducing the virulence of the strains by removing TTSS-SPII increased endophytic.

In line with our findings, a study conducted by De Meyer *et al.* (2015) reported the presence of *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* as NRE isolated from indigenous legumes in Flanders.

Within *Betaproteobacteria* class, AM10 strain was identified as *Variovorax paradoxus* with 100% of homology. To our knowledge, this species was found for the first time in *Hedysarum pallidum* root nodules. Whereas, it has been reported as an endophyte on *Zea mays* and as plant growth-promoting agent in metal-degraded soils (Pereira *et al.*, 2014).

Alphaproteobacteria group was represented by two genera: *Rhizobium* and *Phyllobacterium*. As far as we know, these two groups were reported for the first time with *Hedysarum pallidum* root nodules. Despite, several studies revealed the unculturable character of rhizobial symbionts and the presence of bacterial endophytic within root nodules of *H. confertum* (*H. humile*), *H. naudinianum* and *H. perrauderianum* (Tondello *et al.*, 2011; Torche *et al.*, 2014). Indeed, Benhizia *et al.* (2004) reported *Gammaproteobacteria* as the sole culturable nodules occupants within three wild of *Hedysarum* species (*Hedysarum spinosissimum* ssp. *capitatum*, *H. pallidum* and *H. carnosum*) collected in Algeria. However, no reports confirm the ability of these bacteria to nodulate *Hedysarum* species in axenic conditions. Therefore, nearly complete 16Sr RNA sequencing was performed on the four representative's strains of the class *Alphaproteobacteria* (CA8, CA10, ML23, ML25) to ensure their identity. Indeed, blast results classified them as (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (100%),

Rhizobium sullae (99.38%), *Rhizobium* sp. (98.89%) respectively, indicating that culturability of the rhizobial occupant was possible.

Regarding *Firmicutes* phylum which includes *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Staphylococcus* genera, diverse studies reported the ability of these genera to inhabit different plant roots for instance, the investigated plant species *Hedysarum pallidum*, from wild legume in Tunisia (Zakhia *et al.*, 2006) and from *Glycine max* (Soybean) in China (Li *et al.*, 2008)

DGGE approach could be represented an important strategy for revealing the unculturable bacterial community associated with *H. pallidum* roots. Nevertheless, these profiles allowed the detection of new specie comparing to the culture-dependent methods identified as *Mesorhizobium camelthorni* CCNWXJ 40-4^T (EU169581), first isolated by Chen *et al.* (2011) from *Alhagi sparsifolia* or camelthorn in China. The appearance of most abundant uncultivable *Mesorhizobium* by DGGE analysis in all tested sites was in line with previous results on two endemic species of *Hedysarum* in Algeria (*H. naudinianum* and *H. perrauderianum*) using another culture-independent method (16S amplicon cloning according by Torche *et al.* (2014)) which considered *Mesorhizobium* sp. as a true inducer of nodule organogenesis. However, *M. camelthorni* was isolated from nodules of forage legume plant *Astragalus glombiformis* growing in Eastern Morocco (Guerrouj *et al.*, 2013) using culture dependent methods.

Non-culturability of this taxon from different endemic species tested so far of *Hedysarum* growing in Algeria by culture-dependent methods could be due to a genome mutation under the influence of environmental factors or an acquired unculturability status *in vitro*. This result was seemed to be a wide spread phenomenon in Mediterranean wild legume (Muresu *et al.*, 2008, 2013; Tondello *et al.*, 2011).

Chen *et al.* (2011) reported that the type strains of *M. camelthorni* can nodulate *Sophora alopecuroides*, *Glycyrrhiza inflata* and *Medicago sativa* in cross-infection tests. Therefore, it seems that a possible strategy that could be employed to isolate the rhizobial symbionts of *H. pallidum* is to inoculate *Medicago sativa* or *Astragalus glombiformis* with surface-sterilized crushed *H. pallidum* nodules, and see if nodules form on *M. sativa* or *A. glombiformis* roots.

About nodulation test, attempts at re-isolating of rhizobia from small nodules upon surface sterilization were inconclusive. It was not clear

whether this could be due to an acquired unculturability status, otherwise, obtained structures were not true nodules and this effect of unculturability may be due to the lack of specificity between these strains and the plant. In fact, *R. sullae* and *R. leguminosarum* are the specific symbionts of *Trifolium* and *Hedysarum coronarium* legumes respectively and as our results *Mesorhizobium* is the most dominant taxon and the true inducer of nodulation in *H. pallidum* nodules. So, they may present other way of interactions in *H. pallidum* nodules.

