

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de La Recherche Scientifique

Université des Frères MENTOURI Constantine 1

N° d'ordre : 210/DS/2018

N° de série : 10/B.Eco/2018



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Biologie et Ecologie végétale

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCE

Filière : Biotechnologies Végétale

Spécialité : Biotechnologies Végétale

Présentée par

Mr. DEKAK Ahmed

Intitulé

**Caractérisation des isolats bactériens par des techniques
phénotypiques et électrophorétiques isolés à partir des nodules
de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des
*Ginesteae (Fabaceae)***

Soutenue le : 13/11/2018

Devant le jury composé de

Président: Mr M. KITOUNI

Prof.Université des Frères MENTOURI, Constantine1

Directeur de thèse: Mr Y. BENHIZIA

Prof.Université des Frères MENTOURI, Constantine1

Examineurs : Mr M.A. HAMIDECHI

Prof.Université des Frères MENTOURI, Constantine1

Mme K. BENDJOUMANA

Prof.Université ABBES LAGHROUR, Khenchela

Mr A. MECHAI

M.C.A.Université LARBI TEBESSI, Tebessa

Mr M.N. MEKAHLIA

M.C.A.Université LARBI TEBESSI, Tebessa

2018/2019

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette étude ont été réalisés dans le Laboratoire d'Ecologie Microbienne du Département de Biochimie - Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université Mentouri I Constantine. Au terme de ce travail, j'aimerais exprimer mon profond remerciement à mon directeur de thèse **BENHIZIA YACINE**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Mentouri I Constantine, pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de diriger ce travail, pour ses recommandations et ses discussions perspicaces pour avoir cru en moi, pour ses encouragements et pour son implication et pour ces recommandations scientifiques qu'il m'a accordés, ainsi que pour ses conseils qui ont beaucoup enrichi non seulement mon travail au sein du laboratoire mais également différents aspects de ma vie.

Je suis très reconnaissante à **M. KITOUNI**, Professeur. Université Mentouri I Constantine, pour avoir accepté aimablement de présider le jury d'évaluation de cette thèse.

Mon appréciation et ma gratitude vont aussi à **M.A. HAMIDECHI**, Professeur au niveau de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Université Mentouri I Constantine, pour avoir accepté d'évaluer le travail de cette étude.

J'adresse mes sincères remerciements à **Mme K. BENDJOUMANA**, Professeur à l'Université **ABBES LAGHROUR**, Khenchela, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie du jury d'évaluation de cette thèse.

Ma gratitude va également à **Mr A. MECHAI** M.C.A. Université **LARBI TEBESSI**, Tebessa, d'avoir accepté d'expertiser le travail de cette thèse de fin d'étude.

Mes remerciements vont aussi à **M.N. MEKAHLIA** M.C.A. Université **LARBI TEBESSI**, Tebessa. D'avoir accepté de participer à l'évaluation de cette étude

Je remercie également tous (es) les amis (es) que j'ai rencontré au laboratoire. Mes vifs remerciements reviennent à **Menasria taha, Chanchouni haroun et Chabi rabah** pour être de très bons amis et pour avoir été là à chaque fois que j'avais besoin d'eux. Mes très spéciaux remerciements reviennent à mes très chères amies : **Fatmi indel, Bougoussa slim** pour tous les moments partagés ensemble, pour leurs soutiens et leurs mots encourageants et pour leur amitié sincère.

Que toutes les personnes ayant contribué à la réalisation et l'aboutissement de ce travail scientifique trouve ici l'expression de ma profonde et sincère gratitude.

Finalement mes très distincts remerciements reviennent à mes très chers parents et à ma petite et grande famille.

Abstract

Most studies of rhizobia have focused on identification and systematics of symbionts nodulating crop legumes because of their interest in improving yield. However, few studies investigated the endosymbiotic nitrogen-fixing bacteria nodulating wild and spontaneous legume species, in particular in North Africa.

This study aims to phenotypically characterize endosymbiotic bacteria isolated from root-nodules of a wild legumes growing in arid and semiarid regions of northeast Algeria. *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* by chemotaxonomic, biochemical profiling and symbiotic properties comparing them with reference strains (RS). In addition polyphasic characterization of bacteria isolated from nodules of *Genista cinerea*. It examines growth variations of endosymbiont isolates under different environmental conditions including severe situations and to determine their taxonomic position based on growth tolerance limits and potential adaptations, using advanced statistical modelling techniques and genomic characterization based on 16S rRNA sequencing.

Phenotypic characterization was performed using physiological tests (different pH levels, NaCl concentrations, and tolerance to temperature), nutritional experiments (assimilation of different carbohydrates and amino acids) and biochemical profiling (antibiotic resistance, heavy metals resistance and protein profile). Polyphasic characterization was conducted using physiological tests, nutritional experiments and genomic characterization based on 16S rRNA sequencing. Data were analyzed using Markov Chain Monte Carlo sampler for multivariate generalized linear mixed models (MCMCglmm) to detect growth differences between isolates and RS. Similarities between isolates and RS were assessed using agglomerative hierarchical clustering (AHC), whereas multiple factor analysis (MFA) was performed to understand factors influencing each group of isolates/RS and Phylogenie of isolates was conducted.

The results showed that the isolates can grow at pH [4–10], salt concentration [NaCl=0–5%] and temperature up to 45°C. The rhizobia associated with *G. microcephala* and *A. uniflorum* were able to produce different hydrolytic enzymes including cellulose, pectinase and urease, with remarkable tolerance to toxic metals such as zinc, lead, copper, and mercury. Numerical analysis of the phenotypic characteristics revealed that the rhizobial isolates formed four main distinct groups showing high levels of similarity with *Gammaproteobacteria*. Symbiotic and cultural characteristics of *G. cinerea* isolats revealed the existence of a large physiological diversity among tested bacteria, which showed a broad capability to assimilate different carbonaceous and nitrogenous substances, with consistent and large tolerances to pH [4–10], temperature [4–55°C], and salinity [NaCl=2–10%]. Although, the endosymbiont isolates have broad metabolic diversity, they formed two distinct groups with high level of similarity with RS. Group 1 included fast-growing and salt-tolerant isolates characterized by tolerance to acidity with high growth in alkaline conditions. Group 2 covered slow-growing acid-sensitive isolates that high salinity negatively affected their growth. Results of AHC and MFA evidenced that bacterial diversity of endosymbiont isolates showed high level of similarity with RS, a proof that they are rhizobial strains. In concordance with phylogenetic results isolates are closely related to different rhizobia species

The salt tolerant and heavy metals resistance patterns found among the indigenous rhizobial strains associated to *G. microcephala* and *A. uniflorum* are reflecting the environmental stresses pressure and make the strains good candidates for plant successful inoculation in arid areas. Our findings indicate that both fast- and slow-growing rhizobia nodulated *G. cinerea* growing in arid and semiarid regions of northeast Algeria. These rhizobia are poly-extremophiles adapted to diverse environmental stresses and linked to *Beta* and *Gammaprotéobacteria*.

Keywords: Rhizobia diversity; Spontaneous legums (Fabaceae); phenotypic and polyphasic characterization; Bayesian MCMC approach; 16S RNA, drylands soils.

Résumé

La plupart des études sur les rhizobiums se sont concentrées sur l'identification et la systématique des symbiotes qui nodulent les légumineuses des cultures en raison de leur intérêt à améliorer le rendement. Cependant, peu d'études ont étudié les bactéries fixatrices d'azote endosymbiotiques qui nodulent des espèces de légumineuses sauvages et spontanées, en particulier en Afrique du Nord.

Cette étude vise à caractériser phénotypiquement les bactéries endosymbiotiques isolées des nodosités des racines des légumineuses spontanées qui pousse dans les régions arides et semi-arides du nord-est de l'Algérie. *Genista microcephala* et *Argyrobium uniflorum* par étude des profils chimiotaxonomique, biochimique et propriétés symbiotiques en les comparant à des souches de référence (RS). En outre, la caractérisation polyphasique des bactéries isolées à partir de nodules de *Genista cinerea*. En examinant les variations de croissance des isolats d'endosymbiont dans différentes conditions environnementales, y compris les situations sévères et pour déterminer leur position taxonomique basée sur les limites de tolérance de croissance et les adaptations potentielles, en utilisant des techniques de modélisation statistique avancées et la caractérisation génomique.

La caractérisation phénotypique a été réalisée à l'aide de tests physiologiques (pH différents, concentrations de NaCl et tolérance à la température), d'expériences nutritionnelles (assimilation de différents glucides et acides aminés) et de profils biochimiques (résistance aux antibiotiques, métaux lourds et profil protéomique). La caractérisation polyphasique a été réalisée en utilisant des tests physiologiques, des expériences nutritionnelles et une caractérisation génomique basée sur le séquençage de l'ARNr 16S. Les données ont été analysées à l'aide d'un échantillonneur Markov Chain Monte Carlo pour modèles mixtes linéaires généralisés multivariés (MCMCglmm) pour détecter les différences de croissance entre les isolats et SR. Les similitudes entre les isolats et SR ont été évaluées en utilisant la classification hiérarchique agglomérative (AHC), tandis que l'analyse factorielle multiple (AMF) a été réalisée pour comprendre les facteurs influençant chaque groupe d'isolats / SR puis la phylogénie des isolats a été réalisée.

Les bactéries associés aux *G. microcephala* et *A. uniflorum* peuvent croître à un pH [4-10], une concentration en sel [NaCl = 0-5%] et une température allant jusqu'à 45 ° C capables de produire différentes enzymes hydrolytiques, y compris la cellulose, la pectinase et l'uréase, avec une tolérance remarquable aux métaux toxiques tels que le zinc, le plomb, le cuivre et le mercure. L'analyse numérique des caractéristiques phénotypiques a révélé que les isolats formaient quatre groupes distincts principaux montrant des niveaux élevés de similitude avec les *Gammaprotéobactéria*. Les caractéristiques symbiotiques et culturaux des isolats de *G. cinerea* ont révélé l'existence d'une grande diversité physiologique parmi les bactéries testées, qui présentaient une large capacité à assimiler différentes substances carbonées et azotées, avec des tolérances constantes et importantes au pH [4-10], à la température [4 -55°C], et la salinité [NaCl = 2-10%]. Bien que les isolats aient une grande diversité métabolique, ils ont formé deux groupes distincts avec un niveau élevé de similarité avec SR. Le groupe 1 comprenait des isolats à croissance rapide et tolérants au sel, caractérisés par une tolérance à l'acidité et une croissance élevée dans des conditions alcalines. Le groupe 2 couvrait des isolats sensibles à l'acidité et à croissance lente dont la salinité élevée affectait négativement leur croissance. Les résultats de l'AHC et de l'AMF ont montré que la diversité bactérienne des endosymbionts présentait un niveau élevé de similarité avec SR, preuve qu'ils sont des souches de rhizobia. Les résultats phylogéniques confirment que les isolats sont étroitement liés à différentes espèces de rhizobia

Les profils de résistance aux métaux lourds et tolérance au sel trouvés parmi les souches rhizobia associées aux *G. microcephala* et *A. uniflorum* reflètent la pression des contraintes environnementales et font de ces souches de meilleures candidates pour une inoculation réussie dans les zones arides. Nos résultats indiquent que les deux types d'isolats à croissance rapide et à croissance lente ont nodulé *G. cinerea* poussant dans les régions arides et semi-arides du nord-est de l'Algérie. Ces rhizobia sont des poly-extrémophiles adaptés à divers stress environnementaux et liés à des *Bêta* et *Gammaprotéobactéria*.

Mots clés : Diversité des Rhizobia; Légumineuses (Fabaceae) indigènes; Caractérisation phénotypique et polyphasique ; Approche MCMC; 16S rRNA; Régions arides et semi-arides.

ملخص

معظم الدراسات التي أجريت على بكتيريا العقد الجذرية ركزت على تصنيف البكتيريا المتعايشة والمثبتة للنتروجين مع البقوليات الزراعية وذلك لزيادة المردود, وفي الوقت نفسه قليل من الدراسات خصت البكتيريا المتعايشة مع البقوليات البرية.

تهدف هذه الدراسة الى الوصف المظهري للبكتيريا المتعايشة والمعزولة من العقد الجذرية للبقوليات *Genista microcephala* و *Argyrobium uniflorum* التي تنمو في المناطق الجافة والشبه جافة شمال شرق الجزائر وذلك عن طريق إختبار قدرت العزلات على تكوين العقد الجذرية على النبات العائل, التعرف على السلالات البكتيرية بدراسة بعض الخصائص المرفولوجية متبوعة بدراسة مظهرية, فزيولوجية و بيوكيميائية إضافة إلى توضيح مقاومة و حساسية العزلات للمعادن الثقيلة المضادات الحيوية زيادة الى إستعمال تقنية الهجرة الكهربائية للبروتينات, لتحديد التصنيف المظهري للعزلات مقارنة بسلالات المرجعية. التصنيف المتعدد الأطوار الذي خص به العزلات المتحصل عليها من نبات *G. cinerea* أستعمل خلالها دراسة فزيولوجية (مستويات الحموضة المختلفة, تركيز كلوريد الصديوم, درجة الحرارة) و مصادر الكربون (إستيعاب الكربوهيدرات المختلفة) زيادة إلى مصادر الأزوت (إستيعاب الأحماض الأمينية) وكذلك إستعمال طريقة التصنيف الوراثي لهذه العزلات بتشفير سلسلة المخزون الوراثي للوحدة الريبوزومية الصغيرة (16S rRNA)

الوصف المظهري لعزلات البقوليات *G. microcephala* و *A. uniflorum* تم بتقييم أوجه التشابه بين العزلات و السلالات المرجعية بإستخدام طريقة المجموعات الهرمية (CAH) أما فيما يخص عزلات *G. cinerea* فقد أستعمل (CAH) في حين تم تحليل تأثير العوامل لمتعددة (MFA) لفهم مدى تأثير العوامل المدروسة على كل مجموعة من العزلات و السلالات المرجعية وكذلك إستخلاص الشجرة الجينية لتحديد الموقع التصنيفي لذات لعزلات.

البكتيريا المتعايشة مع *G. microcephala* و *A. uniflorum* تستطيع النمو ما بين pH (4-10), تراكيز الملوحة بين (0-5%), درجة حرارة تصل الى 45°م و تستطيع إفراز مجموعة من إنزيمات الإماهة من سيلولاز, بكتيناز و يوريز مع مقاومة مجموعة من المعادن الثقيلة السامة مثل الزنك, الرصاص, النحاس و الزئبق. تحليل الإحصائي للبيانات بين ان العزلات تتكون من أربع مجموعات مختلفة بنسبة تشابه عالية مع *Gammaproteobacteria*

في الوقت نفسه عزلات *G. cinerea* تتميز بتنوع مظهري مظهرة مدى واسع في إستعمال الكربوهيدرات والأحماض الأمينية مع مقاومة هامة لـ: pH (4-10) ودرجة حرارة تصل الى 55°م وإلى الملوحة (2-10%), مكونة بذلك مجموعتين مختلفتين مع نسبة تشابه معتبرة مع السلالات المرجعية كما أظهرت نتائج التحليل الوراثي إنتماء هذه العزلات إلى *Gammaproteobacteria* و *Betaproteobacteria*

الكلمات المفتاحية: البقوليات البرية, المناطق الجافة والشبه جافة, التنوع البيولوجي للبكتيريا, الطريقة الإحصائية MCMC, التصنيف المظهري والوراثي للبكتيريا (16S rRNA)

LISTE DES FIGURES

TITRES	PAGE
Figure 01 : Processus de minéralisation de l'azote (Jared, 2010)	6
Figure 02 : Cycle de l'azote (Raven <i>et al.</i> , 2007)	7
Figure 03 : Classification des légumineuses (Vernie, 2008)	13
Figure 04 : la structure de nitrogénase (Rubio et Ludden, 2008).	15
Figure 05 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2001).	16
Figure 06 : Structure et synthèse des facteurs Nod (Vernie, 2008)	18
Figure 07 : Différents types de gènes <i>nod</i> (Kouakou 2011)	19
Figure 08 : <i>nod ABC</i> : gènes de la voie de biosynthèse facteur <i>nod</i> ; <i>nod D</i> : régulateur positif (Saoudi, 2008)	20
Figure 09 : le processus d'infection dans les poils absorbants. (Obato, 1989).	22
Figure 10 : les différents stades de l'organogenèse de la nodulaire (Vernie, 2008)	23
Figure 11 : La structure de deux types de nodules chez les Légumineuse (Duhoux, 2004) 01-A : coupe longitudinale d'un nodule indéterminé 02-B : coupe transversale d'un nodule déterminé	25
Figure 12 : Carte de localisation géographique et de climat des sites d'échantillonnage (cercle solide) dans le nord-est de l'Algérie	27
Figure 13 : <i>Argyrolobium uniflorum</i> (à gauche) et forme des nodules (à droite)	28
Figure 14 : <i>Génista microcephala</i> (à gauche) et formes des nodules (au milieu et à droite)	29
Figure 15 : <i>Genista cinerea</i> (à gauche) et formes des nodules (au milieu et à droite)	29
Figure 16 : Conservation des nodules sous CaCl ₂ (Vincent, 1970)	30
Figure 17 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)	31
Figure 18 : Assemblage de jarre de léonard (Vincent, 1970)	44
Figure 19 : Germination des graines sur TYA a : Gousses de <i>Genista microcephala</i> , b : Gousses d' <i>Argyrolobium uniflorum</i> , c : Graines germées sur TYA	45
Figure 20 : Jarres placées dans la chambre de culture (a) Jarres placées dans la chambre de culture (b) Développement des plantules après 10 jours de l'inoculation.	46
Figure 21 : Gousses et graines de <i>Génista Cinérea</i> (a) les gousses, (b) les graines	47
Figure 22 : Les graines germées sur la boîte de pétrie sont placées dans les flacons contenant le milieu Fahraeus solide à raison de 3 à 4 graines par flacon	48
Figure 23 : Analyse de la qualité et de la quantité de produit PCR 16S rRNA au QIAXCEL	51
Figure 24 : Caractères cultureux et examen microscopique par la coloration de Gram	54
Figure 25 : Figures des trois Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobactérium</i>	56
Figure 26 : Résultats de différents tests biochimiques réalisés sur les isolats et les souches de référence	59
Figure 27 : Dendrogramme montrant les relations phénotypiques (A) et les profils normalisés d'électrophorèse sur gel de dodécyl sulfate de sodium-polyacrylamide des souches de rhizobia nodulant <i>Genista microcephala</i> et <i>Argyrolobium uniflorum</i> (B).	68
Figure 28 : Relation entre le pH du milieu de croissance et la densité optique des souches de référence et des bactéries isolées à partir des nodules de <i>Genista cinerea</i> des zones arides d'Algérie. Les lignes représentent une régression linéaire avec un ajustement de modèle linéaire généralisé (GLM)	72

<p>Figure 29 : Matrice de corrélation entre les isolats de l'étude et les souches de référence cultivées dans différentes conditions de pH. Les valeurs des tests de corrélation sont représentées par les coefficients de corrélation de Pearson (représentés par la couleur et l'intensité de l'ombrage dans les diagrammes circulaires et les carrés, et les valeurs supérieures à la diagonale) et les valeurs P (au-dessus de la diagonale). Les dendrogrammes latéraux sont des graphiques de la classification hiérarchique agglomérative (AHC). Les rectangles au sein de la matrice indiquent des amas AHC d'isolats / souches de BNL</p>	73
<p>Figure 30 : Relation entre la salinité du milieu de croissance (concentration de NaCl) et la densité optique indiquant la croissance de souches de référence et d'isolats de bactéries nodo-isolantes isolées de <i>Genista cinerea</i> poussant dans les zones arides d'Algérie. Les lignes pleines représentent une régression linéaire avec un ajustement de modèle linéaire généralisé (GLM)</p>	76
<p>Figure 31 : Matrice de corrélation entre les niveaux de croissance des isolats et les souches de référence cultivées sous différents stress salins (concentrations en NaCl). Les valeurs des tests de corrélation sont représentées par les coefficients de corrélation de Pearson (représentés par la couleur et l'intensité de l'ombrage dans les diagrammes circulaires et les carrés, et les valeurs supérieures à la diagonale) et les valeurs P (au-dessus de la diagonale). Les dendrogrammes latéraux sont des graphiques de la classification hiérarchique agglomérative (AHC). Les rectangles au sein de la matrice indiquent des amas AHC d'isolats / souches de BNL</p>	77
<p>Figure 32 : Boîtes à moustaches représentant la croissance (densité optique) des souches de référence et des isolats des nodules de <i>Genista cinerea</i> en présence des différents glucides comme source de carbone. Les cercles blancs pleins indiquent les moyennes, alors que les cercles noirs sont aberrants</p>	80
<p>Figure 33 : Matrice de corrélation entre les niveaux de croissance des isolats et les souches de référence cultivées en présence de différents sucres. Les valeurs des tests de corrélation sont représentées par les coefficients de corrélation de Pearson (représentés par la couleur et l'intensité de l'ombrage dans les diagrammes circulaires et les carrés, les valeurs supérieures à la diagonale) et les valeurs P (au-dessus de la diagonale). Les dendrogrammes latéraux sont des graphiques de la classification hiérarchique agglomérative (AHC). Les rectangles au sein de la matrice indiquent des amas AHC d'isolats / souches de BNL</p>	81
<p>Figure 34 : Boîtes à moustaches représentant la croissance (densité optique) des souches de référence et des isolats des nodules de <i>Genista cinerea</i> en présence des différents acides aminés comme source d'Azote. Les cercles blancs pleins indiquent les moyennes, alors que les cercles noirs sont aberrants</p>	83
<p>Figure 35 : Matrice de corrélation entre les niveaux de croissance des isolats et les souches de référence cultivées en présence de différents sucres. Les valeurs des tests de corrélation sont représentées par les coefficients de corrélation de Pearson (représentés par la couleur et l'intensité de l'ombrage dans les diagrammes circulaires et les carrés, les valeurs supérieures à la diagonale) et les valeurs P (au-dessus de la diagonale). Les dendrogrammes latéraux sont des graphiques de la classification hiérarchique agglomérative (AHC). Les rectangles au sein de la matrice indiquent des amas AHC d'isolats / souches de BNL</p>	84

<p>Figure 36 : Scatterplot des scores partiels des facteurs montrant les centroïdes des isolats et les souches de référence regroupées sur la corrélation factorielle biplot 1-2 de l'analyse factorielle multiple (AMF) (graphique du haut). Chaque isolat est projeté dans MFA dimensions utilisant quatre vecteurs représentant les paramètres de croissance testés, à savoir le pH, le NaCl, les hydrates de carbone et les acides aminés "AA". Le graphique en bas à gauche est le graphique de corrélation des axes MFA partiels (F1, F2). Dendrogramme inférieur-droit indique la classification hiérarchique agglomérative (AHC) impliquant des données de croissance des BNL obtenues à partir de tous les tests de dépistage phénotypiques</p>	86
<p>Figure 37 : Arbre phylogénétique montre les relations entre les bactéries isolées et les souches apparentées basé sur la séquence 16S rRNA (Neighbor Joining). Les valeurs bootstrap en pourcentage basées sur 1000 ensembles de données ré-échantillonnés sont affichées aux nœuds; seules les valeurs supérieures à 50% sont données. La barre d'échelle indique une substitution de 0,02 nucléotide par position nucléotidique</p>	89

LISTE DES TABLEAUX

TITRES	PAGE
<p>Tableau 01: Les Légumineuses les plus étudiées et leurs différents symbiontes (Sawada <i>et al.</i>,2003).</p>	11
<p>Tableau 02 : Les souches de références et les isolats utilisés dans cette étude</p>	32
<p>Tableau 03 : Les solvants des antibiotiques utilisés (Somasegaran et Hoben ,1994)</p>	39
<p>Tableau 04: Activités enzymatiques et tests distinctifs des isolats et les souches de référence. +, croissance ou réaction positive; -, pas de croissance ou réaction négative. TDA, tryptophane désaminase.</p>	60
<p>Tableau 05 : Caractéristiques phénotypiques des rhizobia isolés et souches de référence</p>	64
<p>Tableau 06 : Concentrations minimales inhibitrice des antibiotiques et des métaux lourds de la croissance des rhizobia isolées.</p>	66
<p>Tableau 07 : Circonstance de croissance (+: présence, -: absence) dans différentes conditions thermiques des souches de référence et isolats de rhizobia isolés de <i>G. cinerea</i></p>	69
<p>Tableau 08 : Bactéries nodultrices isolées des racines de <i>G. cinerea</i> et résultats de comparaison (similitude en%) avec les séquences de gènes 16S rRNA des souches types (GenBank et du serveur Ez-Taxon)</p>	90

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1- Généralité sur la fixation de l'Azote	5
1-1- L'Azote	5
1-2- Cycle de l'azote	5
1-2-1- Minéralisation de l'azote organique	6
(i) Ammonification	6
(ii) Nitrification	7
(iii) Dénitrification	7
2- fixation biologique	8
2-1- Les fixateurs libres	8
2-2- Les fixateurs symbiotiques	8
2-2-1- Genre <i>Rhizobium</i>	9
2-2-2- Genre <i>Bradyrhizobium</i>	9
2-2-3- Genre <i>Azorhizobium</i>	9
2-2-4- Genre <i>Mesorhizobium</i>	9
2-2-5- Genre <i>Sinorhizobium</i>	10
2-3- Installation de la fixation symbiotique de l'azote	12
2-3-1- La symbiose	12
2-3-2- La symbiose (légumineuse – rhizobia)	12
2-4- La nitrogénase bactérienne	14
2-5- Le dialogue moléculaire	15
2-5-1- Les flavonoïdes	17
2-5-2- Facteur <i>nod</i>	17
2-5-3- Les gènes <i>Nod</i>	18
2-5-4- Les gènes <i>nif</i>	20
2-5-5- Les gènes <i>fix</i>	21
3- Infection et développement de nodule	21
(i) Infection	21
(ii) Formation de la nodosité	23
3-1- Différentes formes de nodules	24
4 - Taxonomie des <i>Rhizobium</i>	26
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1- Isolement des bactéries à partir des nodules	27
1-1- Sites de collecte des nodules et biologie des plantes hôtes	27
(i) <i>Argyrobium uniflorum</i> (Decne.) Jaub. & Spach	28
(ii) <i>Genista microcephala</i> Coss. & Durieu	29
(iii) <i>Genista cinerea</i>	29
1-2- Conservation des nodules	30
1-3- Isolement des souches bactériennes à partir des nodules	30
1-3-1- Stérilisation des nodules	30
1-3-2- Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés	31
2- Caractérisation phénotypique des isolats des légumineuses <i>Genista microcephala</i> et <i>Argyrobium uniflorum</i>	33
2-1- Caractères culturels	33
(i) Milieu liquide	33
(ii) Milieux solides	33

2-2- Observations des colonies et conservation des isolats	33
2-2-1 Examen microscopique par la coloration de Gram	33
2-2-2- Conservation des souches	33
2-3- Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	34
2-3-1- Test du 3-cétolactose	34
2-3-2- Précipitation du glycérophosphate de calcium	34
2-3-3- Croissance sur Litmus milk (Lait tournesolé)	34
2-4- Tests nutritionnels	35
2-4-1- Source de carbone	35
2-4-2- Source d'azote	35
2-4-3- Besoin en vitamines	35
2-5- Tests biochimiques (recherche des enzymes spécifiques)	36
2-5-1- Réduction des nitrates	36
2-5-2- Hydrolyse de l'urée	36
2-5-3- Activité pectinolytique	36
2-5-4- Activité cellulolytique	37
2-5-5- Désamination du tryptophane	37
2-5-6- Tryptophanase	37
2-6- Tests physiologique	38
2-6-1- Tolérance au NaCl	38
2-6-2- Température de croissance	38
2-6-3- Effet de pH	38
2-7- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques	38
2-7-1- Métaux lourds	38
2-7-2- Résistances aux antibiotiques	39
2-8- Méthode de la taxonomie numérique	39
2-9- Détermination du profil protéique par SDS-PAGE	40
2-9-1- Principe de séparation des protéines sur gels en système discontinu	40
2-9-2- Protocole	41
(i) Préparation des extraits protéiques	41
(ii) Préparation des solutions stocks (Solutions mères)	42
(iii) Préparation des gels	42
(iv) Préparation tampon de migration pH 8,3	43
2-9-3- Montage des plaques	43
2-9-4- Dépôts des échantillons protéiques et migration électrophorétique	43
2-9-5- Révélation des bandes protéiques	43
2-10- Authentification des isolats	44
2-10-1- Préparation des jarres de Léonard	44
2-10-2 - Stérilisation des graines	44
2-10-3- Inoculation des jarres	45
2-11- Analyse statistique	46
3- Caractérisation polyphasique des bactéries nodulant <i>G. cinerea</i>	47
3-1- Authentification des isolats	47
3-1-1- Désinfection et mise en germination des graines	47
3-1-2- Inoculation	47
3-2- Caractérisation phénotypique des isolats	48
3-2-1 Caractères culturels et morphologiques des isolats	48
3-2-2- Caractéristiques physiologiques des isolats	48
3-2-3- Assimilation des carbohydrates et utilisation des sources de Nitrogène	49
3-2-4- Analyse statistique	49
3-3- Caractérisation génotypique par 16S rRNA des bactéries associées au <i>G. cinerea</i>	50
3-3-1- Culture et Lyse de Colonies Bactériennes et Purification de l'ADN génomique total	50

(i) Lyse de la paroi cellulaire	50
(ii) Précipitation des protéines et récupération de l'ADN	50
3-3-2- Amplification de l'ADN 16S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	51
3-3-3- Séquençage Sanger des produits PCR du gène 16S rRNA	52
Chapitre III : Résultats et discussion	
1- Caractérisation phénotypique des isolats des légumineuses <i>Genista microcephala</i> et <i>A. uniflorum</i>	53
1-1- Caractères culturels	53
1-2- Caractérisation phénotypiques des bactéries	55
1-2-1- Tests distinctifs entre <i>Rhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>	55
(i) Test du 3-cétolactose	55
(ii) Précipitation du glycérophosphate de calcium	55
(iii) Croissance sur Litmus milk (Lait tournesolé)	55
1-3- Tests biochimique (tableau 04)	57
1-3-1- Réduction des nitrates	57
1-3-2- Hydrolyse de l'urée	57
1-3-3- Activité pectinolytique	57
1-3-4- Activité Cellulolytique	58
1-3-5- Tryptophane désaminase	58
1-3-6- Tryptophanase	58
1-4- Tests physiologiques	61
1-4-1- Tolérance au NaCl	61
1-4-2- Température de croissance	61
1-4-3- Effet de pH	62
1-5- Tests nutritionnels	62
1-5-1- Source de carbone	62
1-5-2- Source d'azote	63
1-5-3- Besoin en vitamines	63
1-6- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques	65
1-6-1- Résistance aux métaux lourds	65
1-6-2- Résistance aux antibiotiques	65
1-7- Analyse numérique des caractères phénotypiques	67
1-8- Analyse des profils protéiques	67
2- Polyphasique caractérisation des bactéries nodulant <i>G. cinerea</i>	69
2-1- Tests physiologiques	69
2-1-1- Température de croissance maximale	69
2-1-2- Croissance dans différentes conditions de pH	70
2-1-3- Tolérance au sel	74
2-2- Tests nutritionnels	78
2-2-1- Assimilation des carbohydrates	78
2-2-2- Source d'Azote	82
2-3- Analyse multifactorielle des isolats et des souches de références	85
2-4- Caractérisation génotypique par 16S rRNA des bactéries associées au <i>G. cinerea</i>	87
Conclusion	91
Chapitre IV : Références bibliographiques	94
Annexes	107

Introduction

La rareté de l'eau caractérisant les environnements arides et semi-arides tout au long de l'année, les formes de vie, y compris les populations microbiennes, sont sélectionnées pour résister aux conditions stressantes (Zahran, 2017). Ces processus de sélection agissent à la fois sur la communauté et les populations, rendant les populations moins abondantes mais phylogénétiquement diverses, et forçant les populations à exprimer des caractéristiques leur permettant de faire face à des conditions défavorables telles que la chaleur et la sécheresse (Taketani *et al.*, 2017). À l'échelle mondiale, environ 60% des 150-190 millions de tonnes d'azote fixées par an sont produites par des organismes vivants. Ce processus est connu sous le nom de fixation biologique de l'azote (Hopkins, 2003). Les bactéries des nodosités des racines sont des micro-organismes du sol qui établissent une symbiose fixatrice d'azote avec divers arbres et plantes herbacées à croissance naturelle dans les terres cultivées et non cultivées. La plupart de ces plantes hôtes sont des légumineuses de la famille des légumineuses *Fabaceae* (alt. Leguminosae) originaire des régions arides et semi-arides (Vandamme *et al.*, 2002, Azani *et al.*, 2017).

Grâce à leur capacité à établir des symbioses rhizobienne et mycorhiziennes, les légumineuses fixant l'azote sont des éléments clés dans la succession naturelle des écosystèmes arides ou semi-arides, car ils constituent une source fondamentale d'entrée de l'azote dans la rhizosphère (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 2004; Pant et Pant, 2017). Par rapport aux hétérotrophes fixant l'azote et des bactéries associées, les symbioses rhizobium-légumineuse représentent le principal mécanisme de fixation biologique de l'azote dans différents biotopes, y compris les déserts chauds-arides (Zahran, 2017). Dans les symbioses légumineuses-rhizobium, des bactéries spécialisées du sol fixent l'azote atmosphérique dans les tissus des racines des plantes en échange de l'obtention de carbone de la plante hôte. Cependant, des souches bactériennes symbiotiques inefficaces peuvent apparaître, forçant ainsi la plante hôte à discriminer entre les microsymbiontes en sélectionnant le partenaire le plus efficace. Dans le processus de choix des partenaires, les légumineuses peuvent empêcher complètement les souches inefficaces d'établir une symbiose, ou de fournir moins de ressources nutritionnelles et sanctionnant ainsi des souches moins efficaces (Westhoek *et al.*, 2017). Les facteurs Nod (NFs), précédemment considérés comme absolument essentiels pour cette symbiose, se sont avérés être dispensables dans des conditions particulières. De même, le récepteur NF, précédemment considéré comme uniquement impliqué dans la symbiose, est déclenché lors d'infections par des phytopathogènes. En effet, on comprend de plus en plus que l'immunité innée de la plante est un élément crucial dans l'établissement et le maintien de la symbiose (Gourion *et al.*, 2015).

Les rhizobiums ou bactéries qui nodulent les légumineuses (BNL) ou les bactéries du nodule racinaire (BNR) sont définies comme des bactéries fixatrices d'azote qui forment des nodules sur les plantes légumineuses. Des études de séquençage génomique Rhizobia ont révélé de nouveaux taxons, qui ont provoqué de profonds changements dans la taxonomie de ces bactéries. Les Rhizobia sont actuellement constitués de plus de 128 espèces connues appartenant à 13 genres, établissant une symbiose avec les plantes cultivées (légumineuses fourragères et à grains) et les plantes sauvages (Velázquez *et al.*, 2017). Les symbiotes bactériens prédominent pour la plupart des espèces de légumineuses dans divers habitats à travers le monde et appartiennent principalement à la classe des protéobactéries qui comprend les genres *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Methylobacterium* (Weir, 2006) et deuxièmement aux γ -protéobactéries, bien que leur capacité de nodulation n'ait pas été clairement démontrée (Benhizia *et al.*, 2004). Rhizobium (rhizobia au pluriel) peut être utilisé comme un nom commun pour les bactéries de nodulation des légumineuses ou de fixation de l'azote indépendamment du genre impliqué dans la symbiose. Cependant, la nomenclature de l'alpha-rhizobia et de la bêta-rhizobia est utilisée pour distinguer les rhizobiums associés aux alpha-protéobactéries des bêta-protéobactéries, respectivement (de Lajudie et Martinez-Romero, 2017).

La plupart des études taxonomiques des rhizobiums se sont concentrées sur les symbiotes des légumineuses cultivées d'importance agricole (de Lajudie et Martinez-Romero, 2017), mais des études récentes dans ce domaine de recherche ont étudié la diversité des bactéries en tant que plantes écologiquement importantes (Gnat *et al.*, 2014), en particulier dans les régions arides (Taketani *et al.*, 2017). Shamseldin *et al.* (2016), décrit environ 238 espèces de BNL réparties sur 18 genres. Cependant, le sujet n'est pas terminé et d'autres études sont nécessaires pour étudier les espèces végétales négligées dans les régions reculées du monde et / ou se développer dans des conditions arides telles que les déserts, y compris les zones arides d'Afrique du Nord. Ceci est dû en grande partie à notre manque de compréhension des interactions légumineuses-rhizobium (Janczarek *et al.*, 2015). Par exemple, la description des espèces de rhizobiums ci-dessus ne représente qu'environ 23% des légumineuses, et il a été estimé qu'il y a environ 19 000 espèces de légumineuses. Espérons que la découverte et la désignation de nouvelles espèces de bactéries qui nodulent les légumineuses comestibles peuvent contribuer à améliorer la productivité et le rendement des cultures (Polhill, 1981), en particulier dans les pays en développement qui souffrent de mauvaises conditions environnementales (Shamseldin *et al.* 2016).

Les grandes variations climatiques Nord-Sud dans les régions nord-africaines donnent lieu à des formes de végétation très diverses qui présentent une richesse extraordinaire avec plus de 500 espèces végétales pastorales endémiques (Quézel et Santa, 1962, Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 2004).

En Algérie, les espèces végétales des systèmes pastoraux et fourragers sont remarquablement diversifiées avec un fort endémisme chez les Fabacées et les Poacées (Kazi Tani et al., 2009). Les légumineuses sauvages sont d'importantes plantes fourragères et / ou de pâturage qui jouent un rôle fondamental dans le processus de restauration de l'équilibre écologique de leur environnement (Pant et Pant, 2017). La tribu Genisteae (famille Fabaceae) contient environ 140 espèces végétales arbustives (Duran, 2003), principalement distribuées La région méditerranéenne. *Genista microcephala* (Coss. & Durieu) et *Argyrobium uniflorum* ((Decne.) Jaub. & Spach) sont endémiques arbustes d'Afrique du Nord. Ils sont communs dans l'est de l'Algérie (Maire, 1987) et coloniser les forêts, les collines rocheuses et les basses montagnes. Les deux légumineuses sauvages jouent un rôle important dans la production de plantes fourragères et / ou de pâturages un rôle fondamental dans le processus de restauration de l'équilibre de leur environnement.

Les ressources biologiques des régions arides chaudes sont peu connues et parfois complètement inexploitées (Bradai *et al.*, 2015; Laalam *et al.*, 2015), Des bactéries endosymbiotiques de *G. microcephala* et *A. uniflorum* poussant dans une zone aride de Tunisie ont été décrites Zakhia et al., 2004 ; Mahdhi *et al.*,2008). Cependant, aucune donnée sur les bactéries capables de noduler *G. microcephala* et *A. uniflorum* d'Algérie n'est disponible. Les souches de rhizobia isolées de ces plantes sont associées à différentes espèces de rhizobiums, principalement des genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* *Phyllobacterium* et *Ensifer* (Zakhia *et al.*, 2004 ; Mahdhi *et al.*,2008). Considérant le rôle écologique majeur de *G. microcephala* et *A. uniflorum* dans les zones arides Algériennes, le présent travail visait à caractériser les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en utilisant la taxonomie numérique des caractéristiques phénotypiques telles que le profil protéique et les résistances aux métaux lourds.

Conjointement à cette étude phénotypique une caractérisation polyphasique des isolats associés aux racines de la légumineuse spontanée *Genista cinerea* est entreprise. Le genêt cendré (*G. cinerea* (Vill.) DC., 1805) est un arbuste endémique pérenne des régions semi-arides du bassin méditerranéen. Situé dans l'est de l'Algérie (Maire, 1987) et colonise principalement les forêts, les collines rocheuses et les basses montagnes (Quézel et Santa, 1962).

Cette étude pionnière dans la caractérisation des rhizobia nodulant *G. cinerea* pour la première fois tout au long de son aire de répartition. Cette recherche vise à (i) mettre en évidence la capacité d'infectivité des isolats à noduler la plante hôte (*G. cinerea*), (ii) caractériser phénotypiquement des dizaines d'isolats en utilisant des tests physiologiques et des expériences nutritionnelles, (iii) comparer les taux de croissance de ces isolats (iv) estimer la diversité de BNL en étudiant le lien entre les isolats d'étude et les souches de référence en utilisant des méthodes de regroupement basées sur la croissance de bactéries dans différentes conditions de culture, ce qui devrait éclaircir et comprendre la niche écologique des isolats.

Il est important d'identifier les organismes au niveau de la souche. Les effets bénéfiques des milieux des cultures dépendent souvent de la souche. Le typage conventionnel, tel que les études sérologiques, la sensibilité aux phages ou la résistance aux antibiotiques ont le désavantage de reposer sur des phénotypes et de ne pas être exprimés de manière stable. La même chose vaut pour les plasmides qui sont également instables ou peuvent même être transférés à d'autres souches. Il serait au moins aussi rapide, facile, et convaincant d'utiliser la réaction de polymérisation en chaîne et le séquençage de l'ADN pour déterminer une partie de la séquence du gène de 16S rRNA des souches avec une bonne caractérisation phénotypique. (Liebl *et al.*, 1991, Young, 1992), à la lumière de ces recommandations bibliographique un séquençage du gène 16S rDNA était réalisé pour dix isolats associés au nodules de *G. cinerea*.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

1. Généralité sur la fixation de l'Azote

1.1. L'Azote

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la Croissance des plantes. Ce nom est paradoxal, d'ailleurs: il vient du préfixe «a-» Privatif et du radical grec «ζ ω τ » (zoot) vivant –alors que l'azote est nécessaire à la vie (Pujic, 2009).

La vie sur terre influence profondément la composition de l'atmosphère en produisant du dioxyde de carbone CO₂ et du méthane CH₄ à travers les processus de la respiration et de la fermentation reliés au recyclage du carbone. La vie a aussi influencé la composition de l'atmosphère à travers le recyclage d'un autre élément, l'azote (N) (Newton, 1998).

L'élément azote (N) est un constituant essentiel du protoplasme. Tous les organismes vivants ont besoin de cet élément pour synthétiser les protéines et les acides aminés (Tortora *et al.*, 2003). C'est aussi un des composants des quatre bases (adénine, thymine, guanine, cytosine) impliquées dans la constitution des nucléotides, unités de l'ADN et de l'ARN (Meyer *et al.*, 2005), présent dans de nombreuses enzymes et dans le noyau tétra-pyrrolique des chlorophylles (Tourte *et al.*, 2005).

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, favorisant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Stenvenson, 1986). Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse (Lamaze et col., 1990). Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO₃⁻) et d'ammonium (NH₄⁺). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Hageman, 1984).

La première source d'azote utilisée par les plantes est l'azote du sol. En absence de tout apport d'engrais les plantes non fixatrices d'azote utilisent l'azote du sol durant leur cycle Physiologique. Même les plantes fixatrices d'azote atmosphérique utilisent d'abord l'azote de la semence et du sol durant la première phase de la croissance. L'azote du sol est essentiellement sous forme organique. C'est par minéralisation que la matière organique du Sol libère l'azote utilisable par les plantes (Newton, 1998).

1.2. Cycle de l'azote

La plus grande partie de l'azote de la biosphère (78%) se trouve dans l'atmosphère. La fixation d'azote est le principal moyen naturel par lequel l'azote atmosphérique est ajouté au sol. (Haynes, 1984; Foth, 1990).

