



N° d'ordre : 76/D3C/2019

N° de série :03/MB/2019

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

THESE

En vue de l'obtention du diplôme

Doctorat 3^{ème} cycle

Option : Ecologie Microbienne

Présentée par

M^{elle} HANANE MELLAL

Thème

**Symbiose *Rhizobium*-Lupin. Biodiversité des
microsymbiotes et leur caractérisation à partir des nodules
racinaires de la Légumineuse *Lupinus angustifolius*.**

Membres du jury

Président :	M. Boudemagh Allaoueddine	Pr. UFMC1, Constantine
Directeur de thèse :	M. Benhizia Yacine	Pr. UFMC1, Constantine
Examineurs :	Mme. Bendjemana katia	Pr. Univ Abbas Laghrour Khenchela
	M. Hamidechi M. Abdelhafid	Pr. UFMC1, Constantine
Invité :	M. Benguedouar Ammar	Pr. UFMC1, Constantine -Retraité-

Année universitaire : 2018-2019



N° d'ordre : 76/D3C/2019

N° de série :03/MB/2019

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

THESE

En vue de l'obtention du diplôme

Doctorat 3^{ème} cycle

Option : Ecologie Microbienne

Présentée par

M^{elle} HANANE MELLAL

Thème

**Symbiose *Rhizobium*-Lupin. Biodiversité des
microsymbiotes et leur caractérisation à partir des nodules
racinaires de la Légumineuse *Lupinus angustifolius*.**

Membres du jury

Président :	M. Boudemagh Allaoueddine	Pr. UFMC1, Constantine
Directeur de thèse :	M. Benhizia Yacine	Pr. UFMC1, Constantine
Examineurs :	Mme. Bendjemana katia	Pr. Univ Abbas Laghrour Khenchela
	M. Hamidechi M. Abdelhafid	Pr. UFMC1, Constantine
Invité :	M. Benguedouar Ammar	Pr. UFMC1, Constantine -Retraité-

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Je tiens à adresser mes vifs remerciements aux membres du jury : Monsieur BOUDEMAGH Allaoueddine de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.
Madame BENDJEMANA Katia et Monsieur HAMIDECHI M. Abdelhafid, les examinateurs de ma thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie Monsieur le professeur BENGUEDOUAR Ammar, mon premier encadreur pour son aide et pour ses conseils très utiles.

Ma reconnaissance et mes sincères remerciements s'adressent à Monsieur BENHIZIA Yacine qui a accepté de prendre en charge l'encadrement de ce sujet et qui a toujours été là pour m'aider, me diriger, me conseiller tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur BEDMAR Eulogio, directeur de l'unité de recherche Microbiologie du Sol et Systèmes Symbiotiques (CSIC-Grenade, Espagne) , pour l'accueil chaleureux dans son laboratoire , et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions, Nos longues discussions sur le sujet m'ont permis d'apprendre beaucoup sur des domaines qui étaient pour moi mal connus, entre autres la biologie moléculaire. Merci profondément. Merci pour toute son équipe pour leur précieuse aide.

Un grand merci à CASTELLANO-HINOJOSA Antonio pour sa disponibilité, ses conseils utiles, et sa gentillesse. Qu'il puisse trouver ici mon profond respect.

Je tiens à remercier particulièrement toutes mes collègues et amies doctorantes au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble, pour l'ambiance familiale et conviviale durant toutes ces années ; Félicitations pour celles qui ont déjà soutenu : Fatima, Mouna, Wissem, Hiba, Maroua et Asma. et bon courage pour celles qui sont en phase de préparation de la thèse : Sabira, Leila, Radja, Bisma, Meriem et aussi à Rabeh.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à SALMI Adouda pour sa convivialité ses conseils et l'aide qu'elle m'a apportée lors de mon séjour à Grenade.

Merci à toutes mes amies, Hayet, Ameni, Amel et Maroua pour l'ambiance agréable, qu'elles ont entretenue lors de notre colocation à Grenade.

Je remercie tous ceux qui ont croisé ma route pendant ces années, et qui directement ou indirectement ont contribué à l'accomplissement de cette thèse.

En fin, pour terminer ces remerciements je dédie ce travail à:

Mes très chers parents, mon père et ma mère qui m'ont beaucoup soutenu Que Dieu les garde pour moi en bonne santé et leurs donne une longue vie pour qu'ils assistent à tous mes succès.

Mon frère Elhadi et ma sœur Souâad sans lesquelles je ne serais pas arrivée à atteindre mon objectif et de m'avoir apporté le soutien qui m'a donné l'envie de faire cette thèse.

Mes chers neveux Djalil et le petit Racim et mes nieces Douaa, Houda, Takoua et Alaa

Ma très chère amie LEDMI Hala pour son amitié et aussi d'être toujours présente au bon moment.

Résumé

Dans cette étude un total de 80 isolats bactériens isolés à partir des nodules racinaires de *Lupinus angustifolius* poussant à l'état sauvage dans la région Nord-Est Algérien dans la wilaya d'El Tarf. Le test de nodulation a confirmé la capacité de 64 isolats à induire la formation de nodules sur leur plante-hôte d'origine.

La RAPD-PCR, aboutie à la répartition de ces isolats en 17 profils différents. Le séquençage partiel du gène ribosomique ARNr 16S de chaque représentant de groupe a affirmé l'appartenance des souches étudiées au genre *Bradyrhizobium*. Cependant l'affiliation au niveau de l'espèce n'a pas été établie. Pour cette raison l'étude phylogénétique basée sur le séquençage des gènes de ménage (*glnII*, *recA*) ainsi que des gènes symbiotique (*nodC*) a été menée. Cette analyse a confirmée et préciser les résultats précédents. En effet, elle montre leur distribution en quatre grands groupes phylogénétiquement différents. Toutes les souches étudiées appartiennent au groupe *Bradyrhizobium* symbiovar *genistearum*. Les souches ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à savoir : les caractères cultureux, cellulaires, nutritionnels, physiologiques et biochimiques. Cette analyse confirme la biodiversité au niveau des souches isolées de *Lupinus angustifolius* de l'Algérie.

En se basant sur les résultats obtenus, Cette étude a révélé la diversité des rhizobia nodulants *Lupinus angustifolius* avec quelque espèce potentiellement nouvelle de *Bradyrhizobium*, nécessitant une caractérisation taxonomique supplémentaire pour confirmation et description formelle.

Mots clés : *Lupinus angustifolius*, *Bradyrhizobium*, Nodules, Gènes de ménage, Gènes symbiotique, Biodiversité.

Abstract

In this study a total of 80 bacterial strains isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius* grown wild in the North-Eastern Algerian region of El Tarf, The nodulation test confirmed the ability of 64 isolates to nodulate their original host plant.

RAPD –PCR, distribut these isolates into 17 differents profiles. Analysis of 16S rRNA gene sequences of a representative strain of each profil showed that all the isolates belonged to the genus *Bradyrhizobium*, but their affiliation at the species level was not clear. For this reason the phylogenetic study based on the sequencing of housekeeping genes (*glnII*, *recA*) as well as symbiotic genes (*nodC*) was conducted. This analysis confirmed and clarified the previous results. Indeed, revealed the distribution of the strains into four large groups phylogenetically different. All the examined strains form a homogeneous group within the *genistearum* symbiovar of *Bradyrhizobium*. The strains were the subject of a phenotypic characterization namely: cultural characters, cellular, nutritional, physiological and biochemical, which confirm the biodiversity of *Lupinus angustifolius* strains isolated from Algeria.

Based on the results obtained, this study revealed the diversity of the rhizobia nodulating *Lupinus angustifolius*, with some potentially new *Bradyrhizobium* species, requiring further taxonomic characterization for confirmation and formal description.

Key words : *Lupinus angustifolius*, *Bradyrhizobium*, Nodules, Housekeeping genes, Symbiotic genes, Biodiversity.