According to previous reports, rhizobia can also behave as endophytes in nodules and it is frequent the isolation of rhizobial strains from nodules that despite their inability to reinfect their host plant, they often promote its growth (Peix *et al.*, 2012; Muresu *et al.*, 2008). For instance, *R. leguminosarum* bv phaseoli and *Mesorhizobium loti* were isolated from *Trifolium pretense*. Combination of endophytic *R. leguminosarum* bv phaseoli and *R. leguminosarum* bv trifolii resulted in the promotion of clover growth (Sturtz *et al.*, 1997). Further, several studies reported the differences in host plant preference for specific rhizobial within natural populations among legume genera and species (Evans *et al.*, 1996; Laguerre *et al.*, 1993).

Noting the formation of root shovels with some strains was previously described in *Hedysarum coronarium* by Tola *et al.* (2009) which these shovels act as efficient calcium-absorbing organs.

Inability of remaining strains to reinfect their host plant, it could be were suggested presumably endophytic or opportunistic in the root nodules. Indeed, diverse studies highlighted that the presence of different non rhizobial endophytes inside root nodules have beneficial effects including plant growth promotion (Tariq *et al.*, 2014; Ibañez *et al.*, 2017; Singh, 2018). As was previously mentioned, plant health, nodulation and yield were improved which co-inoculated with endophytic *gammaproteobacteria* belonging to *Enterobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas*, compared to inoculation with rhizobia alone (Sturtz *et al.*, 1997; Rajendran *et al.*, 2008).

A principal component analysis (PCA) showed that sampled soils in the six regions were different, which may explain bacterial diversity from *H. pallidum* root nodules. Various factors may be involved in competitive growth in the rhizosphere and in competition for root colonization. In fact, structure of bacterial communities depends on soil,

biotic and abiotic environmental factors influencing their rhizospheric competence and nodule occupancy by individual genotypes, among these factors is competition for nutrient sources (Vlassak and Vanderleyden, 1997; Gaiero *et al.*, 2013).

Interestingly, nodules of *Hedysarum pallidum* appeared characterized by the constant presence of an unculturable *Mesorhizobium* using DGGE approach, but at the same time they harbor a wide range of taxa encompassing some that have high 16S similarities to legume nodulating bacteria detected for the first time in this legume and others that fall into the category of non-nodulating endophytes, proving an influence of the geo-climatic factors in bacterial distribution of *Hedysarum pallidum*. Further investigations targeting the culturability of *Mesorhizobium*, nodulation gene properties, nitrogen fixation abilities and competition for nodulation of rhizobia and endophytic strains would provide to understand the nature of bacterial interaction and to contribute to a better elucidation of the ecological plant-microbe interactions within the *Hedysarum* genus.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by The Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, Algeria and The Ministère de l'Enseignement Supérieur in the ambit of laboratory project LR03ES03.

REFERENCES

- Beck, D.P., Materon, L.A. and Afandi, F. 1993. *Practical Rhizobium - Legume Technology Manual*. ICARDA, Syria.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A. and Squartini, A. 2004. *Gammaproteobacteria* can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst Appl Microbiol.* 27: 462–468.
- Benhizia, Y. 2006. Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum*: *H.carnosum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum* Desf., et *H. pallidum* Desf: Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliquée. Université de Constantine, Algérie.
- Beringer, J.E. 1974. R-Factor transfer in *rhizobium* legume. *J Gen Microbiol.* 84 : 188–198.
- Bevan, W. 2006. Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia. School of Biological Sciences: Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. University of Auckland, New Zealand.
- Bousquet, J., Simon, L. and Lalonde, M. 1990. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Can J for Res.* 20 : 254–257.
- Chen, W.M., Zhu, W.F., Bontemps, C., Young, J.P.W. and Wei, G.H. 2011. *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagisparsifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61 : 574–579.
- Cherni, M., Ferjani, R., Mapelli, F. and Boudabous, A. 2019. Soil parameters drive the diversity of *Citrus sinensis* rhizosphere microbiota which exhibits a potential in plant drought stress alleviation. *Appl Soil Ecol.* 135 : 182–193.
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P.L. and Sorlini, C. 1998. PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16s and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *Int J Syst Bacteriol.* 48 (1): 107–116.
- Daffonchio, D., Cherif, A. and Borin, S. 2000. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S- 23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the ' *Bacillus cereus* group'. *Appl Environ Microbiol.* 66 (12): 5460–5468.
- Date, R.A. 1982. Collection, Isolation, characterization and conservation of *Rhizobium* p. 95-109 In : J.M Vincent edited. *Nitrogen fixation in legumes*. Academic Press Publishers.
- Delarras, C. 2007. Milieux de culture et tests biochimiques pour l'identification bactérienne p.126-172 In : C. Delarras edited. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. TEC & DOC, EM inter, Paris.
- De Meyer, S.E., De Beuf, K., Vekeman, B. and Willems, A. 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem.* 83 : 1–11.
- Deng, Z.S., Zhao, L.F., Kong, Z.Y., Yang, W.Q., Lindström, K., Wang, E.T. and Wei, G.H. 2011. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysalsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiol Ecol.* 76 : 463–475.
- Evans, J.A., Gregory, N., Dobrowolski, S. G., Morris, G. E., O'Connor, C. and Wallace, A. 1996. Nodulation of field-grown *Pisum sativum* and *Vicia faba*: competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* determined by an indirect, competitive ELISA method. *Soil Biol Biochem.* 28:247–255.
- Fisher, M.M. and Triplett, E.W. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 65 (10): 4630–4636.
- Fred, E.B. and Waskman, S.A. 1928. *Laboratory manual of general microbiology*. McGraw-Hill, New York.
- Gaiero, J., Mc Call, C., Thompson, K., Day, A., Best, S. and Dunfield, K. 2013. Inside the root: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am J Bot.*