Mais seul un nombre réduit des genres bactériens vivant librement ou en symbiose avec les plantes sont capables de réduire l'azote moléculaire de l'atmosphère. Par la symbiose entre les bactéries réductrices de l'azote atmosphérique, une grande partie des légumineuses.

A l'échelle mondiale, la fixation biologique annuelle de l'azote est estimée au double de l'utilisation mondiale des engrais. Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible. (Newton, 1998).

1.2.1. Minéralisation de l'azote organique

Après fixation, l'azote moléculaire aboutit à la formation de substances azotées organiques qui, une fois au sol, subissent la minéralisation. La minéralisation est la réaction biologique conduisant à la formation de l'azote minérale (Nitrique et Ammoniacal) à partir de l'azote organique. Cette renaissance de l'azote minéral se produit en trois étapes : l'ammonification, l'oxydation de l'ammonium et l'oxydation du nitrite ; les deux dernières étapes sont combinées dans ce qu'on appelle la nitrification (Jared, 2010).

(i). Ammonification

L'ammonification (figure 01) est la transformation de l'azote organique en ammonium (NH_4^+) sous l'action de micro-organisme hétérotrophe qui utilise des substrats carbonés comme source d'énergie (Vale, 2006). Car elles n'ont pas la capacité d'oxyder le NO_2^- nitrite en NO_3^- (nitrate). Cette forme est transitoire

et sera transformé ensuite en azote nitrique, vu la diversité des micro-organismes ammonifiantes, l'ammonification est un processus sans exigence écologique particulière, car quelles que soient les conditions de l'environnement, il se trouve toujours dans les sols des espèces microbiennes ammonifiantes adaptées à ces conditions, sauf bien sûr s'il s'agit de conditions incompatibles avec la vie (Jared, 2010).

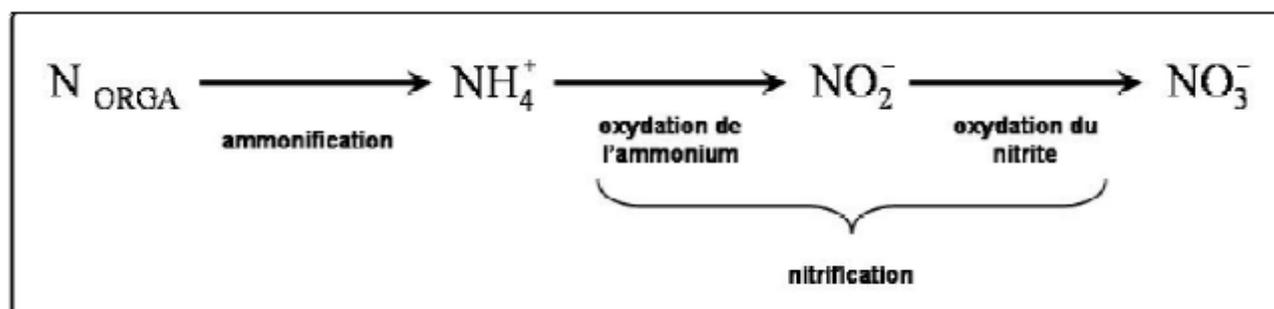


Figure 01 : Processus de minéralisation de l'azote (Jared, 2010)

(ii). Nitrification

La nitrification, soit l'oxydation de NH_3 en NO_3 (figure 01) est couramment réalisée dans les sols bien drainés, à pH neutre, suite à l'activité des bactéries nitrifiantes (Madigan *et al.*, 2007). La première étape de la formation du nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite NO_2 par des bactéries appartenant aux genres *Nitrosomonas* ou *Nitrococcus*. Le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter* (Hopkins, 2003).

(iii). Dénitrification

La dénitrification est un processus microbien de respiration alternatif (figure 02) (anaérobie), au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux (N_2) et l'oxyde d'azote (N_2O), qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al.*, 2007). C'est la principale voie de formation biologique de l'azote. De nombreux microorganismes sont responsables de ce processus tel que *Bacillus*, *Pracoccus*, *Pseudomonas*. (Madigan *et al.*, 2007).

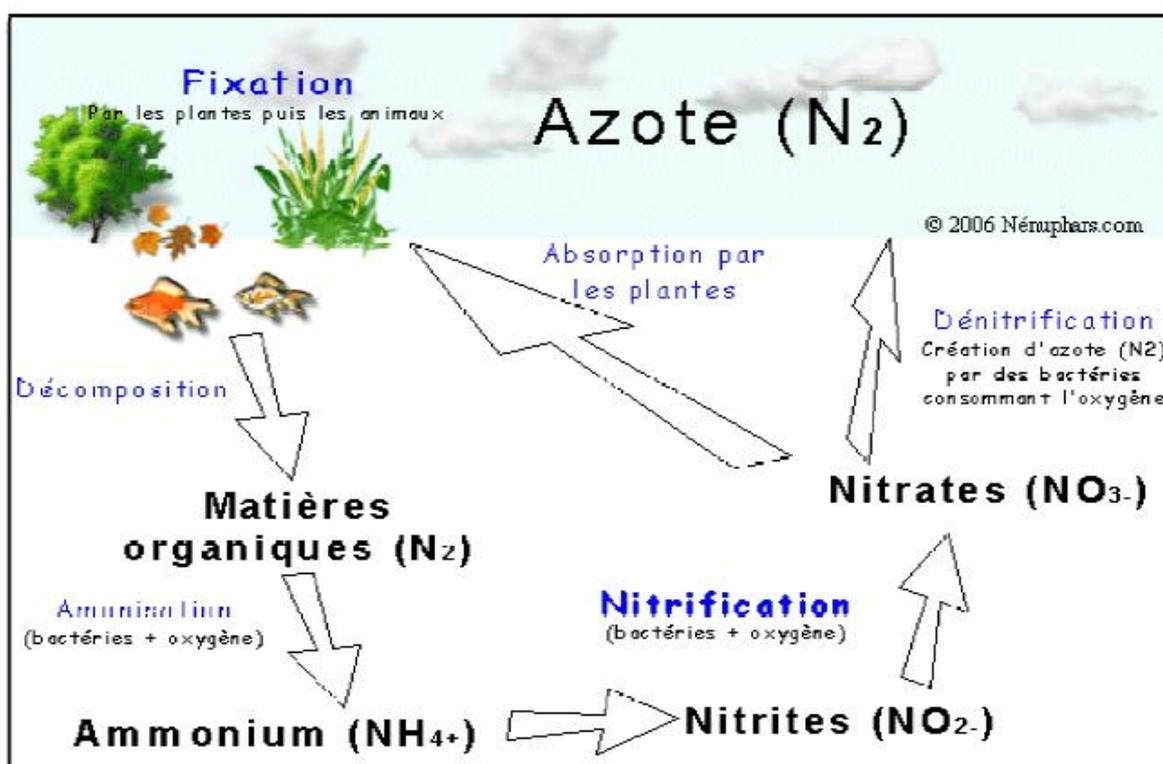


Figure 02 : Cycle de l'azote (Raven *et al.*, 2007)

2. fixation biologique

D'après Nielsen *et al.* (1978) La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains micro-organismes utilisent l'azote de l'air pour leurs synthèses protéique, en le réduisant en ammoniac grâce à une enzyme la nitrogénase. Les microorganismes fixateurs d' azote sont des bactéries et des cyanobactéries, qui vivent soit à l'état libre dans le sol, éventuellement en association avec un végétal, soit en symbiose avec un végétal. L'énergie nécessaire est d'origine solaire (captée par la photosynthèse donc renouvelable et distribuée sur l'ensemble de la surface terrestre), et provient :

- Des carbohydrates du sol quand les micro-organismes vivent à l'état libre.
- Des exsudats racinaires en cas de vie associative dans la rhizosphère d'un végétal.
- Directement des photosynthétats de la plante-hôte quand il ya symbiose

2.1. Les fixateurs libres

Les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophe (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *diazotrophicus*), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*) (Sebihi, 2008).

La majorité des bactéries libres fixatrices d' azote sont capables de fixer des grandes quantités de cet élément en laboratoire. Toutefois, dans le sol la réduction de l' azote en ammoniac est limitée par la quantité de glucide disponible. Le rôle de ces bactéries dans la fixation biologique de l' azote dans les prairies, les forêts et la toundra arctique est néanmoins considérable (Tortora *et al.*, 2003).

2.2. Les fixateurs symbiotiques

Les espèces fixatrices d'azote réellement symbiotique sont nettement moins nombreuses que les fixatrices libres. On y rencontre essentiellement les rhizobiums des actinomycètes (*Frankia*) bactérie filamenteuse (Hopkins, 1999), et des cyanobactéries (Pelmont, 1995).

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent les associations bien connues entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses. Quelques unes de ces associations (tableau 01). Dans les associations symbiotiques, la plante représente l' hôte et le partenaire bactérien le symbiote. La forme la plus commune d' association symbiotique que provoque la formation sur la plante hôte, de structures multicellulaires hypertrophiées, nommées nodules (Hopkins, 1999).

La symbiote est une bactérie Les rhizobiums sont subdivisés en espèces et en sous espèces nommées biovars d'après l'espèce hôte (tableau 01). La plupart des rhizobiums appartenant à l'un des genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ou *Azorhizobium*. *Mesorhizobium* curieusement on ne connaît qu'un seul genre n'appartenant pas aux légumineuses : *Parasponia* (famille des *Ulmaceae*), qui forme des nodules avec un symbiote du genre rhizobium. (Hopkins, 1999).

2.2.1. Genre *Rhizobium*

ne forment de nodules qu'avec un petit nombre de plantes hôtes. (Hopkins, 1999). C'est une bactérie non sporulée et sa survie dans l'inoculum est donc difficile. Par contre, elle se développe bien dans le sol et est donc en général présente dans les terres cultivées. (Blondeau, 1981).

2.2.2. Genre *Bradyrhizobium*

Ce genre ne comprenait qu'une seule espèce définie : *Bradyrhizobium japonicum*. Les bactéries du genre *Bradyrhizobium* sont au même titre que les rhizobia, capables d'induire sur les racines des plantes de la famille des légumineuses la formation d'organe particulier, les nodules, dans lesquels elles fixent l'azote atmosphérique en symbiose avec la plante. Ces symbioses jouent un rôle clé dans le cycle biologique de l'azote ; l'agriculture et la restauration des sols dégradés. (Nkot *et al.*, 2008).

2.2.3. Genre *Azorhizobium*

Comprend une seule espèce définit *Azorhizobium caulinodans*, c'est cette bactérie qui une fois isolé de la nature est très utile pour fournir l'Azote nécessaire à la plante. Elle agit associée à la racine de la plante au niveau de la rhizosphère, à la surface des racines, dans l'espace intercellulaire des tissus de la tige et dans la racine de la plante. Cette bactérie est capable de fixer 200-300 kg d'azote par hectare étant logée à l'intérieur de la tige de sa plante hôte (*sesbania rostrata*). (Wade, 1998).

L'*Azorhizobium caulinodans*, produit des phytohormones telles que l'acide indole acétique (AIA) et la gibbérelline pour la croissance de la plante. Ces hormones favorisent la prolifération des racines, ce qui a pour résultat l'augmentation du volume de la racine et de la quantité des poils absorbants par conséquent l'augmentation de la capacité d'absorption d'eau de la plante. Les autres facteurs de croissance tels que l'auxine, les cytokinines, le Riboflavine et les vitamines requis par la plante sont produits par cette bactérie et qui a un impact significatif sur l'amélioration de la croissance et de la production de la plante. (Wade, 1998).

2.2.4. Genre *Mesorhizobium*

Ce groupe se distingue des autres rhizobiums par une flagellation polaire ou subpolaire par des souches à croissance intermédiaire entre celles à croissance rapide et celles à croissance lente et par la séquence de l'ADNr 16S. Plusieurs espèces ont été proposées: *Mesorhizobium loti* a été isolée d'une large gamme d'hôtes (Jarvis *et al.*, 1982), *Lotus*, *Lupinus*, *Anthyllis*, *Astragalus*, *Caragena*, *Ononis*, *Genista*, *Cicer*, *Leucaena* et *Ornithopus* (Sahgal et Johri, 2003).

2.2.5. Genre *Sinorhizobium*

Sinorhizobium meliloti isolée de *Melilotus* et caractérisée initialement par Dangeard (1926) a été la première espèce reconnue de ce groupe sous le nom de *R. meliloti* (Skerman *et al.*, 1980 ; Jordan, 1984). D' autres recherches ont indiquées l' isolement de souches à croissance rapide à partir des nodosités de *Glycine max* (Keyser *et al.*, 1982) et de différentes autres légumineuses (Trinick, 1980). Ces souches ont été incluses dans le genre *Rhizobium* sous le nom de *R. fredii* (Scholla et Elkan, 1984) puis elles ont été reclassées au sein de genre *Sinorhizobium* en tant que *Sinorhizobium fredii* (Chen *et al.*, 1988).

Tableau 01: Les Légumineuses les plus étudiées et leurs différents symbiontes (Sawada *et al.*, 2003).

Groupe monophylogénétique	Nom actuel	Ancien nom	Plantes hôtes associées	
1	Genre <i>Rhizobium</i>			
	<i>R. etli</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> type I	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	bv <i>phaseoli</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>R. gallicum</i>		<i>Phaseolus</i> spp.	
	bv <i>gallicum</i>		<i>Phaseolus</i> spp.	
	bv <i>phaseoli</i>		<i>Phaseolus</i> spp.	
	<i>R. giardinii</i>		<i>Phaseolus</i> spp.	
	bv <i>giardinii</i>		<i>Phaseolus</i> spp.	
	bv <i>phaseoli</i>		<i>Phaseolus</i> spp.	
	<i>R. hainanense</i>		<i>Arachis hypogaea</i>	
	<i>R. huautlense</i>		<i>Sesbania rostrata</i>	
	<i>R. leguminosarum</i>			
	bv <i>trifolii</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.	
	bv <i>phaseoli</i>	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
bv <i>viceae</i>		<i>Lens</i> spp, <i>Pisum</i> spp, <i>Vicia</i> spp		
<i>R. mongolense</i>		<i>Medicago ruthenica</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>		
<i>R. tropici</i>	<i>R. phaseoli</i> , <i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> type II			
Type A		<i>Phaseolus vulgaris</i>		
Type B		<i>Phaseolus vulgaris</i>		
	Genre <i>Allorhizobium</i>			
	<i>A. undicola</i>		<i>Medicago sativa</i> , <i>Lotus arabicus</i>	
2	Genre <i>Sinorhizobium</i>			
	<i>S. fredii</i>	<i>R. fredii</i>	<i>Glycine max</i> cv Peking, <i>Glycine soja</i> , <i>Medicago sativa</i>	
	<i>S. medicae</i>	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago orbicularis</i> , <i>M. polymorpha</i> , <i>M. rugosa</i> , <i>M. truncatula</i>	
	<i>S. meliloti</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i> spp., <i>Melilotus</i> spp.	
	<i>S. saheli</i>		<i>S. rostrata</i>	
	<i>S. terangae</i>		<i>S. rostrata</i>	
	bv <i>sesbaniae</i>		<i>S. rostrata</i>	
	<i>S. xinjiangense</i>		<i>Glycine max</i>	
		Genre <i>Ensifer</i>		
	<i>E. adharens</i>		<i>Medicago sativa</i>	
3	Genre <i>Mesorhizobium</i>			
	<i>M. loti</i>	<i>R. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i> , <i>L. japonicus</i> , <i>L. tenuis</i> , <i>L. kryvolii</i> , <i>L. filicalius</i> , <i>L. schoelleri</i>	
	<i>M. tianshanense</i>	<i>R. tianshanense</i>	<i>Glycine max</i>	
4	Genre <i>Bradyrhizobium</i>			
	<i>B. elkanii</i>	<i>B. japonicum</i> DNA homologie groupe II	<i>Glycine</i> spp	
	<i>B. japonicum</i> <i>B. liaoningense</i>	<i>R. japonicum</i>	<i>Glycine</i> spp <i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i>	
6	Genre <i>Azorhizobium</i>			
<i>A. caulinodans</i>		<i>Sesbania rostrata</i>		
9	Genre <i>Ralstonia</i>			
<i>R. taiwanensis</i>		<i>Mimosa pudica</i>		

2.3. Installation de la fixation symbiotique de l'azote

2.3.1. La symbiose

La symbiose est souvent une relation régulière et obligatoire entre des partenaires bien spécifiques (Broughton, 2000), elle permet à deux espèces différentes de vivre ensemble, chacun tirant profit de l'autre.

Il ya deux types de la symbiose Endo- et Ecto selon la position relative des partenaires, on parlera d'endo- ou ecto- symbiose. Si le symbiote se trouve à l'extérieur de l'hôte, on parle d'ectosymbiose et l'endosymbiose peut être intra- extra cellulaire (Broughton, 2000).

2.3.2. La symbiose (légumineuse – rhizobia)

Les Légumineuses ou *Fabaceae* représentent une famille importante et variée des angiospermes (Tableau 01). En effet, il s'agit de la troisième plus grande famille chez les plantes supérieures avec plus de 720 genres et 20000 espèces allant de la luzerne, espèce herbacée, aux arbres composant les forêts tropicales d'Amérique Latine et d'Afrique tropicale (Cronk *et al.*, 2006).

La nodulation des légumineuses (figure 03) est un phénomène très fréquent. Cependant certaines espèces ne peuvent être contaminées par des rhizobiums et ne fixent pas l'azote. Les observations ont montré que 90% des *Papilionacées* étaient nodulées, 90% des *Mimosacées*, mais seulement 30% des *Césalpinacées*. Ceci montre que la fixation de l'azote est un phénomène fréquent, mais non obligatoire, de la nutrition des plantes de cette famille. (Cronk *et al.*, 2006).

En effet, les légumineuses peuvent en général s'alimenter en azote par deux voies :

- **Assimiler l'azote du sol** : l'absorption des nitrates (engrais ou matière organique nitrifiée) se fait par les racines. Ces nitrates sont réduits par la nitrate réductase, enzyme essentiellement située dans les feuilles, pour donner de l'ammoniac qui participe ensuite à la formation des acides aminés et des protéines. Toutes les légumineuses possèdent cette enzyme. (Henzell et Wallis, 1977).
- **Fixer l'azote de l'air** : l'azote de l'atmosphère pénètre par le sol jusqu'aux nodosités où il est réduit en ammoniac par la nitrogénase des bactéroïdes de rhizobium. Cet ammoniac est ensuite incorporé à des chaînes carbonées pour donner des acides aminés et protéines comme dans le cas précédent. Seules les légumineuses portant des nodosités fixatrices. (Henzell et Wallis, 1977).

Bien que la symbiose Légumineuse-Rhizobium, soit une interaction hautement adaptée et régulée, il ne s'agit pas d'une interaction obligatoire ou permanente. En effet, les deux partenaires peuvent vivre indépendamment et de manière autonome et chaque nouvelle génération de plante doit être infectée par de nouvelles bactéries. Il est cependant intéressant de noter que seules les bactéries différenciées (bactéroïdes) fixent l'azote ; en culture libre, les bactéries n'expriment pas la nitrogénase (Kneip *et al.*, 2007).

L'interaction Rhizobium / Légumineuse est caractérisée par la spécificité avec laquelle, elle s'établit. En général, chaque Légumineuse ne peut être infectée que par un nombre restreint de souches de rhizobia et réciproquement, chaque souche de rhizobia ne peut infecter qu'un nombre limité de genres de Légumineuses. (Kneip *et al.*, 2007).

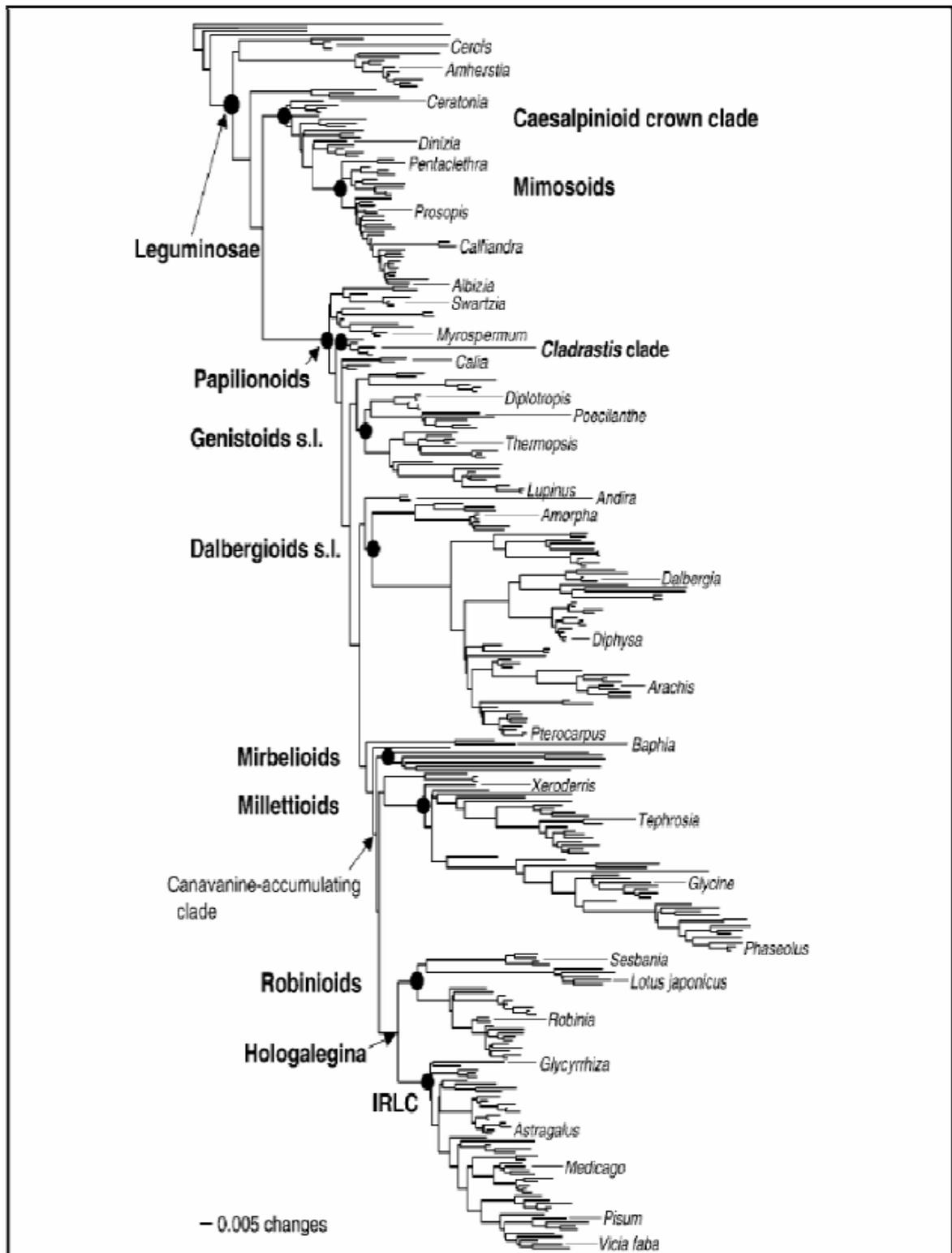
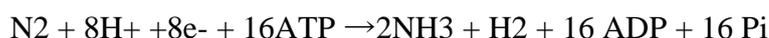


Figure 03 : Classification des Légumineuses (Vernie, 2008)

2.4. La nitrogénase bactérienne

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé complexe nitrogénase (Rees et Howard, 2000). Cette enzyme a été mise en évidence uniquement chez des procaryotes. Le complexe nitrogénase (figure 04) est très conservé chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure. Il est constitué de deux métalloprotéines : le site de la réduction du substrat est la protéine MoFe (composant I ou dinitrogénase) et le donneur d'électrons est la protéine Fe (composant II ou dinitrogénase réductase). Le composant I est un hétérotétramère de type $\alpha 2 \beta 2$ codé par les gènes *nif D* et *nif K* et le composant II est un homodimère codé par le gène *nif H* (Rees et Howard, 2000 ; Rangaraj *et al.*, 2001). La régulation de l'expression de la nitrogénase est complexe ; elle fait intervenir au niveau transcriptionnel d'autres gènes *nif* de l'opéron (*nif A* et *nif L* notamment) et au niveau post-traductionnel un système d'ADP ribosylation (répression de l'enzyme par NH_4^+ et l'obscurité). Le complexe nitrogénase est extrêmement labile en présence de dioxygène (Halbleib et Ludden, 2000).

La réaction catalysée par cette enzyme est la suivante :



Les nitrogénases sont dénaturées irréversiblement par l'oxygène. Dans les nodules des légumineuses, l'apport d'oxygène est régulé en grande partie par une protéine qui lie l'oxygène, la leghémoglobine (Davet, 1996 ; Werner, 1992 ; Torche, 2014). Un dispositif intéressant de la fixation de l'azote qui distingue les bactéries de nodule des diazotrophes vivants libres, est le fait que l'ammoniac fixé est immédiatement excrétée sans une autre assimilation par la bactérie. Cette ammoniac est alors assimilée dans le cytoplasme de la cellule de la plante hôte par l'action combinée de deux enzymes, la glutamine synthétase (GS) et la glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) (Brewin *et al.*, 1992 ; Torche, 2014).



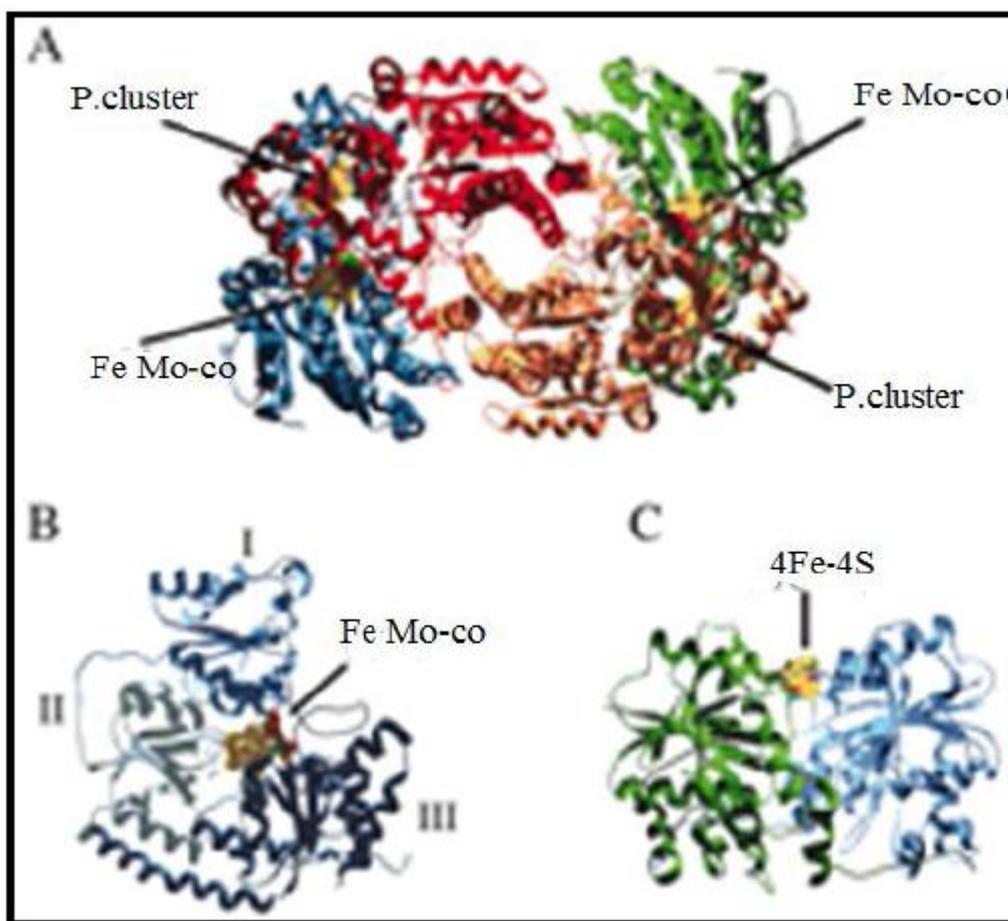


Figure 04 : la structure de nitrogénase (Rubio et Ludden, 2008).

Le complexe nitrogénase est constituée de deux composants : le composant I est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités représentées en bleu et vert et deux sous-unités représentées en rouge et orange (A), le détail de la sous-unité, est donné (B) et le composant II est un homodimère (C).

2.5. Le dialogue moléculaire

Les interactions symbiotiques sont contrôlées par des échanges de signaux entre les deux partenaires (figure 05). Les récents progrès dans la connaissance des mécanismes aboutissant à l'infection et à la formation d'un nodule ont montré qu'un dialogue moléculaire était à l'origine de la reconnaissance entre la bactérie et sa plante hôte. Les racines de la plante excrètent dans la rhizosphère des composés phénoliques généralement de type flavonoïdes, agissant comme inducteurs des gènes *nod* bactériens impliqués dans la nodulation, par l'intermédiaire de protéines régulatrices *nod D* qui sont des activateurs transcriptionnels de ces gènes (Peters et Verma, 1990; Fischer *et al.*, 1993).

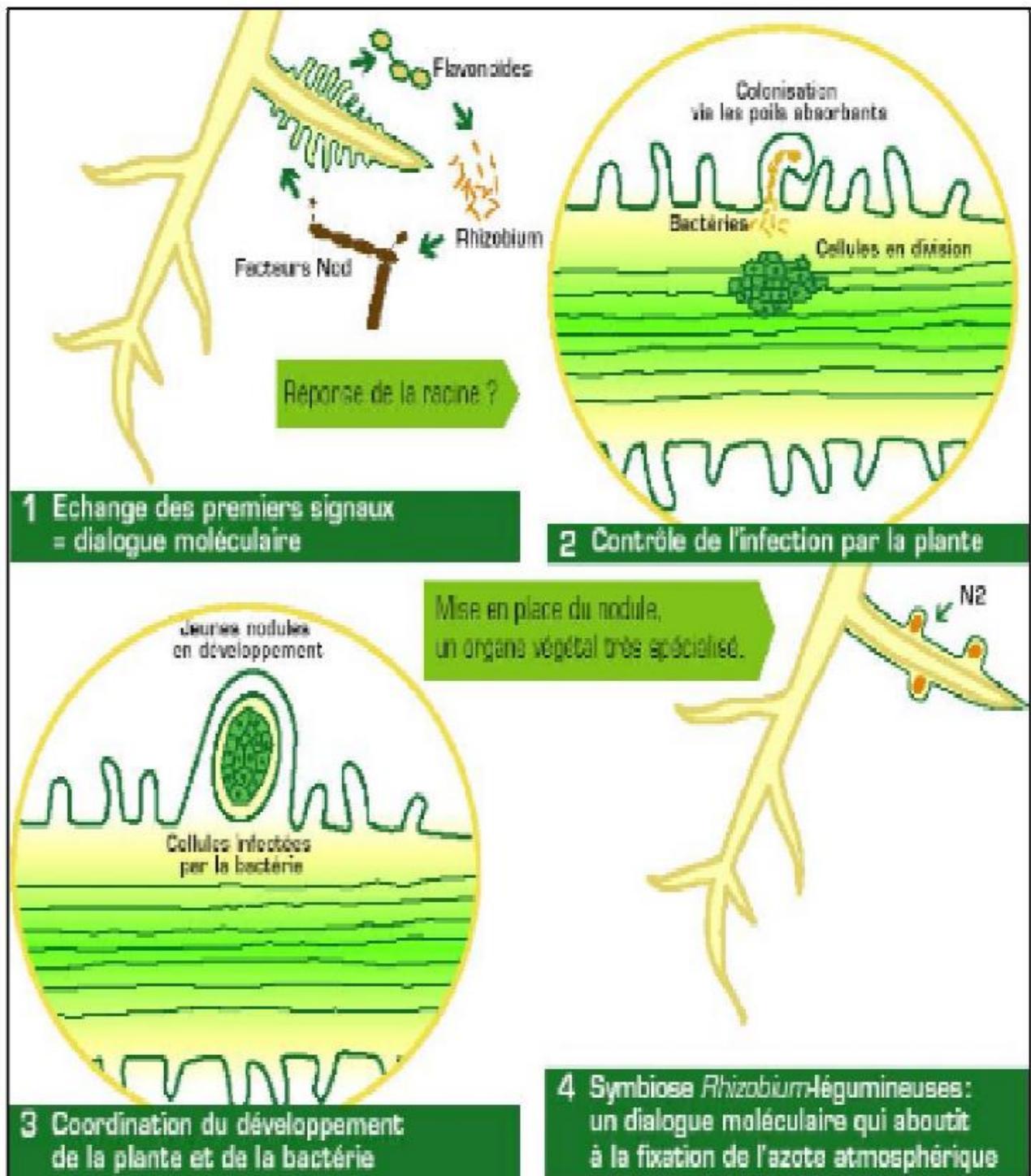


Figure 05 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2001).

2.5.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés principalement excrétés au niveau des pointes racinaires. Ils constituent les premiers signaux échanges entre la plante et la bactérie. Chaque plante produit une mixture de flavonoïdes qui peut varier selon son état physiologique. Ce sont des dérivés du 2-phenyl-1,4-benzopyrone avec une structure définie par deux anneaux aromatiques et un cycle propane ou pyrène. Selon les modifications de cette structure, plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés chez les plantes, parmi lesquels les isoflavonoïdes sont spécifiques des Légumineuses (Brencic et Winans, 2005). Certains de ces flavonoïdes ont la capacité d'induire les gènes *nod* des bactéries requis pour la nodulation. Ces capacités varient selon les flavonoïdes et selon les rhizobia. Certains flavonoïdes peuvent même inhiber l'expression des gènes *nod*. (Brencic et Winans, 2005).

Ils interviennent dans la symbiose entre les fabacées et les bactéries du groupe *Rhizobium*. Ces exsudats qui sont émis par les cellules des racines de légumineuses vont attirer la bactérie, qui en retour relâche des lipopolysaccharides (LPS) provenant de sa membrane. Ces LPS ont une structure antigénique spécifique, reconnue par la plante, la bactérie peut lyser la paroi de la cellule végétale et s'y introduire. Il y a formation d'un cordon infectieux, qui se ramifie au fur et à mesure de son passage dans d'autres cellules végétales (Saoudi, 2008).

2.5.2. Facteur *nod*

Tous les facteurs *nod* (figure 06) issus des rhizobia ont la même structure chimique basique, consistant en un squelette oligomérique de trois à cinq résidus de *N*-acetyl-Dglucosamine (GlcNAc) liés en *B*-1,4 et au niveau de l'extrémité non réductrice du squelette la présence d'une chaîne d'acide gras (de 16 à 18 atomes de carbone) généralement saturée et plus rarement insaturée, Les facteurs *nod* différent selon les espèces par les groupements (dits décorations ou substitutions) accrochés à leur chaîne oligosaccharidique, la longueur de la chaîne et le degré de saturation de la chaîne d'acides gras. La synthèse du squelette d'oligomères de chitine des facteurs *nod* requiert l'activité de trois enzymes codées par les gènes *nodABC*, présents chez tous les rhizobia caractérisés jusqu'ici exceptées deux souches de *Bradyrhizobium* (Giraud *et al.*, 2007). Le gène *nodC* codant pour une *N*-acetylglucosamyltransferase permet l'élongation de la chaîne, puis le gène *nodB* codant pour une *N*-deacetylase entraîne la suppression du résidu *N*-acetyl de l'extrémité de la chaîne ce qui permet au produit du gène *nodA*, une *N*-acyl-transférase d'y ajouter une chaîne d'acides gras. Ces gènes sont nécessaires à la synthèse des facteurs *nod*, l'inactivation de l'un d'entre eux entraîne une incapacité à noduler toute plante (Perret *et al.*, 2000).

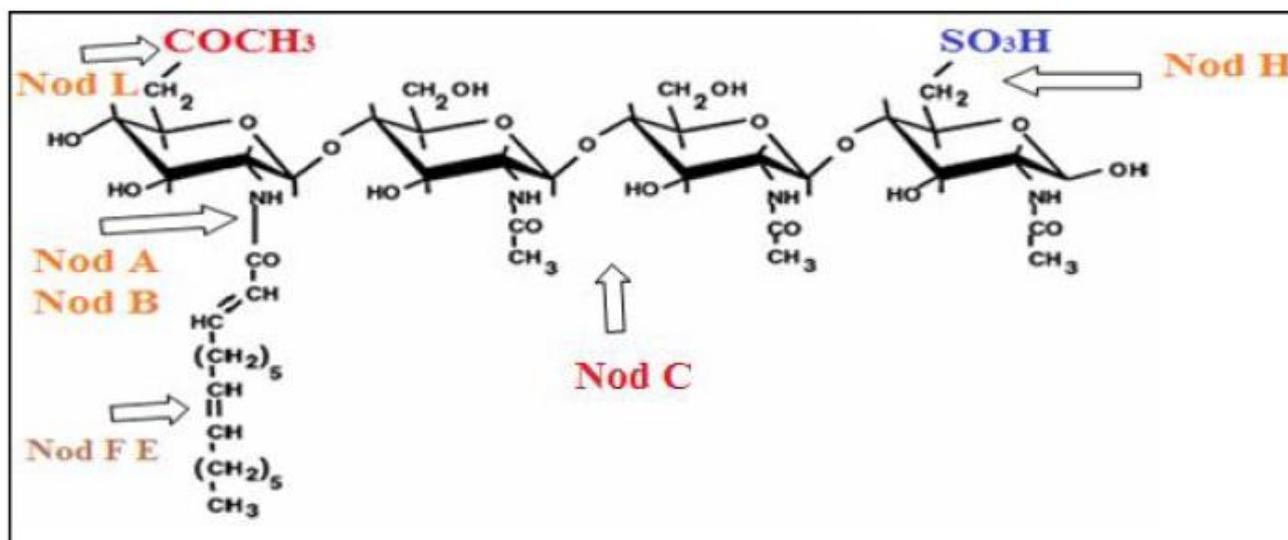


Figure 06 : Structure et synthèse des facteurs Nod (Vernie, 2008)

2.5.3. Les gènes Nod

Les gènes de nodulation ou gènes *nod* incluent des gènes communs et des gènes spécifiques de l'hôte à infecter (gènes *hsn*) (Broughto *et al.*, 2000 ; Spaink, 2000). En 2000, au total 13 gènes de nodulation étaient déjà connus. Il s'agit des opérons *nod ABCIJ*, *nod FEL*, *nod MNT*, du *nod O* et du *nod D* (Perret *et al.*, 2000).

Le gène *nod D* négocie les premières étapes de la nodulation chez la bactérie. Il est par conséquent le premier gène *nod* transcrit lors du processus de nodulation. Sa transcription se fait de manière constitutive (Geurts et Bisseling, 2002) et l'activation de son produit, le *nod D*, est réalisée par les flavonoïdes qui sont des molécules émises par les racines des légumineuses. Une fois activé, le *nod D* se lie aux sites régulateurs des opérons porteurs des autres gènes *nod* et active leur transcription. La figure 07 ci-après illustre ce rôle régulateur du *nod D* et présente les autres gènes de nodulation.

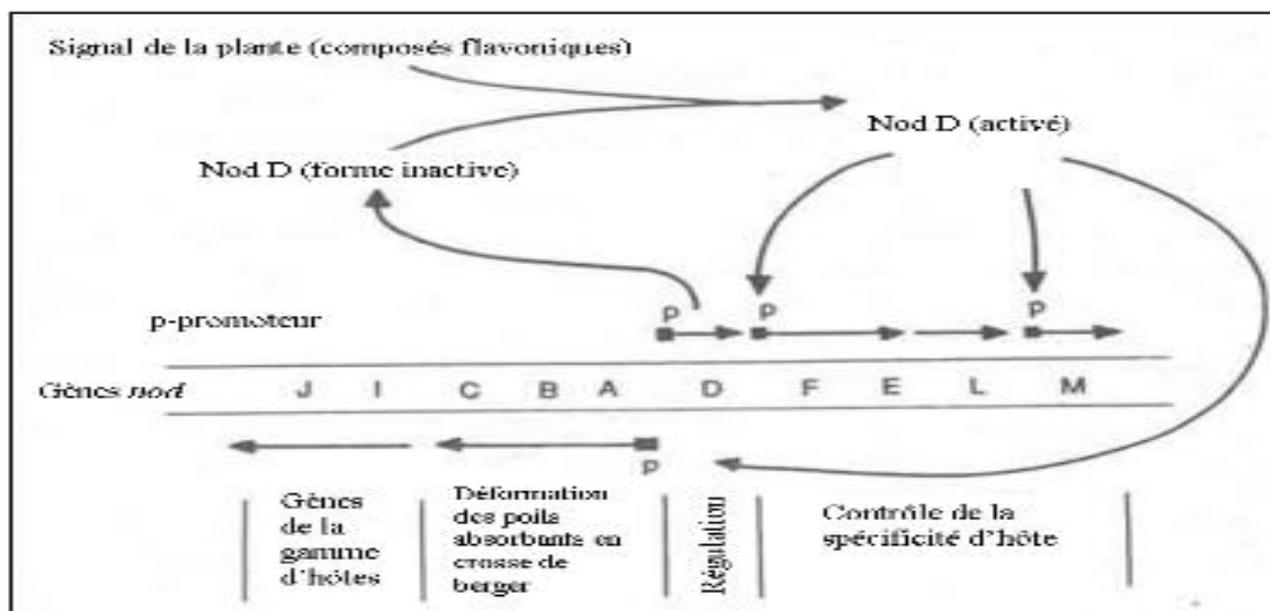
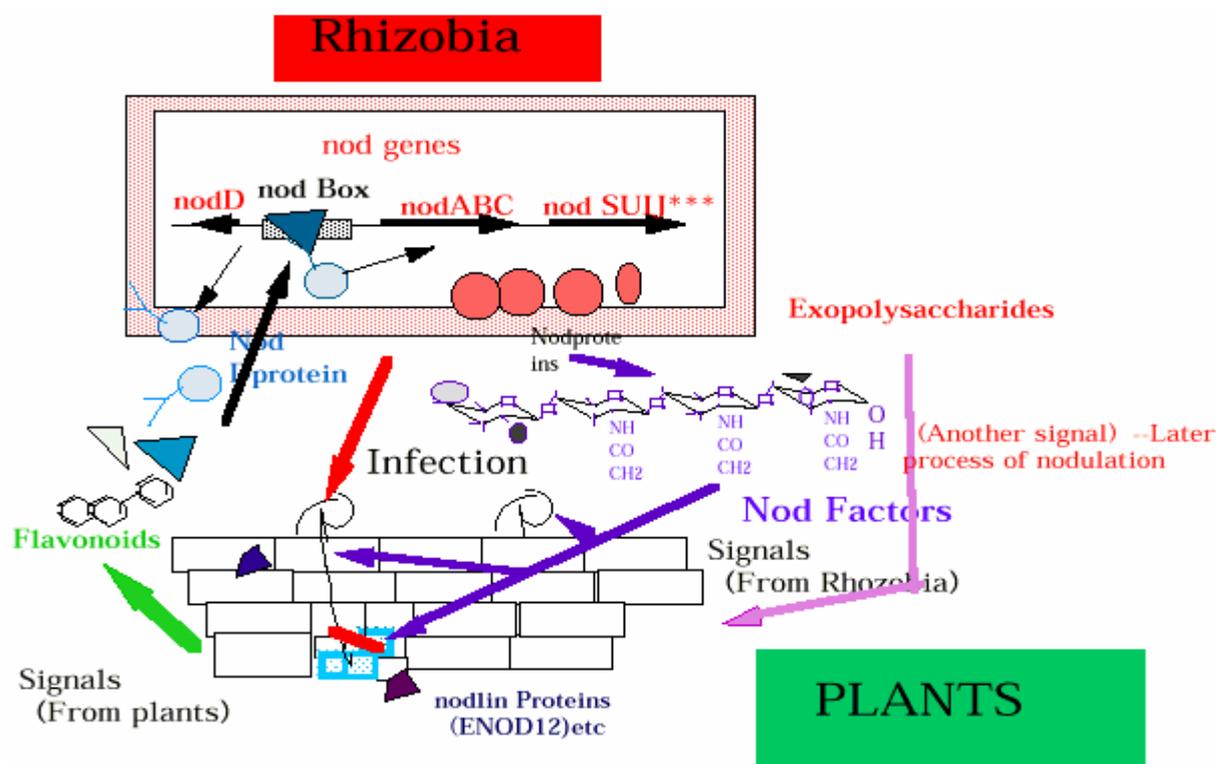


Figure 07 : Différents types de gènes *nod* (Kouakou 2011)

Les gènes *nod* communs (*nod* A, B, C, I et J) sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants en forme de crosse (*curling*) et inciter les cellules végétales à se diviser (Brewin *et al.*, 1992 ; Pelmont, 1995).