في هذه الدراسة تم عزل 80 سلالة بكتيرية من العقد الجذرية للنبته البرية *Lupinus angustifolius* المستوطنة في منطقة شمال شرق الجزائر في ولاية الطارف. تكوين الجذرية 64 تكوين جذرية

تم تمييز هذه RAPD-PCR حيث وزعت الى 17 . لتعريف البكتيرية
استعملنا سلالة تمثيلية واحدة عن كل نمط وراثي. حيث أظهر تحليل التطور الجيني لسلاسل ARNr 16S أن جميع *Bradyrhizobium*، لكن انتماءها على مستوى الأنواع لم يكن واضحا. لهذا دراسة جينية على أساس التطور الجيني للجينات (*glnII*, *recA*) وكذلك الجينات التكافلية (*nodC*) مبنية توزيع السلالات إلى أربع مجموعات كبيرة مختلفة وراثيا. كما أنها صنف في مجموعة

Bradyrhizobium symbiovar genistearum. تعريف البكتيرية
للتوصيف المظهري اشتملت على اختبارات مرفولوجية خلوية تغذوية فيزيولوجية وبيوكيميائية والتي أكدت التنوع البيولوجي في السلالات المعزولة من العقد الجذرية لنبته *Lupinus angustifolius* المعزولة من الجزائر. لى النتائج التي تم الحصول عليها، كشفت هذه الدراسة عن تنوع سلالات الريزوبيوم القادرة على تكوين جذرية *Lupinus angustifolius* الجديدة المحتملة من جنس *Bradyrhizobium* تتطلب مزيداً من التوصيف التصنيفي للتأكيد والوصف الرسمي.

المفتاحية : *Bradyrhizobium*, *Lupinus angustifolius* , الجينات الوراثية الجينات افلية الجذرية التنوع البيولوجي.

Table des Matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé en Français

Résumé en Anglais

Résumé en Arabe

Introduction01

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

1 : « Fixation biologique de l'azote atmosphérique »

1.1 Description du processus.....	04
1.2 Diversité des microorganismes fixateurs d'azote.....	06
1.2.1 Les fixateurs libres.....	06
1.2.2 Les fixateurs symbiotique.....	06

2: « Les Légumineuse »

2.1 Diversité des légumineuses.....	08
2.2 Intérêts des légumineuses.....	10
2.3La tribu des <i>Genistées</i>	11

3: « Description du genre *Lupinus* »

3.1 Taxonomie du genre <i>Lupinus</i>	12
3.2 Distribution géographique.....	13
3.2.1 Lupins de l'Ancien Monde.....	13
3.2.2 Lupins de nouveau monde.....	13
3.3 Description morphologique.....	14
3.4 <i>Lupinus angustifolius</i>	16
3.5 Lupins d'Algérie.....	17
3.6 Intérêt et Utilisation de lupin.....	17

4: « Description des Rhizobia »

4.1 Biodiversité des rhizobia.....	19
4.2 Bactéries nodulants du Lupin.....	20
4.3 Genre <i>Bradyrhizobium</i>	21

5. « Interaction légumineuse-rhizobia »

5.1 Mécanismes de la Nodulation.....	23
5.1.1 Pré-infection.....	23
5.1.2 Infection.....	23
5.1.3 Développement du nodule.....	24
5.1.4 La symbiose fixatrice d'azote.....	25
5.2 Les bases moléculaires de la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse.....	26
5.2.1 Génétique de la nodulation chez la légumineuse.....	26
5.2.1.1 Le signal plante : les flavonoïdes.....	26
5.2.2 Génétique bactérienne de la nodulation.....	27
5.2.2.1 Gènes de la nodulation (<i>nod</i>)	28
5.2.2.2 Gènes de la fixation de l'azote.....	28
5.2.2.3 Facteurs Nod.....	29

6. « La taxonomie bactérienne »

6.1 Méthodes phénotypiques.....	30
6.2 Méthodes génotypiques.....	31
6.2.1 Les méthodes de typage basées sur la PCR.....	32
6.2.1.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).....	32
6.2.2 Gènes Impliqués dans les études taxonomiques et phylogénétiques.....	33
6.3 Méthodes phylogénétiques.....	34
6.3.1 Construction d'un arbres phylogénétiques.....	34
6.3.1.1 Méthodes de distance.....	35
6.3.1.2 méthodes du maximum de vraisemblance.....	35
6.3.1.3 Méthodes de maximum de parcimonie.....	36

Chapitre II. Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique utilisés dans cette étude 37

1.1 Isolement des souches à partir des nodules.....	38
1.2 Maintien et conservation des souches.....	39
1.3 Authentification des isolats.....	40
1.3.1 Stérilisation et germination des graines.....	40
1.3.2 Inoculation des plantules.....	40

2. Caractérisation phénotypique

2.1 Caractérisation morphologique.....	41
2.2 Caractérisation cellulaire.....	41
2.3 Vitesse de croissance : Test du bleu de bromothymol (BTB).....	41
2.4 Détermination du temps de génération.....	42
2.5 Tests physiologiques.....	42
2.5.1 Effet du pH.....	42
2.5.2 Effet de la salinité.....	42

2.5.3 Effet de la température.....	42
2.6 Tests nutritionnels.....	43
2.6.1 Assimilation de la source de carbone.....	43
2.6.2 Utilisation de la source d'azote	43
2.7 Tests biochimiques.....	43
2.7.1 Réduction des nitrates.....	44
2.7.2 Hydrolyse de l'urée.....	44
2.7.3 Activité cellulolytique.....	44
2.7.4 Activité pectinolytique.....	45

3. Caractérisation génotypique et phylogénétique des isolats

3.1 Isolement de l'ADN bactérien.....	45
3.2 Quantification de l'ADN.....	45
3.3 Amplification de l'ADN.....	46
3.4 Analyse de la biodiversité des isolats selon les profils de RAPD.....	46
3.5 Amplification par PCR des gènes taxonomique et symbiotiques.....	47
3.6 Electrophorèse de l'ADN.....	48
3.7 Purification des fragments d'ADN amplifiés.....	49
3.8 Séquençage des produits d'amplification.....	49
3.9 Analyse des profils électrophorétiques.....	50
3.10 Analyse phylogénétique des séquences obtenues.....	50

Chapitre III. Résultats et Discussions

1. Echantillonnage 52

1.1 Morphologie et répartition des nodules.....	52
---	----

2. Analyse pédologique des échantillons de sols 53

2.1 Texture.....	54
2.2 Le pH.....	54
2.3 Humidité (H)	54
2.4 Les teneurs en carbone et en matière organique.....	55
2.5 L'azote.....	55

3. Isolement des rhizobia nodulant *lupinus angustifolius* 56

3.1 Test de nodulation.....	56
-----------------------------	----

4. Caractérisation phénotypique 56

4.1 Caractérisation morphologique de colonies.....	57
4.2 Temps de génération et taux de croissance.....	57
4.3 Caractérisation physiologique.....	60

4.3.1 Tolérance à la température.....	60
4.3.2 Tolérance au pH.....	61
4.3.3 Tolérance à la salinité.....	62
4.4 Caractérisation nutritionnelle.....	63
4.4.1 Utilisation de la source de carbone.....	63
4.4.2 Utilisation de la source d'azote.....	64
4.5 Caractérisation biochimique.....	65
4.5.1 Test du bleu de bromothymol (BTB)	65
4.5.2 Réduction des nitrates.....	65
4.5.3 Hydrolyse de l'urée.....	66
4.5.4 Activité cellulolytique.....	66
4.5.5 Activité pectinolytique.....	67

5. Caractérisation génotypique

5.1 Analyse de la biodiversité selon les profils de RAPD.....	69
5.2 Analyse phylogénétique des isolats de <i>L.angustifolius</i>	69
5.2.1 Séquençage et analyse phylogénétique du gène ribosomique 16S.....	72
5.2.2 Séquençage et analyse phylogénétique des gènes <i>glnII</i> et <i>recA</i>	75
5.2.3 Séquençage et analyse phylogénétique de gène <i>nodC</i>	80

Conclusion et perspective.....	83
---------------------------------------	-----------