- 100 : 1738-1750.
- Gloux, K. and Le Rudulier, D. 1989. Transport and catabolism of proline betaine in salt stressed *Rhizobium meliloti*. *Arch Microbiol.* 151 : 143-148.
- Graham, P. and Vance, C. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131 : 872-877.
- Guerrouj, K., Pérez-Valera, E., Chahboun, R., Abdelmoumen, H., Bedmar, E. and Missbah El Idrissi, M. 2013. Identification of Rhizobial symbiont of *Astragalus Glombiformis* in Eastern Morocco as *Mesorhizobium camelthorni*. *Anton Leeuw.* 104: 187-198.
- Gürtler, V. and Stanisich, V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* 142(1): 3-16.
- Hannachi-Salhi, A., Combes, D., Baatout, H., Boussaid, M. and Trifi, F.N. 2004. Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI-FAO. 130: 65-72.
- Huybens, N., Mainil, J. and Marlier, D. 2009. Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Ann Med Vet.* 153: 112-128.
- Ibáñez, F., Tonelli, M.L., Muñoz, V., Figueredo, M.S. and Fabra, A. 2017. Bacterial Endophytes of Plants: Diversity, Invasion Mechanisms and Effects on the Host p.25-40 In: D.K. Maheshwari edited. *Endophytes: Biology and Biotechnology*. Sustainable development and biodiversity 15: Springer, Cham.
- Iniguez, A.L., Dong, Y., Carter, H.D., Ahmer, B.M.M., Stone, J.M. and Triplett, E.W. 2005. Regulation of Enteric Endophytic Bacterial Colonization by Plant Defenses. *Mol Plant Microbe Interact.* 18 (2): 169-178.
- Kan, F.L., Chen, Z.Y., Wang, E.T., Tian, C.F., Sui, X.H. and Chen, W.X. 2007. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legume grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Arch Microbiol.* 188: 103-115.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16 : 111-120.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33 : 1870-1874.
- Laguerre, G.E., Geniaux, S. I., Mazurier, R., Rodriguez C. and Amarger, N. 1993. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, bv. trifolii, and bv. phaseoli revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can J Microbiol.* 39 : 412-419.
- Li, Z., Xu, J., Tang, C., Wu, J., Muhammad, A. and Wang, H. 2005. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere.* 62 : 1374-1380.
- Li, J., Wang, E.T. and Chen, W.X. 2005. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. *Syst Appl Microbiol.* 28: 465-477.
- Lindstrom, K. and Lehtomaki, S. 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*galegae*) compared with other fast growing rhizobia. *FEMS Microbiol Lett.* 50: 277-287.
- Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Cherif, H., Ouzari, I. and Borin, S. 2013. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. *BioMed Res Int.* 2013 : 1-13.
- Mathieu, C. and Pieltain, F. 2003. *Analyse chimique des sols (Méthodes choisies)*. TEC & DOC, Lavoisier, Paris.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F.B. and Squartini, A. 2008. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol Ecol.* 63 : 383-400.
- Muresu, R., Tondello, A., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B. and Squartini, A. 2013. Antioxidant treatments counteract the non-culturability of bacterial endophytes isolated from legume nodules. *Arch Microbiol.* 6: 91-385.
- Muyzer, G., de Waal, F.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59 (3): 695-700.
- Ourarhi, M., Abdelmoumen, H., Guerrouj, K., Benata, H., Muresu, R., Squartini, A. and Missbah-Elidrissi, M., 2011. *Colutea arborescens* is nodulated by diverse rhizobia in Eastern Morocco. *Arch Microbiol.* 193:115-124.
- Peix, A., Carro, L., Cerda-Castillo, E., Tejedor, C., Ramirez-Bahena, M.H. and Velázquez, E. 2012. New Research on the Genetic Diversity of Non-Rhizobial Endophytes p.191-202 In: J.A.C. Amaya edited. *Genetic Diversity: New Research*. Nova Science Publishers, Salamanca.
- Peix, A., Ramirez-Bahena, M.H., Velázquez, E. and Bedmar, E.J. 2015. Bacterial associations with legumes. *Crit Rev Plant Sci.* 34 : 17-42.
- Pereira, S.I. and Castro, P.M. 2014. Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environ Sci Pollut Res Int.* 21 (24) : 14110-14123.
- Rajendran, G., Sing, F., Desai, A.J. and Archana, G. 2008. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Biores Technol.* 99 : 4544-4550.
- Riah, N., Béna, G., Djekoun, A., Heulin, K., de Lajudie, P.,