Les flavonoïdes, (figure 08) compatibles activent la protéine *nod* D, qui est un senseur de l' environnement et un activateur des gènes *nod*. Les protéines *nod* D synthétisées vont se lier à la *nod*-box, lieu de régulation des gènes *nod* A, B et C. Avec la coopération des flavonoïdes, les protéines *nod* D vont pouvoir promouvoir l' expression des gènes *nod* A, B et C : les protéines *nod* D ont un site de liaison pour les flavonoïdes ; une fois les flavonoïdes liées aux protéines *nod* D, ces dernières, liées à la *nod*-box, sont capable d' induire la transcription de ces gènes. Les vingt polymérases se fixent alors sur le promoteur de ces gènes. (Brewin *et al.*, 1992 ; Pelmont, 1995). ces derniers sont transcrits, et les protéines *nod* A, B et C sont traduites.(Saoudi, 2008).



5

Figure 08 : *nod ABC*: gènes de la voie de biosynthèse facteur *nod* ; *nod D*: régulateur positif
(Saoudi, 2008)

2.5.4. Les gènes *nif*

La transcription des gènes de la fixation de l'azote (gènes *nif*) n'a lieu que dans des conditions physiologiques bien définies qui dépendent des propriétés des bactéries concernées. Les signaux majeurs intervenant dans cette régulation sont l'ammoniaque et l'oxygène. Plus de vingt gènes *nif* organisés en opérons interviennent dans la synthèse et le fonctionnement du complexe nitrogénase, dont les gènes *nifHDK* qui représentent les gènes de structure (*nifH* code pour la réductase, *nifDK* pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo). La biosynthèse du cofacteur FeMo requiert l'assemblage des produits des gènes *nifB*, *nifE* et *nifN*. La majorité des autres gènes jouent un rôle dans la synthèse et la maturation des groupements prosthétiques ; certains interviennent dans la synthèse de transporteurs d'électrons et de protéines de régulation. Bien que très conservés chez les micro-organismes fixateurs d'azote, les gènes *nif* diffèrent au niveau de leur localisation : soit plasmidique ou chromosomique ; de leur organisation et de la régulation de leur expression (Fischer, 1993).

2.5.5. Les gènes *fix*

Les gènes *fix* sont des gènes additionnels, propres aux fixateurs symbiotiques et impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules lors de la fixation symbiotique azotée (Brewin *et al.*, 1992 ; Hopkins, 2003). Certains de ces gènes (*fix L*, *fix J*) sont des régulateurs de la synthèse du gène *nif A*, intervenant dans la régulation de la synthèse de la nitrogénase.

Le système de régulation *fixLJ* joue un rôle très important dans l'expression des gènes *nif* et *fix* et particulièrement dans la régulation du gène *nifA* (David *et al.*, 1988). La protéine régulatrice *fixL*, située sur la membrane des bactéroïdes, est sensible à l'oxygène. En condition d' anoxie, *fixL* s'autophosphoryle et la protéine *fixJ* est phosphorylée à son tour, par utilisation de *fixL*-Phosphate comme donneur. Ceci permet l'activation de la transcription des différents gènes et particulièrement celle de *nifA*, qui code pour un activateur de transcription spécifique à l'opéron *nif*. Il existe également une protéine de régulation négative (*nifL*) avec une activité antagoniste à celle de *nifA*, qui inhibe la synthèse des gènes *nif* en condition aérobie (Spaink *et al.*, 1998).

3. Infection et développement de nodule

La séquence des événements qui débutent par l'infection bactérienne et qui se terminent par la formation d' un nodule différencié fixant l'azote, a été très étudiée chez les légumineuses, d'abord sous l'angle morphologique, puis plus récemment sous un angle biochimique et de génétique moléculaire. Globalement, le processus met en jeu des interactions multiples entre la bactérie et les racines hôtes, en effet les rhizobiums et les racines (Hopkins,1999).

(i). Infection

Par les poils absorbants : (figure 09) la famille *Frankia* colonise les poils absorbants et provoque leur déformation. Un hyphes pénètre au travers de la paroi du poil et devient un endophyte intracellulaire. En réponse à cette invasion, la plante encapsule l'hyphes au fur et à mesure de sa progression vers le cortex racinaire. Dans le même temps, par suite des divisions répétées des cellules corticales, il se forme un renflement, une boursoufflure de la racine du côté de l'infection, le nodule. Celui-ci sera progressivement envahi par l'endophyte (Obato,1989) .

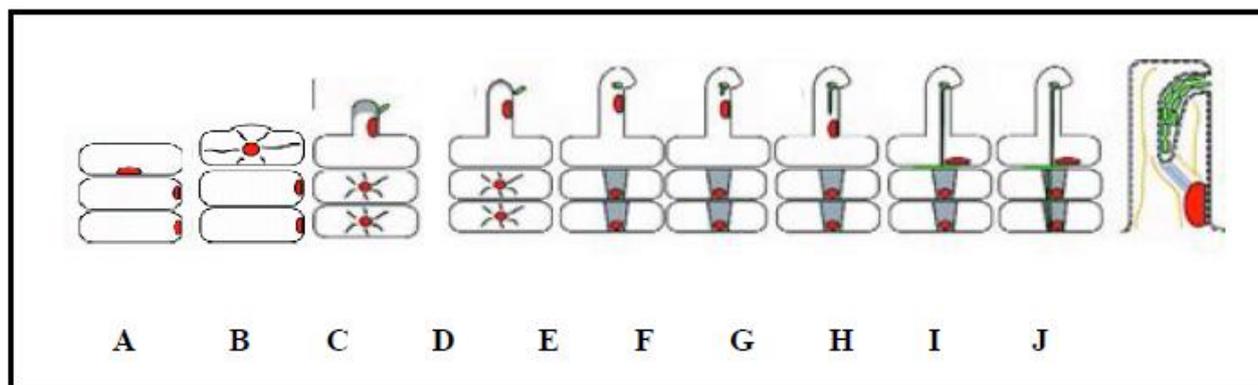


Figure 09 : le processus d' infection dans les poils absorbants. (Obato,1989).

A. Une cellule épidermique et deux cellules du cortex externe sous-jacentes. Le noyau (en rouge) de la cellule épidermique est positionné en face du futur poil absorbant.

B. Initiation du poil absorbant dans la cellule épidermique.

C. Attachement d'une cellule rhizobienne (en vert) à un poil absorbant de type I et activation des cellules corticales sous-jacentes en réponse aux facteurs Nod.

D. Croissance continue du poil qui atteint le type II.

E. Déformation du poil de type II en crosse de berger sous l'influence des facteurs Nod et croissance de la micro-colonie rhizobienne dans le creux du poil. Les cellules du cortex externe se sont polarisées et des ponts cytoplasmiques

F. Initiation du cordon d'infection.

G. Croissance du cordon d'infection vers la base du poil absorbant. Le noyau descend en avant du cordon d'infection.

H. Fusion du cordon d'infection avec la paroi de la cellule épidermique et croissance des bactéries dans l'espace intercellulaire entre la cellule épidermique et la cellule corticale sous-jacente.

I. Croissance du cordon d'infection au travers des cellules du cortex externe.

J. Grossissement du poil absorbant observé en G. La crosse a été coupée afin de voir que les bactéries dans le cordon d' infection sont toujours à l' extérieur du poil absorbant. La paroi cellulaire est représentée en trait noir, la membrane plasmique en pointilles. Des microtubules (en bleu) sont situés entre l' extrémité du cordon d' infection et le noyau. Des filaments d' actine sont représentés en orange (Obato,1989).

Par pénétration intercellulaire : ce processus d'infection dans lequel les poils absorbants ne sont pas impliqués n'a été reconnu, dans l'état actuel des connaissances, que dans la famille des Elaeagnacées. Frankia colonise la surface racinaire et pénètre la cuticule des cellules épidermiques. Les hyphes se déplacent alors au niveau de la lamelle moyenne, entre deux cellules contiguës et gagnent les espaces intercellulaires de la racine. Dans ce cas, il n'y a pas formation de pré-nodule.(Obato,1989).

(ii). Formation de la nodosité

Quel que soit le mode d'infection, on observe l'induction, au niveau du péricycle de la racine, d'un primordium. Celui-ci se développe rapidement et finira par percer le cortex de la racine-mère, formant ainsi la nodosité (figure 10). Au cours de son développement, le primordium sera progressivement envahi par l'endophyte déjà présent dans ou entre certaines cellules du cortex de la racine-mère. La nodosité chez les espèces à actinorhizes apparaît donc comme une véritable racine dont la croissance en longueur est rapidement stoppée (Obato,1989).

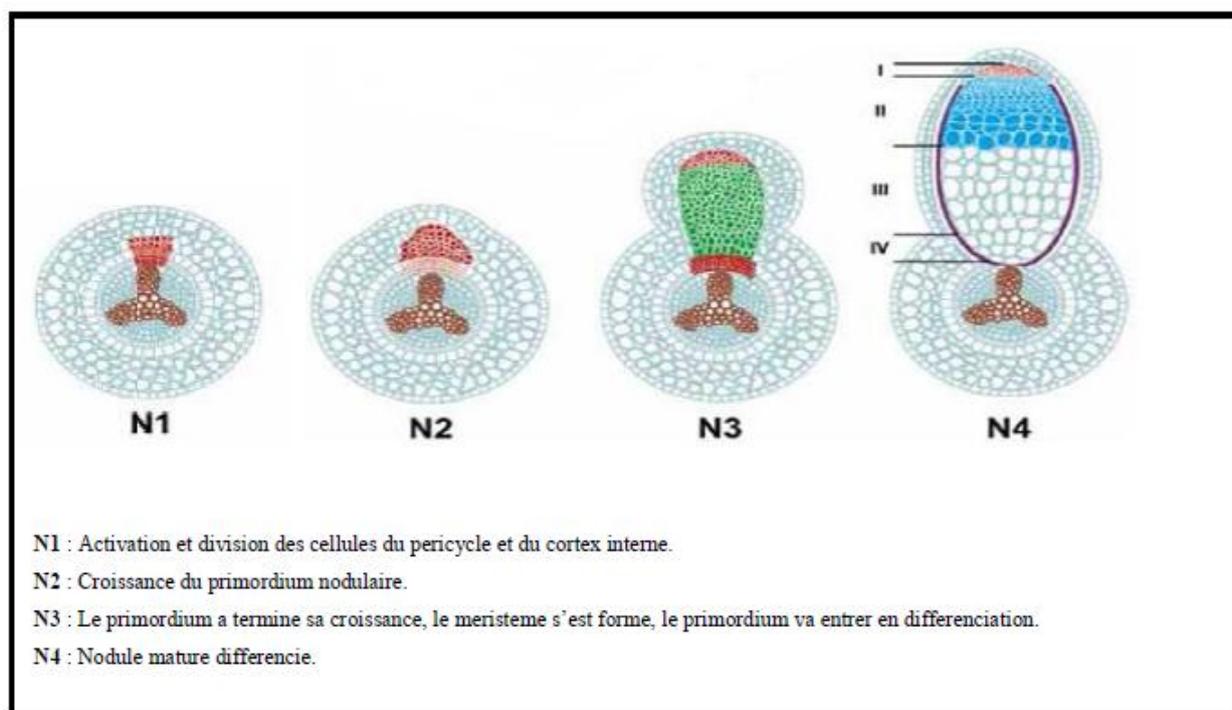


Figure 10 : les différents stades de l'organogenèse de la nodulaire (Vernie,2008)

Alors la nodosité apparaît comme un organe comportant 5 éléments :

- **Un méristème I** : formé de petites cellules non contaminées par les rhizobiums et qui assurent la croissance de la nodosité.
- **La zone de rupture des cordons II** : dans cette zone, les cellules se multiplient activement et sont contaminées par les rhizobiums, mais la fixation n'a pas lieu.
- **La zone de fixation III** ou les cellules de la plante hôte sont remplies de rhizobiums qui prennent une forme renflée ou ramifiée appelée bactéroïde. Sous cette forme les rhizobiums contiennent une enzyme, la nitrogénase, qui permet la fixation de l'azote de l'air. Cette enzyme contient du fer et du molybdène, métaux qui servent au transport des électrons nécessaires à la réaction de réduction. Les cellules où a lieu la fixation sont colorées en rouge par leghémoglobine, pigment qui sert au transport de l'oxygène jusqu'au bactéroïde.
- **La zone de dégénérescence IV** : qui est colorée en brun. Les cellules de la plante hôte dégèrent et la fixation n'a plus lieu.

- **Les faisceaux libéro-ligneux** : dérivés des vaisseaux du cylindre central qui irriguent le nodule, apportent les glucides nécessaires pour la réaction de fixation, et exportent vers les feuilles les composés azotés formés.

3.1. Différentes formes de nodules

Le type de nodule dépend de la plante hôte et non de son symbionte (figure 11). Ainsi, les Légumineuses tempérées (pois, luzerne, trèfle...) forment généralement des nodules indéterminés, alors que les Légumineuses tropicales (soja, haricot...) forment habituellement des nodules déterminés (Hirsch, 1996). Cependant, certaines plantes comme *Sesbania rostrata* peuvent former des nodules des deux types selon les conditions environnementales (Fernandez *et al.* 1998). C'est notamment selon le site d'initiation des divisions cellulaires du cortex que les deux types de nodules se distinguent. Les nodules indéterminés se développent à partir des cellules du cortex interne alors que les nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe. Les nodules indéterminés sont caractérisés par la présence d'un méristème persistant. Des cellules sont constamment ajoutées à la partie distale du nodule, ce qui lui confère une forme allongée. Toutes les étapes de développement nodulaire sont présentes au sein d'un même nodule selon un gradient de différenciation de la partie distale (méristème) à la partie proximale (racine), (Hirsch, 1996 ; Crespi et Galvez, 2000).

Au contraire, les nodules déterminés ont une activité méristématique qui disparaît très tôt après l'initiation du nodule. La croissance du nodule se fait par élargissement des cellules, donnant une forme arrondie au nodule, Il n'y a pas de différenciation spatiale du nodule, juste une différenciation temporelle. Enfin, dans les nodules indéterminés l'azote est principalement exporté sous forme d'asparagine et de glutamine, et sous forme d'uréides dans les nodules déterminés, (Vernie, 2008).

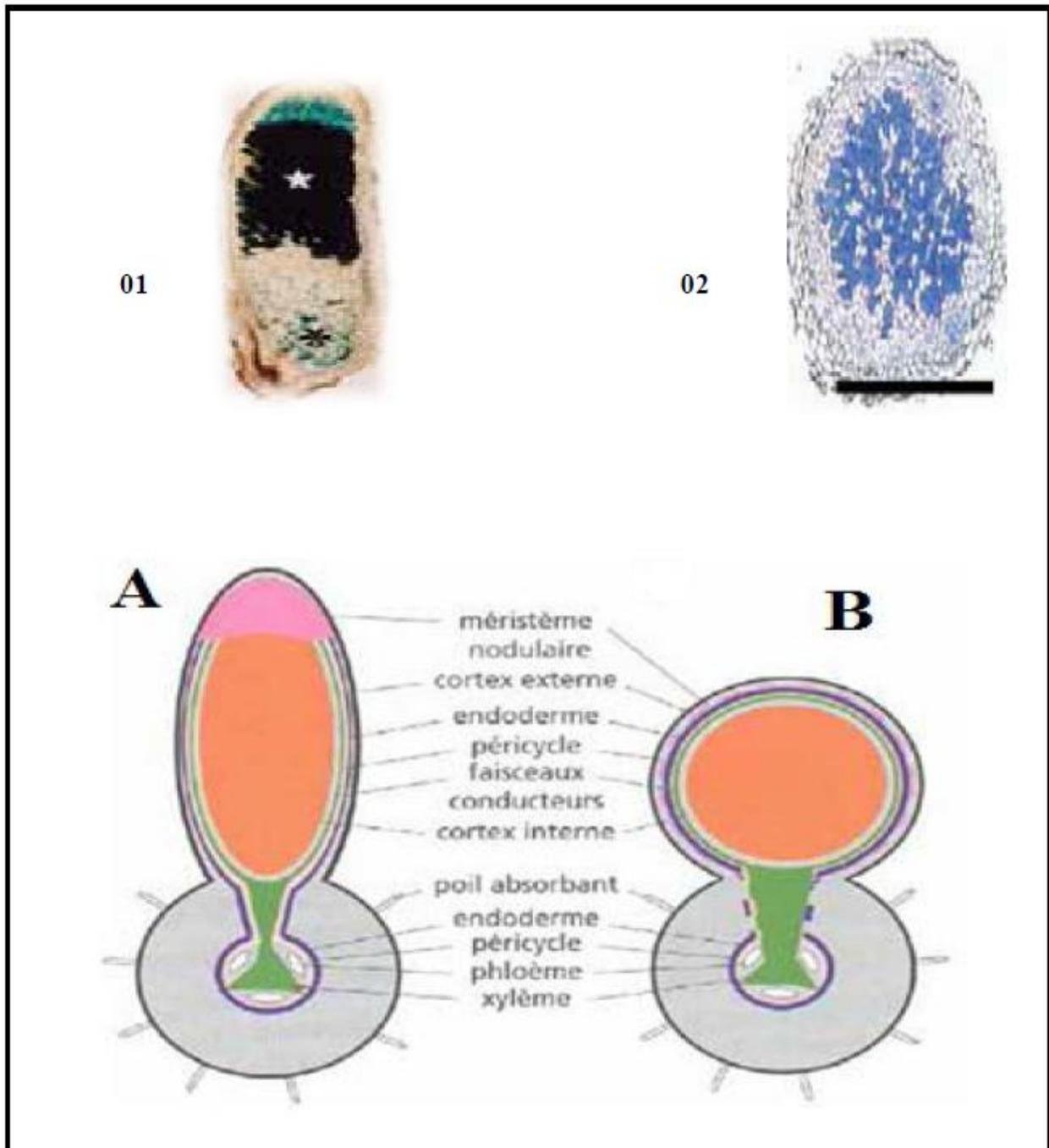


Figure 11 : La structure de deux types de nodules chez les Légumineuse (Duhoux, 2004)

01-A : coupe longitudinale d'un nodule indéterminé **02-B** : coupe transversale d'un nodule déterminé

4 - Taxonomie des *Rhizobium*

La taxonomie ou systématique a deux fonctions : la première est d'identifier et de décrire aussi complètement que possible les unités taxonomiques de base ou espèces; la seconde de trouver le moyen d'arranger et de cataloguer ces unités entre elles. Ainsi, plusieurs espèces bactériennes seront-elles regroupées dans un genre, lui-même classé dans une famille, puis dans un ordre, une classe et une division ou phylum (Prin *et al.*,1993).

Vandamme *et al.* (1996). ont précisé que la taxonomie des *Rhizobiaceae* a connu de profonds remaniements au cours des dix dernières années, du fait de l'abandon du spectre d'hôte comme important critère pris en compte pour la définition des espèces et de l'adoption des critères généralement retenus pour la classification bactérienne.

En partant du concept que les *Rhizobium* peuvent être classés en fonction de la plante-hôte avec laquelle ils entrent en symbiose et que les groupes d'inoculation croisée comme étant des groupes de plantes entre lesquelles les organismes présents dans les nodules sont mutuellement interchangeables. Cependant, les limites de cette classification sont rapidement apparues (Elkan, 1992). D'autre part Dommerges *et al.*,1999. signalent que même si le concept d'inoculation croisée n'a plus actuellement de valeur sur le plan taxonomique (notamment depuis le développement des méthodes génomiques), il ne peut être écarté sur le plan pratique, puis qu'il est nécessaire de savoir si la ou les souches *Rhizobienn* qu'on étudié son capable de noduler effectivement la plante hôte.

En 1988, la taxonomie des *Rhizobium* au sens large s'est considérablement modifiée par la combinaison d'études polyphasiques et phylogénétiques (Prin *et al.*,1993). Tout récemment, cette dernière classification a été remise en question, tant au niveau de certaines espèces et biovars que de certains genres, la construction d'arbres phylogéniques prenant en compte un nombre de plus en plus important de bactéries a permis de confirmer encore l'hétérogénéité des genres et des espèces traditionnellement rangées dans la famille des *Rhizobiaceae* (Young, 1992).

La caractérisation phénotypique classique des rhizobia se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques. La morphologie d'une bactérie repose sur ses caractéristiques cellulaires (forme, endospores, flagelles, corps d'inclusion, coloration de Gram,...) et celle respectives a la colonie (couleur, dimension, forme,...). Les caractéristiques physiologiques et biochimiques s'intéressent à l'ensemble des données de croissance aux différentes températures et valeurs de pH, aux différentes concentrations de sels, aux conditions atmosphériques, à la croissance en présence de différents agents antimicrobiens et la présence de l'activité enzymatique et de composés de métabolisme (Vandamme *et al.*, 1996).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1- Isolement des bactéries à partir des nodules

1-1- Sites de collecte des nodules et biologie des plantes hôtes

Les prospections sur terrain au Nord-est de l'Algérie, nous ont conduit à identifier trois espèces de plantes sauvages de légumineuses endémiques du pourtour de la méditerranée appartenant à la tribu des Genisteeae. (i) *Argyrolobium uniflorum* (Decne.) Jaub. & Spach a été collecté sur deux sites, Bir El-Ater (climat xéro-thermo-méditerranéen) ($34^{\circ} 43'24''\text{N}$, $8^{\circ} 2'33''\text{E}$, Tebessa) et Negrine en zone subdésertique ($34^{\circ} 29'24''\text{N}$, $7^{\circ} 33'1''\text{E}$, Tebessa), et (ii) *Genista microcephala* Coss. & Durieu a été échantillonné à partir d'un zone subdésertique (Metlili $35^{\circ} 15'49''\text{N}$, $5^{\circ} 39'8''\text{E}$) située près de la province de Batna. Les racines de la troisième espèce (iii) *G. cinerea* ont été collectées sur le site de Bekkaria ($35^{\circ} 21'10.45''\text{N}$, $8^{\circ} 15'16.14''\text{E}$) situé près de la localité de Tébessa (Figure 12).

Le climat des régions d'études est thermoméditerranéen, c'est-à-dire semi-aride méditerranéen, avec un été chaud sec (température maximale enregistrée en juillet = 35°C , précipitations = 10mm) et un hiver relativement froid (température minimale en janvier = 1.7°C avec précipitations = 27mm). Suite à des données météorologiques à long terme, du point de vue climatologiques Ces régions sont considérées comme en tant à précipitation limitée en ce qui concerne la production primaire nette climatique. En effet, les relevés mensuels d'évapotranspiration potentielle tout au long de chaque l'année dépassent la quantité de pluie, bien que les précipitations se produisent principalement en hiver et en automne mais avec de grandes variations saisonnières et interannuelles (Annexe table S1)

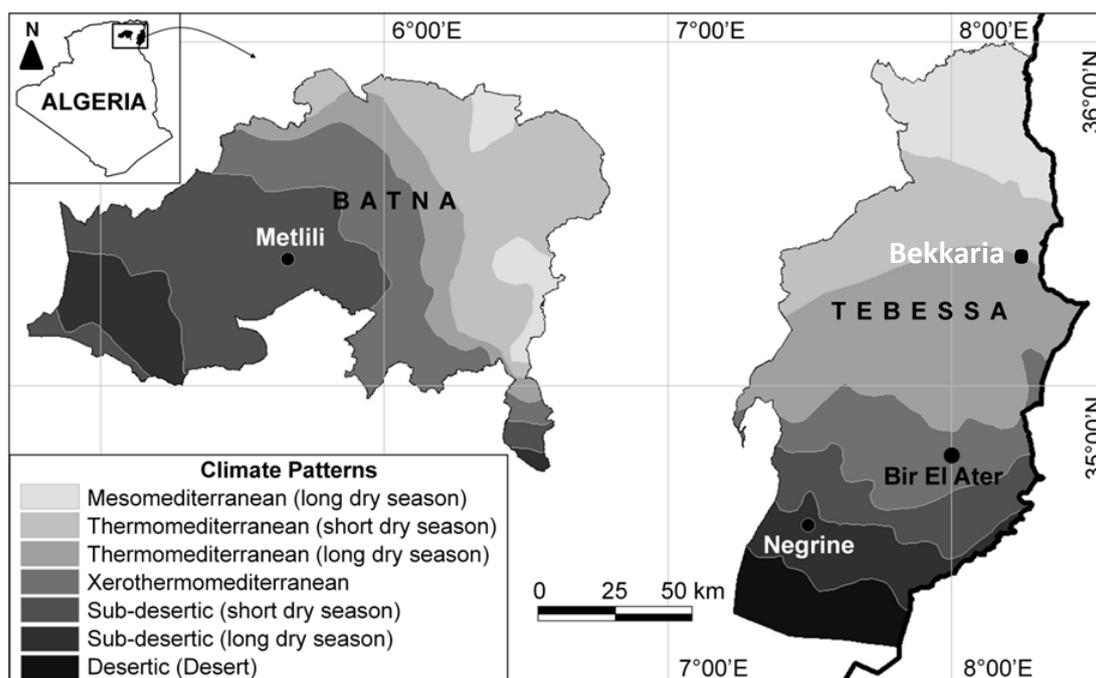


Figure 12 : Carte de localisation géographique et de climat des sites d'échantillonnage (cercle solide) dans le nord-est de l'Algérie

Après avoir récolté les nodules à partir des plantes vertes et saines assurant ainsi une activité élevée de fixation d'azote. Les nodules récoltés sont de grandes tailles avec une couleur rouge-rose à l'intérieur indiquant par conséquent la présence de la lèghémoglobine et la fixation active de l'azote, il est important de noter que le type des nodules récoltés sur les racines de *Génista microcephala* sont distincts selon la position qu'ils occupent sur les racines, des nodules indéterminés situées sur la partie supérieure et d'autres qui sont reliées entre eux par un cordon apparent à une racine latérale modifiée localisées sur la partie inférieure des racines de la plantes(figure 14) . En effet ce type de nodule est appelé nodule actinorhizien, organe tout à fait original par rapport au nodule des Légumineuses (Santi, 2008). Tant disque les nodules récoltés sur les racines d'*Argyrobium uniflorum* sont de type déterminé (figure 13).

(i) *Argyrobium uniflorum* (Decne.) Jaub. & Spach :

Calice profondément bilabié. Lèvre supérieure à 2 dents, l'inférieure à 3. 10 étamines monadelphes, en tube, fendu. Ovaire pluri-ovulé. Gousse linéaire, déhiscente, velue, généralement toruleuse. Graines non arillées. Sous-arbrisseaux à tiges étalées. Folioles ovales 3-5 fois plus longues que larges (figure 13). Fleurs et gousses sessiles. Labre calicinal divisé tout . au plus dans sa moitié apicale occupe les rocailles, lits des oueds assez commun dans les régions de l'atlas saharien, le Sahara septentrional et secteur du sahara central méditerranéen (Quezel et Santa, 1962)



Figure 13 : *Argyrobium uniflorum* (à gauche) et forme des nodules (à droite)

(ii) *Genista microcephala* Coss. & Durieu :

Gousse ovoïde, monosperme, entourée en entier par le calice et les débris de la corolle. Corolle simplement pubescente (figure 14). Feuilles pourvues à la base de 2 stipules, très petites et spinescentes. Rameaux grêles. Fleurs jaunes Broussailles, rencontrées dans les steppes et Endémique de l'Afrique du Nord (Quezel et Santa, 1962)



Figure 14 : *Génista microcephala* (à gauche) et formes des nodules (au milieu et à droite)

(iii) *Genista cinerea*

Fleurs en grappes très allongées et très fournies. Arbustes élevés à rameaux dressés avec huit Gousses allongées (15-18 mm). 2-5 spermes. Feuilles ovales-elliptiques, glabres sur leur face supérieure, velues, soyeuses en dessous localisées dans les Forêts claires dans l'ouest de la méditerranée (Figure 15).



Figure15 : *Genista cinerea* (à gauche) et formes des nodules (au milieu et à droite)

1-2- Conservation des nodules

Les nodules frais peuvent être stockés dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48 heures pour un usage immédiat, pour une longue période de stockage la dessiccation des nodules est recommandée.

La dessiccation est réalisée dans des flacons contenant un déshydratant tel que le CaCl₂ anhydre et une couche de coton sur la quelle reposent les nodules (Figure 16).

Chaque flacon doit être étiqueté par les informations suivantes :

- Nom de la plante hôte
- Date de conservation
- Date et lieu de prélèvement

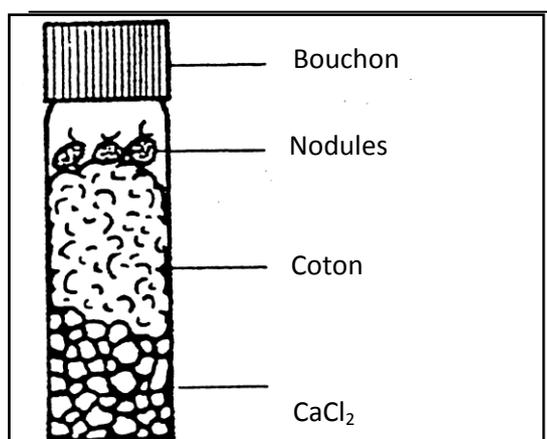


Figure 16 : Conservation des nodules sous CaCl₂ (Vincent, 1970)

1-3- Isolement des souches bactériennes à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés dans l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C puis une heure à la température ambiante.

1-3-1- Stérilisation des nodules

Les nodules réhydratés sont immergés dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes en suite transférés rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0.1% (1g Hg Cl₂ + 5 mL HCl + 11 D'eau distillée). En fin les nodules sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile, puis on les laisse dans l'eau distillée stérile pendant une heure après le dernier rinçage by (Somasegaran and Hoben, 1994).

1-3-2- Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri. Les nodules sont écrasés avec une pince stérilisée par émerision dans l'éthanol et flambé au bec Bunsen. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale sous une hotte à flux laminaire.

A l'aide d'une anse de platine, une suspension de chaque nodule écrasé est étalée selon la technique des quatre cadrans (Figure 17) sur les milieux de cultures afin d'isoler des souches pures (tableau 02) (Somasegaran and Hoben, 1994)..

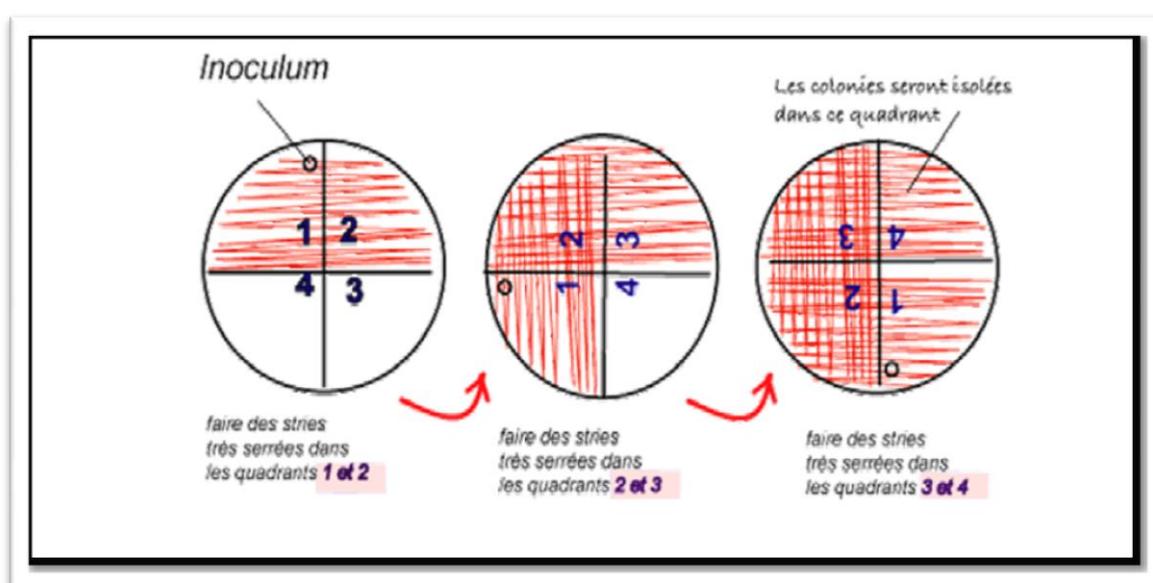


Figure 17 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

Tableau 02 : Les souches de références et les isolats utilisés dans cette étude

Codes	Souches	Plante-hôte	Origine géographique	Types de nodules	Sources
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp.nov. RHA6	<i>Hedysarum coronarium</i>	Constantine -Algérie-	Déterminé	A. Benguedouar -Constantine-
HS1	<i>Pseudomonas</i> sp.NZ096	<i>Hedysarum.S.SP.</i> <i>capitatum</i>	Constantine Algérie	Déterminé	Y.Benhizia -Constantine-
HP7	<i>Enterobacter</i> <i>kob</i>	<i>Hedysarum pallidum</i>	Setif -Algérie-	Déterminé	Y.Benhizia -Constantine-
Hca1	<i>Pseudomonas</i> sp.KD	<i>Hedysarum carnosom</i>	Constantine -Algérie-	Déterminé	Y.Benhizia -Constantine-
HnA	<i>Panotoea</i> <i>agglomerans</i>	<i>Hedysarum Naudinianum</i>	Setif -Algérie-	Déterminé	A. Torche -Constantine-
N1	Isolat	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Negrine -Tebessa-	Déterminé	Présente étude
N2	Isolat	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Negrine -Tebessa-	Déterminé	Présente étude
AN11'	Isolat	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Negrine -Tebessa-	Déterminé	Présente étude
AN123'	Isolat	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Negrine -Tebessa-	Déterminé	Présente étude
YN12	Isolat	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Negrine -Tebessa-	Déterminé	Présente étude
B3	Isolat	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Bir el ater -Tebessa-	Déterminé	Présente étude
AB2'	Isolat	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Bir el ater -Tebessa-	Déterminé	Présente étude
D	Isolat	<i>Genista microcephala</i>	Metlili -Batna-	Indéterminé	Présente étude
E	Isolat	<i>Genista microcephala</i>	Metlili -Batna-	Indéterminé	Présente étude
K	Isolat	<i>Genista microcephala</i>	Metlili -Batna-	Indéterminé	Présente étude
F	Isolat	<i>Genista microcephala</i>	Metlili -Batna-	Nodules reliés par un cordon	Présente étude
A	Isolat	<i>Genista microcephala</i>	Metlili -Batna-	Nodules reliés par un cordon	Présente étude
M	Isolat	<i>Genista microcephala</i>	Metlili -Batna-	Nodules reliés par un cordon	Présente étude
GD	Isolat	<i>G. cinerea</i>	Bekkaria -Tebessa-	Déterminé	Présente étude
GI, GI22	Isolat	<i>G. cinerea</i>	Bekkaria -Tebessa-	Indéterminé	Présente étude
GIg11, GIg12, GIg13, GIg14, GIg15, GIg21, GIg23	Isolat	<i>G. cinerea</i>	Bekkaria -Tebessa-	Tumeur	Présente étude

2- Caractérisation phénotypique des isolats des légumineuses *Genista microcephala* et

Argyrolobium uniflorum :

2-1- Caractères cultureux

Les milieux utilisés pour l'étude des caractères cultureux proposées par Vincent, 1970 sont :

(i) **Milieu liquide** :

- Yeast Mannitol Broth (YMB) (g/l) (Mannitol, 10.00 ; K₂HPO₄ ,0.50 ; MgSO₄7H₂O, 0.20; NaCl, 0.10; Extrait de levure, 0.50)

(ii) **Milieux solides** :

- Yeast Mannitol Agar (YMA) (g/l) (yeast extract, 0.5; mannitol, 10.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄ 7H₂O, 0.20; agar, 15)
- Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo (YMA+RC) (g/l) (yeast extract, 0.5; mannitol, 10.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄ 7H₂O, 0.20; NaCl 0.10, Congo red, 0.025; agar, 15)
- Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue (YMA+BTB) (g/l) (yeast extract, 0.5; mannitol, 10.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄ 7H₂O, 0.20; agar, 15; bleu bromothymol 5 mL)
- Glucose Peptone Agar + Bromocresol Pourpre (GPA+BCP) (g/l) (Glucose, 10 ; Peptone, 5 ; Solution stock bromocrésol pourpre, 10 mL [1g BCP dans 100 mL dans 100mL d'éthanol] ; Agar, 15)

2-2- Observations des colonies et conservation des isolats

Les colonies ayant absorbées peu de rouge Congo et n'ayant pas acidifié le milieu GPA (virage du BCP au jaune) sont pris en compte comme isolats candidats à étudier. Ces colonies qui sont considérées comme bactéries nodulant les légumineuses de notre étude (Benhizia *et al.*, 2004).

2-2-1 Examen microscopique par la coloration de Gram

Une observation microscopique est réalisée sur des lames dont une préparation de culture en YMB est étalée en couche mince, séchée et fixée. La préparation des lames est réalisée sous la hotte à flux laminaire, puis les lames sont colorées par la coloration Gram.

2-2-2- Conservation des souches

La conservation se fait sur le milieu YMA additionné de 3 g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est répartie dans des tubes à essai formant des géloses inclinées. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle. Des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose, et après incubation à 28°C pendant trois jours les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 06 à 12 mois (Vincent, 1970).

2-3- Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

2-3-1- Test du 3-cétolactose

Ce test proposé par Jordan, (1984). Permet de distinguer entre le genre *Rhizobium* et le genre *Agrobacterium*. Il se base sur l'oxydation du C₃ du glycosyl des saccharides (Bernaerts et De Ley, 1963) Ce test repose sur la culture des souches à étudier à 28°C pendant 3 jours sur le milieu suivant (g/l) : (Extrait de levure ,10 ; Glucose, 20 ; Carbonate de calcium ,20 ; Agar, 18).

Une anse de culture bactérienne de ce milieu estensemencée sur milieu solide contenant (g/l) : (Lactose, 10 ; Extrait de levure, 1 ; Agar,18), les cultures sont incubées 2 jours à 28 °C. En suit les boites sont inondées avec le réactif de Benedict (g/l) (Citrates de sodium ,173 ; Carbonate de sodium anhydre, 100 ; CuSO₄5H₂O ,7.3) à température ambiante.

Après environ une heure, la révélation de la présence du 3-cétolactose se manifeste par la formation d'un halo jaune de Cu₂O autour des colonies d'un diamètre de 2 à 3 cm. Comparativement avec le fond bleu du réactif de Benedict. Sachant que seule les souches d'*Agrobacterium* spp. sont capable de produire l'enzyme 3-cétoglucosidase.

2-3-2- Précipitation du glycérophosphate de calcium

Selon Hofer, 1941. Les souches sont cultivées 2 jours à 30 °C sur gélose au mannitol et au calcium glycérophosphate(g/l) (KNO₃, 5 ; NaCl, 3.9 ; MgCl₂6H₂O,1g ; KCl, 0.16 ; MgSO₄7 H₂O, 0.6 ; Ca Glycérophosphate ,0.8 ; Mannitol , 20 ; Agar ,18)

Les colonies entourées d'halo brunâtre et présentant un précipité claire, constitué probablement de phosphate tricalcique indique leur appartenance au genre *Agrobacterium* spp. Par contre les *Rhizobium* donnent lieu à aucun brunissement (réaction négative).

2-3-3- Croissance sur Litmus milk (Lait tournesolé)

Selon Vincent (1970) les réactions sur le milieu au lait tournesolé permettent de distinguer les formes non rhizobial et les contaminants qui ont une croissance rapide accompagnée par une décoloration du lait. La mise en évidence d'une protéolyse acide ou alcaline, se manifeste par un halo clair autour des colonies (développement d'une zone de digestion du « sérum » caractéristique des souches de *Rhizobium*).

Pour la préparation du milieu, une solution contenant 20 g de lait tournesolé est dissoute dans 100 mL d'eau distillée et une autre solution contenant 3 g d'agar dilué dans 100 mL sont stérilisées

séparément à 110°C pendant 10mn. Refroidies à 50°C, les deux solutions sont mélangées pour constituer le milieu de culture.

Les bactéries sontensemencées sur boites et incubées à 28°C pendant 15 à 20 jours. Il est mis en évidence la formation d'une zone de protéolyse claire autour des colonies. L'acidification du milieu est en outre accompagnée de l'apparition d'une couleur rose.

2-4- Tests nutritionnels

2-4-1- Source de carbone

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : Glucose, Maltose, Raffinose, Xylose, Arabinose, Fructose, Lactose, Sorbitol et Sucrose.

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

2-4-2- Source d'azote

Les souches sont cultivées sur milieu Défini 8 (g/l) (KH_2PO_4 , 0.3 ; Na_2HPO_4 , 0.3 ; MgSO_4 , 0.21 ; Ca Cl_2 , 0.2 ; Glutamate-Na, 1 ; Mannitol, 1 ; Solution stock vitamines (mg/l) 1mL [Acide nicotinique ,100 ; Thiamine ,100 ; Panthotenate-Ca, 100] ; Oligoéléments (mg/l) 1mL [H_3BO_3 ,50 ; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 35 ; $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8 ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,40 ; $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16]) (Vincent, 1970) où le glutamate de sodium est remplacé par l'un des acide aminés suivants : valine, tyrosine, leucine, proline, thréonine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane, lysine, glycine, sérine, histidine, arginine, méthionine, alanine, asparagine, cystéine et glutamine.

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

2-4-3- Besoin en vitamines

Les souches sont cultivées sur le milieu B III (g/l) (K_2HPO_4 ,0.23 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.10 ; Glutamate-Na, 1.10 ; Solution stock vitamines (mg/l) 1 mL [Riboflavine, 20 ; Acide p-aminobenzoïque, 20 ; Acide nicotinique, 20 ; Biotine, 20 ; Thiamine-HCl, 20 ; Pyridoxine-HCl , 20 ; Panthotenate-Ca, 20 ; Inositol ,120] ; Solution stock oligoéléments (g/l)1mL[Ca Cl_2 , 5 ; H_3BO_3 ,0.145 ; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.125 ; $\text{Co SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.070 ; $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.005 ; $\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0043 ; $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.108 ; Na Mo O_4 ,

0.125 ; Nitrit triacetate 1]) décrit par Dazzo, 1982 où la solution stock des vitamines est remplacée par une des vitamines suivantes : riboflavine, acide p-aminobenzoïque, acide nicotinique, biotine, thiamine-Hcl, panthotenate de Ca et pyridoxine.