Références bibliographiques	85
--	-----------

Annexes

Article publié

Liste des abréviations

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
<i>B</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
BET	Bromure d'ethidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BTB	Bleu de Bromothymol
CMC	Carboxy-méthyl-cellulose
dNTPs	Desoxyribonucleotid triphosphates
DO	Densité Optique
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique
ERIC	Enteric Repetitive Intergenic Consensus
<i>glnII</i>	Glutamine synthétase II
GPS	Global Positioning System
MLSA	Multi-Locus Sequence Analysis
<i>nodC</i>	N-acetyl glucosaminyl transferase nodulation protein C
pb	Paire de base
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
<i>recA</i>	DNA recombinaise A
REP	Séquence répétitive extragènique palindromique
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TBE	Tris – Acide borique – EDTA
UPGMA	Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean
USDA	United States Drugs and Agricultural Office
YMA	Yeast Mannitol Agar

Liste des Figures

Figure 1: Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac par la Nitrogénase.....	5
Figure 2 : Classification des sous-familles de légumineuses en se basant sur un arbre phylogénétique du gène <i>matK</i> . Au total, 3696 espèces de légumineuses sont représentées en couleurs et 100 espèces non-légumineuses de référence en non-coloré....	10
Figure 3: Position phylogénétique simplifiée du genre <i>Lupinus</i> au sein des Fabaceae, basée sur une compilation des séquences chloroplastiques et des séquences nucléaires de l'ITS.....	11
Figure 4: Morphologie générale du genre <i>Lupinus</i> . A. Feuille digitée ou A'. Feuille unifoliée ; B. Corolle, a. Etendard, b. Ailes, c. Quille (ou Carène) ; C. Androcée ; D. Fruit fermé ; E. Fruit ouvert, d. Graine.....	15
Figure 5: Caractères botaniques du <i>lupinus angustifolius</i> . (a) : Aspect morphologique de la plante. (b) : Aspect des feuilles. (c) : Aspect des fleurs. (d) : Aspect des grappes. (e) : Aspect des gousses. (f) : Aspect des graines.....	16
Figure 6: Les différents stades de la formation des nodosités de type déterminé et indéterminé.....	25
Figure 7: Interaction entre le rhizobium et sa plante hôte.....	27
Figure 8: Localisation géographique des site d'échantillonnage.....	38
Figure 9: Racines nodulées de <i>Lupinus angustifolius</i>	52
Figure 10: l'aspect cultural des isolats de <i>L.angustifolius</i> , (a) sur le milieu YMA. (b) sur le milieu YMA.....	58
Figure 11: (a) Observation des colonies des isolats de <i>L.angustifolius</i> à la loupe binoculaire(b) Observation microscopique d'une coloration de Gram des isolats de <i>L.angustifolius</i>	58
Figure 12: Influence de la variation de température sur la croissance des souches testées	60
Figure 13: Effet de la variation de pH sur la croissance des souches testées.....	61

Figure 14: Effet de la salinité sur la croissance des souches testées.....	63
Figure 15: Assimilation de différents substrats carbonés par les souches étudiées....	64
Figure 16: Assimilation de différents sources d'azote par les souches étudiées.....	65
Figure 17: Résultats des différents tests Biochimiques.....	68
Figure 18: Dendrogramme résultant de l'analyse par RAPD-PCR des isolats nodulant <i>L.angustifolius</i>	71
Figure 19: Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène ribosomique 16S.....	73
Figure 20: Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement des séquences partielles d'ARNr 16S des souches des nodules de <i>L. angustifolius</i> . sauvages et d'espèces phylogénétiquement apparentées du genre <i>Bradyrhizobium</i>	74
Figure 21: Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification des gènes <i>glnII</i> , <i>recA</i>	75
Figure 22: Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement des séquences partielles du gène <i>glnII</i> des souches isolées des nodules de <i>L. angustifolius</i> et d'espèces phylogénétiquement apparentées au genre <i>Bradyrhizobium</i>	77
Figure 23: Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement des séquences partielles du gène <i>recA</i> des souches isolées des nodules de <i>L.angustifolius</i> et d'espèces phylogénétiquement apparentées au genre <i>Bradyrhizobium</i>	78
Figure 24: Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement des séquences concaténées des gènes <i>recA+glnII</i> des souches isolées des nodules de <i>L. angustifolius</i> et d'espèces phylogénétiquement apparentées au genre <i>Bradyrhizobium</i>	79
Figure 25: Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène <i>nodC</i> des souches isolées de <i>L.angustifolius</i>	80
Figure 26: Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement de séquence du gène <i>nodC</i> des souches isolées des nodules de <i>L. angustifolius</i> et d'espèces phylogénétiquement apparentées au genre <i>Bradyrhizobium</i>	82

Liste des Tableaux

Tableau 1: Majeures familles et genres de bactéries capables de noduler les légumineuses	22
Tableau 2: Coordonnées GPS des sites de collecte et leurs caractéristiques climatiques.....	37
Tableau 3: Souches de références utilisées dans cette étude.....	38
Tableau 4: Composés utilisés comme sources de carbone et d'azote.....	43
Tableau 5: Réactifs utilisés dans la PCR pour l'analyse des profils d'ADN (RAPD-PCR).	46
Tableau 6: Réactifs utilisés dans la PCR pour l'amplification des gènes.....	46
Tableau 7: Amorces utilisées pour l'amplification des séquences répétitives RAPD, les gènes <i>ARNr 16S</i> , <i>glnII</i> , <i>recA</i> et <i>nodC</i> par PCR.....	47
Tableau 8: Programmes d'amplification de l'ADN.....	48
Tableau 9: Quantités d'ADN et d'amorces requises pour le séquençage.....	50
Tableau 10: Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sols collectés.....	53
Tableau 11: Le nombre et la nomenclature des différents isolats isolés de <i>L. angustifolius</i>	56
Tableau 12: Résultat du taux de croissance et du temps de génération.....	59
Tableau 13: Résultat de la caractérisation biochimique des souches isolées de <i>L. angustifolius</i> ainsi que les souches de références.....	67
Tableau 14: Différents groupes obtenus à partir de RAPD-PCR.....	70

Introduction

L'analyse de la variabilité génétique des êtres vivants en particulier ceux d'importance agronomique constitue une étape essentielle pour comprendre les mécanismes d'évolution des espèces ainsi que pour assurer une bonne gestion des ressources biologiques pour une utilisation durable.

Dans les pays du pourtour du bassin méditerranéen, les légumineuses occupent une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Elles constituent une source d'alimentation pour l'homme (légumineuses à graines, pois chiche, haricot, lentille ...) et fourrage pour les animaux (luzernes, trèfles, sulla...). Les plantes de cette famille présentant souvent des nodosités traduisant une symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote appelées *Rhizobium* (Moulin, 2002).

Le système de fixation d'azote atmosphérique le plus pertinent dans les agricultures est celui où l'azote est fixé de manière symbiotique par l'association de légumineuses et de bactéries appartenant au groupe *Rhizobium*, qui fournit au monde entier 45 millions d'azote aux terres agricoles (Curatti et Rubio, 2014).

L'interaction entre ces deux partenaires est réalisée avec un haut degré de spécificité. Une légumineuse entre en symbiose avec un nombre limité d'espèces bactériennes. En revanche certains micro-symbiontes s'associent avec plusieurs partenaires alors que d'autres ont une gamme d'hôte étroite. Cette spécificité est basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires (Pawlowski et Bisseling, 1996).

Le lupin est une légumineuse à grande importance agronomique, économique et nutritionnelle. la culture du lupin remonte à la plus haute antiquité. pour ses graines très riches en protéines et en huiles ce qui lui confère une bonne valeur énergétique (Koltz,1863). Selon Quezel et Santa (1962), en Algérie il existe 4 espèces (*L. angustifolius*, *L. albus*, *L. micranthus*, *L. tassilicus*).