- and Laguerre, G. 2013. Genotypic and symbiotic diversity of *Rhizobium* populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria. *Syst Appl Microbiol.* 37(5): 368-375.
- Singh, I. 2018. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: a review. *Eur J Biol Res.* 8 (4): 191-213.
- Stagkovi a, O., De Meyer, S., Mili e a, B. and Willems, A. 2009. Isolation and characterization of endophytic non rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Botanica serbica* 33 (1):107-114.
- Struffi, P., Corich, V., Giacomini, A., Benguedouar, A., Squartini, A., Casella, S. and Nuti, M.P. 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J Appl Microbiol.* 84: 81-89.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G. and Nowak, J. 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol Fert Soils.* 25(1):13-19.
- Tariq, M., Hameed, S., Yasmeen, T., Zahid, M. and Zafar, M. 2014. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World J Microbiol Biotechnol.* 30: 719-725.
- Tola, E., Henriquez-Sab a, J.L., Polone, E., Dazzo, F.B., Concheri, G., Casella, S. and Squartini, A. 2009. Shovel roots: a unique stress-avoiding developmental strategy of the legume plant *Hedysarum coronarium* L. *Plant Soil.* 322: 25-37.
- Tondello, A., Villani, M., Alessandrini, A., Baldan, B. and Squartini, A. 2011. Identification of the root nodule symbiont of the rare legume species *Hedysarum confertum* Desf. (*Hedysarum humile* L.) in its Italian relictual site. *Plant Biosyst.* 145: 901-905.
- Torche, A., Benhizia, H., Rosselli, R., Romoli, O., Zanardo, M., Baldan, E., Alberghini, S., Tondello, A., Baldan, B., Benguedouar, A., Squartini, A. and Benhizia, Y. 2014. Characterization of bacteria associated with nodules of two endemic legumes of Algeria, *Hedysarum naudinianum* and *H. perrauderianum*. *Ann Microbiol.* 64 (3): 1065-1071.
- Vincent, J.M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria.* Blackwell, Oxford.
- Vlassak, K. M. and Vanderleyden, J. 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. *Crit Rev Plant Sci.* 16:163-229.
- Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria p.2.4.5-2.4.1 In: F.M. Ausubel et al edited. *Current Protocols in Molecular.* Wiley & Sons, New York.
- Yoon, S. H., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67: 1613-1617.
- Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B. and de Lajudie, P. 2006. Unusual bacteria associated to root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH* gene-like within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbiol Ecol.* 51: 375-393.
-

Nom : BOUKAOUS

Prénom : Leyla

Doctorat 3^{ème} cycle

Titre : Mise en évidence des Bactéries Nodulant les Légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes de l'Algérie

Résumé :

Une collection de 81 isolats a été obtenue à partir des nodules de la plante fourragère *Hedysarum pallidum* Desf. (Desfontaine) poussant dans six sites différents sur le plan géobioclimatique en Algérie. Une caractérisation préliminaire des isolats porte sur des tests phénotypiques et symbiotiques. L'amplification des régions intergéniques transcrites 16S-23S (ITS) et le séquençage partiel du gène ADNr 16S ont permis l'assignation des isolats représentatifs à la classe des *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* et le phylum des *Firmicutes*, ceci témoigne une diversité dans la population bactérienne associée aux nodules d'*Hedysarum pallidum*. Fait intéressant, cette étude a également signalé pour la première fois l'isolement des rhizobiums cultivables nodulant *Hedysarum pallidum*. De plus, l'Électrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant (DGGE) a mis en évidence la prédominance de l'espèce non cultivable *Mesorhizobium camelthorni* au niveau de tous les sites testés.

Mots clés : *Hedysarum pallidum* Desf., Nodules, Diversité, rhizobiums, DGGE, *Mesorhizobium camelthorni*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Directeur de thèse : Pr. BENHIZIA Yacine

Année universitaire : 2019/2020