- Incuber à 28°C avec agitation pendant 24 heures.
- Mesurer la DO à 600nm.

2-5- Tests biochimiques (recherche des enzymes spécifiques)

2-5-1- Réduction des nitrates

Les souches sont cultivées sur TY contenant 0.1% KNO₃ (p/v). Après 4 jours d'incubation avec agitation à 28°C, on ajoute sur la surface de la culture 3 à 4 gouttes des réactifs du nitrate réductase (Guiraud, 1998).

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.

2-5-2- Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence la présence d'une activité uréasique . Les isolats et les souches de références cultivées sur TY sontensemencés sur YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012 (g/l) de rouge de phénol comme indicateur de pH. Le milieu solide sans urée est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes puis refroidi jusqu'à environ 45°C. La solution d'urée est stérilisée par filtration (0.22 μ m) et ajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire puis incubation à 28°C pendant 48 heures.

2-5-3- Activité pectinolytique

Les souches en phase de croissance exponentielle sur TY sontensemencées sur milieu semblable à l'YMA où le mannitol est remplacé par 0.1% d'inositol et 0.2% de pectine.

L'incubation dure 7 jours à 28°C. Les boites sont ensuite rincées délicatement à l'eau de robinet puis inondées d'une solution de rouge de Ruthénium 0.05% et laisser agir pendant 30 min. Un halo décoloré autour des colonies indique une activité pectinolytique.

2-5-4- Activité cellulolytique

Les bactéries cultivées sur milieu TY Sont ensemencées sur YMA Contenant 0.25% (p/v) de CMC (carboxy-methyl-cellulose), puis les boites sont incubées à 28°C pendant 5 jours. Les colonies développées sur ce milieu sont rincées délicatement avec l'eau de robinet. Les boites remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/mL) et incubées 30 minutes dans l'étuve à 28°C, puis la solution colorante est remplacée par de NaCl (1N), ensuite les boites sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes. Les colonies apparaissent sur fond rouge, avec un halo jaune orangé mettant en évidence l'activité endoglucanasique.

2-5-5- Désamination du tryptophane

D'après Joffin et Leyral, 2001. La recherche de l'activité tryptophane désaminase et étroitement liée à la production d'acide indol-pyruvique, après ensemencement des souches dans un milieu synthétique urée - tryptophane et incubation à 28°C pendant 3 jours a fin d'assurer une meilleure activité de désamination du tryptophane chez les *Rhizobium* (Sridevi et Mallaiah, 2007), en suite en ajoute 2 à 3 goutte du réactif (TDA). Le précipité brun foncé, à distinguer de la couleur du réactif, montre la présence d'acide indol-pyruvique (TDA⁺). L'absence de coloration marron montre l'absence de l'acide indol-pyruvique (TDA⁻).

2-5-6- Tryptophanase

La Tryptophanase est un complexe multienzymatique permettant aux microorganismes de produire de l'indole à partir du tryptophane. Le composé formé est apolaire, donc plutôt soluble dans des solvants, et réagit fortement avec le diméthyl-4-amino-benzaldéhyde en milieu acide pour donner un complexe coloré en rouge. Après addition au milieu incubé du réactif en solution dans du pentan-1-ol qui extrait l'indole produit, une réaction positif se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge, la coloration étant rassemblée dans la phase organique superficielle. Ce réactif complet porte le nom de réactif de Kovacs. Donc après l'addition de 2 à 3 gouttes du réactif, la formation d'un anneau rouge se traduit par la présence d'indole (indole⁺) et l'absence de la coloration rouge et la formation d'un anneau jaunâtre se traduit par l'absence de production d'indole (indole⁻) (Joffin et Leyral, 2001).

2-6- Tests physiologique

2-6-1- Tolérance au NaCl

Le milieu utilisé pour réaliser se test est le YMB additionné avec différentes concentrations de NaCl : 0.5%(85.5mM), 1%(171mM), 2%(342mM), 3%(513mM), 5%(855mM), 10%(1710mM). Les Tubes sont incubés à 28 °C pendant 24 heures sous faible agitation suivi d'une lecture du taux de croissance à 600nm.

2-6-2- Température de croissance

L'ensemble des souches sont cultivées sur YMA et incubées aux températures suivantes: 4 °C,20 °C,28 °C,37 °C,45 °C,50 °C. Les lectures sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation. Pour la température 4°C la lecture peut se prolonger jusqu'à 10 jours pour les autres températures testées.

2-6-3- Effet de pH

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide YMB aux différents pH : 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8,8.5, 9,9.5, 10. Puis Incubées à 28 °C pendant 24 heures sous faible agitation suivi d'une lecture du taux de croissance à 600nm.

2-7- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

2-7-1- Métaux lourds

Les souches sont cultivées sur le milieu TYA contenant différentes concentrations de métaux lourds dans le but de déterminer la concentration inhibitrice. Puis incubation des boites à 28°C jusqu'à 7 jours. Les métaux lourds utilisés sont : HgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, Pb (CH₃COO)₂ et SbO₃ de 0,5 à 6000µg/mL de TYA.

2-7-2- Résistances aux antibiotiques

Préparation des solutions stock d'antibiotique

La solution stock est préparée en dissolvant 1g d'antibiotique dans 100 mL de solvant correspondant (tableau 03), les solutions préparées sont stérilisées par filtration (0.22µm).

Le test est réalisé en ajoutant la quantité désirée d'antibiotique au milieu de culture TYA refroidi à environ 45°C. L'incubation varie de 1 à 7 jours selon l'antibiotique.

Les antibiotiques utilisés sont : spectynomycine, érythromycine, rifampicine, gentamycine, streptomycine, Kanamycine, chloramphénicol, acide nalidixique de 0.5 à 5000µg/mL de TYA.

Tableau 03 : Les solvants des antibiotiques utilisés (Somasegaran et Hoben ,1994)

Antibiotiques	Solvants
Spectynomycine	Eau distillée
Erythromycine	Ethanol 95%
Rifampicine	Ethanol 95%
Gentamycine	Eau distillée
Streptomycine	Eau distillée
Kanamycine	Eau distillée
Chloramphénicol	Ethanol 95%

2-8- Méthode de la taxonomie numérique

L'analyse numérique englobe la comparaison des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques entre les souches prises deux à deux. Cette méthode d'analyse a été utilisée comme une première méthode de caractérisation et de regroupement de différentes souches non encore identifiées (Zhang *et al.*, 1991).

Il a été rapporté que l'analyse numérique ne peut être valable que sur une base comparative d'au moins 50 caractères relatifs aux souches (Sneath, 1984). Cette marge n'était pas toujours respectée. C'est le cas dans l'étude qui a été menée par Schlinkert-Miller et Pepper (1988) pour la description de quelques symbiotes à croissance rapide de lupin. Il est également recommandé que la caractérisation phénotypique soit effectuée sous des conditions standardisées afin que la comparaison

avec les souches de référence ou même entre les souches de différents laboratoires soit applicable (Martinez-Romero *et al.*, 1991).

La présente analyse menée pour l'étude des isolats et les souches de référence est basée sur 69 caractères phénotypiques. Tous les résultats des caractères phénotypiques utilisés pour cette approche doivent être transformés en une forme numérique compatible avec le logiciel XLStat version 2014, de tel sorte que les résultats positifs sont codés par le chiffre (1), et les négatifs par (0). Pour les D.O. inférieurs à (0,100) sont marqués par un zéro (0) et celles qui sont supérieures sont marqués par un (1). Le seuil de densité optique 0.100 est choisi, car il nous vérifie la bonne croissance de l'inoculum (DO = 0.1, estimée à 10^6 cell/mL).

2-9- Détermination du profil protéique par SDS-PAGE

La cellule bactérienne contient plus de 2000 protéines différentes ; ce qui est considérée comme source importante d'information pour la caractérisation et l'identification et donc la connaissance de la position taxonomique d'un organisme bactérien (Ndiaye *et al.*, 2002).

L'électrophorèse est la migration des molécules chargées en solution sous l'influence d'un champ électrique. La vitesse de migration des molécules dépend de la force du champ qui agit sur la charge, la taille et la forme des molécules ainsi que la concentration ionique, la viscosité et la température du milieu dans lequel les molécules se déplacent. Les protéines sont des composés amphotères ; leur charge est déterminée par le pH de la solution ; Donc à un pH donné et dans des conditions non dénaturantes la séparation électrophorétique des protéines est déterminées par la taille et la charge des molécules (Coyne *et al.*, 2002).

2-9-1- Principe de séparation des protéines sur gels en système discontinu

Le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) est un détergent anionique qui dénature les protéines et confère une charge négative au polypeptide proportionnellement à sa longueur. Les complexes SDS-protéines qui se forment sont chargés négativement à pH 7 et toutes les protéines possèdent la même densité de charge. Donc, dans des conditions dénaturantes de SDS-PAGE, la migration est déterminée non pas par la charge intrinsèque du polypeptide mais par le poids moléculaire (Coyne *et al.*, 2002).

En haut du gel de séparation, se trouve une bande plus petite d'acrylamide de composition différente appelé gel de concentration. Alors que le gel de séparation a de petits pores et un pH de 8,8,

le gel de concentration a des pores plus grands et un pH de 6,8. De plus, les ions des deux gels au moment du dépôt des protéines sont des ions chlorure alors que ceux du tompon sont des ions glycine. Les ions glycine qui entrent dans le gel de concentration à pH 6,8 sont près de leur point isoélectrique et ont une très faible mobilité. Les ions chlorure eux, conservent une grande mobilité. Les protéines chargées par le SDS sont plus lentes que le chlorure mais plus rapide que la glycine.

Quand le front d'ions atteint la discontinuité du pH et de porosité entre le gel de concentration et le gel de séparation, le pH soudain plus élevé permet aux ions glycine de prendre de la vitesse dans leur déplacement. Ils deviennent plus chargés et rapides et dépassent les protéines formant ainsi un champ de contre courant. Maintenant, qu'il y a assez d'électrolytes en avant d'elle, les protéines peuvent migrer librement en fonction de leur masse (Roth, 1994).

2-9-2- Protocole

Il s'agit d'une électrophorèse monodimensionnelle en présence de Sodium Dodécyl Sulfate sur gel verticale de polyacrylamide (SDS-PAGE) en système discontinu, selon la méthode de Laemmli (1970).

(i) Préparation des extraits protéiques

Une aliquote de 100 µl de chaque culture bactérienne, en phase de croissance exponentielle en milieu TY, est centrifugée à une vitesse de 7000 tours/min pendant 15 minutes à 4°C, puis le culot est suspendu dans 50 µl de tampon de lyse et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec un T = 12,52%, et un C = 0,97%.

- Tampon de lyse :

Tris	25 mM
Glycerol	192 mM
SDS	2,5%
Dithiothreitol (DTT)	1%
Bleu de Bromophenol	5 mg
Eau distillée	200 mL

Dans la préparation des échantillons après addition du SDS et DTT (Dithiothreitol), la solution est portée au bain-marie bouillant pendant 3 minutes pour assurer une dénaturation complète des protéines. Cette étape est nécessaire pour la rupture des ponts disulfure.

(ii) Préparation des solutions stocks (Solutions mères)

- Solution D'acrylamide

Acrylamide 30%	60g
Bis acrylamide 0,8%	1,6g
H ₂ O	QSP 200mL

- Tampon de resolving: Tris-Hcl 3M pH 8,8

Tris 3M	72,7g
SDS 0,8%	1,6g
DTT 0,2%	0,8mL
H ₂ O	QSP 200mL

Ajuster le pH 8,8 avec Hcl

- Tampon stacking: Tris Hcl 0,5M pH 6,8

Tris 0,5M	12,1g
SDS 0,4%	0,8g
DTT 0,2%	400 µl
H ₂ O	QSP 200mL

Ajuster le pH 8,8 avec Hcl

(iii) Préparation des gels

- Gel de séparation (resolving gel) avec T = 12,52% , C = 0,97%.

Solution d'acrylamide	10,4 mL
Tampon resolving	3,14 mL
Tetraméthylènediamine (TEMED)	12,5 µl
Ammoniumperoxodisulfate (APS)	140 µl
H ₂ O	QSP 25 mL

- Gel de concentration (stacking gel) avec T = 2,82%, C = 1,42%.

Solution d'acrylamide	5 mL
Tampon stacking	5 mL
TEMED	20 µl
APS 15%	200 µl
H ₂ O	QSP 20mL

(iv) Préparation tampon de migration pH 8,3

Tris	0,025M	1,06g
Glycine	0,192M	5,04g
SDS	0,1%	0,35g
DTT	0,05%	175 µl
H ₂ O		QSP 350mL

2-9-3- Montage des plaques

Monter les plaque dans le couleur (Plaque + Espacer de chaque côté + Plaques en verre + intercalaire en plastique).

- Couler le gel de séparation et recouvrir d'eau et butanol
- Retirer l'eau et l'alcool et couler le gel de concentration
- Placer rapidement les peignes avant la polymérisation du gel
- Laisser polymériser, retirer délicatement les peignes pour ne pas abîmer les puits formés dans le gel.
- Placer les plaques dans l'appareil à électrophorèse et remplir les cuves avec le tampon de migration.

2-9-4- Dépôts des échantillons protéiques et migration électrophorétique

Remplir les puit par le tampon de migration, et à l'aide d'une seringue Hamilton de 100µl déposer 20 µl de chaque échantillon protéique dans les puits. La migration électrophorétique est réalisée en appliquant un ampérage constant de 40 mA par plaque et un voltage de départ de 120V qui atteint à la fin de la migration la valeur de 280V. La durée de migration arrive jusqu'à cinq Heures, et elle est stoppée lorsque le front de migration formé par l'indicateur bleu de Bromophenol arrive à 3-4 mm de l'extrémité inférieur du gel.

2-9-5- Révélation des bandes protéiques

Après migration, le gel est démoulé, le gel de concentration est écarté, et donc le gel de séparation est mis dans un récipient contenant la solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation.

La décoloration est effectuée en remplaçant la solution de coloration par l'eau distillée jusqu'à la décoloration complète du gel et l'apparition nette des bandes protéiques.

2-10- Authentification des isolats

Cette approche nous permet d'identifier la capacité infective de nos isolats en mettant en évidence leur aptitude à former des nodules avec leur hôte respective. Le recours au test de nodulation sur jarres de Léonard décrit par Vincent, 1970 est recommandable.

2-10-1- Préparation des jarres de Léonard

Des bouteilles en plastique sont coupées latéralement en deux parties. Ces jarres sont stérilisées sous les hottes à flux laminaire par l'hypochlorite de sodium concentré laissées séchées sous la hotte à flux laminaire. La partie supérieure de chaque jarre est remplie d'un mélange de sable et vermiculite humidifié avec la solution nutritive de Fähreus (Annexe 01) et préalablement stérilisé à l'autoclave. La partie inférieure du dispositif est remplie de solution nutritive. Les deux parties de la jarre sont reliées par un cordon de compresse ce qui permet d'alimenter en continu, par capillarité, la partie supérieure en solution nutritive (figure 18).

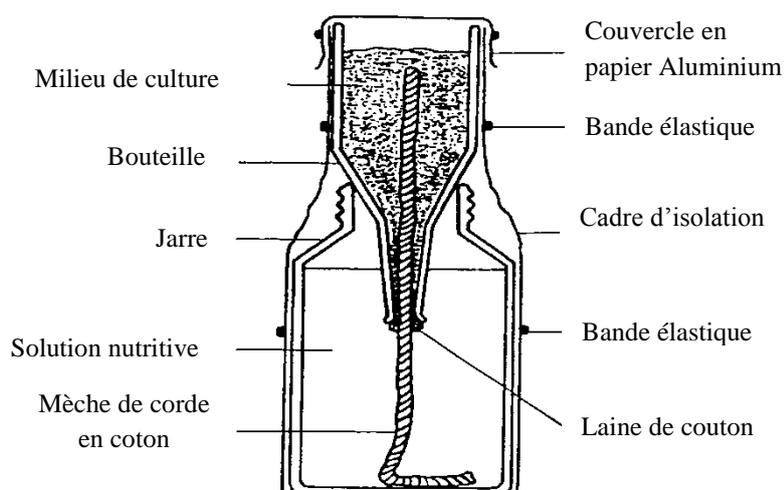


Figure 18 : Assemblage de jarre de Léonard (Vincent, 1970)

2-10-2 - Stérilisation des graines

Les graines sont stérilisées à l'éthanol 95% pendant 10 secondes, puis ils subissent une scarification à l'aide de l'acide sulfurique concentré six minutes pour les graines d'*Argyrolobium uniflorum*, quinze minutes pour les graines de *Genista microcephala*, et enfin rincées 10 fois avec l'eau distillée stérile. On laisse imbiber dans le dernier rinçage pendant 2 à 3 heures.

Les graines stériles sont mises en germination sur des boîtes de TYA (Beringer, 1974), puis sont enveloppées avec du papier aluminium et mises à germer à l'obscurité pendant 3 à 7 jours. (figure 19)

2-10-3- Inoculation des jarres

Après germination, les graines germées sont placées dans le mélange sable vermiculite dans la partie supérieur des jarres à raison de 2 à 3 graines par jarre, puis inoculées immédiatement avec 1mL d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance.

Enfin les jarres, sont couvertes du papier aluminium pendant les premières 24 heures d'inoculation et placées dans une chambre de croissance à température ambiante équipée d'un système de lumière discontinue 8h/16h pendant huit semaines (figure 20), les plantes sont récoltées, les racines sont rincées afin d'observer le résultat de la nodulation.



Figure 19: Germination des graines sur TYA

a : Gousses de *Genista microcephala*, b : Gousses d'*Argyrolobium uniflorum*,

c : Graines germées sur TYA

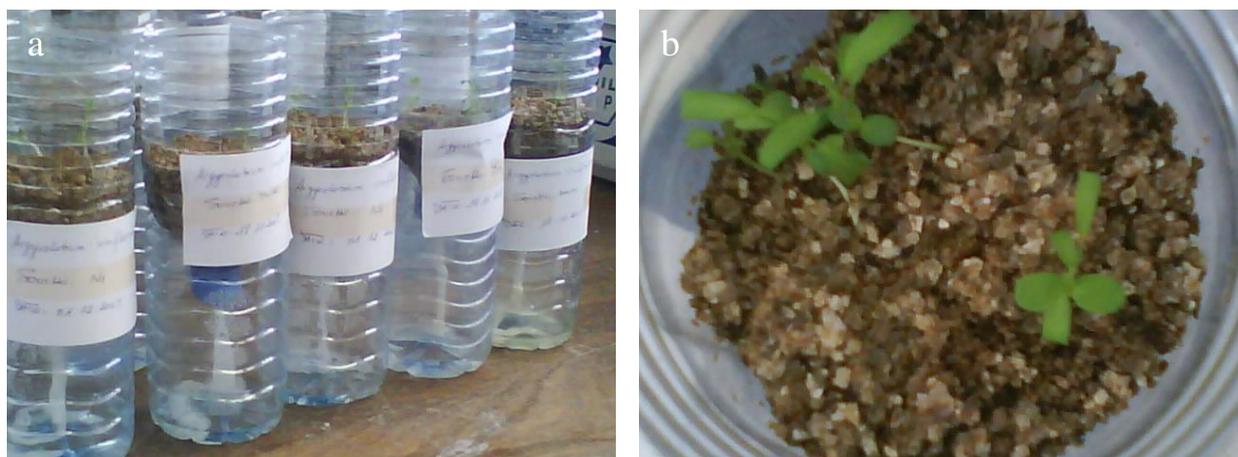


Figure 20 : Jarres placées dans la chambre de culture

(a) Jarres placées dans la chambre de culture

(b) Développement des plantules après 10 jours de l'inoculation.

2-11- Analyse statistique

Les Caractéristiques phénotypiques et les traces densitométriques normalisées des modèles électrophorétiques des protéines ont été regroupés en utilisant la classification hiérarchique ascendante (AHC) (Sneath *et al.*, 1973). Les résultats de la caractérisation phénotypique a été convertie en un ensemble de données binaires, qui a été utilisé pour estimer la similitude de coefficient de correspondance simple de chaque paire de contraintes et générer une matrice de similarité. Toutes les analyses de données ont été effectuées en utilisant le logiciel statistique XLStat version 2014 (www.xlstat.com).

3- Caractérisation polyphasique des bactéries nodulant *G. cinerea*

3-1- Authentification des isolats

3-1-1- Désinfection et mise en germination des graines

Les graines (figure 21) sont stérilisées à l'éthanol 95% pendant 10sec , puis transférées immédiatement dans l'acide sulfurique pendant 3 min suivi d'un rinçage avec de l'eau distillée stérile pour 10 reprise et ont laissé les graines s'imbiber dans le dernier rinçage pendant 1h (Vincent, 1970), (Somasegaran et Hoben, 1994) . Les graines stérilisés sont mises en germination sur une boîte de pétrie contenant du YMA et dans des flacons contenant le milieu Fahræus (Annexe).



Figure 21 : Gousses et graines de *Génista Cinérea* (a) les gousses, (b) les graines

3-1-2- Inoculation

Les graines germées sur la boîte de pétrie sont placées dans les flacons contenant le milieu Fahræus solide à raison de 3 à 4 graines par flacon (figure 22). Puis les flacons sont couverts par du papier aluminium et placées dans la chambre de culture (phytotron). Après une semaine les flacons sont inoculés par 1mL de suspension bactérienne YMB en phase exponentiel de croissance assurant ainsi 10^6 cell/mL.

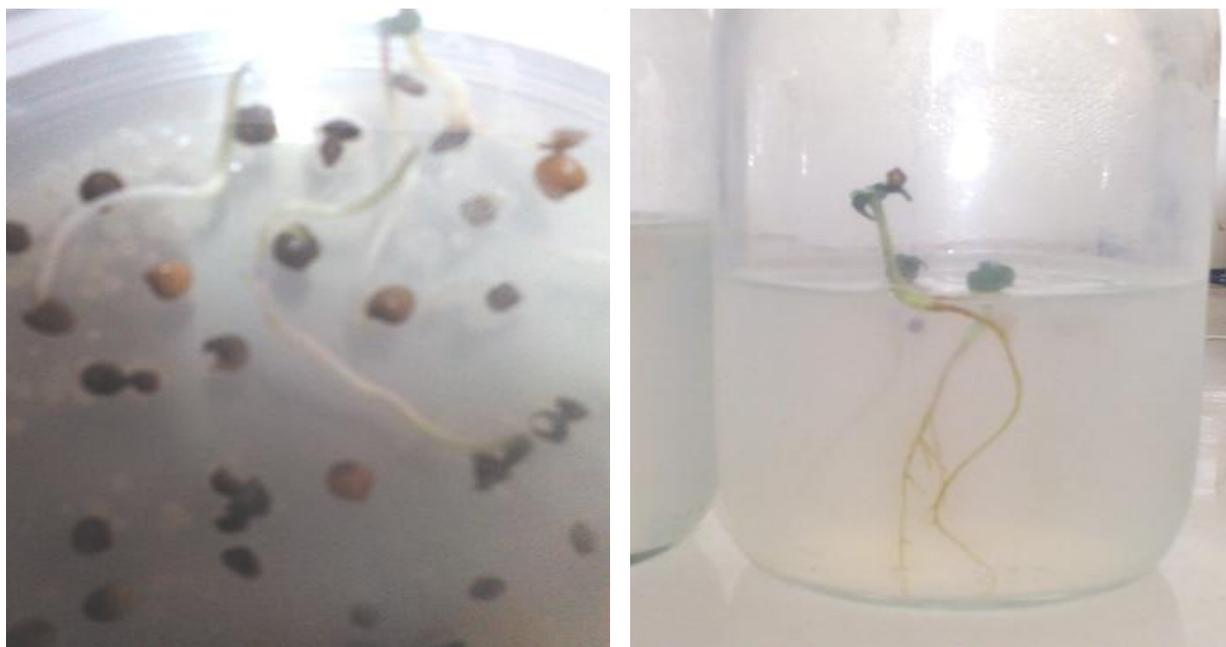


Figure 22 : Les graines germées sur la boîte de pétrie sont placées dans les flacons contenant le milieu Fahraeus solide à raison de 3 à 4 graines par flacon

3-2- Caractérisation phénotypique des isolats

Les isolats purs ont été caractérisés en fonction de leurs caractères morphologiques et nutritionnels en utilisant des méthodes standard (Somasegaran et Hoben, 1994). À des fins de comparaison, cinq souches de référence (SR) ont été utilisées avec des isolats de l'étude actuelle (tableau 1). Tous les SR ont été obtenus auprès du Département de Microbiologie, Faculté des Sciences Nature et de la Vie, Université de Constantine 1 (Algérie). Ces souches de référence ont été isolées à l'origine à partir de nodosités racinaires de plantes légumineuses (Fabaceae) poussant dans des conditions écologiques similaires au nord de l'Algérie (Benguedouar *et al.*, 1997, Benhizia *et al.*, 2004, Torrche *et al.*, 2010).

3-2-1 Caractères cultureux et morphologiques des isolats

Les caractères cultureux des isolats étudiés ont été réalisées sur YMA et YMA avec 0,25% de rouge Congo (YMA-RC) en utilisant des méthodes standard (Vincent, 1970).

3-2-2- Caractéristiques physiologiques des isolats

La température de croissance maximale à 4, 30, 37, 44 et 55 ° C a été évaluée sur YMA. La tolérance aux différentes concentrations en NaCl et la croissance dans des conditions acides et basiques ont été testées dans le (YMB) ajusté et tamponné (le pH variait entre 2 et 10). Les résultats de croissance ont été enregistrés en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm après 24 heures

d'incubation à 28 ° C. Les niveaux de salinité considérés dans cette étude étaient de 2, 4, 6, 8 et 10%. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque isolat et souche de référence.

3-2-3- Assimilation des carbohydrates et utilisation des sources de Nitrogène

Le criblage d'assimilation des glucides a été réalisé en utilisant cinq substrats comme seule source de carbone (1% p / v: fructose, glucose, lactose, galactose et xylose) sur YMB modifié où l'extrait de levure a été remplacé par NH₄Cl à 0,1% (p / v) le mannitol par l'hydrate de carbone cible (Vandamme *et al.*, 1996). L'assimilation de l'azote des isolats et des souches de référence a été déterminée sur un milieu chimiquement défini 8 (Vincent, 1970), où le glutamate de sodium a été remplacé par un des acides aminés suivants à 0,1% (alanine, proline, isoleucine, leucine et cystéine). Les résultats ont été enregistrés en mesurant la densité optique à 600 nm après 24 heures d'incubation à 28 ° C.

3-2-4- Analyse statistique

Utilisant des données avec des réplifications de chaque test de caractérisation phénotypique, l'influence de chaque paramètre de croissance du milieu sur la variation de la densité optique des isolats a été étudiée séparément en utilisant un MCMCglmm. Le MCMCglmm est un échantillonneur Markov chaîne Monte Carlo pour modèles mixtes linéaires généralisés multivariés (GLMM) avec un accent particulier sur les effets aléatoires corrélés. Ce type de modèle est basé sur le Markov chaîne Monte Carlo bayésé (MCMC) au lieu du maximum de vraisemblance (ML) ou du maximum de vraisemblance restreint (REML) (Hadfield, 2010, Hadfield et Nakagawa, 2010). Chaque MCMCglmm comportait comme variables explicatives des «effets fixes» du paramètre de croissance en question d'une part et des isolats de *G. cinerea* et souches de références (SR) d'autre part. La souche de référence A6 (*Rhizobium sllae*) a été implantée dans l'interception de chaque modèle pour examiner la variation des croissances isolées par rapport à cette SR. La variable dépendante «densité optique» a été ajustée à une famille «gaussienne» de MCMCglmm, alors que la forme du nodule a été insérée comme un effet aléatoire dans le modèle. Les formes des nodules ont été considérées comme des pseudo-réplifications (Bolker *et al.*, 2009) puisque des isolements répétés de bactéries nodulant les légumineuse (BNL) ont été effectués et plusieurs isolats du même nodule ont ensuite été criblés.

Pour chaque test de caractérisation, deux MCMCglmm ont été réalisés sur la base de l'interaction ou non entre le paramètre de croissance de l'essai et les isolats. Ensuite, le critère d'information de déviance (DIC) a été utilisé pour sélectionner le modèle final avec le meilleur ajustement. Le DIC est une généralisation hiérarchique de la modélisation du critère d'information Akaike (AIC) et du critère d'information bayésé (BIC). Il est particulièrement utile dans les problèmes

liés à la sélection des modèles bayésés où les distributions a posteriori des modèles sont obtenues par la simulation Markov chaîne Monte Carlo (Spiegelhalter *et al.*, 2014). La modélisation statistique a été réalisée en utilisant le package {MCMCglmm} (Hadfield, 2010), et le package {ggplot2} (Chang, 2013) a été utilisé pour tracer des graphiques. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide de la version 3.3.2 du logiciel R (R Core Team, 2016).

Séparément pour chaque test phénotypique (pH, salinité, assimilation du carbone et de l'azote), les isolats étudiés et SR ont été regroupés en utilisant la classification hiérarchique agglomérative (AHC). L'AHC a été réalisée en utilisant la matrice des corrélations de Pearson entre les croissances de toutes les BLN étudiées et avec une liaison complète comme méthode d'agglomération. Le calcul et la visualisation des matrices de corrélation ont été effectués en utilisant le paquet R {corrplot} (Wei et Simko, 2017). En outre, et en utilisant simultanément les données de tous les tests phénotypiques, les différences de croissance entre les isolats d'étude et SR ont été testées en utilisant l'analyse factorielle multiple (MFA) afin d'analyser simultanément les effets des paramètres de croissance sur les BNL. les différences et / ou les similarités entre ces BNL (Bensizerara *et al.*, 2013). AHC et MFA ont été réalisées en utilisant le logiciel statistique XLStat version 2014 (www.xlstat.com).

3-3- Caractérisation génotypique par 16S rRNA des bactéries associées au *G. cinerea*

3-3-1- Culture et Lyse de Colonies Bactériennes et Purification de l'ADN génomique total

(i) Lyse de la paroi cellulaire

Les Souches ont été repiquées sur Boîtes de Pétri YMA, et mises en culture à 30°C, en étuve. Après observation d'une belle pousse des bactéries, une ose est utilisée pour récolter un culot de biomasse bactérienne, mise en tubes de 2 mL dans 500µl de Tampon de Lyse (100µl Tris-Hcl [10mM, pH 8,3]).

La lyse est réalisée dans le Tampon de lyse plus l'ajout de Protéinase K (20µl), à 50°C durant 6 heures sous agitation (1400 rpm), pour détruire les parois bactériennes. Ajout de (20µl de SDS 10%) pour précipitation des débris cellulaires et des protéines du lysat suivi d'une centrifugation à 12 000 rpm pendant 5 minutes pour culoter les débris cellulaires et les amas protéiques, le surnageant qui correspond à l'ADN et récupérer dans des tubes Eppendorf de capacité de 2 mL.

(ii) Précipitation des protéines et récupération de l'ADN

La Purification de l'ADN par précipitation avec 1 Volume de solution Polyéthylène glycol, après incubation de 20 mn à +4°C et une re-suspension dans 100µl de Tampon TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM) suivi d'une deuxième purification par extraction Phénol/Chloroforme (1Vol/1Vol), puis précipitation à l'Isopropanol (0,7 Vol). Enfin rinçage du culot à l'éthanol 70° et re-suspension des culots dans 100µl de Tampon TE une nuit, avant d'utiliser 2µl pour réaliser la PCR 16S.

3-3-2- Amplification de l'ADN 16S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification du gène 16S DNA est réalisée en utilisant Mix HotStart HOTBIOAmp (ADNg, 2µl ; Mix HOTBIOAmp à 12.5mM MgCl₂, 6µl ; Enhancer, 2µl ; H₂O qsp 30µl, 18µl) en présence des deux amorces 27 f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et 1492 r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

L'amplification par PCR repose sur une **dénaturation initiale** à 96°C 12 min suivie par 35 cycles de **dénaturation** à 96°C pendant 20secondes, **hybridation des amorces** à 55°C pendant 30sec, **extension** à 72°C durant 1 minute 30sec, **polymérisation finale** 72°C durant 10 minute

Le Contrôle qualité des produits PCR se fait par électrophorèse sur QIAXCEL pour validation de la qualité et de la quantité de produit PCR (Une seule bande bien spécifique de taille identique à la taille attendue : environ 1460 pb pour le gène 16S) (Figure 23).

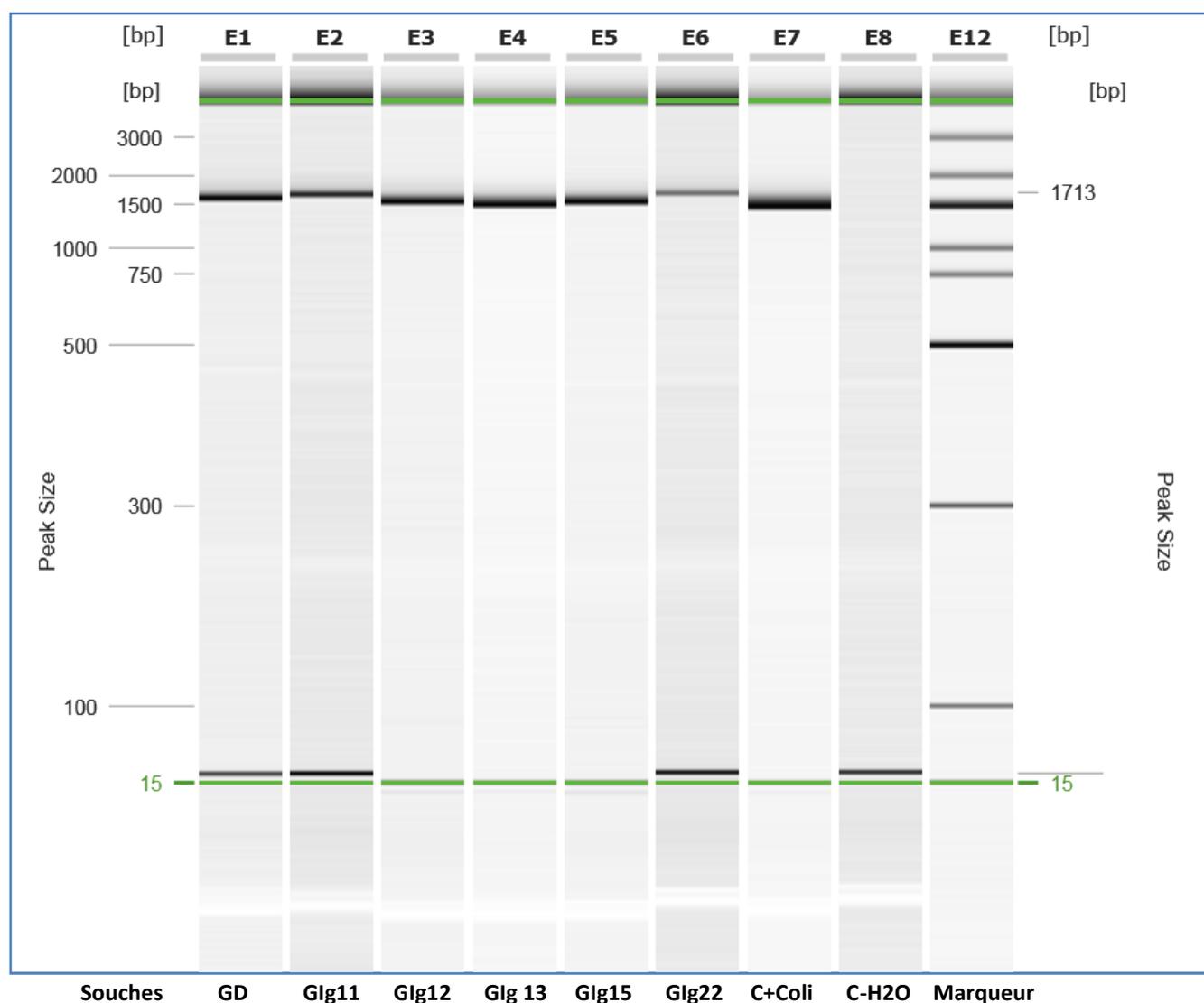


Figure 23 : Analyse de la qualité et de la quantité de produit PCR 16S rRNA au QIAXCEL

3-3-3- Séquençage Sanger des produits PCR du gène 16S rRNA

Purification des produits PCRs avant séquençage par la méthode Exosap-It (Applied biosystems) ce Séquençage est réalisé avec le kit BigDye V3.1 Dye Terminator Kit (Thermo Fisher Scientific). Les réactions de séquence ont ensuite été purifiées avec le kit BigDyeXterminator (Thermo Fisher Scientific) puis Les séquences sont analysées sur un Séquenceur 96 capillaires ABI3730XL (Thermo Fisher Scientific). La vérification de la qualité des Séquences est réalisée par alignement avec le logiciel CHROMAS Pro (Technelysium Ltd) pour créer le Contig Complet du gène 16S rDNA.

Les matrices de distance ont été générées comme décrit par Jukes et Cantor (1969) et les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le voisinage méthode Saitou et Nei (1987). Les topologies ont été évaluées par échantillonnage bootstrap exprimé en pourcentage de 1000 répétitions (Felsenstein, 1985).

L'analyse phylogénétique est réalisée en utilisant MEGA software version 6 (Thompson *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 2013) Comparant les séquences correspondantes à des espèces représentatives récupérées à partir des bases de données GenBank et du serveur EzTaxon (Kim *et al.*, 2012).

Chapitre III :

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1- Caractérisation phénotypique des isolats des légumineuses *Genista microcephala* et *A. uniflorum*

1-1- Caractères cultureux

La croissance sur YMA-rouge Congo les colonies montrent des différences dans leurs absorbances du rouge Congo on trouve celles qui ne l'absorbent pas et garde leur couleur blanchâtre, ou l'absorbent faiblement. Ceci qui corrobore avec les résultats obtenus sur les souches Gammaproteobacteria (Benhizia, 2004)

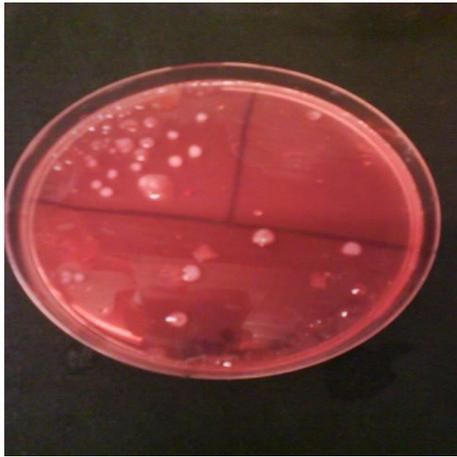
Les colonies apparaissent sur milieu YMA au bout de 24 heures et se distingue par une production de poly β -hydroxybutyrate (PHB). Elles ont une couleur blanche ou crème, forme homogène et un aspect lisse brillant avec une texture translucide. La vitesse de croissance des isolats est en accord avec celles démontrés par Ndiaye, 2002 en étudiant les souches de *Rhizobium nodulant* l'espèce *Acacia raddiana*.

L'absence du virage de la couleur du milieu GPA au Bromocrésol pourpre vers le jaune (non modification du pH du milieu) ainsi que la vitesse de croissance et l'acidification du milieu YMA-BTB provoquer par l'ensemble des isolats étudiés ce qui prouve que nos isolats ont une croissance rapide.

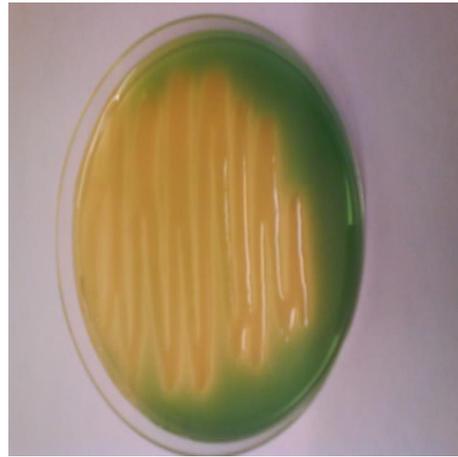
Les réactions enregistrées par les isolats sur ces différents milieux est semblables à celles avancées par Jordan, (1984) et Beck *et al.* (1993). Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (figure 24).

L'examen microscopique des cellules bactériennes donne des bactéries de forme de bacille Gram négatif et de différentes tailles (figure 24).

Les caractères cultureux affichés par l'ensemble des isolats les rapprochent d'avantage des caractères morphologiques, l'aspect des colonies et la forme et la coloration Gram des cellules bactérienne des Rhizobia.



YMARC



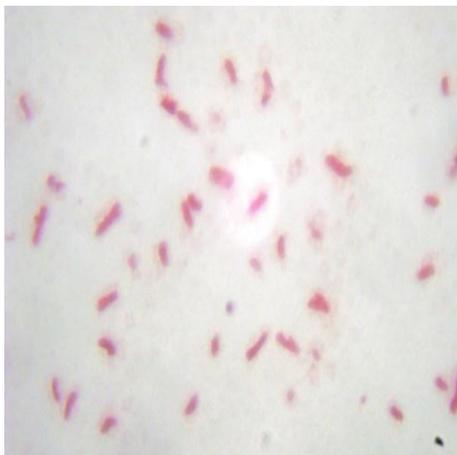
YMA BTB après 24 h d'incubation



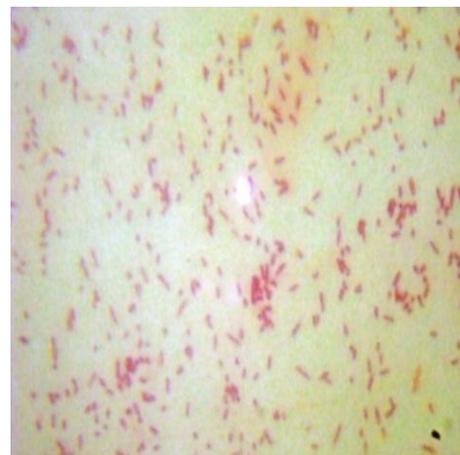
YMA



GPA BCP



Coloration Gram isolat M



Coloration Gram isolat AN123'

Figure 24 : Caractères cultureux et examen microscopique par la coloration de Gram

1-2- Caractérisation phénotypiques des bactéries

1-2-1- Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium*

(i) Test du 3-cétolactose

Après l'addition de réactif de Benedict, les isolats (A,E) ont montré la formation d'un halo jaune autour des colonies (figure 25) qui est expliqué par la production de la 3-cétoglucosidase suite à l'oxydation du C₃ du glucosyl des saccharides, ce résultat est réconforté par les travaux de Young *et al.* (2001) en présentant le rapprochement phylogénétique des *Allo Rhizobium* au genre *Agrobactérium*, par contre les isolats (N1,N2,YN12,AN123',AN11',AB2',B3,D,K,F,M) ne présentent pas d'halo jaune autour des colonies donc l'absence de production du 3-cétoglucosidase. La non formation d'halo jaune est consolidée par les travaux de Lambert *et al.* (1990) pour le genre *Phylobactérium*

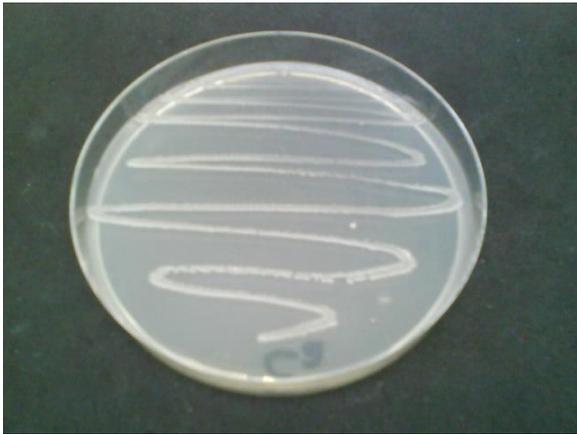
(ii) Précipitation du glycérophosphate de calcium

Les isolats sont cultivés 2 jours à 30°C sur gélose au mannitol et au calcium glycérophosphate, ne donne lieu à aucun brunissement ni à la formation du précipité (figure 25). Les résultats de ce test sont semblable a celle déclaré par Struffi *et al.* (1998) pour les Rhizobia.