Néanmoins, le lupin n'a pas été largement utilisé pour l'alimentation humaine en raison de la présence d'alcaloïdes qui donnent aux lupins sauvages un goût très amer. Aujourd'hui, la culture du lupin dans le monde entier est limitée aux variétés douces.

les lupins sont capables de nodulation en s'associant avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* essentiellement – et sont donc fortement avantagées pour coloniser des habitats pauvres en éléments azotés. D'autres espèces de lupins ont montré leur potentiel pour permettre la restauration de milieux tels que des déserts érodés ou des dunes de sable (Magnússon *et al.*, 2004 ; Fuentes et Planchuelo, 2000).

Les études dans le milieu méditerranéen ont été jusqu'à présent principalement focalisées sur les légumineuses cultivées et leurs symbiotes. Alors que Jusqu'à présent l'avancée de recherche dans la connaissance des rhizobium associées aux légumineuses spontanées est lente. Pourtant, par leur vaste répartition géographique dans le bassin Méditerranéen, ces plantes jouent un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols (Perry,2016)

En Algérie, de nombreuses études sur la symbiose rhizobia-légumineuses sont réalisées (Benhizia et al., 2004 ; Boulila et al. 2009 ; Bourebaba et al.,2016 ; Riah et al., 2014 ; Ahnia et al., 2014 ; Torche et al., 2014 et autres), ces études ont concerné les rhizobia des différentes régions du pays (régions de nord, semi-aride et aride).

De ce fait, la nécessité de lancer des investigations pour les descriptions génotypiques et phénotypiques et de connaître la diversité des deux symbiotes est un préalable à toute utilisation des potentialités de ce phénomène. Dans ce contexte, Le présent travail concerne en priorité l'étude de la biodiversité des endosymbiotes associés à la plante de *Lupinus angustifolius* , sur le plan phénotypique. génotypiques et phylogénétique. Pour atteindre ces objectifs nous avons réalisé les étapes suivantes:

1. prospecter et déterminer le site géographique de la plante *Lupinus*.
2. Isolement de souches bactériennes à partir des nodules de *Lupinus angustifolius* dans différents sites de la région de la wilaya d El-Taref dans lesquels ces plantes sont habituellement rencontrées .
3. Authentifier pour une mise en évidence du pouvoir ineffectif d'isolats obtenus.
4. Caractérisation génotypique des souches isolées en utilisant des techniques qui permettent l'étude de la biodiversité génétique et phylogénétique en se basant sur les profils d'ADN et le séquençage des acides nucléiques.
5. Une caractérisation phénotypique des isolats obtenus a été menée pour évaluer leurs propriétés symbiotiques, leur capacité à tolérer les conditions de stress : les températures élevées, la salinité, la variation de pH et l'utilisation des sucres et des acides aminés comme seule source de carbone et d'azote.

Trois grandes parties sont illustrées dans cette présente thèse, la première aborde une synthèse bibliographique permettant de situer le travail dans son contexte scientifique.

Ensuite, une deuxième partie concerné le matériel et les méthodes utilisés pour chaque étape de travail depuis la mise en culture , l'authentification et la caractérisation phénotypique et phylogénétique des isolats symbiotiques de *L.angustifolius*.

Enfin, les résultats obtenus ont été analysés, comparés et discutés dans la dernière partie.

Cette thèse est clôturée par une conclusion, comporte une série de réflexions scientifiques et de perspectives qui restent à réaliser dans un avenir proche.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

1. Fixation biologique de l'azote atmosphérique

1.1 Description du processus

L'azote est un élément chimique fondamental pour toute forme de vie. On le retrouve dans de nombreuses biomolécules telles que les acides aminés, les acides nucléiques, et dans de nombreux autres composés organiques indispensables à la vie, ce qui implique son intervention dans la structure et le métabolisme cellulaire (Peret, 2007). Cet élément est l'un des plus abondants sur Terre, constituant près de 78% de l'atmosphère (Richlefs et Miller, 2005), où il est présent sous forme de diazote gazeux (N_2), une forme chimiquement inerte très stable et inutilisable par la plupart des organismes vivants. Bien que la disponibilité d'azote est limitée dans beaucoup de sols, Les organismes vivants dépendent donc des molécules azotés plus réactives présentes dans le sol : comme l'ammonium et les nitrates, qui ne sont pas malheureusement abondantes que l'azote gazeux. (Hopkins, 2003; Perry et al., 2004).

En effet, pour être utilisable, l'azote doit être sous forme minérale (NH_4^+ et NO_3^-). Le processus qui permet l'assimilation de l'azote atmosphérique est appelé fixation de l'azote. Il peut être mené de manière abiotique, à cause des phénomènes naturels comme les décharges électriques et les éruptions volcaniques, ou industrielle (processus de Haber-Bosch) (Hopkins, 2003), ou par l'intermédiaire des activités métaboliques de certains êtres vivants ce processus appelé la fixation biologique de l'azote (FBN).

La fixation biologique de l'azote est sur terre, le second plus important processus biochimique après l'assimilation du CO_2 (la photosynthèse). cette fixation n'est pas commune à toutes les plantes mais seules les plantes de la famille des légumineuses en association avec les seuls organismes capables de l'utiliser qui sont des bactéries du sol dites diazotrophes qui peuvent convertir l'azote moléculaire (N_2 ou diazote) en une forme biologiquement utile (Doré et al., 2006 ; Rose et Mueller, 2006). Ces bactéries fixatrices d'azote remplissent une fonction écologique irremplaçable. En effet, avant la découverte des procédés de synthèse industrielle de l'ammoniac, elles étaient les seules capables à faire entrer l'azote dans les cycles biologiques (Davet, 1996). Il est à noter que l'agriculture des anciens grecs et romains a bien exploité la fixation biologique de l'azote en cultivant des légumineuses, sachant que le rôle des microorganismes dans la fixation de l'azote n'ait été découvert qu'en 1888 par H. Hellriegel et H. Wilfarth (Hopkins, 2003).

Ces bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à un complexe enzymatique réducteur appelé la nitrogénase (Duhoux et Nicole, 2004). Le complexe nitrogénase (Figure 1) le plus étudié comprend deux composantes metalloprotéiques : une ferroprotéine (protéine Fe) et une ferro-molybdoprotéine (protéine FeMo). Les gènes qui codent ces deux protéines et les autres protéines nécessaires à la réaction ou à sa régulation sont groupés dans un même opéron appelé *nif* (pour Nitrogen Fixation). La protéine FeMo est un tétramère de 230 kDa codé par les gènes *nifD* et *nifK*, elle contient le site réducteur du substrat. La protéine Fe est un homodimère de 64 kDa codé par le gène *nifH*, c'est le composant donneur d'électrons, il contient le site de liaison de l'ATP (Rees et Howard, 2000). En conditions de faible teneur en oxygène, cette enzyme catalyse la réduction de l'azote atmosphérique N₂ en ammoniac NH₃ (Downie, 2005), selon le mécanisme suivant:

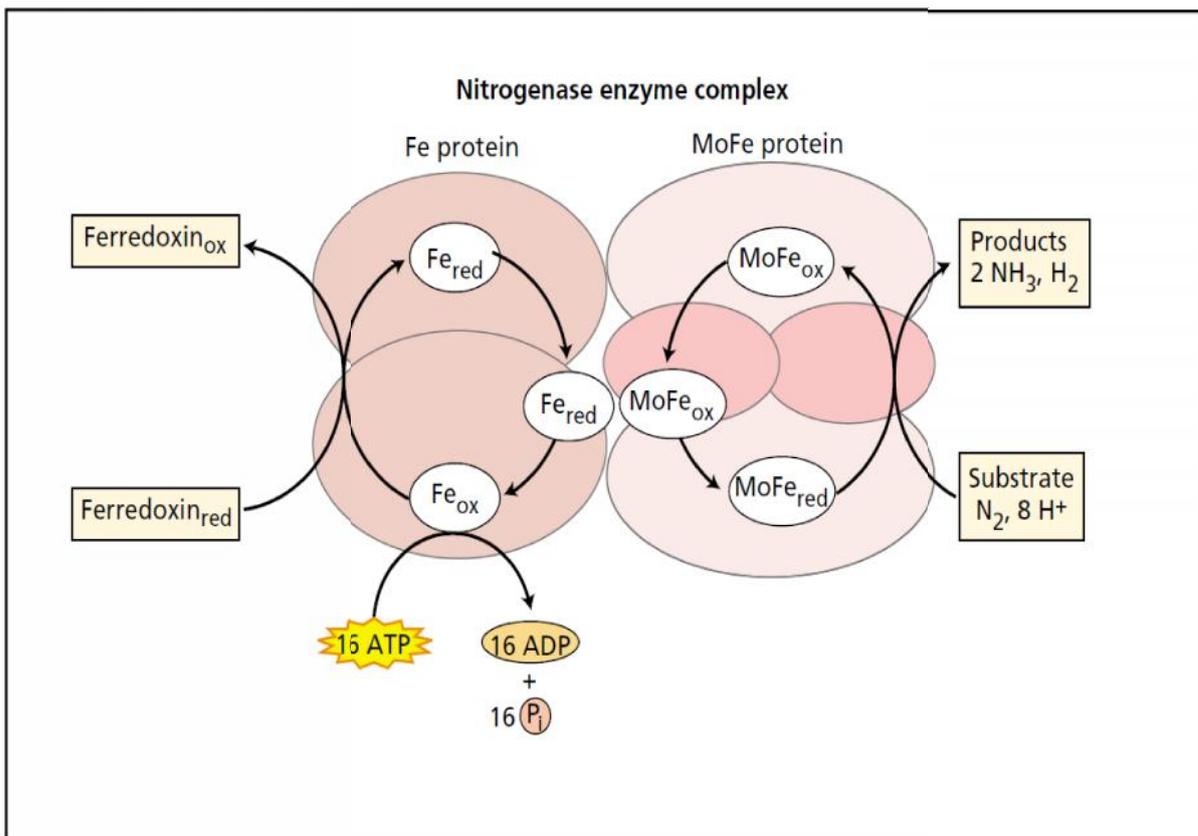
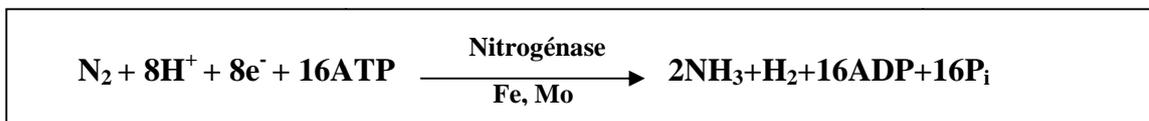


Figure 1: Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac par la Nitrogénase (Taiz and Zeiger, 2003).

1.2 Diversité des microorganismes fixateurs d'azote

La diazotrophie est un processus qui a été mis en évidence uniquement chez les procaryotes (bactéries et cyanobactéries) (Raymond et *al.*, 2004 ; Lloret et Martínez-Romero, 2005). En effet, il existe des microorganismes fixateurs d'azote à l'état libre, et des microorganismes fixateurs qui vivent en associations symbiotiques avec les plantes dans des structures racinaires ou caulinaires organisées appelées nodosités ou nodules (vilain,1997).

1.2.1 Les fixateurs libres

Les bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique sans être en association symbiotique, sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ou d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de certains animaux (Hopkins, 2003). Comprennent des genres variés : bactéries aérobies *Acetobacter* (Gillis et *al.*, 1989), *Azobacter* (Becking, 2006), *Azospirillum* (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000), ou bactéries anaérobies strictes *Clostridium* (Asami et Kiwamu, 2006), *Desulfovibrio* (Le Gall et Senez, 1960), ou aérobies facultatives *Klebsiella* (Chelius et Triplett, 2000), *Pseudomonas* (Yan et *al.*, 2008) , des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique *Rhodobacter* (Masepohl et *al.*, 2005), et *Rhodospseudomonas* (Wang et Noren, 2006), des cyanobactéries (Algues bleu-vert) comme *Anabaena* (Allen et Arnon, 1955) et *Nostoc* (Meeks et Elhai, 2002), et dans les conditions microaérobie on trouve les genres *Azospirillum* (Tejera et *al.*, 2005; De Felipe, 2006) et *Beijerinckia* (De Felipe, 2006).

1.2.2 Les fixateurs symbiotique

Au cours de l'évolution, certaines plantes ont mis en place des associations symbiotiques avec ces microorganismes pour pallier la faible disponibilité de l'azote dans les sols. Il existe plusieurs types de symbioses fixatrices d'azote, deux groupes de végétaux forment des symbioses nodulaires avec des bactéries diazotrophes: les plantes actinorhiziennes, dont les partenaires symbiotiques sont des bactéries filamenteuses sporulantes Gram positif du genre *Frankia* associées à des arbres et des arbustes comme les Casuarina, les Myrica et les Alnus (Franche et *al.*, 2009), les légumineuses qui s'associent aux *Rhizobium* (bactéries unicellulaires gram négatif l'un des principaux groupes et le plus anciennement connu, s'associent aux légumineuses (Perry et *al.*, 2004). Dans les deux cas , la symbiose avec les bactéries aboutit à la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines, parfois sur les tiges. Dans les nodules, les bactéries, protégées et recevant de la plante des

composés carbonés issus de la photosynthèse, lui fournissent en échange de l'azote assimilable.

Les plantes actinorhiziennes jouent un rôle important dans la colonisation de terres peu fertiles ou dégradées (Dommergues et *al.*, 1998). Mais la symbiose quantitativement la plus importante d'un point de vue écologique (maintien et régénération de la fertilité des sols) et agronomique (productions agricoles et forestières) est celle associant les rhizobiums aux légumineuses (Graham et Vance, 2000).

Les cyanobactéries sont d'autres bactéries, photosynthétiques, Gram négatif, capables de fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Une symbiose particulièrement importante concerne la cyanobactérie *Anabaena* associée à la fougère aquatique *Azolla*, qui est utilisée comme engrais vert dans les rizières (Franche et *al.*, 2009). Les symbioses fixatrices d'azote (*Rhizobium*-légumineuses, *Frankia*-plantes actinorhiziennes, cyanobactéries-fougères) sont responsables de la réduction de plus de 120 millions de tonnes d'azote atmosphérique par an (Elmerich, 1993). Il faut enfin noter qu'au delà de ces associations symbiotiques fortes, de nombreuses bactéries fixatrices libres sont capables d'interagir avec les plantes en s'associant aux systèmes racinaires de façon endophytique sans former de structures différenciées. C'est le cas, en particulier, pour les *Azospirillum* avec les graminées (Cocking, 2003).

La fixation biologique de l'azote, un processus complexe, réalisé exclusivement par des microorganismes procaryotes (bactéries et Archaea), permet la conversion du N₂ atmosphérique en ammoniac par l'enzyme nitrogénase.

L'azote fixé biologiquement est utilisé directement par la plante et est donc moins susceptible aux pertes dues à l'immobilisation, à la dénitrification, à la volatilisation ou à la lixiviation (Nielsen, 2006). Du point de vue de l'agriculture, le système de la fixation biologique de l'azote le plus pertinent est celui où l'azote est fixé de manière symbiotique par l'association de légumineuses et de bactéries appartenant au groupe *Rhizobium*, qui fournit au monde entier 45 millions d'azote aux terres agricoles (Geddes et *al.*, 2015). Pour cela cette association a été depuis toujours la plus étudiée à l'échelle mondiale pour leur importance agronomique, économique et sociale.

2. Légumineuse

Les plantes de la famille des légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées rhizobiums . Cette association se traduit par une relation symbiotique, au cours de cette association la plante fournit à son symbiote une niche écologique et les éléments nutritifs issus de la photosynthèse, nécessaires à son métabolisme. et le micro-organisme fournit l'azote assimilable (NH_3) à partir de l'azote de l'air (N_2) (Hopkins, 2003).

Cette relation rapporte autant d'azote que l'industrie mondiale des engrais. Face à une indépendance galopante en engrais azotés pour l'agriculture dite durable. La rotation des cultures avec les Légumineuses est indispensable pour économiser les fertilisants chimiques, très couteux en énergie fossile et contribuant à l'effet de serre via l'émission de grandes quantités d'oxyde nitrique (Crutzen et *al.*, 2007).