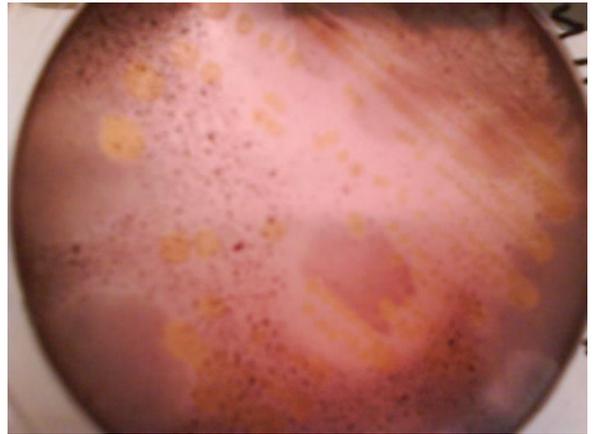
(iii) Croissance sur Litmus milk (Lait tournesolé)

L'ensemble des isolats a montré une croissance lente sur ce milieu, les colonies apparaissent dès la première semaine entourées d'un halo clair (figure 25). Ce comportement est le même décrit par Struffi *et al.* (1998) et Benguedouar (2000) pour les souches de Rhizobia.

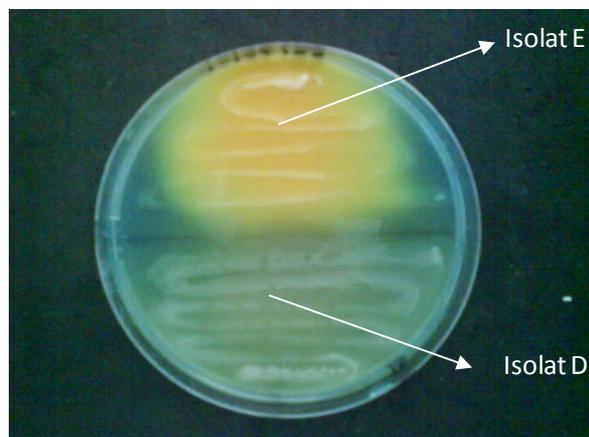
Donc ces testes nous permettent d'avoir une première notion sur la caractérisation et l'identification de nos isolats en leur réservant une place taxonomique parmi les Rhizobia.



Test précipitation du glycérophosphate de calcium



Test Litmus milk



Test du 3-cétolactose

Figure 25 : Figures des trois Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobactérium*

1-3- Tests biochimique (tableau 04)

1-3-1- Réduction des nitrates

Après l'addition de 2 à 3 gouttes des réactifs de nitrates réductase, toutes les souches ont donné une couleur rouge qui confirme la réduction des nitrates en nitrites (figure 26). La réaction peut être rendue négative par la réduction des nitrites formés, il faut donc contrôler la réaction dans l'absence de la coloration en ajoutant un peu de poudre de zinc pour vérifier la persistance des nitrates dans le milieu en les réduisant et changeant la coloration (Guiraud, 1998).

Lucinski *et al.* (2002) montre que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia dont 97% de cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes.

1-3-2- Hydrolyse de l'urée

La capacité de l'hydrolyse de l'urée par les rhizobia à été mis en évidence par les travaux de Jarvis *et al.* (1977) en utilisant le rouge de phénol comme indicateur de pH, le virage de la couleur du rouge vers le jaune indique l'alcalinisation du milieu suite à la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium comme s'est montré dans l'équation (Guiraud, 1998)



Les souches de références et les isolats de notre étude ont une activité uréasique et alcalinisent le milieu de culture (figure 26).

1-3-3- Activité pectinolytique

Après l'ajout du rouge de ruthénium et le rinçage avec l'eau, Un halo clair est installé autour des colonies de l'ensemble des isolats et des souches de références indiquant le pouvoir pectinolytique de nos souches et isolats (figure 26).

Struffi *et al.* (1998) déclarent la présence de deux enzymes endoglucanase et polygalacturonase chez l'espèce *Rhizobium sullae* qui dégradent les ponts glucidiques de la paroi cellulaire.

1-3-4- Activité Cellulolytique

L'ensemble des isolats et la souche de référence A6 : *Rhizobium sllae* apparaissent sur un fond rouge entourés d'un halo jaune orangé ce qui met en évidence leur activité cellulolytique. Par contre les souches HS1, HnA, HP7, HCa1 appartenant aux *Gammaprotéobacteria*, ne présentent pas d'halo qui est expliqué par une activité cellulolytique négative (figure 26).

Les bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hédysarum* laissent apparaître une activité cellulolytique négative (Benhizia, 2004). Par ailleurs Igual *et al.* (2001) confirment la présence de l'activité cellulolytique chez toutes les microsymbiontes appartenant au *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

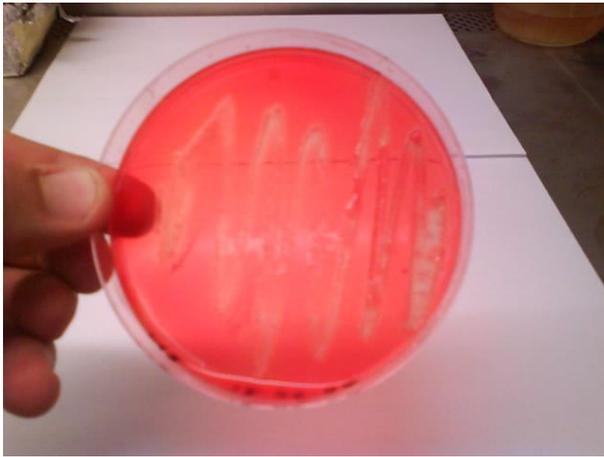
1-3-5- Tryptophane désaminase

La recherche de nouvelle enzyme nous permet de mieux étudier les caractéristiques de nos isolats à fin de bien déterminer leur position taxonomique par apport aux souches de références. Pour ce test les isolats AN123', N1, AB2'et la souche de référence HCa1 sont dépourvus d'enzymes Tryptophane désaminase. Tant disque le reste des souches et isolats étudiés sont productrice d'indole acétique acide et en le pouvoir de désaminé le tryptophane (figure 26).

Les travaux avancés par Sridevi et Mallaiiah, (2007) montre que les *Rhizobium* isolés à partir des nodules *Sesbania procumbens* , *Sesbania rostrata* et *Sesbania procumbens* sont productrice d'indole acétique acide. Cette phytohormone de croissance qui régule la physiologie des plantes, d'où leur appellation de PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria)

1-3-6- Tryptophanase

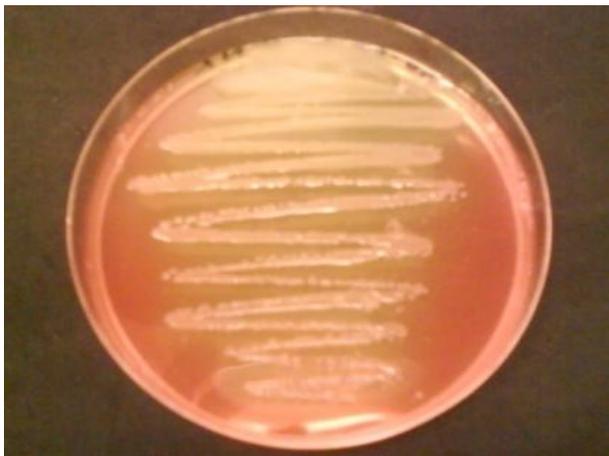
Après l'adition de trois gouttes de réactif de Kovacs on a remarqué la formation d'un anneau jaunâtre justifiant la non production d'indole par nos isolats et les souches de références, qui confirme la non possession des isolats étudiés et les souches de référence de la tryptophanase (figure 26).



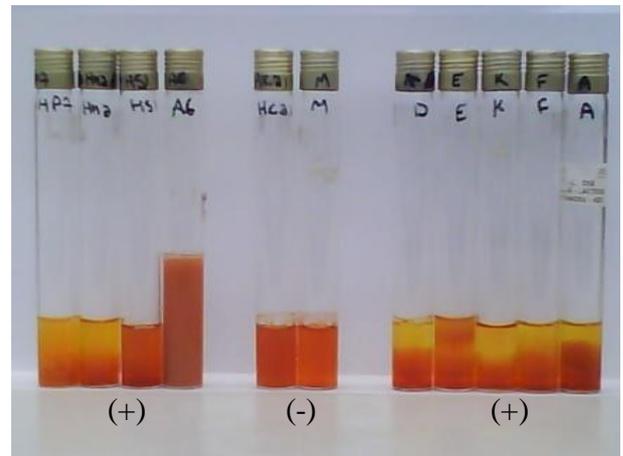
Activité cellulolytique (+)



Activité pectinolytique (+)



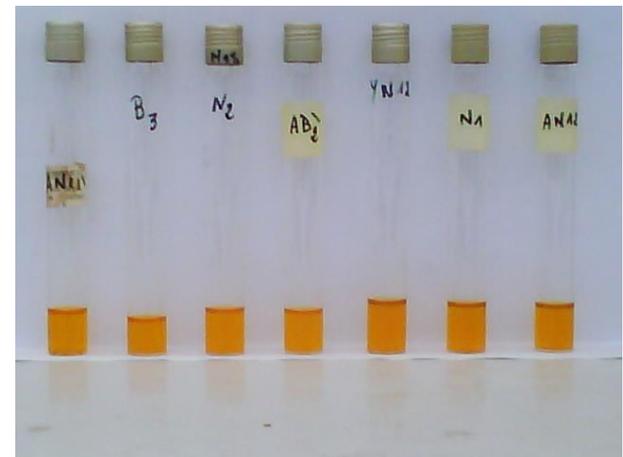
Hydrolyse de l'urée (+)



Tryptophane désaminase



Réduction des nitrates (+)



Tryptophanase (-)

Figure 26 : Résultats de différents tests biochimiques réalisés sur les isolats et les souches de référence

Tableau 04: Activités enzymatiques et tests distinctifs des isolats et les souches de référence. +, croissance ou réaction positive; -, pas de croissance ou réaction négative. TDA, tryptophane désaminase.

Isolats et souches de référence		TDA	Nit	Urease	Cellulase	Tryptophanase	Pectinase	Calcium glycerophosphate	3-ceto lactose	Litmus milk
Souches de référence	Hs1	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	Hp7	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	Hca1	-	+	+	-	-	+	-	-	-
	A6	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	HnA	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Argyrobium uniflorum</i>	N1	-	+	+	+	-	+	-	-	+
	N2	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	YN12	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	AN123'	-	+	+	+	-	+	-	-	+
	AN11'	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	AB2'	-	+	+	+	-	+	-	-	+
	B3	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Genista microcephala</i>	D	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	E	+	+	+	+	-	+	-	+	+
	K	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	F	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	A	+	+	+	+	-	+	-	+	+
	M	+	+	+	+	-	+	-	-	+

1-4- Tests physiologiques

1-4-1- Tolérance au NaCl

Les résultats obtenus, rapportés dans le (tableau 05) montrent que jusqu'à une salinité de 855mM de NaCl, la croissance des souches de référence et de nos isolats n'est pas affectée à l'instar des deux isolats D, E qui ont montré une nette sensibilité a cette même concentration de NaCl. La majorité des isolats et souches de référence demeure osmo-tolérants, bien que la croissance de la totalité des micro-symbiontes étudiés est altérée à 10% (1710mM de NaCl).

Merabet *et al.* (2006) ont mis en évidence *in vitro* une tolérance à une salinité allant jusqu'à 800mM de NaCl, chez des Rhizobia isolés de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymoroha* dans la sebkha de Misserghine (Oran). D'autre part la symbiose *Rhizobium*-légumineuse et la formation des nodules sur les racines des plantes hôtes sont plus sensibles au stress osmotique que leur rhizobia. La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodules ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de la nitrogénase (Zahran, 1999 ; Saadallah *et al.*, 2001).

1-4-2- Température de croissance

Les résultats obtenus (tableau 05), montrent que toutes les souches testées sont capable de croître entre 4°C et 45°C à l'exception des souches YN12, HCa1, HS1 qui n'ont pas pu se développer à la température 45°C et les deux isolats F et A qui n'ont pas poussés à la température 4°C par contre la souches HP7 a pu croître a la température 50°C. Par ailleurs la Température 50°C à inhiber la croissance de l'ensemble des souches étudiées. Ces résultats corroborent la grande variabilité de la thermo-tolérance rapportée chez les diverses espèces et souches de rhizobia. Pour la plupart des Rhizobiums, l'intervalle de température de croissance est situé entre 28°C et 31°C et beaucoup d'entre elles sont capable de croître à 37°C (Zahran, 1999).

Selon Lindstrom et Lehtomaki (1988), la température maximale de croissance serait de 35°C pour *Rhizobium leguminosarum*, 36°C pour *Sinorhizobium fridii*, 37°C pour *Mesorhizobium loti* et *Rhizobium galegae*, 41°C pour *Sinorhizobium meliloti* et de 40°C pour *sinorhizobium medicae*

1-4-3- Effet de pH

Il ressort des résultats obtenus (tableau 05), que l'ensemble des isolats et des souches de références testées est capable de pousser entre pH3.5 et pH10. Donc les souches testées dans cette étude présentent un spectre large de tolérance au pH, puisqu'elles sont capables de croître aussi bien à des pH acides qu'alcalins. Les résultats enregistrés sont en concordance avec celles avancés par Maatallah *et al.* (2002), qui ont aperçu la croissance de leur isolats a des valeurs de pH comprises entre pH4 et pH supérieur à 7.5.

Selon Graham, (1992) les rhizobia à croissance rapide semblent plus sensibles à l'acidité que ne le sont les rhizobia à croissance lente.

1-5- Tests nutritionnels

1-5-1- Source de carbone

les densités optiques enregistrées, nous indique clairement la différence de l'assimilation des sucres par les isolats selon leur partenaire symbiotique. Les isolats issus d'*Argyrolobium uniflorum* montrent une bonne croissance en présence du glucose, maltose, arabinose, fructose et sucrose et un faible développement en présence de raffinose, xylose, lactose et sorbitol. Tant disque les isolats isolés à partir des nodules de *Genista microcephala* ont enregistré les plus faible taux de croissance pour tous les sucres utilisés, en les comparant avec les densités optique enregistrés par les souches de références qui sont bien développées dans la gamme des sucres utilisés.

Toutefois, selon Allen et allen (1950), les rhizobiums différent dans leur aptitude à assimiler les variables sources de carbone.

Cette différence de corrélation vis-à-vis de l'utilisation des sources de carbone, est fortement liée à la description de nouveaux genres de rhizobiums qui s'accompagne par la révélation d'une grande diversité des profils d'utilisation de sources de carbone (Zhang *et al.*, 1991 ; de Lajudie *et al.*, 1994).

1-5-2- Source d'azote

La croissance des isolats et des souches de référence varie d'une source d'azote à une autre, en analysant les D.O. on remarque un bon développement des isolats de *Genista microcephala* et la souche de référence HCa1, HP7 et A6 en présence de la leucine. Par ailleurs les isolats (AB2', B3, AN11', AN123', N2, YN12) issus des nodules d'*Argyrolobium uniflorum* affichent un bon développement en présence de la proline contrairement à la souche N1 qui a montré une croissance appréciable avec la leucine et la thréonine. En contre partie la phénylalanine a réprimé la croissance de l'ensemble des isolats et des souches de référence étudiés, d'autre part l'asparagine ne favorise pas la croissance des souches et isolats et elle a assuré un faible développement des souches (A6, HP7, HS1).

Jordan, (1984) a pu mettre en évidence le pouvoir inhibiteur de croissance des Rhizobia par certains acides aminés, et Struffi *et al.* (1998) ont illustré dans leurs travaux l'inhibition du développement des Rhizobia en présence de la thréonine.

1-5-3- Besoin en vitamines

Les densités optiques révèlent une meilleure utilisation des vitamines testées par les isolats issus d'*Argyrolobium uniflorum*, également pour les isolats A et M issus de *Genista microcephala*. Par contre les isolats D, E, K, F, A affichent les plus faibles taux de croissance pour l'ensemble des vitamines utilisées. En général nous remarquons une bonne utilisation des vitamines testées avec une nette différence de croissance qui se distingue entre les isolats et les souches de références.

Werner (1992) démontre que les besoins en vitamines chez les rhizobia est très variable et qu'en général la croissance des *Bradyrhizobium* est stimulée par la biotine et celle de *Rhizobium* par la thiamine et la pantothénate. Les autres vitamines ne sont pas exigées pour la croissance des rhizobia.

En contre partie la disponibilité de quelques vitamines comme la biotine, thiamine et riboflavine dans la rhizosphère limite la croissance de *Sinorhizobium meliloti* (Karunakara *et al.*, 2006)

Tableau 05 : Caractéristiques phénotypiques des rhizobia isolés et souches de référence

Caracteristiques	<i>A. uniforum</i>							<i>G. microcephala</i>						Souches de Référence					
	AB2'	B3	AN11'	AN123'	N2	N1	YN12	D	E	K	F	A	M	A6	HS1	HnA	HCal	HP7	
Temperature	4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
	28 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	45 °C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
	50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
pH	3.5 -10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
NaCl%	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Source de carbon	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	Raffinose	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
	Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
	Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	
	Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
	Lactose	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	
	Sorbitol	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
	Sacharose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	
Vitamines	PAA	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
	Biotin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
	Perydoxine	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	Thiamine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	Riboflavin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	Panthotenate	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	Nicotinic Ac	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Amino acids	Valine	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Tyrosine	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
	Leucine	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Proline	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
	Threonine	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	Isoleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	Phenylalanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tryptophan	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	Lysine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
	Glycine	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Serine	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Histidine	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
	Arginine	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Methionine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Alanine	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	Asparagine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	Cysteine	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
	Glutamine	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+

PAA:P-aminobenzoic acid.

1-6- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

1-6-1- Résistance aux métaux lourds

Les concentrations minimales obtenues pour la croissance des isolats et des souches de référence, en présence des différentes concentrations des métaux lourds nous indiquent la résistance de ces microsymbiontes aux différents métaux lourds utilisés (tableau 06).

Tous les isolats et les souches de référence résistent à des concentrations très élevées d'antimoine (SbO_3). Alors qu'elles affichent une nette sensibilité au chlorure de mercure ($HgCl_2$).

Struffi *et al.* (1998), ont montré dans leur travaux la résistance du *Rhizobium sultae* au plomb et au cuivre ainsi que leur nette sensibilité au mercure.

Biro *et al.* (1995), déterminent que la sensibilité aux métaux lourds à une importance primaire pour la sélection des isolats qui sont écologiquement divers, et ils ont trouvé une diversité particulièrement élevée chez les isolats de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

D'autre part Gremion, (2003), précise dans ces travaux que les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance qui immobilisent, mobilisent ou transforment les métaux lourds, et donc elles peuvent influencer la solubilité des métaux lourds par l'altération de leurs propriétés chimiques.

1-6-2- Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été étudiée sur milieu TY additionné aux différentes concentrations d'antibiotiques. Les résultats obtenus montrent que les souches étudiées sont résistantes à la spectinomycine et l'érythromycine. La majorité d'entre elles résistent à la gentamycine, par contre les isolats et souches de référence ont montré une sensibilité remarquable aux antibiotiques kanamycine, chloramphénicol, streptomycine, rifampicine (tableau 06).

Les résultats avancés par Maatallah *et al.* (2002), présentent la résistance des souches aux Kanamycine, érythromycine et à l'acide nalidixique. D'autre part Beck *et al.* (1993), insiste sur l'utilisation de la résistance aux antibiotiques dans les études sur les rhizobia en tant que moyen d'identification et comparaison des souches.

Tableau 06 : Concentrations minimales inhibitrice des antibiotiques et des métaux lourds de la croissance des rhizobia isolées.

Origine	Souches	MIC (µg/mL)											
		Spec	Gent	Kan	CHL	Strep	Rif	Ery	SbO ₃	ZnCl ₂	CuCl ₂	HgCl ₂	Pb(CH ₃ COO) ₂
Souches de référence	Hs1	>5000	300	20	100	500	200	>5000	>6000	2750	1500	250	2250
	Hp7	>5000	300	300	100	600	50	>5000	>6000	2500	1500	250	2250
	Hca1	>5000	400	20	100	400	100	>5000	>6000	2250	1500	250	2250
	A6	>5000	1250	600	500	1250	200	>5000	>6000	2750	1500	500	2250
	HnA	>5000	100	20	300	400	50	>5000	>6000	2750	1500	750	2250
<i>A. uniflorum</i>	N1	>5000	800	300	400	600	150	>5000	>10000	2100	1600	750	1700
	N2	>5000	800	300	400	600	50	>5000	>10000	1600	1550	600	1700
	YN12	>5000	1000	300	400	600	150	>5000	>10000	1600	1500	500	1700
	AN123'	>5000	1000	600	400	600	150	>5000	>10000	1800	1550	800	1700
	AN11'	>5000	1200	600	400	600	50	>5000	>10000	2100	1600	800	1700
	AB2'	>5000	1250	300	400	600	150	>5000	>10000	2100	1200	600	1700
	B3	>5000	800	600	400	1000	50	>5000	>10000	1800	1600	300	1700
<i>G. microcephala</i>	D	>5000	1250	600	400	600	200	>5000	>10000	1800	1500	800	1700
	E	>5000	800	600	400	1000	200	>5000	>10000	1600	1050	300	1700
	K	>5000	700	300	400	600	200	>5000	>10000	1600	1500	500	1700
	F	>5000	300	300	300	600	150	>5000	>10000	1600	1500	800	1700
	A	>5000	1200	600	400	600	150	>5000	>10000	1800	1500	1000	1700
	M	>5000	800	600	400	600	150	>5000	>10000	2100	1000	500	1700

(Spect: Spectinomycin; Gent: Gentamicin; Kan: Kanamycin; CHL: Chloramphenicol; Strep: Streptomycin; Rif: Rifampicin; Ery; erythromycin)

1-7- Analyse numérique des caractères phénotypiques

Dans cette étude, treize isolats de rhizobia ont été caractérisés, et 66 caractères phénotypiques ont été inclus pour l'analyse numérique. La classification hiérarchique agglomérative a montré que niveau limite de 62% de similarité moyenne, les isolats testés peuvent être regroupés en deux classes et quatre groupes (figure 27 A). Classe I regroupe tous les isolats de *G. microcephala* (Metlili) formée de groupe I qui est composé de deux isolats (A et F) à 74,22% similarité; Le groupe II est représenté par trois isolats (K, D et E) avec la souche de référence *Enterobacter kobei*. Classe II compilé les six isolats bactériens (AB2, N1', B3, N2, AN11 et YN12') provenant de nodules d' *A. uniflorum* collectés à Bir El-Ater et Negrine.

1-8- Analyse des profils protéiques

L'analyse des profils protéiques (figure 27 B) a montré qu'à 45,61% de similitude, les isolats ont formé trois classes distinctes avec les souches de référence. Le groupe I regroupe un isolat (B3) de *A. uniflorum* (Bir El- Ater) et deux souches de référence (*Pseudomonas sp* KD et *Pantoea agglomerans*). Les deux isolats (K et AN11') de *G. microcephala* et *A. uniflorum* ont été regroupés avec *Pseudomonas sp.* NZ096 et *Rhizobium sullae* à 62,61% et 64,35% de similarité, respectivement (Groupe II). Le groupe III a classé l'isolat (AB2') de *A. uniflorum* (Bir El-Ater) et *Enterobacter kobei* à 62,61%. La comparaison de les profils protéiques totaux obtenus par électrophorèse en présence SDS peut être très standardisé pour regrouper un certain nombre des souches (Carrasco *et al.*, 2005) et les souches ayant des profils protéique avec des électrophérogrammes identiques peut constituer un cluster très homogène avec le plus probable hautes homologues moléculaires internes. En outre, plusieurs études ont révélé une grande similitude entre le contenu protéique et l'hybridation ADN / ADN (Keresters *et al.*, 1994). Cependant, récemment, Benguedouar *et al.* (1997), affirme que l'usage de SDS-PAGE se limite à une identification au niveau de l'espèce.

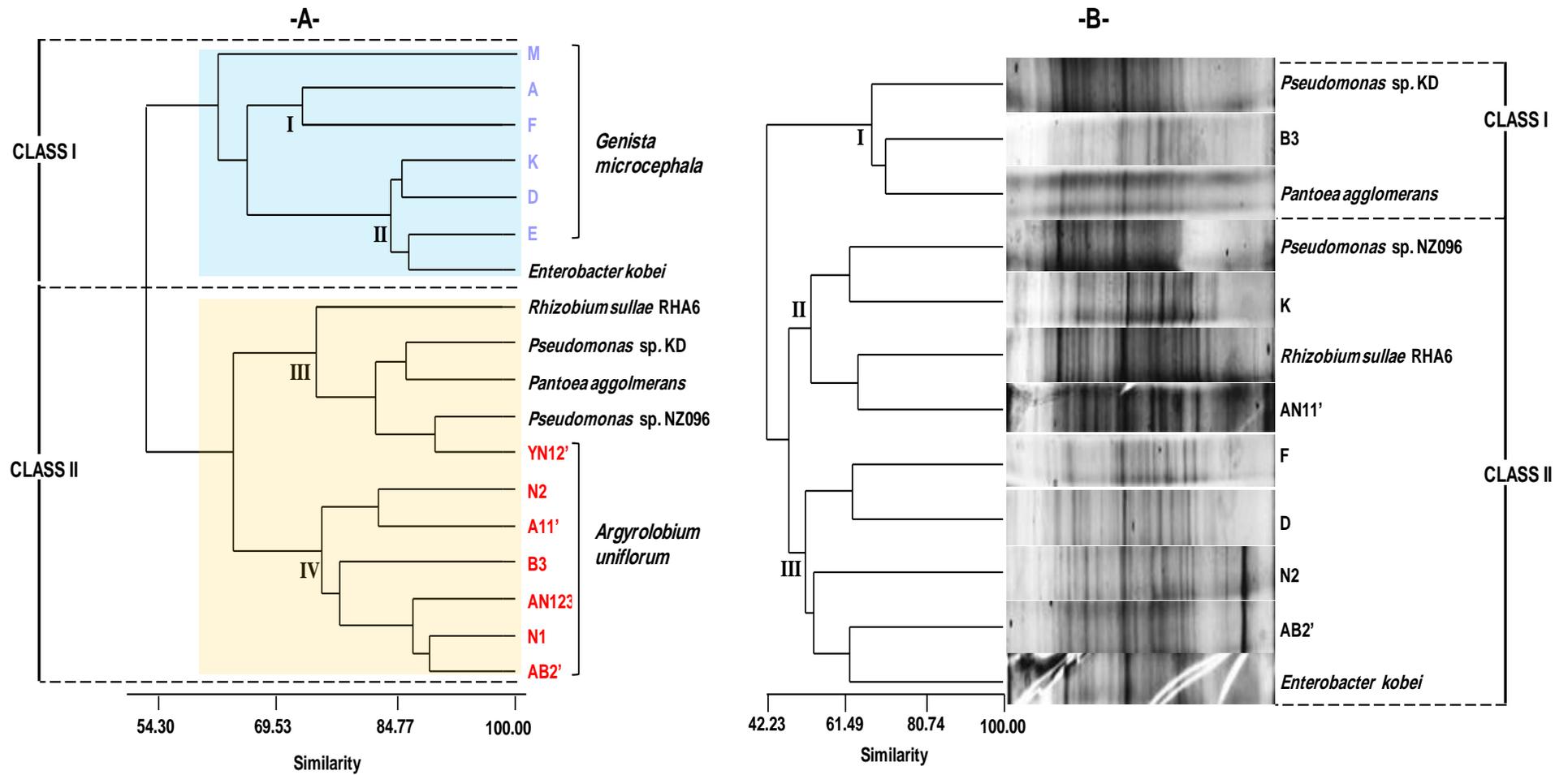


Figure 27: Dendrogramme montrant les relations phénotypiques (A) et les profils normalisés d'électrophorèse sur gel de dodécyl sulfate de sodium-polyacrylamide des souches de rhizobia nodulant *Genista microcephala* et *Argyrolobium uniflorum* (B).

2- Caractérisation Polyphasique des bactéries nodulant *G. cinerea*

Un total de dix isolats de rhizobia ont été criblés et caractérisés à partir des nodules de *G. cinerea*. Ces bactéries gram-négatives, non sporulées, et ont des formes de colonie circulaire et convexe de 1-2 mm de diamètre, et se développent sur milieu YMA à 28 ° C. La plupart des isolats sont translucides avec une consistance gommeuse et n'ont pas absorbé le rouge Congo sur YMA-RC. Six isolats (GI, GIg11, GIg12, GIg13, GIg15, GIg23) peuvent être considérés comme des bactéries à croissance rapide, car les colonies sont visibles et se développent après 24 heures d'incubation. En revanche, les isolats GD, GIg14, GIg21 et GI22 ont une croissance lente avec des colonies visibles et bien développées après 3-5 jours d'incubation. Il est bien à noter que les dix isolats choisie sont des de BNL infectieuses de la plante hôte

2-1- Tests physiologiques

2-1-1- Température de croissance maximale

Les isolats et les souches de référence ont été testés pour les conditions de température élevée (tableau 07). La réponse aux températures élevées a été positive pour tous les isolats de l'étude et les souches de référence à l'exception de GIg23, GIg11, Hs1, HnA et HCa1, dont la croissance a été perturbée au-dessus de 44 ° C. L'étude des BNL *Genista cineria* peut être qualifiée de thermo-tolérante.

Tableau 07 : Circonstance de croissance (+: présence, -: absence) dans différentes conditions thermiques de souches de référence et isolats de rhizobia isolés de *G. cinerea*

Souches	Temperature [°C]				
	4	30	37	44	55
Isolats de <i>G. cinerea</i>					
GI	+	+	+	+	+
GI22	+	+	+	+	+
GIg11	+	+	+	+	-
GIg12	+	+	+	+	+
GIg13	+	+	+	+	+
GIg14	+	+	+	+	+
GIg15	+	+	+	+	+
GIg21	+	+	+	+	+
GIg23	+	+	+	+	-
GD	+	+	+	+	+
Souches de reference (SR)					
A6	+	+	+	+	+
HS1	+	+	+	-	-
HnA	+	+	+	-	-
HCa1	+	+	+	-	-
HP7	+	+	+	+	+

2-1-2- Croissance dans différentes conditions de pH

Les résultats de la tolérance aux pH acides et alcalins des isolats étudiés sont présentés à la (figure 28) La tolérance à l'acidité était très variable. Les isolats GI22, GIg14 et GIg21 ont le plus faible taux de croissance sous la plupart des pH acides, mais montrent une bonne croissance en pH = 4 et une croissance modérée en alcalinité, par contre l'isolat GD qui était sensible aux différents pH testés. De plus, le reste des isolats a montré une tolérance aux pH alcalins et acides. Tandis que RS et les isolats, GIg14 et GIg21 présentaient un taux de croissance modéré pour différents pH, le reste des isolats préférait les pH alcalins. En outre, les isolats présentant une tolérance au pH acide étaient des bactéries à croissance rapide. Les méthodes GLMM par MCMC ont indiqué que la croissance de tous les isolats étudiés sauf GIg14 augmentait lorsque le pH du milieu augmentait. Le MCMCglmm a également révélé que la croissance accrue de l'isolat GIg15 était significativement plus élevée ($P = 0,018$) que la croissance des souches de référence (tableau 09 annexe). Cependant, les augmentations de la croissance des autres isolats de l'étude n'étaient pas significatives par rapport à la croissance de SR (tableau 09 annexe). Les courbes récapitulatives MCMC des composantes de la variance et de la variance résiduelle indiquent que le modèle a convergé (figure S1 annexe). Les tests de corrélation de Pearson ont révélé des similarités élevées et significatives entre les isolats sélectionnés (44,4-87,2%) à différents niveaux de signification. Une similarité élevée et significative, allant de 46,5 à 65,3%, a été observée entre les isolats GI, GIg11, GIg12, GIg23 et les souches de référence A6 et HS1, avec une similarité significative remarquable de l'isolat GI avec tous les SR. En outre, l'AHC a montré que les BNL étudiées ont été classées en trois groupes différents avec un lien remarquable entre l'isolat GI et SR, qui forment un groupe distinct des isolats étudiés. Ceux-ci comprenaient les isolats GI14, GI21 et GI22 en tant que groupe séparé et le reste des isolats en tant qu'un autre groupe différent (figure 29).

Concernant les effets du pH sur la croissance des BNL isolés, nos résultats sont en accord avec ceux de Raza et al. (2001) qui ont signalé une tolérance comprise entre pH = 4 et pH = 10 pour des dizaines d'isolats rhizobiens de *Lupinus luteus* et *L. angustifolius* cultivés dans différentes régions d'Égypte. Cordero et Blair (1978) ont signalé que la limite inférieure de tolérance au pH pour *Rhizobium lupini* est d'environ 4,2 à 3,2. Selon Graham et Parker (1964) et Jordan (1984), les rhizobiums peuvent tolérer des pH allant de 4,5 à 9. Yadav et Vyas (1971) ont montré qu'environ 20 souches isolées de huit espèces de légumineuses différentes pouvaient tolérer des pH élevés jusqu'à pH = 10 dans des conditions non salines. Ballen *et al.* (1998) ont signalé que les souches isolées à partir de sols acides ne tolèrent pas toutes les pH acides, mais que celles-ci peuvent se développer dans des microniches à un pH favorable. En effet, les souches tolérantes aux pH acides sont des espèces à croissance rapide telles que *Mesorhizobium loti* et *Rhizobium tropici* (Gao *et al.*, 1994; Graham *et al.*,

1994). Cependant, Mohamed *et al.* (2000) ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la tolérance d'une souche BNL à pH acide du milieu et sa croissance. Shamseldin et Werner (2005) ont indiqué l'existence d'une variabilité de tolérance élevée à différents pH parmi les souches de *Rhizobium etli* isolées des sols égyptiens. La résistance des souches de *Rhizobium* à des températures élevées et à des niveaux de pH alcalins différents a récemment été confirmée (Shamseldin et al., 2017).

D'autres études ont montré que les rhizobia à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité que les *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984; Van de Velde et al., 2010). Cependant, les souches de la même espèce peuvent présenter une grande variation de la tolérance au pH (Glenn et Dilworth, 1994; El Hilali, 2006). La majorité des souches de BNL isolées de *Lablab purpureus* (Fabaceae) ont un pH variant entre 4 et 11 avec une croissance optimale pour toutes les souches testées entre pH 6,5 et 7,5 (Benselama et al., 2014).

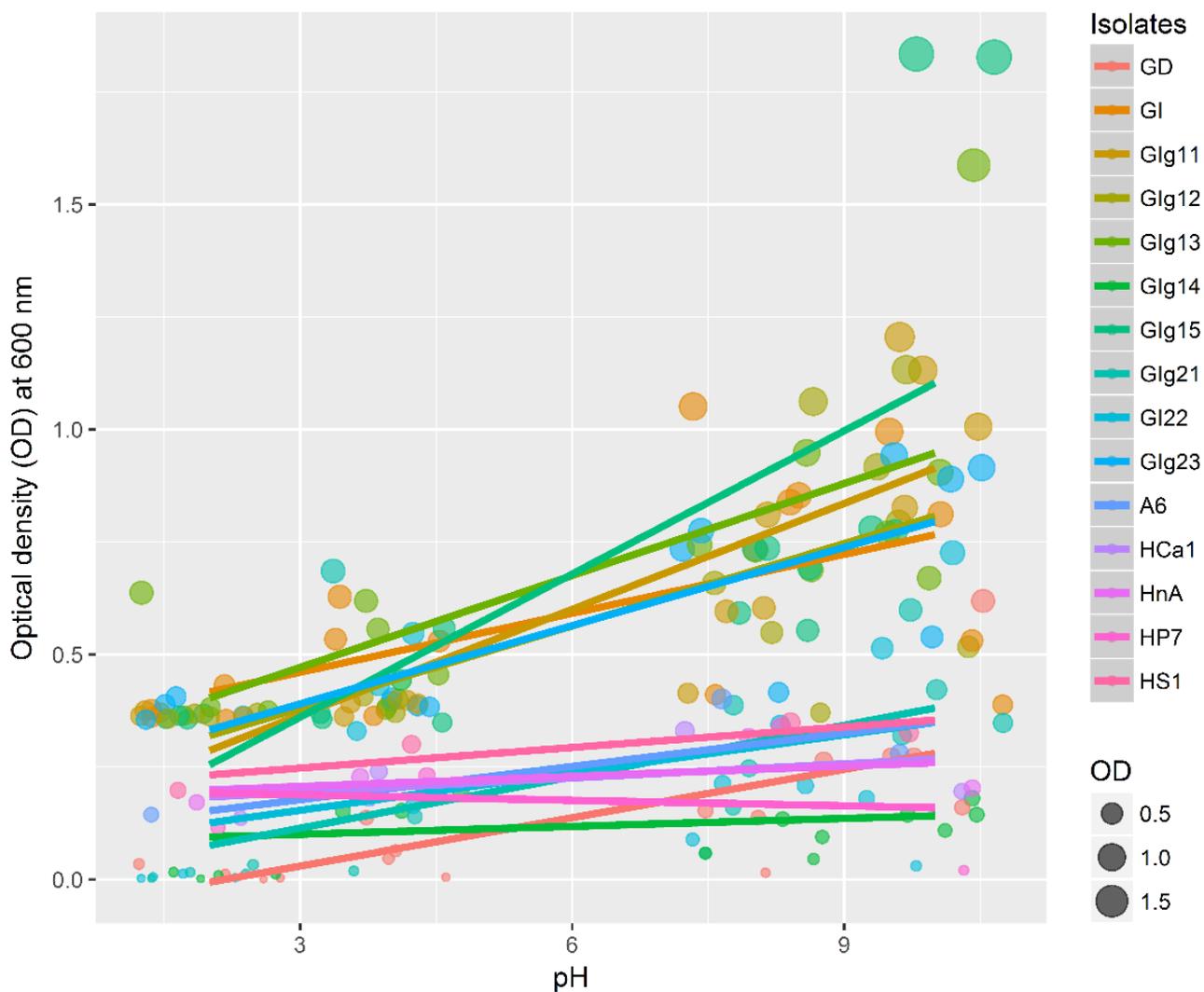


Figure 28 : Relation entre le pH du milieu de croissance et la densité optique des souches de référence et des bactéries isolées à partir des nodules de *Genista cinerea* des zones arides d'Algérie. Les lignes représentent une régression linéaire avec un ajustement de modèle linéaire généralisé (GLM)

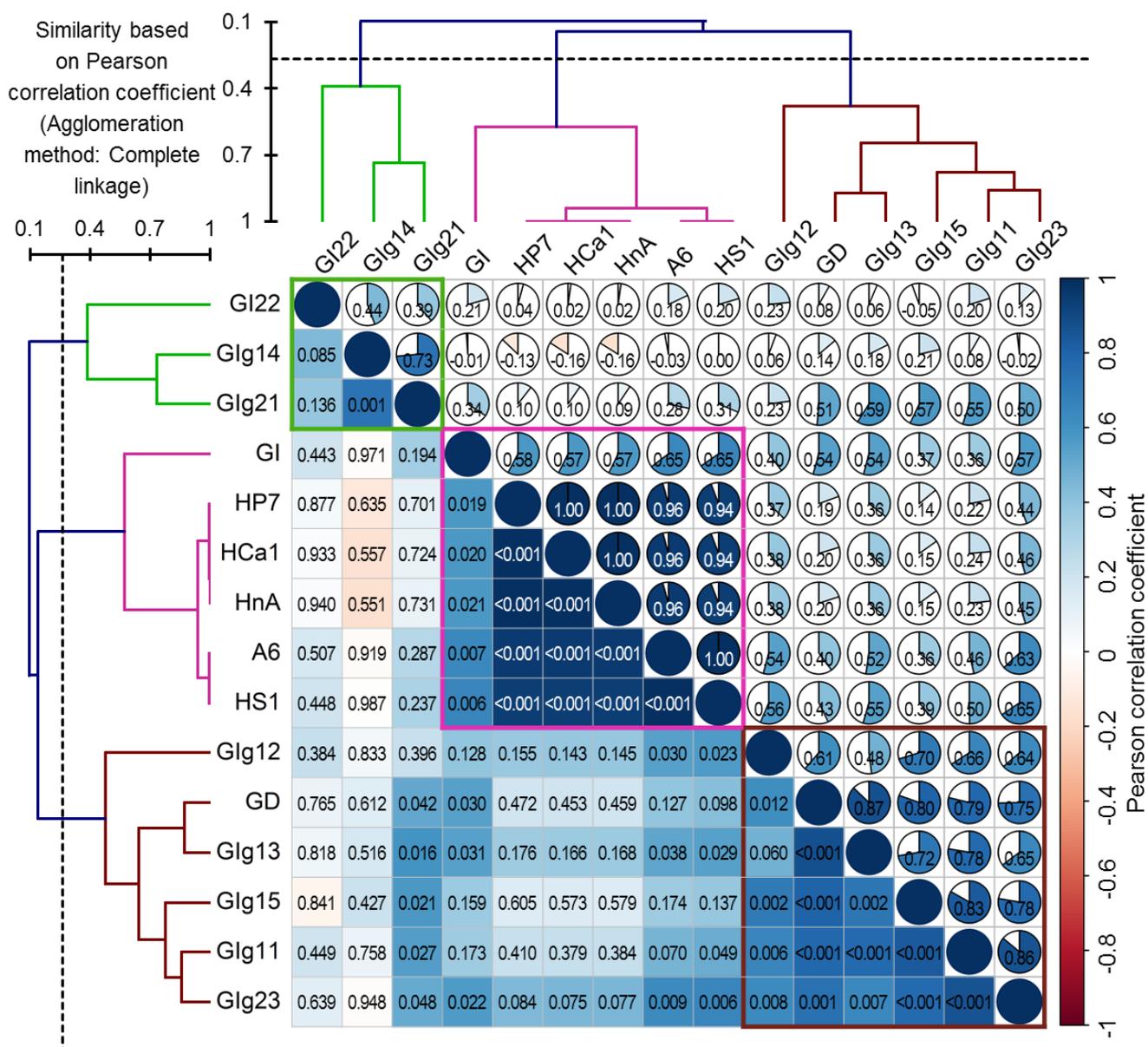


Figure 29 : Matrice de corrélation entre les isolats de l'étude et les souches de référence cultivées dans différentes conditions de pH. Les valeurs des tests de corrélation sont représentées par les coefficients de corrélation de Pearson (représentés par la couleur et l'intensité de l'ombrage dans les diagrammes circulaires et les carrés, et les valeurs supérieures à la diagonale) et les valeurs P (au-dessus de la diagonale). Les dendrogrammes latéraux sont des graphiques de la classification hiérarchique agglomérative (AHC). Les rectangles au sein de la matrice indiquent des amas AHC d'isolats / souches de BNL

2-1-3- Tolérance au sel

Tous les isolats présentaient une croissance variable mais avec un niveau plus élevé que les souches de référence dans toutes les concentrations de NaCl. La croissance des BNL testé avait tendance à diminuer lorsque la concentration du NaCl augmentait (figure 30). En effet, le MCMCglmm a indiqué que le taux de croissance noté par l'isolat GD à différents niveaux de sel était significativement plus élevé que la croissance de SR ($P < 0,001$). Le modèle a révélé que l'augmentation des concentrations de NaCl (4-10%) induisait une diminution significative du taux de croissance de presque tous les BNL testés, principalement GD, GI, IG22, GIg11, IGg12, GIg13, GIg14, GIg15, GIg23. La plupart de ces diminutions significatives ont été observées à un niveau élevé de salinité, c'est-à-dire $[NaCl] = 10\%$. Les isolats GIg11 et GI22 étaient les plus sensibles au sel, quel que soit le niveau de salinité, alors que l'isolat GD ne tolérait qu'une salinité élevée (10%) (tableau..). La croissance de l'isolat GIg21 n'a été affectée par aucune concentration de NaCl, ce qui qualifie cet isolat de tolérant au NaCl. De plus, aucun isolat n'a été jugé significativement affecté à une concentration en sel modérée ($NaCl = 6\%$) (tableau 09 annexe). Presque tous les isolats de l'étude présentaient des similarités élevées et significatives entre eux (43,1 - 87,8%) et les souches de référence (43,4 - 68,3%), sauf la croissance de la souche A6 qui ne présentait aucune similarité significative avec tous les isolats de l'étude. Idem, aucune similarité significative n'a été observée entre les isolats (GIg11, GIg14, GIg15, GI22 et les souches de référence) En effet, l'AHC a démontré que SR représentaient un groupe différent des isolats d'étude regroupés en deux groupes différents (figure 31).

En ce qui concerne la croissance des isolats de BNL sous différents stress salins, nos résultats sont en accord avec les études précédentes qui qualifient les rhizobiums comme tolérant à une large gamme de concentrations de NaCl inférieures à 12% (Benidire *et al.*, 2017; Laranjo *et al.*, 2017). Une telle résistance au sel a également été signalée chez des rhizobiums nodulant le fenugrec, qui peuvent se développer dans des conditions de sel atteignant 14% (Abdelmoumen *et al.*, 1999). Miller et Wood (1996) ont signalé que le rhizobium est une bactérie sensible à une forte salinité, en particulier pendant le processus de symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées grâce à son mécanisme d'adaptation efficace qui atténue les effets du stress salin.

Plusieurs espèces de bactéries sont capables de s'adapter à des conditions de salinité élevées par l'accumulation intracellulaire de solutés appelés osmolytes (Csonka et Hanson, 1991; Benidire *et al.*, 2017). En général, la gamme de tolérance au sel est plus large chez les symbiotes BNL que chez leurs plantes hôtes. Plusieurs études ont souligné l'intérêt de la sélection simultanée des deux partenaires de l'association pour une meilleure fixation symbiotique. Cependant, le seuil de tolérance au sel de la plante hôte est le facteur le plus important qui détermine l'efficacité de l'association du

rhizobium (Rai *et al.*, 1985; Bekki *et al.*, 1987; Gray *et al.*, 1991). Selon Dong *et al.* (2017), les souches de *Bradyrhizobium* nodulant *Stylosanthes guianensis* (Fabaceae) présentent une large gamme de tolérance au sel. De plus, la croissance des souches BNL isolées de *Lablab purpureus* n'est pas affectée par des concentrations de NaCl inférieures à 513 millimolaires, alors que la croissance des BNL est modérément affectée à une concentration élevée de 1710 millimolaires (Benselama *et al.*, 2014). Cheriet *et al.* (2014) ont mentionné que les rhizobiums nodulant *Medicago ciliaris* présentaient une grande diversité dans leur tolérance au sel et que l'effet inhibiteur de la salinité différait entre les souches de BNL et suivant la nature du sel.

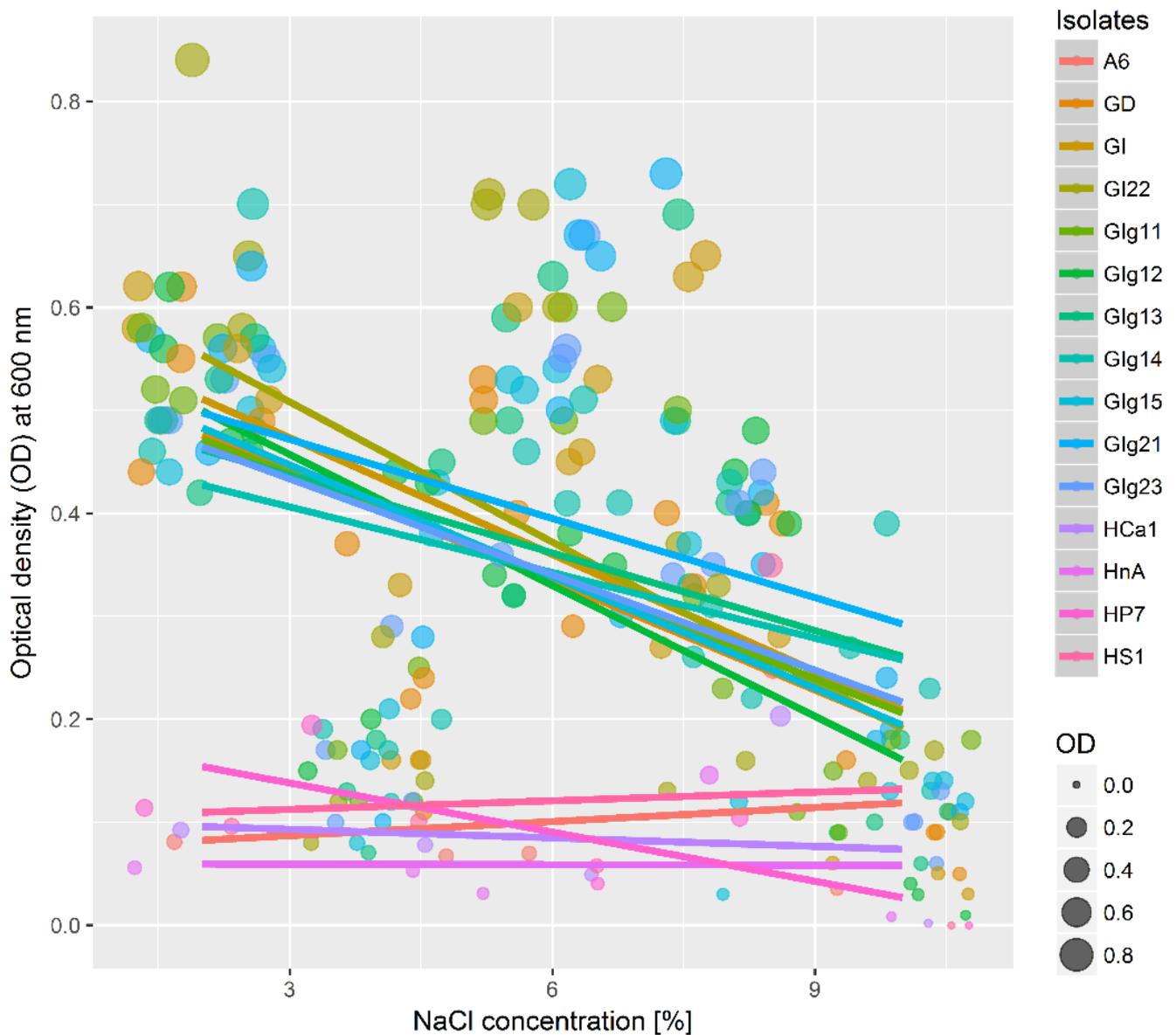


Figure 30 : Relation entre la salinité du milieu de croissance (concentration de NaCl) et la densité optique indiquant la croissance de souches de référence et d'isolats de bactéries nodo-isolantes isolées de *Genista cinerea* poussant dans les zones arides d'Algérie. Les lignes pleines représentent une régression linéaire avec un ajustement de modèle linéaire généralisé (GLM)

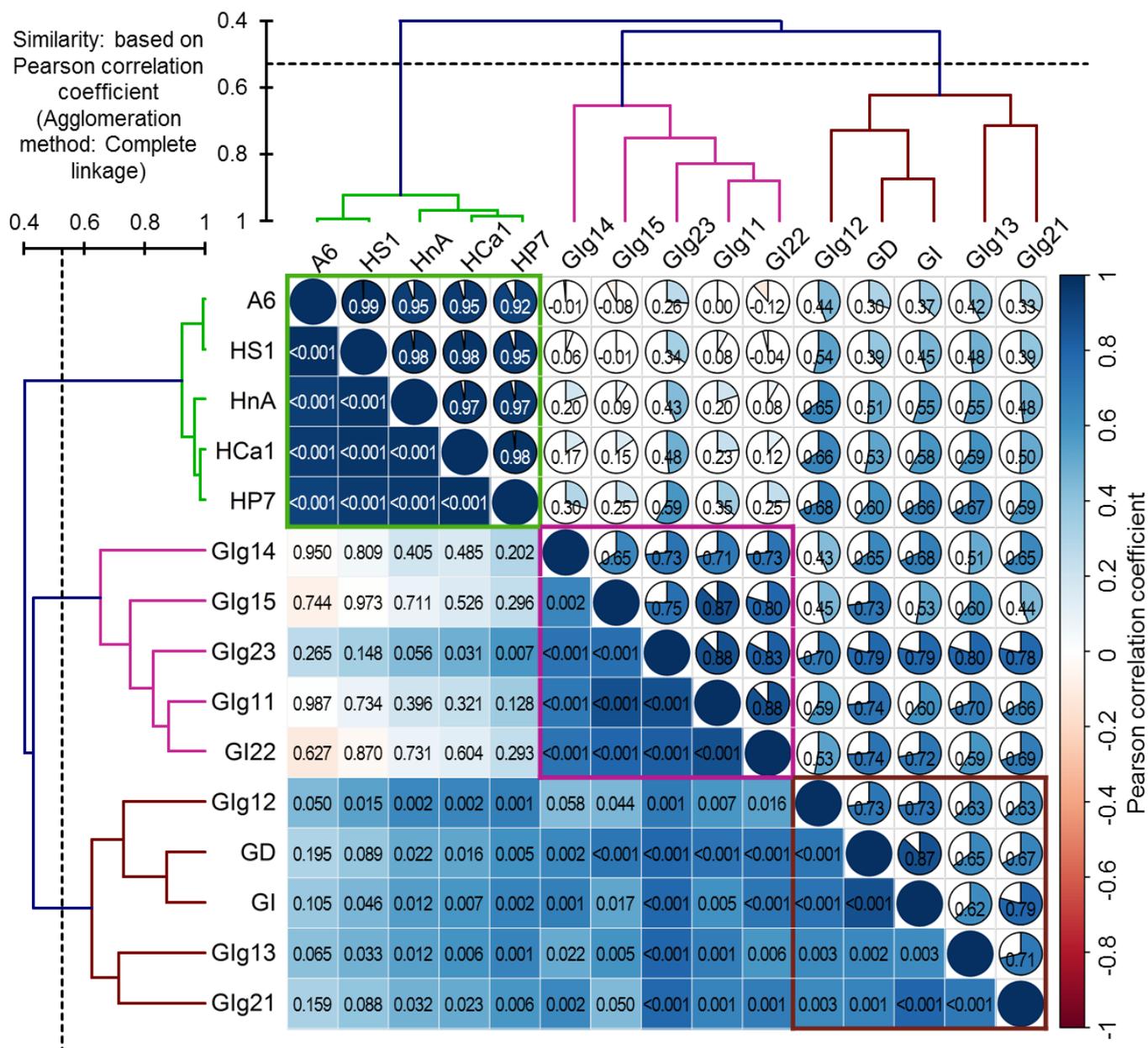


Figure 31 : Matrice de corrélation entre les niveaux de croissance des isolats et les souches de référence cultivées sous différents stress salins (concentrations en NaCl). Les valeurs des tests de corrélation sont représentées par les coefficients de corrélation de Pearson (représentés par la couleur et l'intensité de l'ombrage dans les diagrammes circulaires et les carrés, et les valeurs supérieures à la diagonale) et les valeurs P (au-dessus de la diagonale). Les dendrogrammes latéraux sont des graphiques de la classification hiérarchique agglomérative (AHC). Les rectangles au sein de la matrice indiquent des amas AHC d'isolats / souches de BNL

2-2- Tests nutritionnels

2-2-1- Assimilation des carbohydrates

Les isolats ont obtenu la plus faible croissance lorsqu'ils ont été traités avec les monosaccharides, le fructose et le glucose, et disaccharide le lactose par rapport à la SR. D'autre part, les isolats étudiés présentaient un taux de croissance élevé avec le galactose et le xylose (figure 32). Le MCMCglmm a révélé un taux de croissance significatif et positif à l'intercept du modèle ($P < 0,001$) incluant la souche de référence A6 et le fructose. Il a montré que les croissances des isolats étudiés augmentaient significativement ($P < 0,001$) par rapport à SR quand ils étaient fournis principalement avec du galactose et du xylose, et d'autre part le glucose, comme sources de carbone au lieu du fructose. Seuls les isolats GIg11, GIg12 et GIg13, présentant un nodule de forme tumorale, présentaient une diminution significative du taux de croissance ($P < 0,05$) par rapport à SR (tableau 09 annexe). La croissance globale des autres isolats de l'étude était statistiquement non différente par rapport à SR. Idem, les croissances des isolats et SR obtenus avec le lactose étaient un peu moins élevées que celles du fructose, mais sans différences significatives ($P = 0,058$) (tableau 09 annexe). Les résultats peuvent s'expliquer par un coefficient de similarité de Pearson très significatif ($P < 0,001$), qui est (96,2% à 100%) entre les isolats et aucune similarité significative entre les isolats et les souches de référence dans l'utilisation des carbohydrates comme seule source de carbone. L'AHC a distingué deux groupes distincts: SR en tant que groupe unique et tous les isolats étudiés comme un groupe différent (figure 33).

Le dépistage du BNL isolé de *G. cinerea* pour l'assimilation des glucides a révélé que ces rhizobiums soumis au climat chaud semi-aride utilisent les sucres différemment des souches BNL isolées de *Mucuna pruriens* (Fabaceae) poussant sauvagement sur les contreforts de l'Himalaya où le climat est humid-subtropical (Paudyal et Gupta, 2017). Les rhizobia à croissance rapide sont considérés comme des bactéries acidifiantes indiquant l'utilisation de sucres et / ou d'alcools de sucre entraînant souvent la production d'acides organiques (Castro *et al.*, 2000; Safronova *et al.*, 2004), alors que les rhizobia à croissance lente leur capacité à utiliser diverses sources de carbone est plus limitée. Par conséquent, l'abondance et la richesse des isolats à croissance rapide peuvent être attribuées aux caractéristiques édaphiques et aux types de sol spécifiques à chaque site de la région étudiée. La variation de la composition et de l'abondance de la flore de légumineuses indigènes - qui sont également spécifiques du site sur le plan écologique - constitue le facteur déterminant des caractéristiques et des caractéristiques du BNL (Gao *et al.*, 1994). Comme la plupart des souches de BNL affichent leur infectivité par l'intensité de la formation de nodules le long des racines sur la plante hôte (Graham *et al.*, 1994) et que les résultats des tests de nodulation sont comparés, le niveau d'infectivité varie non seulement par la souche d'inoculation mais aussi selon la source de carbone

utilisée. Ainsi, le sucre qui stimule la production d'exopolysaccharides qui stimule également la capacité de nodulation (Gharzouli *et al.*, 2012). Selon Le Quéré *et al.* (2017), toutes les souches du rhizobium fixateur d'azote *Ensifer aridi* récupérées dans les déserts asiatiques, africains et américains peuvent utiliser presque tous les glucides dépistés, à l'exception du xylitol. La grande diversité des hydrates de carbone que les rhizobiums peuvent utiliser s'explique par le fait que ces microorganismes se développent principalement dans des sols pauvres en conditions arides et semi-arides, nécessitant la capacité d'utiliser efficacement une large gamme de glucides pour répondre à leurs besoins nutritionnels (Le Quéré *et al.*, 2017).

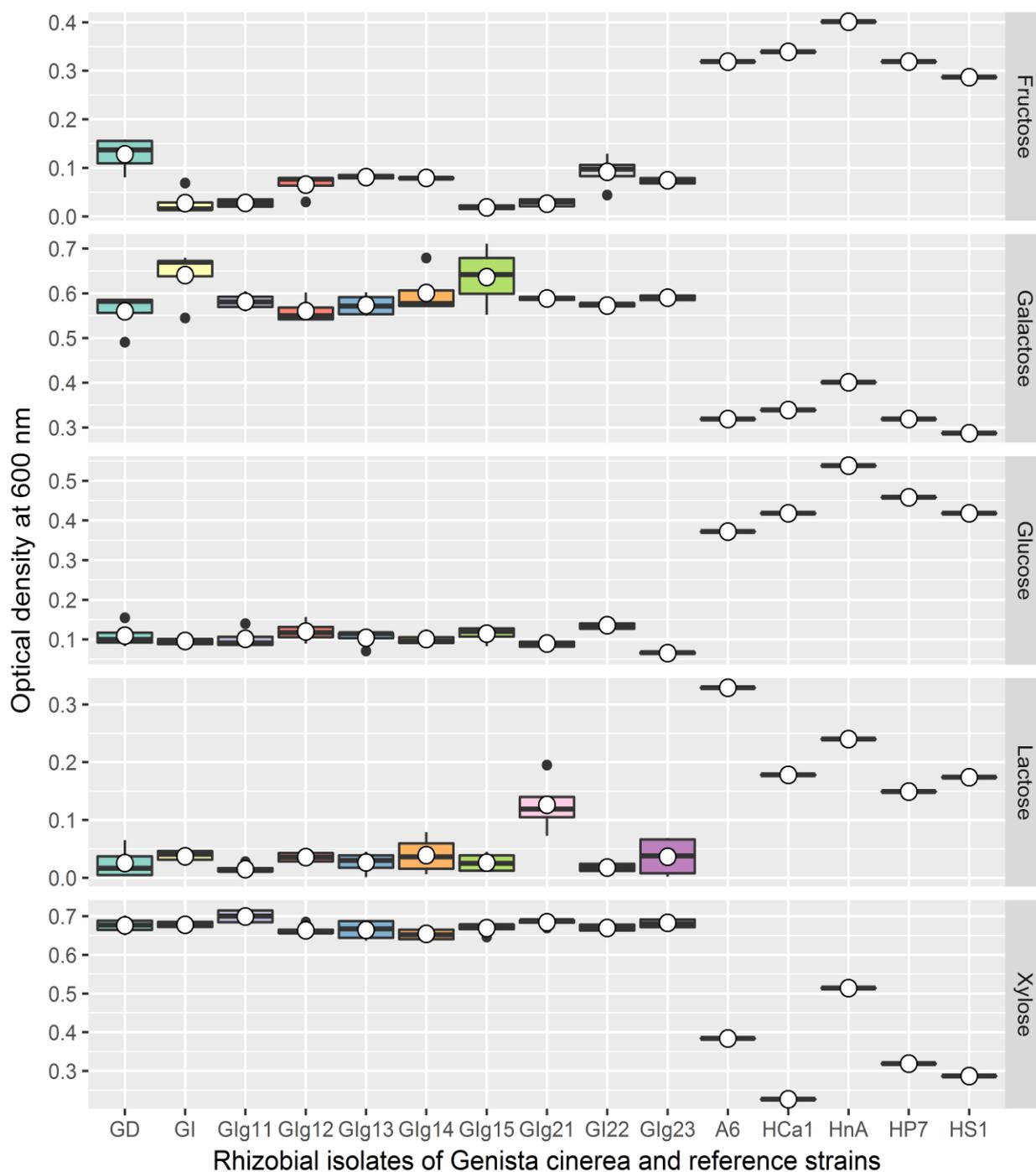


Figure 32 : Boîtes à moustaches représentant la croissance (densité optique) des souches de référence et des isolats des nodules de *Genista cinerea* en présence des différents glucides comme source de carbone. Les cercles blancs pleins indiquent les moyennes, alors que les cercles noirs sont aberrants

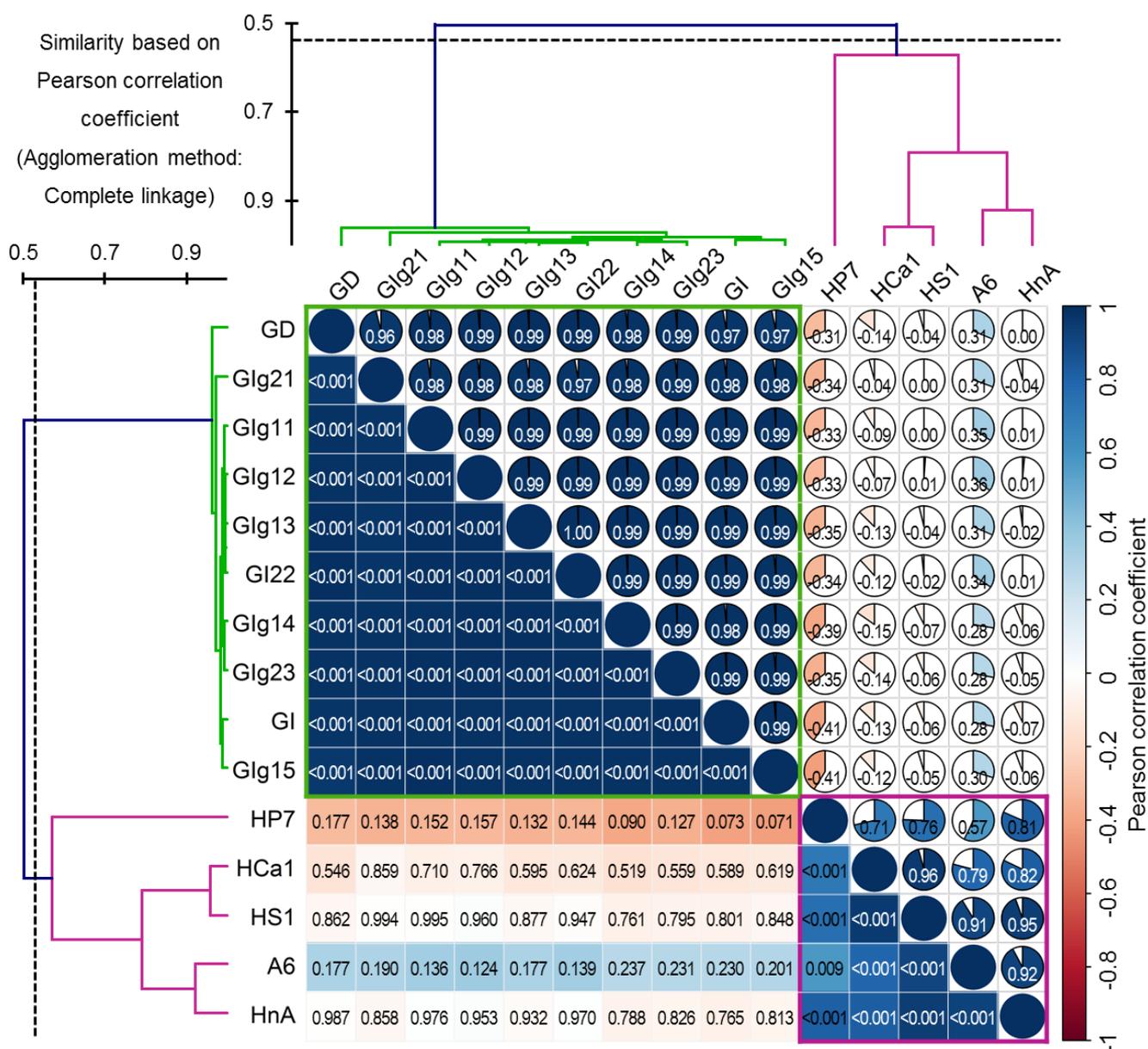


Figure 33 : Matrice de corrélation entre les niveaux de croissance des isolats et les souches de référence cultivées en présence de différents sucres. Les valeurs des tests de corrélation sont représentées par les coefficients de corrélation de Pearson (représentés par la couleur et l'intensité de l'ombrage dans les diagrammes circulaires et les carrés, les valeurs supérieures à la diagonale) et les valeurs P (au-dessus de la diagonale). Les dendrogrammes latéraux sont des graphiques de la classification hiérarchique agglomérative (AHC). Les rectangles au sein de la matrice indiquent des amas AHC d'isolats / souches de BNL

2-2-2- Source d'Azote

Les BNL ont montré des croissances irrégulières suivant la nature chimique des acides aminés, les isolats nodulant *G. cinerea* étaient capables d'utiliser différents acides aminés avec une préférence évidente pour la leucine et l'isoleucine. Un profil de croissance irrégulier a été noté dans les isolats quand ils ont été amendés avec l'alanine, la cystéine et la proline comme seule source d'azote. Inversement, les SR étaient incapables d'utiliser l'isoleucine, la leucine et l'alanine, mais montraient une augmentation significative de la croissance avec la cystéine et la proline. Quelques exceptions aberrantes sont notées: la plus forte croissance a été observée dans la souche HnA avec Alanine, HP7 avec la cystéine, tandis que la souche HS1 a eu un développement plus faible avec la proline (figure 34). Le MCMCglmm a démontré que la croissance de tous les isolats de l'étude était significativement plus élevée que celle de SR lorsqu'ils étaient cultivés avec l'isoleucine et la leucine comme source d'azote, à l'exception de l'isolat GIg13 avec la leucine. La croissance de cet isolat a diminué significativement ($P = 0,034$) par rapport à SR quand il a été approvisionné avec la proline au lieu de l'alanine (tableau 09 annexe). Le modèle a également montré qu'aucun changement significatif des croissances n'a été observé avec la cystéine (tableau 09 annexe). Les isolats de l'étude présentaient des similarités très élevées ($> 90\%$) et significatives ($P < 0,001$) entre elles. Les corrélations calculées entre les isolats et SR concernant l'utilisation d'acides aminés ont également mis en évidence des valeurs élevées ($> 55\%$) et des similarités significatives entre toutes les bactéries testées. L'AHC a différencié le groupe de SR des isolats étudiés regroupés en deux groupes différents: le premier comprenait les isolats GI13, GI21, GI23, tandis que les autres isolats étaient compilés dans le second groupe (figure 35).

Les acides aminés à chaîne ramifiée isoleucine et leucine sont souvent les acides aminés les plus abondants dans les protéomes bactériens, alors que la leucine sert d'indicateur de la disponibilité des acides aminés chez les bactéries entériques (Reitzer, 2003; Prell *et al.*, 2009). Chez les Rhizobia, les rôles symbiotiques des acides aminés spécifiques dans la symbiose ne sont pas encore clairs, car les études antérieures n'ont pas exposé de modèles précis et distincts. Mais cela peut être plutôt lié à (i) la plante hôte symbiotique impliquée qui influence les teneurs en acides aminés dans les exsudats et / ou les tissus racinaires, (ii) la nature du gène spécifique du métabolisme des acides aminés, (iii) la présence de la redondance des gènes et (iv) la grande diversité métabolique des microsymbiotes (Dunn, 2015).

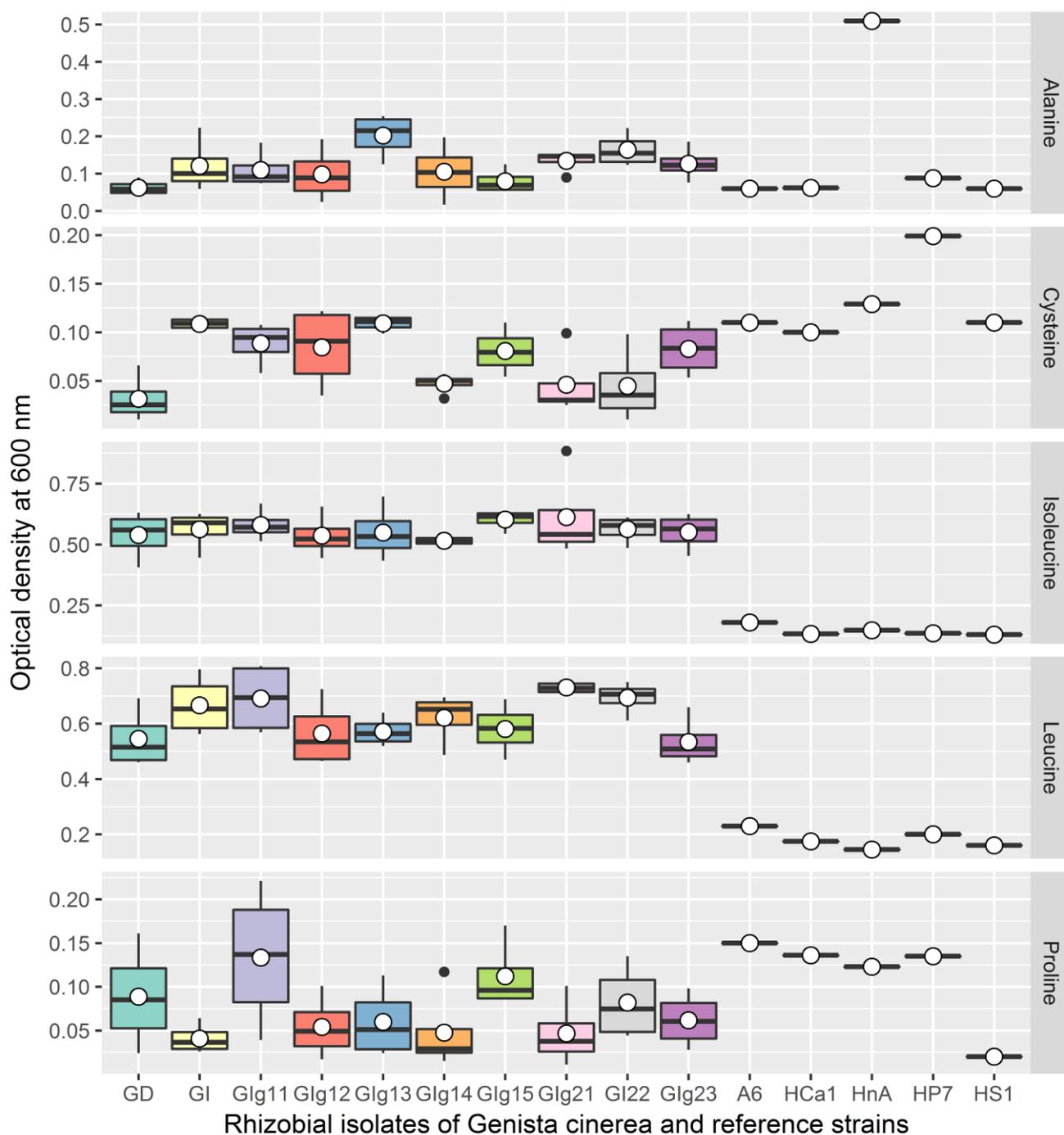


Figure 34 : Boîtes à moustaches représentant la croissance (densité optique) des souches de référence et des isolats des nodules de *Genista cinerea* en présence des différents acides aminés comme source d'Azote. Les cercles blancs pleins indiquent les moyennes, alors que les cercles noirs sont aberrants

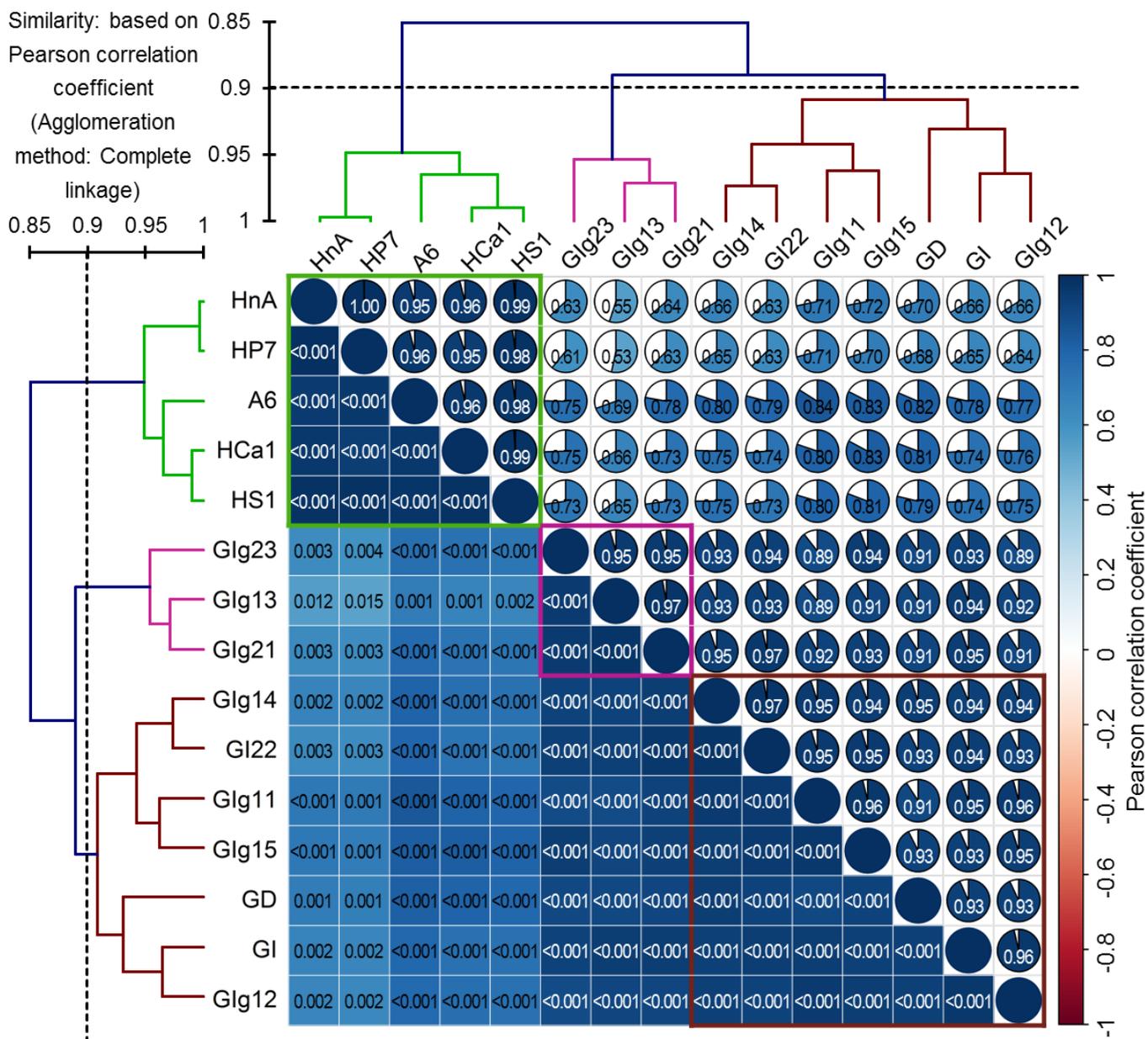


Figure 35 : Matrice de corrélation entre les niveaux de croissance des isolats et les souches de référence cultivées en présence de différents acides aminés. Les valeurs des tests de corrélation sont représentées par les coefficients de corrélation de Pearson (représentés par la couleur et l'intensité de l'ombrage dans les diagrammes circulaires et les carrés, les valeurs supérieures à la diagonale) et les valeurs P (au-dessus de la diagonale). Les dendrogrammes latéraux sont des graphiques de la classification hiérarchique agglomérative (AHC). Les rectangles au sein de la matrice indiquent des amas AHC d'isolats / souches de BNL

2-3- Analyse multifactorielle des isolats et des souches de références

L'analyse factorielle multiple a montré que les bactéries testées étaient divisées en trois phénotypes. Les effets des facteurs de stress (pH et NaCl), des glucides et des acides aminés ont entraîné la distribution d'isolats et de SR sur trois des quatre quadrants de MFA bi-plot 1×2 , totalisant 81,83% d'inertie (figure 36). Le graphique de corrélation des axes MFA indique que les profils de distribution des bactéries sont principalement déterminés par NaCl, sucres et acides aminés (corrélations $> 0,95$) puis pH ($r = 0,62$) sur la première dimension MFA (63,94%). Sur la deuxième dimension (17,89%), le paramètre contributeur principal était le pH, celui positivement corrélé ($r = 0,77$), puis le NaCl ($r = -0,40$) et les acides aminés ($r = -0,49$).

Les trois groupes phénotypiques de BNL, qui ont également été confirmés en utilisant AHC, sont composés comme suit (i) le groupe 1 (GI, GIg11, GIg12, GIg13, GIg15, GIg23) était fortement corrélé avec le gradient de pH. Ce paramètre distingue les isolats de ce groupe des isolats du second groupe en considérant le deuxième axe de MFA, (ii) le groupe 2 (GD, GIg14, GIg21, GI22) est négativement corrélé avec le pH sur les deux axes MFA, mais il est considéré comme halo-tolérant car il présentait une corrélation positive avec les concentrations du NaCl sur la première dimension AMF, (iii) tous SR ont créé le troisième groupe qui ont été différenciés des isolats en raison des influences du NaCl, les sucres et les acides aminés. Cela prouve une fois de plus que SR était halo-sensible. Il convient de noter que les groupes 1 et 2 présentaient des convergences élevées dues aux effets du NaCl, des sucres et des acides aminés, mais que le pH a discriminé entre eux. Ce dernier paramètre a déclenché de fortes ressemblances entre les isolats du groupe 2 et RS. Par conséquent, nous pouvons affirmer que tous les rhizobia isolés de *G. cinerea* ont formé deux groupes principaux, qui ont été considérés comme étroitement apparentés au SR et qui ont formé avec eux un seul groupe avec une similitude globale de 56%. Le groupe 1, comprenant des isolats à croissance rapide, est caractérisé par une tolérance élevée au sel et une tolérance modérée à l'acidité avec une croissance élevée dans des conditions alcalines. Le groupe 2 comprenait des isolats à croissance lente qui ont été affectés négativement par des pH acides et des concentrations élevées de NaCl (figure 36).

La grande diversité phénotypique des isolats nodulant *G. cinerea*, évaluée à l'aide de l'AMF et de l'AHC, peut être attribuée essentiellement aux isolats de grandes adaptations aux différentes conditions environnementales des régions arides et semi-arides telles que l'Afrique du Nord. Étant donné que les poly-extrémophiles se développent de manière optimale dans des conditions extrêmes multiples (Chaïch et al., 2017; Verma et al., 2017) et en fonction des essais physiologiques et biochimiques que nous avons effectués, la plupart de nos isolats testés présentent une adaptation aux conditions environnementales sévères.

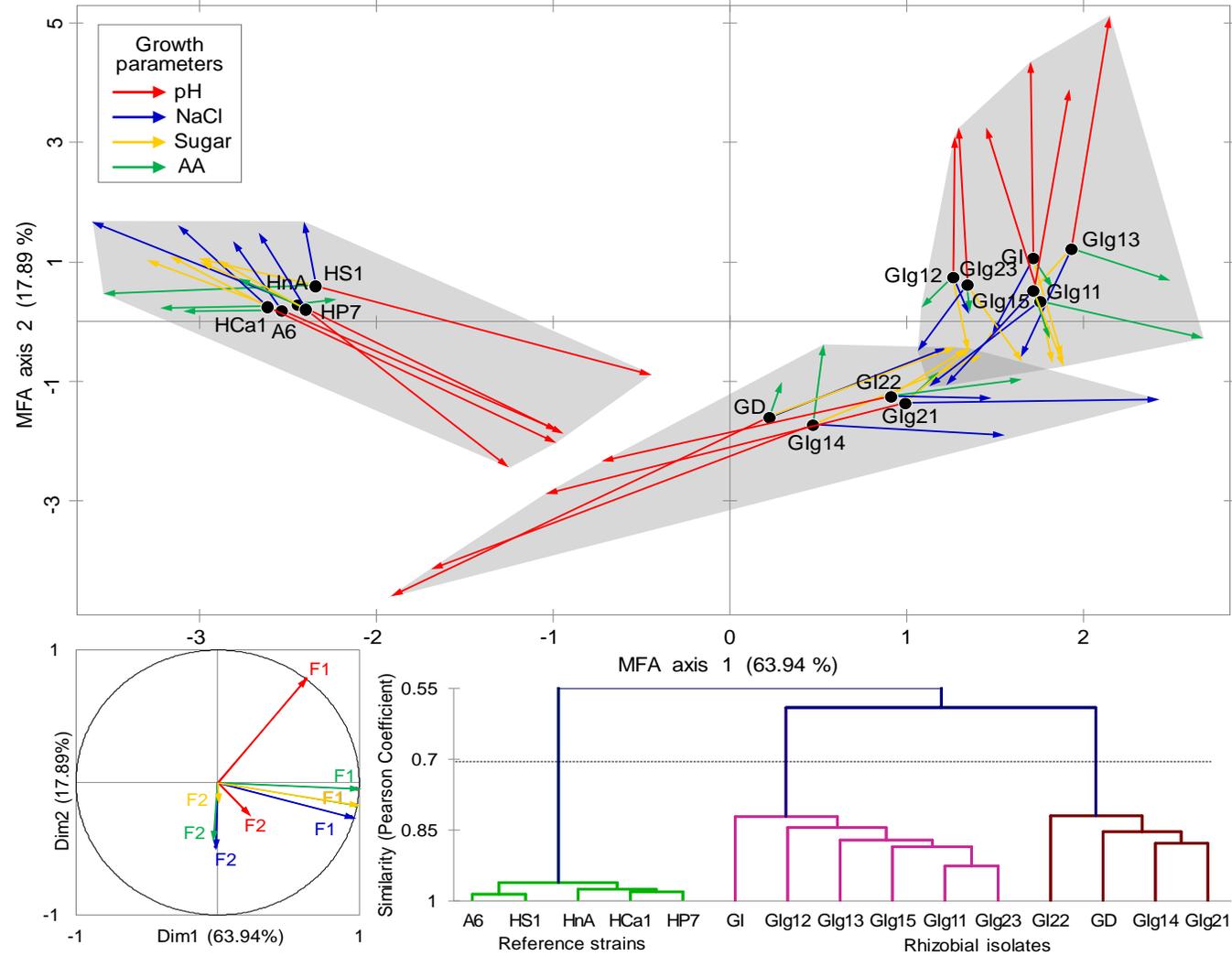


Figure 36 : Scatterplot des scores partiels des facteurs montrant les centroïdes des isolats et les souches de référence regroupées sur la corrélation factorielle biplot 1-2 de l'analyse factorielle multiple (AMF) (graphique du haut). Chaque isolat est projeté dans MFA dimensions utilisant quatre vecteurs représentant les paramètres de croissance testés, à savoir le pH, le NaCl, les hydrates de carbone et les acides aminés "AA". Le graphique en bas à gauche est le graphique de corrélation des axes MFA partiels (F1, F2). Dendrogramme inférieur-droit indique la classification hiérarchique agglomérative (AHC) impliquant des données de croissance des BNL obtenues à partir de tous les tests de dépistage phénotypiques

2-4- Caractérisation géotypique par 16S rRNA des bactéries associées au *G. cinerea*

G. cinerea appartient à la tribu des *Genisteeae* de la famille des *Fbaceae* peut installer des formes symbiotiques avec les bactéries du sol qui restent inconnu ou peu étudiées. Dans la présente étude en se basant sur le séquençage de la petite sous unité ribosomale 16S rRNA (Figure 37), les résultats montrent que les isolats GIg21 affiche une similarité de 99,01% de similarité avec la souche *Pantoea rodasii*. Tant dis que l'isolat GI et GIg12 ont marqué une similarité égale à 99% avec les souches *Luteibacter rhizovicinus*. Les isolats GIg11, GIg13, GIg23 et GD procèdent de la souche *Pantoea vagans* avec des taux de similarités qui sont respectivement (99,10%, 99%, 99,10%, 99,60%). D'autre part l'isolat GIg15 semble très proche au *Pseudomonas azotoformans* affichant ainsi une similarité de 99,11%. L'isolat GIg14 montre une similarité de 99,51% avec *Klebsiella oxytoca* en fin l'isolat GI22 à montrer une similarité particulière de 99% avec *Achromobacter spanius* (tableau 08).