2.1 Diversité des légumineuses

Les légumineuses ou Fabaceae constituent un des groupes les plus importants parmi les dicotylédones. Elles forment une famille importante et variée des Angiospermes, la troisième après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Doyle et Luckow, 2003). Elles correspondent à la division des Magnoliophyta, Classe des *Magnoliopsidae* et Ordre des Fabales (Cronquist, 1988). Son nom dérive du latin *legumen* (graine avec gousse). Ce groupe de plantes correspond à la famille des *Leguminosae* (*Fabaceae*) avec trois sous-familles en fonction de leurs différences florales: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papillioideae* (*Faboideae*), (Sprent et James, 2007).

Cependant, les systématiciens ont repéré que des analyses phylogénétiques de plus en plus nombreuses indiquaient un problème de classification dans ces sous-familles, notamment au niveau de celle des *Caesalpinioideae*. Des tribus et sous-tribus de légumineuses ne présentant pas de monophylies sont retrouvées.

De ce fait, un travail de reclassification a été entrepris par (The Legume Phylogeny Working Group, 2013). C'est en accord avec ce groupe de travail sur la phylogénie des légumineuses, reconnu en tant qu'autorité compétente pour définir/affiner les connaissances phylogéniques et la classification concernant les Fabacées, que des preuves phylogénétiques ont été apportées pour redéfinir les sous-familles des légumineuses (Azani *et al.*, 2017).

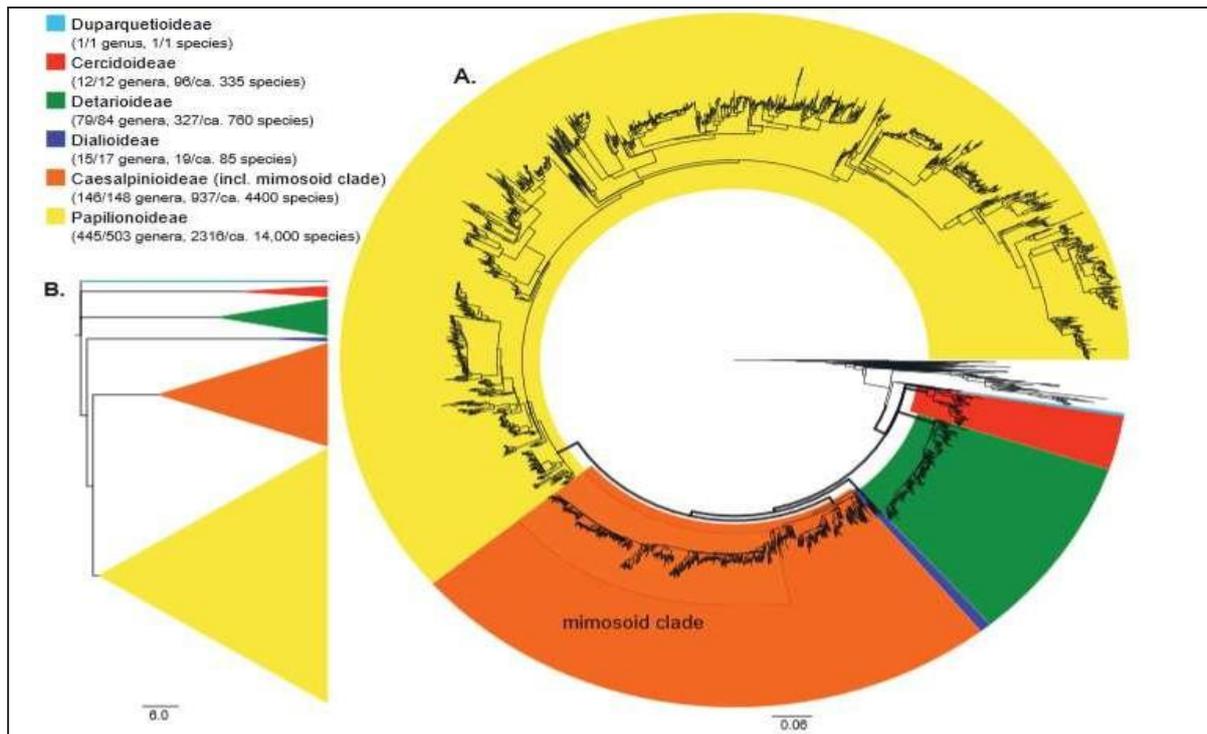
Les auteurs ont ainsi pu redéfinir les sous-familles des *Leguminosae* en se basant sur le gène *matK* (Figure 2). Un des changements majeurs proposé par les auteurs est la création de six sous-familles distinctes au sein des légumineuses : *Caesalpinioideae* (incluant le clade des *Mimosoideae*), *Cercidoideae*, *Detarioideae* , *Dialioideae*, *Duparquetioideae*, et *Papilionoideae*.

Cette famille des légumineuses comprend plus de 770 genres et près de 20 000 espèces (Lewis et *al.*, 2005 ; Azani et *al.*, 2017). Elles sont présentes dans presque tous les milieux terrestres, caractérisées par une large diversité et sont dominées par les espèces ligneuses et vivaces (Chang, 2011).

La majorité des espèces appartenant aux sous-familles *Faboideae* et *Mimosoideae* participe à la fixation de l'azote avec les bactéries symbiotiques (plus de 90% des espèces) (Doyle, 2011) en formant généralement des nodules racinaires et occasionnellement caulinaires.

Pour la première sous famille les *Faboideae*: représentent la sous-famille la plus diverse avec (97%) des plantes nodulés, se divisent en deux groupes majeurs de plantes cultivées il s'agit des légumineuses appelées Galégoïdes, avec les genres (*Trifolium*, *Medicago*, *Pisum*, *Lens*, *Cicer*, *Lotus* ,*Trifolium* ...) principalement des zones tempérées, et des légumineuses dites Phaséolides avec notamment les genres (*Phaseolus*, *Vigna*, *Glycine*, *Aeschynomene*, *Cajanus*...) principalement des zones tropicales, alors que pour la deuxième sous famille Les *mimosoideae* seulement 90% ont été trouvées nodulées (Doyle et Luckow, 2003), sont composés principalement des arbres tropicaux et subtropicaux avec notamment les genres *Acacia* et *Albizia*.

Des nodules ont été rarement rencontrés dans quelques genres de la sous-famille des *Caesalpinioideae* 23% seulement des espèces étudiées sont nodulées par les Rhizobiums sont principalement de plantes ornementales et d'arbres à bois ou alimentaire (Allen et Allen, 1981; Foster et *al.*, 1998). Quelques auteurs suggèrent que ceci peut être dû au fait que, même si toutes les légumineuses sont capables d'établir une symbiose avec les rhizobiums, néanmoins, elles ne sont pas toutes capables de former des nodules (Bryan et *al.*, 1996).



2.2 Intérêts des légumineuses

Les légumineuses tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin *et al.*, 2001).

Les principaux objectifs de recherche, sur légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet *et al.*, 2006).

Beaucoup d'espèces de Légumineuses sont cultivées dans le monde entier comme espèces ornementales (dans les jardins, comme les arbres d'ombre), ou utilisées comme engrais verts, fourrage pour le bétail, fourrage pour les abeilles mellifères, nourriture pour l'homme, en agroforesterie et de reboisement (pour la fixation de l'azote), pâtes pour la production de papier, bois, ainsi que les sources de produits chimiques (ex : les teintures, les tanins), huiles (industrielles, de la nourriture, l'aromathérapie) et les médicaments.

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Lévêque et Mounoulou, 2001), qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales, d'où leur intérêt également dans le cadre d'une agriculture "durable" (réduction des intrants, préservation et enrichissement des sols en azote) (Journet et *al.*, 2002). Ainsi on réduit les coûts agricoles à travers une diminution des engrais industriels et la suppression de la contamination de l'environnement.