La majorité des légumineuses forment des symbioses avec nombreux genres de *Rhizobium* et apparentés à la classe *Alphaproteobacteria*. L'analyse phylogénétique de plusieurs isolats symbiotiques à croissance rapide provenant de nodules à surface stérilisés de racines d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) ont montré que ces isolats appartenaient à la classe des Protéobactéries, dont *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.* et *Klebsiella spp.* (Ibáñez *et al.*, 2009). De plus, Benata *et al.* (2008) ont signalé l'isolement d'un genre bêta-protéobactérien d'*Achromobacter* en tant qu'espèce formant des nodules pour la légumineuse *Prosopis juliflora*, qui peut également être nodulée par des bactéries de différentes lignées, y compris d'autres alphaprotéobactéries. La présence d'*Achromobacter xylooxidans* en association avec d'autres espèces de plantes a été précédemment rapportée chez le niébé *Vigna unguiculata* L. Walp. (Guimarães *et al.*, 2012), *Mucuna bracteata* (Salwani *et al.*, 2012) et soja *Glycine max* L. Merr. (Wedhastri, 2013).

Des tests d'inoculation de plantes et des études histologiques sur le criquet noir *Robinia pseudoacacia* ont révélé que *Pseudomonas sp.* et *Burkholderia sp.* établissent des nodules et développent des tissus nodulaires différenciés (Shiraishi *et al.*, 2010). En outre, l'analyse phylogénétique des gènes symbiotiques a révélé que *Pseudomonas* et *Burkholderia* présentaient de fortes similitudes avec celles des espèces de *rhizobium*, indiquant un transfert horizontal de gènes symbiotiques d'espèces de *rhizobium* dans le sol. Les espèces du genre *Burkholderia* nodulent efficacement plusieurs légumineuses importantes, notamment l'haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) et le genre *Mimosa* (Gyaneshwar, 2011). Cela peut être expliqué, car ces isolats sont des bactéries opportunistes capables de coloniser les nodules racinaires pendant leur formation.

Les bactéries endophytes qui nodulent les racines des plantes jouent un rôle essentiel dans l'amélioration de la croissance des plantes en atténuant les conditions environnementales sévères (Vargas *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2017). Trois souches bactériennes productrices d'acide indol-acétique ont été isolées du nodule racinaire de la légumineuse *Arbs precatorius* L. et identifiées comme *Enterobacter spp.* (*Gammaprotéobacteria*) sur la base de caractéristiques biochimiques et d'une homologie de séquence 16S r DNA (Ghosh *et al.*, 2015). Cette caractéristique prometteuse de la BNL pourrait être utilisée comme inoculants pour établir un système de production agricole durable (Hassan, 2017).

Andrews *et al.* (2018) conciderent que le transfert horizontal des gènes de la symbiose entre les souches rhizobiennes est répandu, est largement répandu géographiquement, ne se limite pas à certains genres rhizobiens et se produit dans et entre les genres rhizobiens. Le transfert des gènes de la symbiose à des bactéries adaptées aux conditions locales du sol peut permettre à ces bactéries de devenir des symbiotes rhizobiens de légumineuses auparavant incompatibles, poussant dans ces sols. Cela, à son tour, aura des conséquences sur la croissance, le cycle biologique et la biogéographie des espèces de légumineuses impliquées, ce qui fournit un lien écologique essentiel reliant le transfert horizontal des gènes de symbiose entre les bactéries rhizobiennes du sol et la biodiversité florale. Structure de la communauté végétale.

Il est possible que les souches non symbiotique présentent dans les nodules en tant que source de gènes qui ne participent pas directement dans la symbiose, mais affectent son activité, de telles souches, après étude génétique et phénotypique appropriée, peuvent être utilisées pour la production de molécules bioactives avec une efficacité accrue. (Sazanova, 2017)

En raison de multiples caractéristiques des rhizobiums, telles que leur capacité à produire des phytohormones et des sidérophores et à solubiliser le phosphate insoluble, en plus de provoquer des réactions de défense des plantes contre les phytopathogènes; ces BNL sont considérés comme des rhizobactéries efficaces pour la croissance des plantes (PGPR), qui ont un potentiel élevé pour améliorer durablement les rendements des cultures. Par conséquent, la caractérisation de PGPR favorise l'utilisation des ressources microbiologiques dans l'agriculture écologique, réduisant ainsi l'utilisation d'engrais chimiques et de pesticides coûteux dans les pratiques agricoles (Vargas *et al.*, 2017; Novo *et al.*, 2018).

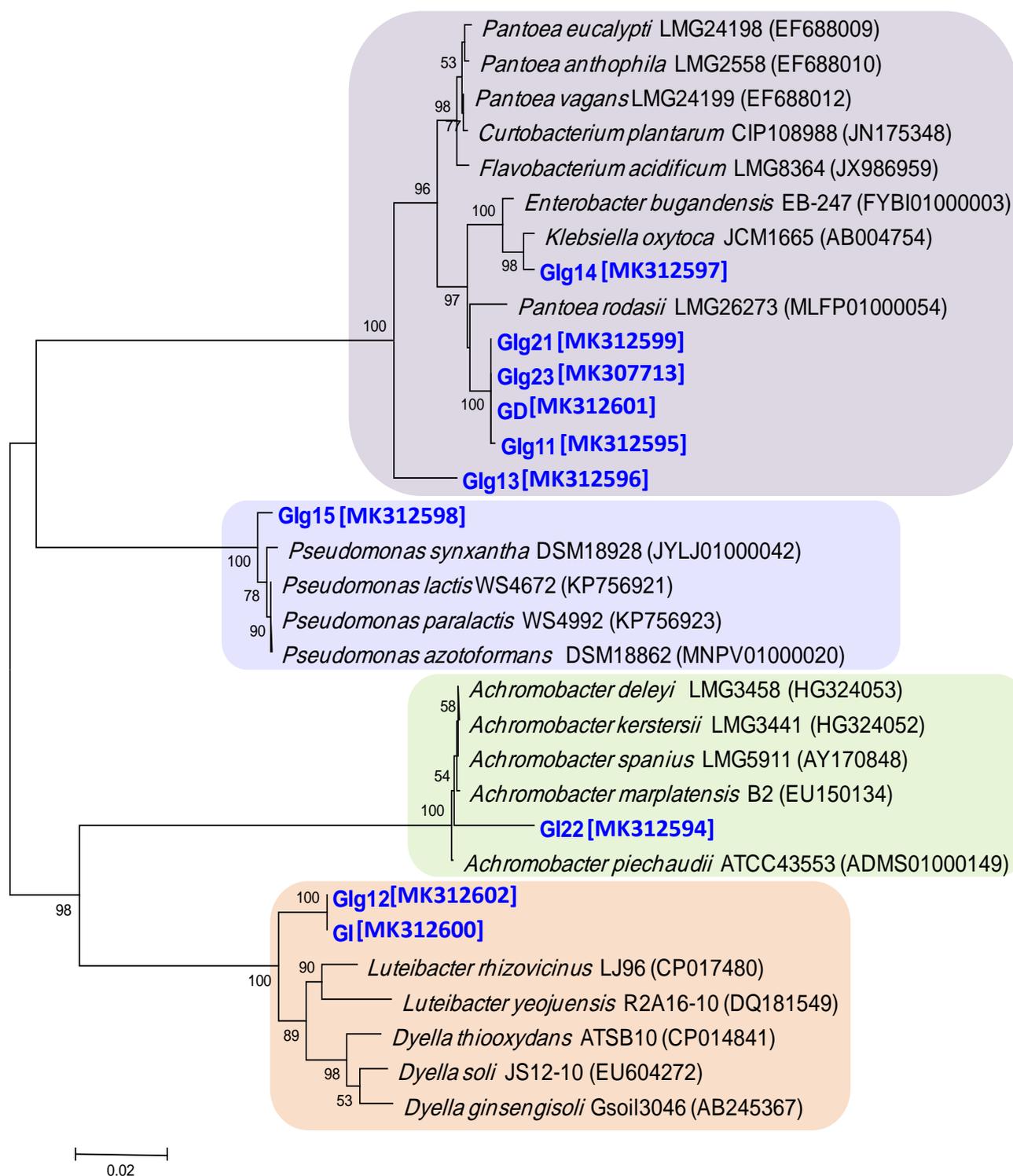


Figure 37 : Arbre phylogénétique montre les relations entre les bactéries isolées et les souches apparentées basé sur la séquence 16S rRNA (Neighbor Joining). Les valeurs bootstrap en pourcentage basées sur 1000 ensembles de données ré-échantillonnés sont affichées aux nœuds; seules les valeurs supérieures à 50% sont données. La barre d'échelle indique une substitution de 0,02 nucléotide par position nucléotidique

Tableau 08 : Bactéries nodulatrices isolées des racines de *G. cinerea* et résultats de comparaison (similitude en%) avec les séquences de gènes 16S rRNA des souches types (GenBank NCBI et du serveur Ez-Taxon)

Isolats [Numero d'accension]	Souche la plus proche (Numero d'accension)	Similarité
GIg11 [MK312595]	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 (EF688012)	99.10
GIg12 [MK312602]	<i>Luteibacter rhizovicinus</i> LJ96 (CP017480)	99.00
GIg13 [MK312596]	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 (EF688012)	99.00
GIg14 [MK312597]	<i>Klebsiella oxytoca</i> JCM 1665 (AB004754)	99.51
GIg15 [MK312598]	<i>Pseudomonas azotoformans</i> DSM 8862 (MNPV01000020)	99.11
GIg21 [MK312599]	<i>Pantoea rodasii</i> LMG 26273 (MLFP01000054)	99.01
GI22 [MK312594]	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911(T) (AY170848)	99.00
GIg23 [MK307713]	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 (EF688012)	99.10
GD [MK312601]	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 (EF688012)	99.60
GI [MK312600]	<i>Luteibacter rhizovicinus</i> LJ96 (CP017480)	99.00

NCBI : National Center for Biotechnology Information

Conclusion

Conclusion

Les travaux menés au cours de cette étude sur la symbiose entre les légumineuses spontanés *Genista microcephala*, *Argyrolobium uniflorum* et *Genista cinerea* appartenant à la tribu des *Genisteae* (Fabaceae)c, nous ont permis d'une part, d'aborder la compréhension de la mise en place de cette association originale avec ses partenaires et, d'autre part d'établir des hypothèses quant au caractérisation phénotypique en les comparant à des souches de références et polyphasique des isolats associés au *G. cinerea*.

Nous avons procédé à un isolement et une caractérisation selon les techniques usuelles propres aux *rhizobia* selon Vincent, (1970) ; Somasegaran et Hoben, (1994) et Jordan, (1984). Cette caractérisation à pour but l'étude de la biodiversité des isolats, par une approche phénotypique, physiologique et biochimique en présence des souches de référence dont leur position taxonomique est connue. *Rhizobium sultae* (Benguedouar, 2000) et des souches appartenant à la classe des *Gamma protéobactéria* isolées et caractérisées par Benhizia et al.(2004).

Les Treize isolats des deux espèces *G. microcephala* et *A. uniflorum* étaient authentifiés en tant que bactéries des nodosités racinaires est basée sur l'aptitude à noduler leurs légumineuses hôtes. Les treize isolats étaient des bactéries en forme de bâtonnet, à Gram négatif, sans formation de spores et à croissance rapide (croissance visible dans de 2 jours) avec acidification de l'YMA-BTB. Seuls deux isolats (A et E) ont montré une activité 3-cétoglucosidase suite à l'oxydation de C3-glucosyl-saccharides. On n'a observé ni brunissement ni formation de précipité après 72 h de croissance sur l'agar mannitol et glycérophosphate de calcium. Tous les isolats sélectionnés présentaient une croissance lente sur milieu de lait tournesol associé à une activité protéolytique.

Les mesures de la densité optique ont indiqué des différences claires dans l'assimilation des hydrates de carbone par les isolats selon leur partenaire symbiotique. Des isolats provenant d'*A. uniflorum* présentaient une croissance maximale dans des milieux contenant du glucose, du maltose, de l'arabinose, du fructose et du saccharose. Inversement, les isolats de *G. microcephala* ne pas présentaient de faibles taux de croissance en utilisant des hydrates de carbone comme seule source de carbone. Aucune croissance ou faible croissance n'a été enregistrée sur le maltose, le raffinose, l'arabinose et le saccharose.

Les isolats ont montré une croissance maximale en utilisant la leucine et la proline comme sources d'azote. De plus, les résultats indiquent que l'asparagine ne favorise pas la croissance de tous les isolats. Les isolats suivants AN123, N1 et AB2' ne possèdent pas de tryptophane désaminase, et aucune formation d'indole n'a été observée parmi les isolats, alors que les autres bactéries testées produisent de l'acide indole-3-acétique et du tryptophane désaminase. Tous les rhizobia isolées de ont montré des activités pectinolytiques et cellulolytiques, alors qu'aucune activité cellulolytique n'a été détectée chez les gammaprotéobactéries Hs1, HnA, Hp7 et HcA1 utilisées comme souches de référence.

Toutes les bactéries testées présentaient un large spectre de tolérance au pH, car elles pouvaient croître dans des pH acides et alcalins allant de pH 3,5 à pH 10. Toutes les bactéries sélectionnées, sauf deux isolats (D et E), étaient plus tolérantes au sel 5% de NaCl. De plus, les souches testées ont montré des valeurs de CMI plus élevées pour l'antimoine jusqu'à 10 mg / ml et moins de résistance au mercure. Les isolats (N1, AN11' et B3) présentaient une tolérance maximale au plomb et au cuivre de 1,7 mg / mL et de 1,6 mg / mL, respectivement. La résistance au zinc a été rapportée à (2,1 mg / mL) pour les isolats (N1, AN11', AB2' et M). Le modèle de tolérance au métal était dans l'ordre Sb>Zn> Pb> Cu> Hg.

Les résultats montrent que tous les isolats étaient résistants à la spectinomycine, à l'érythromycine et à la gentamicine. Cependant, ils étaient plus sensibles à la kanamycine, au chloramphénicol, la streptomycine et la rifampicine.

L'analyse numérique ainsi que l'étude des profils protéiques présente des niveaux élevés de similarité des avec les *Gammaprotéobactéria* leurs réservant une place dans les rhizobia associées aux légumineuses

En fait, ce sont des bactéries polyvalentes avec des caractéristiques très intéressantes, qui offrent à ces légumineuses des avantages écologiques importants. Une caractérisation moléculaire plus poussée des isolats bactériens provenant de *G. microcephala* et *A. Uniflorum* en utilisant des méthodes conventionnelles devrait être effectuée pour un examen plus approfondi de leur diversité.

L'étude polyphasique des bactéries isolées à partir des nodules de *G. cinerea* dans des conditions environnementales difficiles a montré que ces rhizobia sont à croissance rapide et lente et présentent des capacités d'adaptation remarquables aux divers stress. Les isolats endosymbiont sont des poly-extrémophiles car ils sont thermo-tolérants (4-44 ° C), euryhalines (2-10%) et alcaliphiles

(plus forte croissance à pH > 9). Les analyses discriminantes à savoir AHC et MFA prouvent une certaine diversité microbienne des endosymbiotes des nodules de *G. cinerea* et classent ces BNL dans deux groupes distincts qui ont tous les deux un niveau élevé de similarité avec les souches de référence. Ceci confirme que ces endosymbiontes que nous avons isolés appartiennent aux bactéries nodulant les légumineuses. Bien que l'approche analytique avancée que nous avons utilisée soit innovante dans le domaine de la microbiologie et de la caractérisation phénotypique des BNL.

Le séquençage 16S rRNA fait ressortir que *G. cinerea* peut installer une symbiose avec différents rhizobia du sol de la classe des Gammaprotéobactéria (*Pantoea sp.*, *Luteibacter sp.*, *Dyella sp.*, *Curtobacterium sp.*, *Pantoea sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* et *Klebsiella sp.*) et Betaproteobacteria (*Achromobacter sp.*).

Il est intéressant à noter que nous sommes pleinement conscients que d'autres études sont nécessaires pour élucider la position taxonomique exacte des isolats associées aux *G. microcephala*, *A. uniflorum* et *G. cinerea* par le séquençage des gènes de ménage (*atpD*, *recA*, *glnII*) Ainsi, nous jugeons que des études avancées sont nécessaires pour approfondir notre compréhension du transfert horizontal des gènes impliqués dans la nodulation (*gène nod*) et la fixation de l'azote (*gène nif*) en plus aux gènes qui gouvernent la tolérance aux stress environnementaux et la relation entre ces gènes et les gènes symbiotiques.

ChapitreIV :
Références bibliographiques

- Abdelguerfi, A., Abdelguerfi-Laouar, M. (2004).** Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral: diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. *Options Méditerranéennes*, 62: 29. 550
- Allen, E. K., & Allen, O. N. (1950).** Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. *Bacteriological reviews*, 14(4), 273.
- Andrews, M., De Meyer, S., James, E., Stepkowski, T., Hodge, S., Simon, M., & Young, J. (2018).** Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: Occurrence and importance. *Genes*, 9(7), 321.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., (2017).** A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon*, 66(1): 44–77. DOI: 10.12705/661.3
- Ballen, K.G., Graham, P.H., Jones, R.K., Bowers, J.H. (1998).** Acidity and calcium interaction affecting cell envelope stability in *Rhizobium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(6): 582–587.
- Beck, D.P., Materon, L.A., Afandi, F. (1993).** Practical Rhizobium–Legume Technology Manual. Technical manual, No. 19, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria.
- Bekki, A., Trinchant, J.C., Rigaud, J. (1987).** Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by Medicago nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*, 71(1): 61–67.
- Benata, H., Mohammed, O., Noureddine, B., Abdelbasset, B., Abdelmoumen, H., Muresu, R., (2008).** Diversity of bacteria that nodulate *Prosopis juliflora* in the eastern area of Morocco. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 378–386.
- Benguedouar A, Corich V, Giacomini A, Squartini A, Nuti M. (1997).** Characterization of symbiotic bacteria from the Mediterranean legume crop *Hedysarum coronarium* (sulla) by multilocus enzyme electrophoresis. *Agricoltura Mediterranea*;127:173–7.
- Benguedouar A. (2000).** Etude de la symbiose : *Rhizobium-Hédysarum coronarium*. Essai de la caractérisation de l'espèce *Rhizobium hedysary*. Thèse de doctorat, Université de Constantine-Algerie. BENHAIZIA Y. 2006. Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* : *H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum* sub sp *capitatum* Desf. et *H. pallidum* Desf. Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliqué. université Mentouri Constatine
- 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.
- Benidire, L., Lahrouni, M., Daoui, K., El Abidine Fatemi, Z., Carmona, R.G., Göttfert, M., Oufdou, K. (2017).** Phenotypic and genetic diversity of Moroccan rhizobia isolated from *Vicia faba* and study of genes that are likely to be involved in their osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(1): 51–61. DOI: [10.1016/j.syapm.2017.09.003](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.003)

- Benselama, A., Tallah, S., Ounane, S.M., Bekki, A. (2014).** Effects of inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains on nodulation, nitrogen fixation, and yield of *Lablab purpureus* in Algeria. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 7(7): 1870–1876.
- Bensizerara, D., Chenchouni, H., Bachir, A.S., Houhamdi, M. (2013).** Ecological status interactions for assessing bird diversity in relation to a heterogeneous landscape structure. *Avian Biology Research*, 6(1): 67–77.
- Beringer j.e. (1974).** -R- Factor transfer in *Rhizobium* legume. *J. Gen. Microbiol.*, 84: 188-198
- Biro B., Bayoumi H.E., Balazsy S., Kecskes M. (1995).** Metal sensitivity of some symbiotic N₂ fixing bacteria and *Pseudomonas* strains. *Acta Biol Hung.* 46(1): 9-16.
- Blondeau,R.(1981).** Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Ed. Vuibert. Paris,102p.
- Bradai, L., Bouallala, M., Bouziane, N.F., Zaoui, S., Neffar, S., Chenchouni, H. (2015).** An appraisal of eremophyte 581 diversity and plant traits in a rocky desert of the Sahara. *Folia Geobotanica*, 50(3), 239-252.
- Brencic, A., & Winans, S. C. (2005).** Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 155-194.
- Brewin, N., & Dale Noel, K. (1992).** Rhizobium leguminosarum CFGN42 lipopolysaccharide antigenic changes induces by environmental conditions. *Journal of bacteriology*,174(7), 2222-2229.
- Broughton, W. J., Jabbouri, S., & Perret, X. (2000).** Keys to symbiotic harmony. *Journal of bacteriology*, 182(20), 5641-5652.
- Castro, S., Carrera, I., Martínez-Drets, G. (2000).** Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2): 173–177.
- Chaïch, K., Bekki, A., Bouras, N., Holtz, M.D., Soussou, S., Mauré, L., et al. (2017).** Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis*, 71(2): 111–120.
- Chen, W.X., Yan, G.H. (1988).** Numerical taxonomic study of fast – growing Soybean Rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* Ed. Gen.Nov.Int.J.Sy.Bacterial, 38. 392-397p.
- Cheriet, D., Ouarts, A., Chekireb, D., Babaarbi, S. (2014).** Phenotypic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from *Medicago ciliaris* L. growing in Zerizer from Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 8(17): 1763–1778.
- Cordero, S., Blair, G.J. (1978).** The effects of lime-pelleting and lime-superphosphate fertilizer on the growth of three annual legumes in an acid sandy soil. *Plant and Soil*, 50(1–3): 257–268.
- Coyne V. E., James M.D., Reid S.J., Rybicki E.P. (2002).** SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). *Molecular Biology Techniques Manual*. Third edition. University of Cape Town.

- Crespi, M., Galvez, S. (2000).** Molecular mechanisms in root nodule development .Ed.J.Plant.Growth. Regul **19**, 155-166p.
- Cronk, Q., Ojeda, I., Pennington, R.T. (2006).** Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics.Ed.Curr.Opin.Plant.Bio **9**, 99-103p. Henzell, E.F., Wallis,I. (1977). Transfer of nitrogen between legumes and other crops.Ed. biological Nitrogen fixation in farming systems of the tropics, 377p.
- Csonka, L.N., Hanson, A.D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Reviews in Microbiology*, 45(1): 569–606.
- Dangeard,P.A.(1926).**Recherche sur les tubercules radicaux des légumineuses. Ed. Le botaniste. Paris 16.
- Davet, P. (1996).** *Vie microbienne du sol et production végétale*. Editions Quae.
- David, I., Robson, M. J, (1986).** Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N₂ fixation, nodulation and growth of white clover. Ed. Ann. Bot. **57**,331-338p.
- De Lajudie P., Willems A., Pot B. Dewetting, Maestrojuan G., Neyra M., Collins M. D., Dreyfus B., Kersters K., Gillis M. (1994).** Polyphasic taxonomy of Rhizobia: Emendation of genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:715-733.
- De Lajudie, P., Martinez-Romero, E. (2017).** International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Agrobacterium and Rhizobium Minutes of the meeting, 7 September 2014, Tenerife, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(2): 516–520.
- Dommergues, Y., Duhoux, E., & Diem, H. G. (1999).** *Les arbres fixateurs d'azote: caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides*. Espaces 34.
- Dong, R., Zhang, J., Huan, H., Bai, C., Chen, Z., Liu, G. (2017).** High salt tolerance of a *Bradyrhizobium* strain and its promotion of the growth of *Stylosanthes guianensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8): 1625.
- Duhoux,M.,Nicole,M.(2004).**Biologie végétale. Association et interactions chez les plantes.Ed. Dunod.123p.
- Dunn, M.F. (2015).** Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(4): 411–451.
- Duran, A., Durai, H. (2003).***Genista vuralii* (Fabaceae), a new species from Turkey. *Annales Botanici Fennici*, 40: 605 113–116.
- El Hilali, I. (2006).** La symbiose *Rhizobium–Lupin*: biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Doctoral thesis, Univ. Mohammed V, Morocco.
- Elkan, G. H. (1992).** Taxonomy of the rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 446-450.

- Fahreus A.** 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16: 354-381.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fischer, H. M., Babst, M., Kaspar, T., Acuna, G., Arigoni, F., & Hennecke, H. (1993).** One member of a gro-ESL-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *The EMBO journal*, 12(7), 2901-2912.
- Foth, H. D. (1990).** Soil physical properties. *Fundamentals of Soil Science. 8th Eds. John Wiley & Sons, Inc., New York*, 69-96.
- Gao, J.L., Sun, J.G., Li, Y., Wang, E.T., Chen, W.X. (1994).** Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(1): 151-158.
- Geurts, R., & Bisseling, T. (2002).** Rhizobium Nod factor perception and signalling. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S239-S249.
- Gharzouli, R., Benahmed, A., Benhizia, Y., Benguedouar, A. (2012).** Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sulae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. *African Journal of Microbiology Research*, 6(30): 5940-5946.
- Ghosh, P. K., Sen, S. K., & Maiti, T. K. (2015).** Production and metabolism of IAA by *Enterobacter* spp.(Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3), 296-303.
- Giraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. DUNUD. Paris
- Giraud, E., L. Hanibal, J. Fardoux, A. Vermiglio, and B. Dreyfus. (2007).** Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitive*. Proceedings of National Academy of Science USA. 97, 14795-14800p.
- Glenn, A.R., Dilworth, M.J. (1994).** The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiology Letters*, 123(1-2): 1-9.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., Stacey, G. (2015).** Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science*, 20(3): 186-194.
- Graham, P.H., Parker, C.A. (1964).** Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant and Soil*, 20(3): 383-396.
- Graham P. H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38, 475-484.
- Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martinez, E., (1994).** Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(3): 198-207.

- Gray, J.X., Zhan, H.J., Levery, S.B., Battisti, L., Rolfe, B.G., Leigh, J.A. (1991).** Heterologous exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234 and consequences for nodule development. *Journal of Bacteriology*, 173(10): 3066–3077.
- Gremion, F. (2003).** Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., & Young, J. P. W. (2011).** Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(11), 1276-1288.
- Hadfield, J.D. (2010).** MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: the MCMCglmm R 630 package. *Journal of Statistical Software*, 33(2), 1–22. URL: www.jstatsoft.org/v33/i02/631
- Hadfield, J.D., Nakagawa, S. (2010).** General quantitative genetic methods for comparative biology: phylogenies, 632 taxonomies and multi-trait models for continuous and categorical characters. *J Evol Biol* 23: 494–508.
- Hageman, R. H. (1984).** Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. *Nitrogen in crop production*, (nitrogenincropp), 67-85.
- Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000).** Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1081-1084.
- Hassan, S.E.D. (2017).** Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*, 8: 687–695.
- Haynes, R. J. (1984).** Lime and phosphate in the soil-plant system. In *Advances in agronomy* (Vol. 37, pp. 249-315). Academic Press.
- Hirsch, P. R. (1996).** Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytologist*, 133(1), 159-171.
- Hofer AVA. (1941).** Characterization of *Bacterium radiobacter* (Beijerinck and Van Delden). *J. Bacteriol*;41: pp 193–224.
- Hopkins, W. G. (1999).** *Introduction to plant physiology* (No. Ed. 2). John Wiley and Sons.
- Hopkins, W.G. (2003).** *Physiologie végétale*. De Boeck, Bruxelles.
- Ibáñez, 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(1), 49-55.
- Igual, J. M., Velázquez, E., Mateos, P. F., Rodríguez-Barrueco, C., Cervantes, E., & Martínez-Molina, E. (2001).** Cellulase isoenzyme profiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups. *Plant and soil*, 229(1), 35-39.
- Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., Palusińska-Szys, M. (2015).** Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology*, 85: 94–113.

- Jarvis, W. R. (1977).** *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology, and pathogenicity* (No. 15).
- Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E., & Patel, J. J. (1982).** *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(3), 378-380.
- Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J, (1982).** *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. Ed. Int. J. Syst. Bacteriol 32,378-380p.
- Joffin JN, Leyral G. (2001).** Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques. Tome I. Canopé - CRDP de Bordeaux. France.
- Jordan, D.C. (1984).** *Rhizobiaceae*. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 234–244.
- Journet, E. P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., ... & Gianinazzi-Pearson, V. (2001).** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 737-748.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969).** Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 3(21), 132.
- Karunakaran R., Ebert K., Harvey S., Leonard M.E., Ramachandran V., Poole P. (2006).** Thiamine is synthesized by a salvage pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* strain 3841. *Journal of bacteriology* vol 188. N°:18, pp: 6661-6668.
- Kazi Tani, C. (2010).** Contribution à l'étude des communautés d'adventices des cultures du secteur phytogéographique Oranais (nord-ouest algérien): aspects botanique, agronomique et phyto-écologique. 642 Doctoral dissertation, University of Tlemcen, Algeria. URL: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/5698>
- Kerstens, K., Pot, B., Dewettinck, D., Torck, U., Vancanneyt, M., Vauterin, L., & Vandamme, P. (1994).** Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis. In *Bacterial Diversity and Systematics* (pp. 51-66). Springer, Boston, MA.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. (2012).** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 716-721.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C., and Maier, U.G. (2007).** Nitrogen fixation in eukaryotes--new models for symbiosis. Ed. BMC Evol Biol 7, 55p. Rees, D. C., & Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current opinion in chemical biology*, 4(5), 559-566.
- Kouakou, K., Kébé, B. I., Kouassi, N., Anno, A. P., Aké, S., & Muller, E. (2011).** Impact de la maladie virale du swollen shoot du cacaoyer sur la production de cacao en milieu paysan à Bazré (Côte d'Ivoire). *Journal of Applied Biosciences*, 43, 2947-2957.

- Laallam, H., Boughediri, L., Bissati, S., Menasria, T., Mouzaoui, M.S., Hadjadj, S., Hammoudi, R., Chenchouni, H. (2015).** Modeling the synergistic antibacterial effects of honey characteristics of different botanical origins from 645 the Sahara Desert of Algeria. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1239.
- Laemmli UK. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680–5.
- Lambert B., Joos H., Dierickx S., Vantome R., Swigs J., Kresters K., Montagu V.(1990).** Identification and plant interaction sp., a Predominant *Rhizobacterium* of yung Sugar Beet Plant. *Applied and environmental microbiology*. 56(4): 1093-1102
- Laranjo, M., Alexandre, A., Oliveira, S. (2017).** Global transcriptional response to salt shock of the plant microsymbiont *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *Research in Microbiology*, 168(1): 55–63.
- Le Quéré, A., Tak, N., Gehlot, H.S., Lavire, C., Meyer, T., Chapulliot, D., et al. (2017).** Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. *BMC Genomics*, 18(1): 85.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., & Schleifer, K. H.(1991).** Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, “*Brevibacterium flavum*” DSM 20411, “*Brevibacterium lactofermentum*” DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 255-260.
- Lindstrom K., Lehtomaki S. (1988).** Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (galega) compared with other fast-growing rhizobia FEMS Microbiol Lett. 50:277-287.
- Lucinski R., Polcyn W., Rotayczak L. (2002).** Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* legumes. *Acta Biochimia Polonia*. 49(2);537-546
- Maatallah J., Berraho E., Sanjuan J., Lluch C., (2002).** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie* 22:321-329
- Mahdhi M, De Lajudie P, Mars M.(2008).** Phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobial bacteria nodulating *Argyrolobium uniflorum* in Tunisian arid soils. *Can J Microbiol*;54:209–17.
- Maire, R. (1987).** Leguminosae. Flore de l’Afrique du Nord, vol. 16. Lechevalier, Paris.
- Martinez-romero e., Segova I., Mercante f. M., Franco A. A., Graham p., Pardo M. A.,(1991).** *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* l. beans and *Leucaena* spp. trees. *Int. J. Syst Bacteriol*. 41:417-426.
- Mayer, K., Gouzy, J., Küster, H., May, G.D., Retzel, E.F., and Young, N.D. (2006).** Bioinformatics resources for *Medicago truncatula* . The *Medicago truncatula* handbook. Mathesius, U., Journet, E.P.J., Sumner, L.W. Ed. ISBN 0-9754303-1-9

- Merabet C., Bekki A., Benrabah N., Baba Ahmed Bey M., Bouchentouf, I. Ameziane H., Rezki M.A., Domerg O., Cleyet-Marel J.C., Avarrej.C., Bèna G., Bailly X., De Lajudie P. (2006).** Distribution of meicago spieces and their microsymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Research and management*. 20: 1-13
- Miller, K.J., Wood, J.M. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1): 101–136.
- Mohamed, S.H., Smouni, A., Neyra, M., Kharchaf, D., Filali-Maltouf, A. (2000).** Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant and Soil*, 224(2): 171–183.
- Ndiaye A.A., Sylla S.N., Gueye M., Delajudie P., Ndoeye L. (2002).** Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrilamide – SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des Rhizobiums d'*Acacia tortilis* (Forsk) Hayne supsp. *Raddiana* (Savi) *Brenan*. *African Journal of Science and Technology. Science and Engineering Series* 3(1):33-43
- Newton, I. (1998).** *Population limitation in birds*. Academic press.
- Nielsen, J. K. (1978).** Host plant selection of monophagous and oligophagous flea beetles feeding on crucifers. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24(3), 562-569.
- Nkot, L. N., Krasova-Wade, T., Etoa, F. X., Sylla, S. N., & Nwaga, D. (2008).** Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in diverse land use systems of humid forest zone in Cameroon. *applied soil ecology*, 40(3), 411-416.
- Novo, L.A., Castro, P.M., Alvarenga, P., da Silva, E.F. (2018).** Plant Growth–Promoting Rhizobacteria-Assisted Phytoremediation of Mine Soils. In: Prasad, M.N.V., de Campos Favas, P.J., Maiti, S.K. (eds.). *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*, pp. 281–295. DOI: [10.1016/B978-0-12-812986-9.00016-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812986-9.00016-6)
- Obato, M. (1989).** Généralités sur la symbiose fixatrice d'azote rhizobium- légumineuse. Ed. Vuibert. Paris. 102 p.
- Pant, P., Pant, P. (2017).** Ecological restoration techniques for management of degraded, mined-out areas and the role played by rhizospheric microbial communities. In: Singh R., Kumar S. (eds) *Green Technologies and 661 Environmental Sustainability*. Springer, Cham, pp. 437–453.
- Paudyal, S.P., Gupta, V.N. (2017).** Bio-chemical characterization of rhizobia isolated from root nodules of Velvet bean (*Mucuna pruriens* L.). *Our Nature*, 15(1–2): 7–12.
- Pelmont, J. (1995).** Bactéries et environnement. Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires. 255p.
- Perret, X.; Staehe Lin, C., and Selander, R.K. (2000).** Molecular basis of Symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 180-201 p.
- Peters, N. K., & Verma, D. P. S. (1990).** Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 3, 4-8.
- Polhill, R.M. (1981).** *Advances in legume systematics: Parts 1 & 2*. Kew, Royal Botanic Gardens.

- Prell, J., White, J.P., Bourdes, A., Bunnewell, S., Bongaerts, R.J., Poole, P.S. (2009).** Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30): 12477–12482.
- Prin Y., Galianam A., Ducousson A., Dupuy I., De Lajudie P., Neyra M. (1993).** LES *Rhizobium* d'acacia biodiversité et taxonomie. *Bois et Forêts des Tropiques*, 238 (04) :1-20
- Pujic, P., & Normand, P. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur*, (298), 26-29.
- Quézel, P., Santa, S. (1962).** New flora of Algeria and southern desert regions. CNRS, Paris, France.
- R Core Team (2016).** R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org/>
- Rai, R., Nasar, S.K.T., Singh, S.J., Prasad, V. (1985).** Interactions between *Rhizobium* strains and lentil (*Lens culinaris* Linn.) genotypes under salt stress. *The Journal of Agricultural Science*, 104(1): 199–205. DOI: [10.1017/S0021859600043124](https://doi.org/10.1017/S0021859600043124)
- Rangaraj, P., Rüttimann-Johnson, C., Shah, V. K., & Ludden, P. W. (2001).** Accumulation of Fe-labeled precursors of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase on NifH and NifX of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry*.
- Raven, J. P. (2007).** *Generation, flow and manipulation of a microfoam* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- Raza, S., Jørnsgård, B., Abou-Taleb, H., Christiansen, J.L. (2001).** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 32(6): 379–383. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2001.00925.x
- Reitzer, L. (2003).** Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1): 155–176.
- Roth G.M. (1994).** Electrophoresis of enzymes. Vol 40 : 127129
- Rubio, L. M., & Ludden, P. W. (2008).** Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual review of microbiology*, 62.
- Safronova, V.I., Piluzza, G., Belimov, A.A., Bullitta, S. (2004).** Phenotypic and genotypic analysis of rhizobia isolated from pasture legumes native of Sardinia and Asinara Island. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 115–127.
- Sahgal, M., & Johri, B. N. (2003).** The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*, 43-48.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Salwani, S., Amir, H.G., Najimudin, N. (2012).** Evidence of diazotrophic symbionts in the leguminous cover crop *Mucuna bracteata*. *J. Trop. Agr. Sci.* 35: 537.

- Saoudi, M. (2008).** Les bactéries nodulant les légumineuses (BNL): Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*.
- Sawada, A., Takihara, Y., Kim, J.Y., et Tokimasa, S. (2003).** A congenital mutation of the novel gene LRRC8 causes agammaglobulinemia in humans. *J Clin Invest.* 1707-13 p.
- Sazanova, A. L., Kuznetsova, I. G., Safronova, V. I., Belimov, A. A., Popova, Z. P., Tikhomirova, N. Y., & Osledkin, Y. S. (2017).** Study of the genetic diversity of microsymbionts isolated from *hedysarum gmelinii subsp. Setigerum*, growing in the baikal lake region. *Biology agricultural*, 1004.
- Schlinkert-miller M., and Pepper I. L., (1988).** Physiological and biochemical characteristics of a fast-growing strain of Lupin rhizobia isolated from the Sonaran Desert. *Soil Biol. Biochem.* 20: 319-322.
- Scholla, M. H., & Elkan, G. H. (1984).** Rhizobium fredii sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(4), 484-486.
- Sebihi, F.Z., (2008).** Les Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse fourragère *Hedysarum perrauderianum*. Thèse de Magister. Université de Constantine. Algérie.
- Shamseldin, A., Werner, D. (2005).** High salt and high pH tolerance of new isolated Rhizobium etli strains from Egyptian soils. *Current Microbiology*, 50(1): 11–16.
- Shamseldin, A., Carro, L., Peix, A., Velázquez, E., Moawad, H., Sadowsky, M.J. (2016).** The symbiovar *trifolii* of *Rhizobium bangladeshense* and *Rhizobium aegyptiacum* sp. nov. nodulate *Trifolium alexandrinum* in Egypt. *685 Systematic and Applied Microbiology*, 39(4): 275–279.
- 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.
- Shiraishi, A., Matsushita, N., Hougetsu, T. (2010).** Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:269–274.
- Skerman, V., McGowan, V., Sneath, P., Moore, W., & Moore, L. V. (1980).** Approved lists. *Int J Syst Bacteriol*, 30, 225-420.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R. (1973).** Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco W.H. Freeman & Co; 573 p.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J. (1994).** Counting rhizobia by a plant infection method. In *Handbook for Rhizobia*. Springer, New York, NY. pp. 58–64. DOI: 10.1007/978-1-4613-8375-8_6
- Spaink, H.P., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N., and Lugtenberg, B.J. (1991).** A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of Rhizobium. *Nature*, 125-130p.

- Spiegelhalter, D.J., Best, N.G., Carlin, B.P., Linde, A. (2014).** The deviance information criterion: 12 years on. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 76:485–493.
- Sridevi M., Mallaiah K. V. (2007).** Production of indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sesbania* species. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 1:125-128
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Cassella S., Nuti M.P. (1998).** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*, *J. Appl. Microbiol.* 48: 81-89.
- Taketani, R.G., Kavamura, V.N., dos Santos, S.N. (2017).** Diversity and Technological Aspects of Microorganisms from Semiarid Environments. In: de Azevedo, J., Quecine, M. (eds) *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*, pp. 3–19. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-55804-2_1
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, and Kumar S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994).** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
- Torche, A., Benhizia, Y., Benguedouar, A., Gharzouli, R., Benhizia, H., Khelifi, D., Squartini, A. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. *Sciences & Technologie C*, 32: 43–50.
- Torche A, Benhizia H, Rosselli R, Romoli O, Zanardo M, Baldan E.(2014).** Characterization of bacteria associated with nodules of two endemic legumes of Algeria, *Hedysarum naudinianum* and *H. perrauderianum*. *Ann Microbiol.* 10.1007/s13213-013-0745-3.
- Tortora, G.J., Funk, B.R., Case, C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Ed. Du renouveau. Inc.826-830p.
- Tortora, V. (2003).** *Étude de la production d'eau chaude sanitaire du bâtiment François Mitterrand. Prévention du risque légionellose. Application de la circulaire du 22 avril 2002* (Doctoral dissertation).
- Tourte, Y., Bordonneau, M., Henry, M., & Tourte, C. (2005).** *Le monde des végétaux: organisation, physiologie et génomique.* Dunod.
- Trinick, T.H., Ratet, P., Kondorosi, E., Durand, P., Kamate, K., Bauer, P., and Kondorosi, A. (1998).** Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 17, 345-355p.
- Valé, M. (2006).** Quantification et prédiction de la minéralisation nette de l'azote du sol in situ, sous divers pédoclimats et systèmes de culture français (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse).

- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z. (2010).** Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science*, (5969): 1122–1126.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.M., De Vos, P., Willems, A. (2002).** *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(4), 507–512.
- Vargas, L.K., Volpiano, C.G., Lisboa, B.B., Giongo, A., Beneduzi, A., Passaglia, L.M.P. (2017).** Potential of rhizobia as plant growth-promoting rhizobacteria. In: Zaidi A., Khan M., Musarrat J. (eds.). *Microbes for Legume Improvement*. Springer, Cham, pp. 153–174. DOI: [10.1007/978-3-319-59174-2_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2_7)
- Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M. H., Rivas, R., & Martínez-Molina, E. (2017).** Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In: Zaidi A., Khan M., Musarrat J. (eds.). *Microbes for Legume Improvement*. Springer, Cham, pp. 1–43.
- Verma, P., Yadav, A.N., Kumar, V., Singh, D.P., Saxena, A.K. (2017).** Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement. In: Singh, D., Singh, H., Prabha, R. (eds) *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Springer, Singapore, pp. 543–580.
- Vernie, T. (2008).** Analyse fonctionnelle d'EFD, Un régulateur transcriptionnel de l'nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. 125-145p.
- Vincent, J.M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publication Ltd. Oxford, UK.
- Wade T. (1998).** Etude de la photosynthèse bactérienne chez un *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene*. Photoactivité et caractérisation du complexe capteur de lumière.: 2.
- Wedhastri, S., Fardhani, D.M., Kabirun, S., Widada, J., Widiyanto, D., Evizal, R., Prijambada, I. D. (2013).** Legume nodulating bacterium, *Achromobacter xylosoxidans* found in tropical shrub agroecosystem, Sumatra, Indonesia. *Indones. J. Biotechnol.* 18:161–16.
- Wei, T., Simko, V. (2017).** R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot>
- Weir, B.S. (2006).** Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia. PhD thesis, The University of Auckland, New Zealand.
- Werner D. (1992).** Symbioses of plants and microbes. Philips – University Marburg Germany. Edition Chapman and Hall.

- Westhoek, A., Field, E., Rehling, F., Mulley, G., Webb, I., Poole, P.S., Turnbull, L.A. (2017).** Policing the legume-728 Rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice. *Scientific Reports*, 7(1): 1419. DOI: 10.1038/s41598-729 017-01634-2 730
- Yadav, N.K., Vyas, S.R. (1973).** Salt and pH tolerance of Rhizobia. *Folia Microbiologica*, 18(3): 242–247.
- Young, J. P. W. (1992).** Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biological nitrogen fixation, 1544*, 43-86.
- Zahran H.H. (1999).** *Rhizobium* Legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in a arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(4): 968-989.
- Zahran, H.H. (2017).** Legumes-microbes interactions under stressed environments. In: Zaidi A., Khan M., Musarrat J. (eds.). *Microbes for Legume Improvement*. Springer, Cham, pp. 301–339. DOI: 10.1007/978-3-319-59174-2_13
- Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M. (2004).** Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol*;27:380–95.
- Zhang x., harper r., Karsisto m., and Lindström k.,(1991).** Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 104-113.

Annexes

Composition de la solution nutritive en g/l (Fähreus, 1957)

Ca Cl ₂	0.10
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12
KH ₂ PO ₄	0.10
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0.15
Citrate de fer	0.005
Micro éléments	1 ml

Solution micro éléments g/l :

H ₃ BO ₃	2.86
MnSO ₄ 4 H ₂ O	2.03
Zn SO ₄ 5 H ₂ O	0.22
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	0.08
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.14
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Tableau 09: Parameters of the Markov Chain Monte Carlo generalized linear mixed model (MCMCglmm) testing the variation of optical density of root-nodulating bacteria of the host plant *Genista cinerea* (Fabaceae) growing in drylands of North Africa. Only significant terms are shown (full model summaries are provided in Tables S3-S6)

Coefficients	Post.mean	l-95%CI	u-95%CI	eff.samp	P	Sig.
Gaussian MCMCglmm (OD ~ Isolates × pH)						
Intercept	-7.59	-3221	3458	1080	0.768	ns
GIg15 × pH	0.08	0.01	0.15	1000	0.018	*
Gaussian MCMCglmm (OD ~ Isolates × NaCl)						
Intercept	-12.55	-17.45	11.85	3111	0.506	ns
GD	0.44	0.19	0.63	753	<0.001	***
GI × [NaCl]=4%	-0.35	-0.66	-0.04	1000	0.030	*
GIg11 × [NaCl]=4%	-0.37	-0.69	-0.06	1000	0.026	*
GIg14 × [NaCl]=4%	-0.35	-0.65	-0.01	1000	0.032	*
GI22 × [NaCl]=4%	-0.47	-0.78	-0.15	1000	0.006	**
GIg23 × [NaCl]=4%	-0.33	-0.63	0.00	1000	0.050	*
GIg11 × [NaCl]=8%	-0.43	-0.74	-0.10	1000	0.012	*
GIg14 × [NaCl]=8%	-0.40	-0.74	-0.09	1000	0.018	*
GIg15 × [NaCl]=8%	-0.43	-0.76	-0.11	1000	0.016	*
GI22 × [NaCl]=8%	-0.57	-0.90	-0.24	1000	<0.001	***
GD × [NaCl]=10%	-0.37	-0.69	-0.07	1000	0.020	*
GI × [NaCl]=10%	-0.45	-0.75	-0.12	1000	0.008	**
GIg11 × [NaCl]=10%	-0.34	-0.68	-0.04	1000	0.046	*
GIg12 × [NaCl]=10%	-0.43	-0.76	-0.12	756	0.008	**
GIg13 × [NaCl]=10%	-0.33	-0.65	-0.03	1000	0.044	*
GI22 × [NaCl]=10%	-0.45	-0.74	-0.11	1101	0.010	**
GIg23 × [NaCl]=10%	-0.37	-0.70	-0.08	1000	0.034	*
Gaussian MCMCglmm (OD ~ Isolates + Sugars)						
Intercept	0.12	0.07	0.17	1000	<0.001	***
GIg11	-0.06	-0.11	0.00	1000	0.032	*
GIg12	-0.06	-0.11	0.00	1000	0.050	*
GIg13	-0.05	-0.11	0.00	1000	0.050	*
Galactose	0.52	0.49	0.54	906	<0.001	***
Glucose	0.04	0.02	0.07	1000	<0.001	***
Xylose	0.60	0.58	0.62	1000	<0.001	***
Gaussian MCMCglmm (OD ~ Isolates × AA)						
Intercept	-19.31	-1558	1307	4478	0.552	ns
GD × Isoleucine	0.36	0.13	0.55	1000	0.002	**
GI × Isoleucine	0.32	0.13	0.55	1000	0.002	**
GIg11 × Isoleucine	0.35	0.12	0.55	1000	<0.001	***
GIg12 × Isoleucine	0.32	0.10	0.52	1000	0.002	**
GIg13 × Isoleucine	0.23	0.01	0.43	1000	0.042	*
GIg14 × Isoleucine	0.29	0.09	0.52	1000	0.010	*
GIg15 × Isoleucine	0.40	0.20	0.63	1000	<0.001	***
GIg21 × Isoleucine	0.36	0.13	0.56	1000	0.002	**
GI22 × Isoleucine	0.28	0.07	0.50	893	0.004	**
GIg23 × Isoleucine	0.31	0.07	0.51	1000	0.004	**
GD × Leucine	0.32	0.12	0.52	1000	<0.001	***
GI × Leucine	0.38	0.17	0.58	1000	<0.001	***
GIg11 × Leucine	0.41	0.19	0.60	1000	<0.001	***
GIg12 × Leucine	0.30	0.08	0.50	1000	0.002	**
GIg14 × Leucine	0.35	0.16	0.56	1000	<0.001	***

GIg15 × Leucine	0.33	0.13	0.54	1000	<0.001	***
GIg21 × Leucine	0.43	0.22	0.63	1117	<0.001	***
GI22 × Leucine	0.36	0.16	0.58	1097	<0.001	***
GIg23 × Leucine	0.24	0.02	0.44	1122	0.024	*
GIg13 × Proline	-0.23	-0.45	-0.03	1131	0.034	*

(see Table 1 for isolate codes, Post.mean: mean of the posterior distribution, l-95% CI: lower bound of 95% confidence interval, u-95% CI: upper bound of 95% confidence interval, eff.samp: effective sample size=number of samples taken adjusted for autocorrelation in the chains, *P*: p-value of MCMCglmm, Sig.: significance codes; ***: *P* <0.001, **: *P* <0.01, *: *P* <0.05, ^{ns}: *P* >0.05)

Table S1. Long-term monthly climatic data of the region of Bekkaria (35°21'20.14"N, 8°15'06.14"E, elevation: 960 m a.s.l.) in northeastern Algeria

Parameters	January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December	Average
Mean temperature [°C]	6.5±0.9	7.5±0.9	10.6±1.0	13.5±1.1	17.5±1.0	22.8±1.2	26.0±1.4	25.7±1.2	22.2±1.1	15.8±1.1	11.1±1.0	7.9±0.8	15.59±1.1
Maximum temperature [°C]	10.6±1.7	12.1±1.8	16.1±1.3	20.5±1.5	25.0±2.5	31.1±3.5	35.0±3.5	33.9±3.2	29.3±2.3	21.7±1.9	16.1±1.8	11.6±1.5	21.92±2.2
Minimum temperature [°C]	1.7±1.8	2.7±1.9	4.4±2.0	7.1±2.0	11.6±2.1	16.1±2.3	18.8±2.3	18.2±2.1	16.1±1.9	11.1±2.0	6.6±2.2	2.7±2.1	9.76±2.1
Precipitation [mm]	27±26.4	30±31.7	46±27.9	34±17.3	40±14.3	27±10.3	10±3.9	26±4.7	37±9.6	28±7.2	32±14.7	24±28.3	30.08±16.4
Potential evapotranspiration [mm]	32.6±11.5	44.7±13.1	74.8±24.1	99.9±26.9	122.5±29	153.5±34.2	181.4±31.1	165.4±24.8	122.4±19.6	82.5±20.5	44.9±17.8	37.9±12.7	96.88±22.1
Water vapor pressure [hPa]	7.3±1.5	7.2±1.5	7.8±1.9	8.2±2.9	11.7±4.2	14.0±5.3	15.2±5.7	14.3±5.7	15.2±4.8	11.1±3.6	9.8±2.2	7.5±1.8	10.78±3.4
Wind speed [km/h]	6.12±2.2	7.92±2.3	6.12±3.4	6.12±2.3	6.12±2.3	6.12±2.1	6.12±2.0	5.40±1.8	5.76±1.2	6.12±2.0	6.12±2.3	7.20±2.4	6.27±2.2
Sunshine frequency [%]	55±9	56±6	57±4.5	57±4.9	57±2.5	65±5.5	72±6.1	72±5.2	66±6.0	58±3.9	58±7.3	56±9.8	60.8±5.9
Day length [h]	10:01	10:51	11:55	13:02	13:58	14:26	14:13	13:25	12:22	11:15	10:16	09:45	12:08
Sunshine hours [h]	05:30	06:04	06:48	07:26	07:57	09:23	10:14	09:39	08:09	06:31	05:57	05:27	07:26
Ground frost frequency [%]	27	21	13	4	0	0	0	0	0	0	5	21	7
Effective rain [mm]	26	29	43	32	37	26	10	25	35	27	30	23	342
Effective rain ratio [%]	96	95	93	95	94	96	98	96	94	96	95	96	95
Rainy days	5	5	8	5	6	3	1	3	5	4	5	4	54
Solid precipitation ratio [%]	8	6	3	1	0	0	0	0	0	1	2	5	2

Parameters	January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December	Average
Mean temperature [°C]	6.5±0.9	7.5±0.9	10.6±1.0	13.5±1.1	17.5±1.0	22.8±1.2	26.0±1.4	25.7±1.2	22.2±1.1	15.8±1.1	11.1±1.0	7.9±0.8	15.59±1.1
Maximum temperature [°C]	10.6±1.7	12.1±1.8	16.1±1.3	20.5±1.5	25.0±2.5	31.1±3.5	35.0±3.5	33.9±3.2	29.3±2.3	21.7±1.9	16.1±1.8	11.6±1.5	21.92±2.2
Minimum temperature [°C]	1.7±1.8	2.7±1.9	4.4±2.0	7.1±2.0	11.6±2.1	16.1±2.3	18.8±2.3	18.2±2.1	16.1±1.9	11.1±2.0	6.6±2.2	2.7±2.1	9.76±2.1
Precipitation [mm]	27±26.4	30±31.7	46±27.9	34±17.3	40±14.3	27±10.3	10±3.9	26±4.7	37±9.6	28±7.2	32±14.7	24±28.3	30.08±16.4
Potential evapotranspiration [mm]	32.6±11.5	44.7±13.1	74.8±24.1	99.9±26.9	122.5±29	153.5±34.2	181.4±31.1	165.4±24.8	122.4±19.6	82.5±20.5	44.9±17.8	37.9±12.7	96.88±22.1
Water vapor pressure [hPa]	7.3±1.5	7.2±1.5	7.8±1.9	8.2±2.9	11.7±4.2	14.0±5.3	15.2±5.7	14.3±5.7	15.2±4.8	11.1±3.6	9.8±2.2	7.5±1.8	10.78±3.4
Wind speed [km/h]	6.12±2.2	7.92±2.3	6.12±3.4	6.12±2.3	6.12±2.3	6.12±2.1	6.12±2.0	5.40±1.8	5.76±1.2	6.12±2.0	6.12±2.3	7.20±2.4	6.27±2.2
Sunshine frequency [%]	55±9	56±6	57±4.5	57±4.9	57±2.5	65±5.5	72±6.1	72±5.2	66±6.0	58±3.9	58±7.3	56±9.8	60.8±5.9
Day length [h]	10:01	10:51	11:55	13:02	13:58	14:26	14:13	13:25	12:22	11:15	10:16	09:45	12:08
Sunshine hours [h]	05:30	06:04	06:48	07:26	07:57	09:23	10:14	09:39	08:09	06:31	05:57	05:27	07:26

Ground frost frequency [%]	27	21	13	4	0	0	0	0	0	0	5	21	7
Effective rain [mm]	26	29	43	32	37	26	10	25	35	27	30	23	342
Effective rain ratio [%]	96	95	93	95	94	96	98	96	94	96	95	96	95
Rainy days	5	5	8	5	6	3	1	3	5	4	5	4	54
Solid precipitation ratio [%]	8	6	3	1	0	0	0	0	0	1	2	5	2

Table S2. Location and climatic information (classifications and indices) of Bekkaria, Province of Tebessa in northeastern Algeria

Climatic Information	Value/class
Location	
Latitude (North)	08.269°
Longitude (East)	35.372°
Altitude [m]	940 m
WMO station code (Tebessa)	60475
Climate characteristics	
Köppen Class:	BSk B=Arid Climate S=Steppe k=cold
Budyko climate	Desert
Radiational index of dryness	3.5
Budyko evaporation [mm/year]	352
Budyko runoff [mm/year]	9
Budyko evaporation [%]	97.4
Budyko runoff [%]	2.6
Aridity	Semiarid
Aridity index	0.31
Moisture index [%]	-69
De Martonne index	14
Precipitation deficit [mm/year]	802
Climatic NPP *	639
NPP(Temperature)	1896
NPP(Precipitation)	639
Gorczynski continentality index:	36.9

* NPP: Climatic net primary production (in g of DM/m²/year) is precipitation limited.

Table S3. Parameters of the Markov Chain Monte Carlo generalized linear mixed model (MCMCglmm) testing the effects of different pHs on the variation of growths of rhizobial bacteria nodulating roots of the host plant *Genista cinerea* (Fabaceae) growing in drylands of North Africa

Parameters	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	sig.
(Intercept)	-7.59	-3221	3458	1080	0.768	ns
GD	-0.17	-0.67	0.28	1000	0.460	ns
GI	196.0	-6183	6071	976	0.556	ns
Glg11	-127.4	-3699	6000	1557	0.958	ns
Glg12	-127.3	-3699	6000	1557	0.852	ns
Glg13	-127.2	-3699	6000	1557	0.678	ns
Glg14	-127.4	-3699	5999	1557	0.922	ns
Glg15	-127.4	-3699	6000	1557	0.842	ns
Glg21	-127.5	-3699	5999	1557	0.740	ns
GI22	195.8	-6183	6071	976	0.938	ns
Glg23	-127.3	-3699	6000	1557	0.782	ns
pH	0.02	-0.04	0.09	1000	0.430	ns
GD × pH	0.01	-0.05	0.09	1000	0.784	ns
GI × pH	0.02	-0.05	0.09	1000	0.580	ns
Glg11 × pH	0.05	-0.02	0.12	1000	0.146	ns
Glg12 × pH	0.04	-0.04	0.10	1000	0.320	ns
Glg13 × pH	0.04	-0.03	0.11	1113	0.220	ns
Glg14 × pH	-0.02	-0.09	0.05	1000	0.602	ns
Glg15 × pH	0.08	0.01	0.15	1000	0.018	*
Glg21 × pH	0.01	-0.06	0.07	1000	0.716	ns
GI22 × pH	0.00	-0.06	0.08	1244	0.936	ns
Glg23 × pH	0.03	-0.04	0.11	1000	0.390	ns

(see Table 1 for isolate codes, Post.mean: mean of the posterior distribution, l-95% CI: lower bound of 95% confidence interval, u-95% CI: upper bound of 95% confidence interval, eff.samp: effective sample size=number of samples taken adjusted for autocorrelation in the chains, pMCMC: p-value of MCMCglmm, Sig.: significance codes; *: $P < 0.05$, ns: $P > 0.05$)

Table S4. Parameters of MCMCglmm testing the effects of different salinity levels (NaCl concentrations) on the variation of growths of rhizobia nodulating roots of *Genista cinerea* (Fabaceae) growing in drylands of North Africa

Parameters	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	Sig.
(Intercept)	-12.55	-17.45	11.85	3111	0.506	ns
GD	0.44	0.19	0.63	753	<0.001	***
GI	-6.82	-40.02	15.50	29837	0.100	ns
Glg11	-20.60	-41.12	23.90	2494	0.090	ns
Glg12	-20.62	-41.01	23.74	2495	0.092	ns
Glg13	-20.64	-41.08	23.73	2495	0.090	ns
Glg14	-20.61	-41.08	23.82	2495	0.092	ns
Glg15	-20.63	-41.09	23.79	2495	0.088	ns
Glg21	-20.58	-41.07	23.89	2495	0.088	ns
GI22	-6.74	-39.94	15.61	29837	0.100	ns
Glg23	-20.63	-41.18	23.78	2495	0.092	ns
[NaCl]=4%	-0.01	-0.31	0.25	1000	0.942	ns
[NaCl]=6%	-0.01	-0.29	0.29	811	0.944	ns
[NaCl]=8%	0.17	-0.11	0.47	1000	0.244	ns
[NaCl]=10%	-0.05	-0.35	0.23	1000	0.708	ns
GD × [NaCl]=4%	-0.27	-0.60	0.03	1000	0.088	ns
GI × [NaCl]=4%	-0.35	-0.66	-0.04	1000	0.030	*
Glg11 × [NaCl]=4%	-0.37	-0.69	-0.06	1000	0.026	*
Glg12 × [NaCl]=4%	-0.21	-0.52	0.10	853	0.212	ns

GIg13 × [NaCl]=4%	-0.28	-0.61	0.02	1000	0.084	ns
GIg14 × [NaCl]=4%	-0.35	-0.65	-0.01	1000	0.032	*
GIg15 × [NaCl]=4%	-0.27	-0.60	0.03	1000	0.082	ns
GIg21 × [NaCl]=4%	-0.31	-0.63	-0.01	1000	0.064	ns
GI22 × [NaCl]=4%	-0.47	-0.78	-0.15	1000	0.006	**
GIg23 × [NaCl]=4%	-0.33	-0.63	0.00	1000	0.050	*
GD × [NaCl]=6%	-0.08	-0.42	0.23	821	0.666	ns
GI × [NaCl]=6%	-0.05	-0.36	0.28	1149	0.810	ns
GIg11 × [NaCl]=6%	0.01	-0.30	0.33	790	0.964	ns
GIg12 × [NaCl]=6%	-0.17	-0.48	0.17	846	0.308	ns
GIg13 × [NaCl]=6%	0.03	-0.30	0.33	841	0.886	ns
GIg14 × [NaCl]=6%	-0.08	-0.39	0.23	775	0.630	ns
GIg15 × [NaCl]=6%	0.08	-0.21	0.40	814	0.642	ns
GIg21 × [NaCl]=6%	-0.02	-0.30	0.35	923	0.900	ns
GI22 × [NaCl]=6%	0.05	-0.26	0.38	854	0.756	ns
GIg23 × [NaCl]=6%	0.03	-0.31	0.33	848	0.832	ns
GD × [NaCl]=8%	-0.31	-0.64	0.00	1000	0.068	ns
GI × [NaCl]=8%	-0.27	-0.59	0.06	868	0.098	ns
GIg11 × [NaCl]=8%	-0.43	-0.74	-0.10	1000	0.012	*
GIg12 × [NaCl]=8%	-0.27	-0.60	0.05	1000	0.110	ns
GIg13 × [NaCl]=8%	-0.18	-0.50	0.15	1000	0.250	ns
GIg14 × [NaCl]=8%	-0.40	-0.74	-0.09	1000	0.018	*
GIg15 × [NaCl]=8%	-0.43	-0.76	-0.11	1000	0.016	*
GIg21 × [NaCl]=8%	-0.25	-0.58	0.05	1000	0.140	ns
GI22 × [NaCl]=8%	-0.57	-0.90	-0.24	1000	<0.001	***
GIg23 × [NaCl]=8%	-0.30	-0.63	0.03	861	0.080	ns
GD × [NaCl]=10%	-0.37	-0.69	-0.07	1000	0.020	*
GI × [NaCl]=10%	-0.45	-0.75	-0.12	1000	0.008	**
GIg11 × [NaCl]=10%	-0.34	-0.68	-0.04	1000	0.046	*
GIg12 × [NaCl]=10%	-0.43	-0.76	-0.12	756	0.008	**
GIg13 × [NaCl]=10%	-0.33	-0.65	-0.03	1000	0.044	*
GIg14 × [NaCl]=10%	-0.23	-0.56	0.07	695	0.142	ns
GIg15 × [NaCl]=10%	-0.33	-0.63	0.01	777	0.052	ns
GIg21 × [NaCl]=10%	-0.33	-0.64	0.01	1000	0.058	ns
GI22 × [NaCl]=10%	-0.45	-0.74	-0.11	1101	0.010	**
GIg23 × [NaCl]=10%	-0.37	-0.70	-0.08	1000	0.034	*

(see Table 1 for isolate codes, Post.mean: mean of the posterior distribution, l-95% CI: lower bound of 95% confidence interval, u-95% CI: upper bound of 95% confidence interval, eff.samp: effective sample size=number of samples taken adjusted for autocorrelation in the chains, pMCMC: p-value of MCMCglmm, Sig.: significance codes; ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, ns: $P > 0.05$)

Table S5. MCMCglmm testing the effects of different carbohydrates on the variation of growth of rhizobia nodulating roots of *Genista cinerea* (Fabaceae) growing in drylands of North Africa

Parameters	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	Sig.
(Intercept)	0.12	0.07	0.17	1000	<0.001	***
GD	-0.04	-0.10	0.01	1000	0.110	ns
GI	-0.05	-0.11	0.00	1000	0.078	ns
GIg11	-0.06	-0.11	0.00	1000	0.032	*
GIg12	-0.06	-0.11	0.00	1000	0.050	*
GIg13	-0.05	-0.11	0.00	1000	0.050	*
GIg14	-0.05	-0.11	0.00	1000	0.066	ns
GIg15	-0.05	-0.10	0.01	1000	0.060	ns
GIg21	-0.04	-0.10	0.01	1058	0.126	ns
GI22	-0.05	-0.10	0.01	1000	0.098	ns
GIg23	-0.05	-0.11	-0.01	808	0.058	ns
Galactose	0.52	0.49	0.54	906	<0.001	***
Glucose	0.04	0.02	0.07	1000	<0.001	***
Lactose	-0.02	-0.05	0.00	1000	0.058	ns
Xylose	0.60	0.58	0.62	1000	<0.001	***

(see Table 1 for isolate codes, Post.mean: mean of the posterior distribution, l-95% CI: lower bound of 95% confidence interval, u-95% CI: upper bound of 95% confidence interval, eff.samp: effective sample size=number of samples taken adjusted for autocorrelation in the chains, pMCMC: p-value of MCMCglmm, Sig.: significance codes; ***: $P < 0.001$, *: $P < 0.05$, ns: $P > 0.05$)

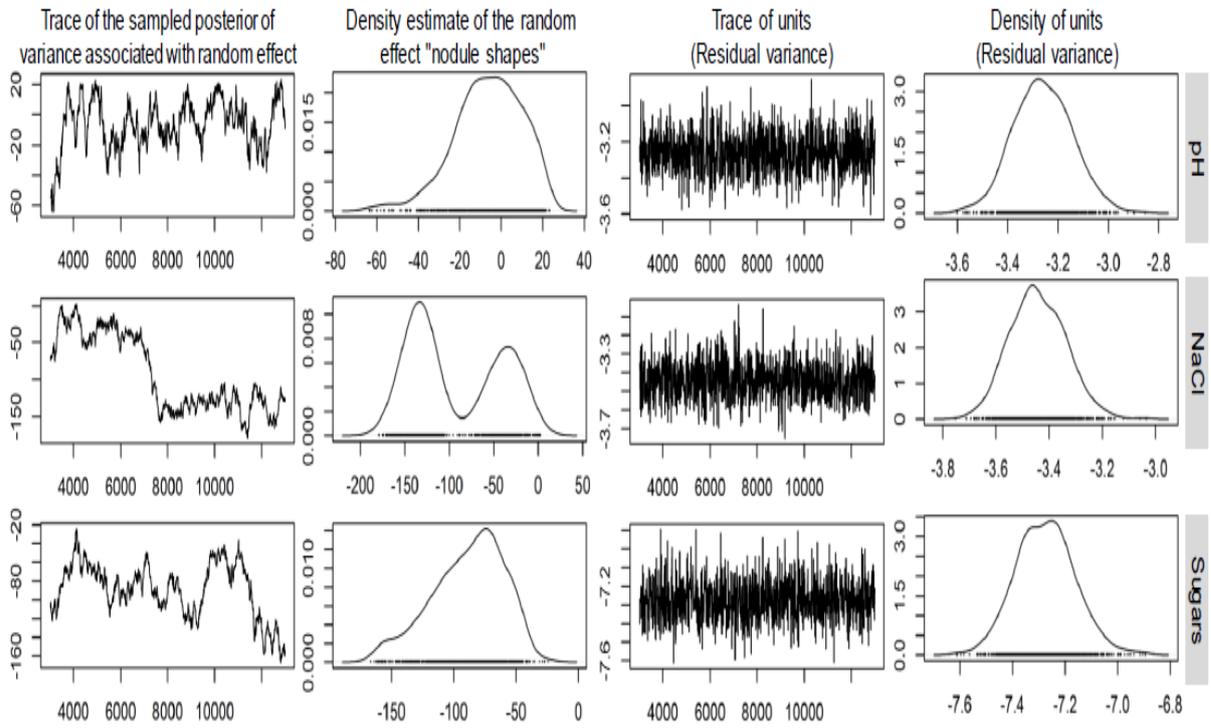
Table S6. MCMCglmm testing the effects of different amino acids (nitrogen source) on the variation of growth of rhizobia nodulating roots of *Genista cinerea* (Fabaceae) growing in drylands of North Africa

Parameters	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	Sig.
(Intercept)	-19.31	-1558.00	1307.00	4478	0.552	ns
GD	0.00	-0.14	0.15	1000	0.976	ns
GI	11.71	-3406	2031	591	0.630	ns
GIg11	6.26	-1919	2052	1059	0.688	ns
GIg12	6.25	-1919	2052	1059	0.742	ns
GIg13	6.35	-1919	2053	1059	0.350	ns
GIg14	6.26	-1919	2052	1059	0.682	ns
GIg15	6.23	-1919	2052	1059	0.900	ns
GIg21	6.28	-1919	2052	1059	0.524	ns
GI22	11.75	-3405	2032	591	0.462	ns
GIg23	6.28	-1919	2052	1059	0.578	ns
Cysteine	0.05	-0.15	0.23	1000	0.606	ns
Isoleucine	0.12	-0.08	0.31	1000	0.208	ns
Leucine	0.17	-0.02	0.34	1000	0.066	ns
Proline	0.09	-0.12	0.27	1000	0.320	ns
GD × Cysteine	-0.08	-0.28	0.13	1000	0.464	ns
GI × Cysteine	-0.06	-0.25	0.17	1000	0.588	ns
GIg11 × Cysteine	-0.07	-0.28	0.14	1000	0.516	ns
GIg12 × Cysteine	-0.06	-0.25	0.17	1000	0.548	ns
GIg13 × Cysteine	-0.14	-0.35	0.07	1000	0.180	ns
GIg14 × Cysteine	-0.11	-0.30	0.10	1000	0.306	ns
GIg15 × Cysteine	-0.05	-0.27	0.16	1000	0.668	ns
GIg21 × Cysteine	-0.14	-0.34	0.07	1098	0.214	ns
GI22 × Cysteine	-0.17	-0.39	0.03	1208	0.116	ns
GIg23 × Cysteine	-0.09	-0.29	0.13	1000	0.370	ns
GD × Isoleucine	0.36	0.13	0.55	1000	0.002	**
GI × Isoleucine	0.32	0.13	0.55	1000	0.002	**
GIg11 × Isoleucine	0.35	0.12	0.55	1000	<0.001	***

GIg12 × Isoleucine	0.32	0.10	0.52	1000	0.002	**
GIg13 × Isoleucine	0.23	0.01	0.43	1000	0.042	*
GIg14 × Isoleucine	0.29	0.09	0.52	1000	0.010	*
GIg15 × Isoleucine	0.40	0.20	0.63	1000	<0.001	***
GIg21 × Isoleucine	0.36	0.13	0.56	1000	0.002	**
GI22 × Isoleucine	0.28	0.07	0.50	893	0.004	**
GIg23 × Isoleucine	0.31	0.07	0.51	1000	0.004	**
GD × Leucine	0.32	0.12	0.52	1000	<0.001	***
GI × Leucine	0.38	0.17	0.58	1000	<0.001	***
GIg11 × Leucine	0.41	0.19	0.60	1000	<0.001	***
GIg12 × Leucine	0.30	0.08	0.50	1000	0.002	**
GIg13 × Leucine	0.20	0.01	0.42	1112	0.060	ns
GIg14 × Leucine	0.35	0.16	0.56	1000	<0.001	***
GIg15 × Leucine	0.33	0.13	0.54	1000	<0.001	***
GIg21 × Leucine	0.43	0.22	0.63	1117	<0.001	***
GI22 × Leucine	0.36	0.16	0.58	1097	<0.001	***
GIg23 × Leucine	0.24	0.02	0.44	1122	0.024	*
GD × Proline	-0.06	-0.28	0.16	1000	0.572	ns
GI × Proline	-0.17	-0.38	0.05	1000	0.130	ns
GIg11 × Proline	-0.07	-0.27	0.14	1111	0.524	ns
GIg12 × Proline	-0.14	-0.35	0.07	1000	0.216	ns
GIg13 × Proline	-0.23	-0.45	-0.03	1131	0.034	*
GIg14 × Proline	-0.15	-0.35	0.08	1000	0.170	ns
GIg15 × Proline	-0.06	-0.27	0.16	1000	0.600	ns
GIg21 × Proline	-0.18	-0.43	0.01	1000	0.092	ns
GI22 × Proline	-0.17	-0.38	0.05	1000	0.126	ns
GIg23 × Proline	-0.16	-0.36	0.06	1110	0.152	ns

(see Table 1 for isolate codes, Post.mean: mean of the posterior distribution, l-95% CI: lower bound of 95% confidence interval, u-95% CI: upper bound of 95% confidence interval, eff.samp: effective sample size=number of samples taken adjusted for autocorrelation in the chains, pMCMC: p-value of MCMCglmm, Sig.: significance codes; ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, ns: $P > 0.05$)

Figure S1. MCMC summary plots of the variance component associated with random effect of the model “nodule shapes” (left plots) and the residual variance component (right plots) for every MCMCgmm model (plots of the same row). See Hadfield (2010) for a more comprehensive explanation of these plots



Séquences nucléotidiques 16S rRNA des dix isolats étudiés

> GI22

ATTGTACGCTAGCGGGATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCGTAGTAGCGGGGGATAACTACGCGAAAGCGTAGATAATACC
GCATACGCCATACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCACTATTAGAGCGGGCCGATATCGGATTAG
CTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCAGCCACATTGG
GACTGAGACACGTCCCAGACTCTTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGCGGCAAACCCCTGATC
CAGCCCTCCCGCGTCTGCGATGATGGCGTTCGGTTGGTAAAGCACTTTTGGCAGGAAAGAAACGTCATTGGC
TAATACGCCGTGAAACTGACGGTACCTGCAGAATAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGTGAAGCGTTATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTCCGAAAGAAAGATGTG
AAATCCCAGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTAACTACCGAGCTAGAGTGTGTGAGGGGAGGTGGAATT
CCGCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATAACA
CTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCCGTAACACGAT
GTCAACTAGCTGTTGGGGCCTTCGGGCCTTAGTAGCGCAGCTAACCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGA
TGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTCTGGAATTCCGAAGAGATTTGGAAGTGCTCGCAAGAG
AACCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTTCGGGACAGAGGGT
CGCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAGAAACCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACC
GCCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCACAAGTAGTTAGCCTAACCGTAAGGGGGGCGATTACCACGGT
AGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

> GIg23

GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAAGAGCTTGCTCTTT
GGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAC
GGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGGATGTGCC
AGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
CGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGG
AAGGCGATGCGGTTAATAACCGCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC
AGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGT
CAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGA
GGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCC
CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGCTGTTTCCTTGAGAAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGAC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTGGCAGAGATGCCTT
GGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGA
TAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATCG
GAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCG
GGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCAGACTGGGGTGAAGTCG

> **GIg11**

TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAAGAGCTTGCTCTT
TGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAWCTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAA
CGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGGATGTGCC
CAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA
CCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAG
GAAGGCGATGCGGTTAATAACCGCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTG
TCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAG
AGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAACGATGTGACTTGGAGGCTGTTTCTTGAGAAGTGGCTTCGGGAGCTAACCGGTTAAGTCGA
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTGGCAGAGATGCMT
TGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAG
TCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTCGGGAACTCAAAGGAACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCTGATGCCGATC
GGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGT
TCCC GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTC
GGGAGGCGCTTACCCTTTGTGATTCAKGACTGGGGTGAAGTCG

> **GIg13**

CGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATAAACCATGGGAAACGGTGGCTAATACC
GCATACCTTCTCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAACCTAGATGGGATTAGT
TAGTAGGCGGGTAATGGCCACCTAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGG
AACTGAGACACGGTCCAGATTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGTTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGCACGCGC
TTAATAGGCGCGTCCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTG
AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCGAAACTGGCAAGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCKGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGACCCCTGGACAAAGA
CTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT
GTCTACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGSACTGGCTTGC GGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTAGTCTTGACATCCAGCGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAAC
GCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGC
AACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACC GGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAG
AGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCACAAGTGCGTCTGATCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGA
CTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCC GGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCA
CTTTGTATCACT

> GIg14

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG
GTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGG
TAGCTAATACCCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAG
ATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
GCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAA
GGGAGTAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCA
AGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGG
GGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CTGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGG
TGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATA
AACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTCAACCTTCGGG
AGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGT

> GIg15

ATTGTACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGG
CGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAACGGACGCTAATACC
GCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCGTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATGAG
CTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGCTGGGAGGAAGGGTWTGTA
TTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACTGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTYGGATGTG
AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAAT
TCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATA
CTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGA
ACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGC
GCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACA
GAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTC
GACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCCCCGTCACACCATCGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTACTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTAC
TATGTTGTGATTCATGACTGGGGTGA

> **GIg21**

GTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAAGA
GCTTGCTCTTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAAC
TACTGGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATC
GGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTC
AGCGGGGAGGAAGGCGATGCGGTTAATAACCGCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATAACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAG
AGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGG
CGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGCTGTTTCCTTGAGAAGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTTAAGTCGACCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTGGC
AGAGATGCCTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCCGGTCGGGAACTCAAAGGA
GACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCG
TAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCAC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAGAAGTAGGTA
GCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCG

> **GI**

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGCA
GAGCTTGCTCTGTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCATCGGGACCTACCCAGTCGTGGGGGATA
ACGTAGGGAAASTTACGCTAATAACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTA
TTAGATGGACCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTC
TGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCACTT
TTATCAGGAGCGAAATGTGCAGGGCTAATAACCATGCAGTCTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATAACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCT
AGGCGGTTTCGTTAAGTAAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAATGGCATTGGAWACTGGCGAGCTA
GAGTGTGATAGAGGRTGGTGAATTCGGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACATCARTG
GCCAAGGCGGCCTACTGGATCAACACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGTCTCAACTCGGAGATCAGTGTGCAAGCTAAC
GCGTTAAGTTCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
AGCGGTGGAGTATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCT
GCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCGAGTAAAGTCGGGAACTCTAA
GGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGC
TACACACGCACTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAGCCGA
TCCCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTAGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCTATG
CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAGAAGCC
GTTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGACGACCACGGAGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAA

> GD

CAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAAGAGCTTGCTCTTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGG
TGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACG
TCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGT
GGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT
GCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGCGGTTAATAAC
CGCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCC
CGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTGCAAAGTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGC
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGACTT
GGAGGCTGTTTCTTGAGAAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGC
GAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGTGGCAGAGATGCCTTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTAAGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
ATCCTTTGTTGCCAGCGATTCGGTCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACC GGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGC
GACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATAC

> GIg12

CTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGCAGAGCTTGCTCTGTGG
GTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCATCGGGACCTACCCAGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAASTT
ACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATTAGATGGACCGAT
GTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG
CAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTATCAGGAGCGAA
ATGTGCAGGGCTAATACCCATGCAGTCTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGTTTCGTTAA
GTAAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGGCATTGGAWACTGGCGAGCTAGAGTGTGATAGAGG
RTGGTGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACATCARTGGCGAAGGCGGCCTA
CTGGATCAACACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGTCTCAACTCGGAGATCAGTGTGCAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATG
TGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGA
GTGCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCGAGTAAAGTCGGGAAGTCTAAGGAGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGCACTAC
AATGGTCGGTACAGAGGGTTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAGCCGATCCCAGTCCGGATT
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTAGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCTATGCTGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGAGCTGCTCCAGAAGCCGTTAGTCTAACC
AAGGGGGA

Nom: Dekak		Date de soutenance: 13/11/2018		
Prénom: Ahmed				
Thèse de Doctorat En Science				
Thème : Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotypiques et électrophorétiques isolées à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des <i>Ginesteae (Fabaceae)</i>				
Résumé : La plupart des études sur les rhizobiums se sont concentrées sur l'identification et la systématique des symbiotes qui nodulent les légumineuses des cultures en raison de leur intérêt à améliorer le rendement. Cependant, peu d'études ont étudié les bactéries fixatrices d'azote endosymbiotiques qui nodulent des espèces de légumineuses sauvages et spontanées, en particulier en Afrique du Nord. Cette étude vise à caractériser phénotypiquement les bactéries endosymbiotiques isolées des nodosités des racines des légumineuses spontanées qui pousse dans les régions arides et semi-arides du nord-est de l'Algérie. <i>Genista microcephala</i> et <i>Argyrolobium uniflorum</i> par étude des profils chimiotaxonomique, biochimique et propriétés symbiotiques en les comparant à des souches de référence (RS). En outre, la caractérisation polyphasique des bactéries isolées à partir de nodules de <i>Genista cinerea</i> . EN examinant les variations de croissance des isolats d'endosymbiont dans différentes conditions environnementales, y compris les situations sévères et pour déterminer leur position taxonomique basée sur les limites de tolérance de croissance et les adaptations potentielles, en utilisant des techniques de modélisation statistique avancées et la caractérisation génomique. La caractérisation phénotypique a été réalisée à l'aide de tests physiologiques (pH différents, concentrations de NaCl et tolérance à la température), d'expériences nutritionnelles (assimilation de différents glucides et acides aminés) et de profils biochimiques (résistance aux antibiotiques, métaux lourds et profil protéomique). La caractérisation polyphasique a été réalisée en utilisant des tests physiologiques, des expériences nutritionnelles et une caractérisation génomique basée sur le séquençage de l'ARNr 16S. Les données ont été analysées à l'aide d'un échantillonneur Markov Chain Monte Carlo pour modèles mixtes linéaires généralisés multivariés (MCMCglmm) pour détecter les différences de croissance entre les isolats et SR. Les similitudes entre les isolats et SR ont été évaluées en utilisant la classification hiérarchique agglomérative (AHC), tandis que l'analyse factorielle multiple (AMF) a été réalisée pour comprendre les facteurs influençant chaque groupe d'isolats / SR puis la phylogénie des isolats a été réalisée. Les bactéries associés aux <i>G. microcephala</i> et <i>A. uniflorum</i> peuvent croître à un pH [4-10], une concentration en sel [NaCl = 0-5%] et une température allant jusqu'à 45 ° C capables de produire différentes enzymes hydrolytiques, y compris la cellulose, la pectinase et l'uréase, avec une tolérance remarquable aux métaux toxiques tels que le zinc, le plomb, le cuivre et le mercure. L'analyse numérique des caractéristiques phénotypiques a révélé que les isolats formaient quatre groupes distincts principaux montrant des niveaux élevés de similitude avec les <i>Gammaprotéobactéria</i> . Les caractéristiques symbiotiques et culturaux des isolats de <i>G. cinerea</i> ont révélé l'existence d'une grande diversité physiologique parmi les bactéries testées, qui présentaient une large capacité à assimiler différentes substances carbonées et azotées, avec des tolérances constantes et importantes au pH [4-10], à la température [4 -55°C], et la salinité [NaCl = 2-10%]. Bien que les isolats aient une grande diversité métabolique, ils ont formé deux groupes distincts avec un niveau élevé de similarité avec SR. Le groupe 1 comprenait des isolats à croissance rapide et tolérants au sel, caractérisés par une tolérance à l'acidité et une croissance élevée dans des conditions alcalines. Le groupe 2 couvrait des isolats sensibles à l'acidité et à croissance lente dont la salinité élevée affectait négativement leur croissance. Les résultats de l'AHC et de l'AMF ont montré que la diversité bactérienne des endosymbionts présentait un niveau élevé de similarité avec SR, preuve qu'ils sont des souches de rhizobia. Les résultats phylogéniques confirment que les isolats sont étroitement liés à différentes espèces de rhizobia. Les profils de résistance aux métaux lourds et tolérance au sel trouvés parmi les souches rhizobia associées aux <i>G. microcephala</i> et <i>A. uniflorum</i> reflètent la pression des contraintes environnementales et font de ces souches de meilleures candidates pour une inoculation réussie dans les zones arides. Nos résultats indiquent que les deux types d'isolats à croissance rapide et à croissance lente ont nodulé <i>G. cinerea</i> poussant dans les régions arides et semi-arides du nord-est de l'Algérie. Ces rhizobia sont des poly-extrémophiles adaptés à divers stress environnementaux et liés à des <i>Bêta</i> et <i>Gammaprotéobactéria</i> .				
Mots clés : Diversité des Rhizobia; Legumeuses (Fabaceae) indigènes; Caractérisation phénotypique et polyphasique ; Approche MCMC; 16S rRNA; Régions arides et semi-arides.				
Membre de jury				
Mohamed	KITOUNI	Président	Professeur	Université Constantine1
Yacine	BENHIZIA	Directeur de thèse	Professeur	Université Constantine1
M.Abdelhafid	HAMIDECHI	Examinateur	Professeur	Université Constantine1
Katia	BENDJOUMANA	Examinatrice	Professeur	Université Khenchela
Abdelbasset	MECHAI	Examinateur	Maître de conférences A	Université Tebessa
M. Nacer	MEKAHLIA	Examinateur	Maître de conférences A	Université Tebessa