2.3 La tribu des *Genistées*

Les Genistées se rencontrent fondamentalement au pourtour méditerranéen. Différents processus paléoclimatique et géologiques ont eu un impacte sur l'évolution des communautés des plantes méditerranéennes. Cette tribu représente une grande signification écologiques dans les pays méditerranéens car elles colonisent les forêts dégradées et caractérisent les paysages des régions en déforestation (Lograda et *al.*, 2009). Il existe plusieurs genres appartenant à cette tribu : genre *Lupinus*, genre *Retama*, genre *Genista*, genre *Spartium*, genre *Cytisus* (Figure 3).

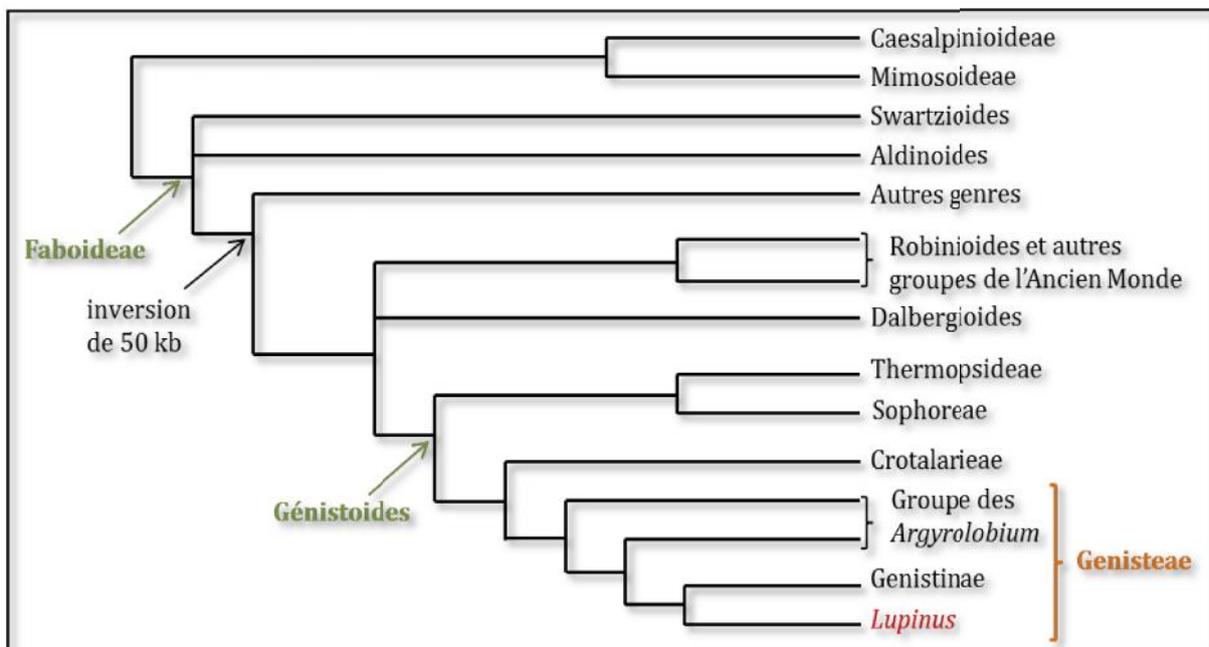


Figure 3: Position phylogénétique simplifiée du genre *Lupinus* au sein des *Fabaceae*, basée sur une compilation des séquences chloroplastiques et des séquences nucléaires de l'ITS (LPGW, 2013).

3. Description du genre *Lupinus*

Le genre *Lupinus* est un groupe de légumineuses de la tribu des Génistées qui fait partie de la famille des *Fabaceae*. comprend environ 200-500 espèces principalement herbacées qui peuvent être annuelles, bisannuelles ou pérennes, ainsi que quelques espèces ligneuses (arbustes ou arbrisseaux) (Ainouche et Bayer, 1999). présentes dans un large éventail de conditions écologiques à la fois dans le Vieux et le Nouveau Monde.

3.1 Taxonomie du genre *Lupinus*

Les lupins appartiennent de point de vue taxonomique au genre *Lupinus*, la tribu des *Génistées*, la sous Famille des *Papilionacées*, la famille des légumineuses (ou *Fabaceae*), l'ordre des *Fabales* (anciennement *Rosales*), la sous-classe des *Rosidae*, la classe des *Magnoliopsidae* (Dicotylédones), le sous embranchement des Angiospermes l'embranchement des Spermaphytes, le phylum des Trachéophytes, le sous règne des *Trachéobiontae* et le règne du *Plantae* (Clements et *al.*, 2005a).

Malheureusement, à ce jour il n'y a aucun examen monographique et systématique complet du genre. La présence d'une telle infraction peut être expliquée par leur vaste distribution géographique et l'amplitude écologique de ses habitats (Ainouche et Bayer, 1999).

En conséquence, le nombre d'espèce de ce genre n'est jusqu'à présent pas bien défini. selon Kurlovich et *al.* (2002). ce nombre serait estimé à plus de 1.000 espèces. Il est environ de 280 pour (Eastwood et *al.* 2008), ou bien a plus de 300 espèces pour Kasperzak et *al.*(2006) et 500 (Bermúdez-Torres et *al.*, 2009). A l'heure actuelle, le nombre d'espèces du genre *Lupinus* acceptées et enregistrées dans le système d'information taxonomique intégré est de 165 seulement (ITIS, 2019) <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>.

La classification initiale du lupin subdivisait le genre en deux sous - genre *Eulupinus* et *Platycarpos*. Le nombre d'ovules (seedbuds) dans l'ovaire et de graines dans la gousse a été accepté comme critère pour cette division (Ascherson et Graebner, 1907). Jusqu'à nos jours, la répartition établie en 1984 est retenue, avec cependant une subdivision du genre en deux nouveaux sous genres : Le premier est d'origine méditerranéenne (Subgenus *Lupinus*) et le second est natif de l'Amérique (Subgenus *Platycarpos*) (Kurlovick et *al.*, 1995 cité par Cowling et *al.*, 1998).

3.2 Distribution géographique

Le genre *Lupinus* suit une distribution qui a la particularité d'être amphi-atlantique puisqu'il occupe l'Amérique du Nord et du Sud (Nouveau Monde) ainsi que les régions principalement méditerranéennes d'Europe, d'Afrique et d'Asie – uniquement au Proche-Orient (Ancien Monde). Cependant, cette répartition est très inégale car seuls 17 à 18 taxons sont présents sur le pourtour méditerranéen.

3.2.1 Lupins de l'Ancien Monde

Tous les lupins de l'Ancien Monde sont des plantes herbacées annuelles qui vivent à altitude faible ou modérée (généralement inférieure à 2000 m) (Plitmann et Heyn, 1984). Le nombre d'espèces est limité et il est admis que ces espèces se divisent en deux groupes selon la microstructure du tégument externe de la graine : les *Scabrispermae* (lupins possédant des graines rugueuses) et les « *Malacospermae* » (lupins possédant des graines lisses).

Les (*Malacospermae*) constituent un groupe très hétérogène, Cinq espèces à large répartition sont retrouvées le long des côtes méditerranéennes : *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. hispanicus* et *L. micranthus* (Naganowska et al., 2003).

Les (*Scabrispermae*) forme un groupe monophylétique fortement soutenu qui compte neuf espèces et variétés rencontrées essentiellement en Afrique et à l'est du bassin méditerranéen, ces espèces sont : *L. atlanticus*, *L. princei*, *L. pilosus*, *L. pilosus var. tassilicus*, *L. anatolicus*, *L. somaliensis*, *L. palestinus*, *L. digitatus*, *L. cosentinii* (Naganowska et al., 2003).

Une espèce nouvelle, *L. mariae-josephi*, découverte très récemment en Espagne (Pascual, 2004), présente des similitudes morphologiques avec les sections *Micranthi* et *Lutei* des « *Malacospermae* » et une microstructure tégumentaire des graines intermédiaire aux *Scabrispermae* et aux « *Malacospermae* ». ces caractères ne permettant pas de la rattacher clairement à l'un ou l'autre des groupes reconnus de lupins.

3.2.2 Lupins de nouveau Monde

Les lupins du Nouveau Monde occupent la quasi-intégralité du continent américain en suivant une distribution continue, de l'Alaska à la Patagonie, et occupent ainsi un large spectre d'habitats. Ils présentent une grande diversité morphologique avec conjointement des espèces herbacées (formes prostrées ou en rosette) et des espèces ligneuses (buissons, arbrisseau et arbustes).

Cette grande variabilité écologique et morphologique explique en partie les difficultés qu'ont rencontrées les taxinomistes pour mettre au clair les relations de parenté à l'intérieur du genre, particulièrement au Nouveau Monde.

Malgré ces obstacles méthodologiques, la phylogénie des lupins américains s'est largement précisée ces dernières années avec les travaux de Hughes et Eastwood (2006), Eastwood et *al.* (2008) et Drummond et *al.* 2012). trois groupes principaux ont été mis en évidence : un clade comprenant des espèces unifoliées du Sud-Est des Etats-Unisne (comprennent que quatre espèces (*L. villosus*, *L. diffusus*, *L. cumulicola* et *L. westianus*) avec un nombre de chromosomes est égal à $2n = 52$), le clade des lupins de l'Est de l'Amérique (regroupent des espèces présentant un nombre de chromosomes $2n = 36$) et le clade très diversifié de l'Ouest de l'Amérique (Toutes ces espèces ont un nombre de chromosomes plus important que les deux clades précédents avec $2n = 48$).

3.3 Description morphologique

Les lupins sont des plantes poilues dressées, la plante peut mesurer de 0.2 à 1.60 m (Langer et Hill, 1991), avec quelques arbustes atteignant jusqu'à 2.5 mètres (Figure 4).

Les feuilles sont majoritairement composées digitées comprenant de 5 à 12 folioles entières ; cependant, quelques espèces américaines présentent des feuilles simples entières à tendance obtuses. Les stipules sont soudées au pétiole par leurs bases et sont généralement engainantes. Le système racinaire des lupins est pivotant et varie considérablement entre les espèces en fonction des adaptations aux différents types de sols en présence, allant d'un pivot dominant avec relativement peu de racines latérales à un système de racines latérales très développé (Clements et *al.*,1993).

Les racines peuvent atteindre la profondeur de 1.0-2.0 mètres, et sont composées par nombreuses nodosités, à durée de végétation de l'ordre de cent cinquante jours (cent trente jours pour *L. angustifolius*) (Lapeyronie, 1982).

Les fleurs, de couleurs variables mais avec une forte tendance pour le bleu et le jaune, sont rassemblées en épis ou en grappes terminales pédonculés affublés de bractées caduques ou persistantes. Elles sont portées par des pédicelles mesurant de 2 à 12 mm (Brink et *al.*, 2006 ; Pesson et Louveaux, 1984). Les fleurs sont à symétrie bilatérale et sont dites papilionacées.

Le fruit des lupins est une gousse étroitement oblongue, plus ou moins comprimée, déhiscente et velue, de couleur crème, brun ou noir (Quezel et Santa, 1962 ; Kurlovich, 2002).

Les gousses contiennent habituellement quatre à neuf graines séparées les unes des autres par de fausses cloisons (Lapeyronie, 1982). Les graines de lupin sont très diverses dans la taille, la forme, et la couleur. La surface de graine est lisse ou à fine maille (Kurlovich, 2002). La forme varie de ronde plate à presque sphérique. Les graines du lupin blanc (*Lupinus albus*) sont grosses, un peu aplaties et de couleur blanc-crème. Celles des lupins bleus (*Lupinus angustifolius*) sont plus ou moins cylindriques, grises bleues, avec des marbrures brunâtre et taches pales. Celles des lupins jaunes (*Lupinus luteus*) sont rondes, à fond jaune avec des macules noires (Lapeyronie, 1982).

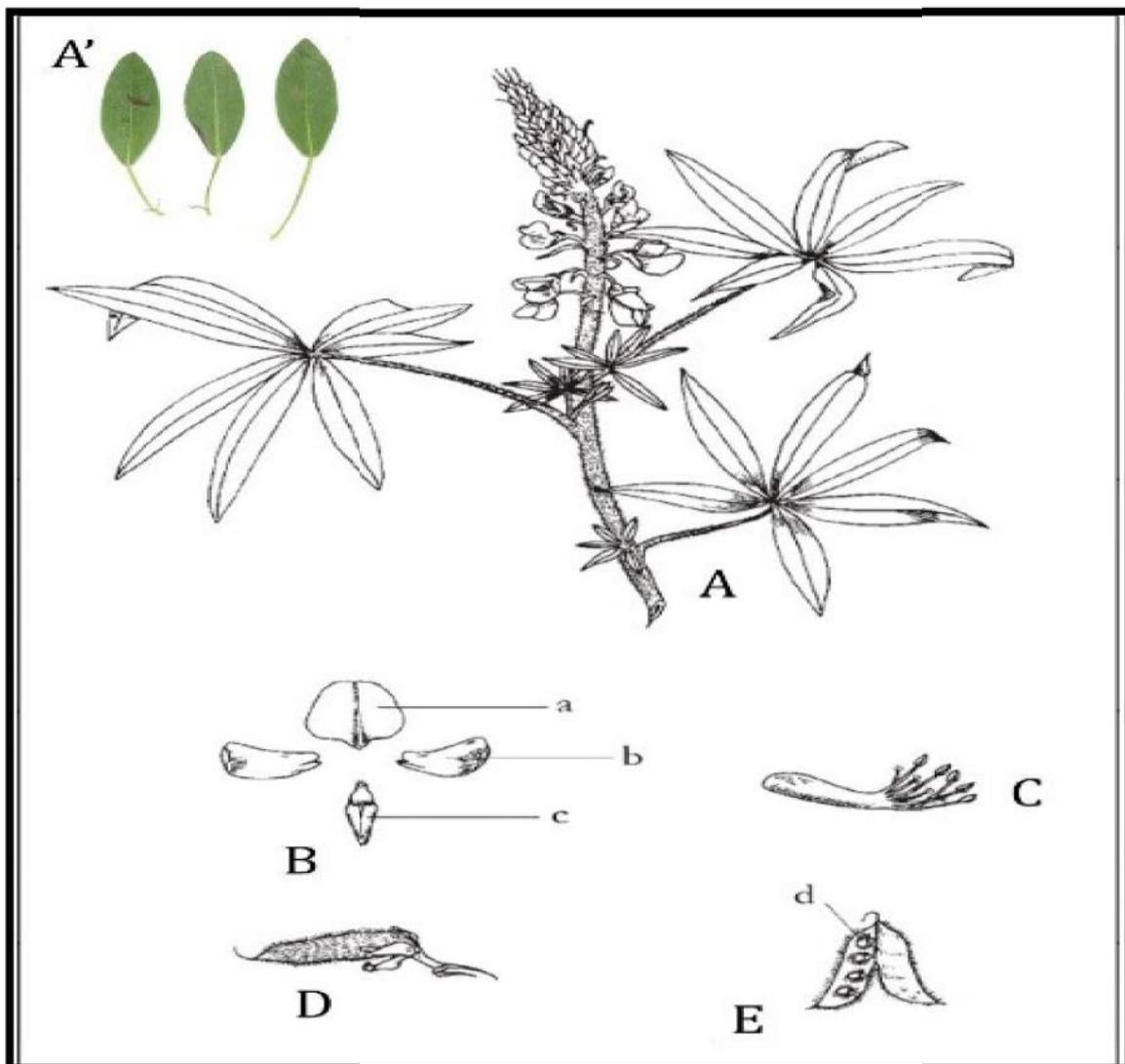


Figure 4 : Morphologie générale du genre *Lupinus*. A. Feuille digitée ou A'. Feuille unifoliée ; B. Corolle, a. Etendard, b. Ailes, c. Quille (ou Carène) ; C. Androcée ; D. Fruit fermé ; E. Fruit ouvert, d. Graine.(Ferval,2014)

3.4 *Lupinus angustifolius*

Dénomination botanique : *lupinus angustifolius* .

Dénomination français: lupin bleu ou lupin à feuilles étroites.

Dénomination anglais : blue ou Narrow- leafed lupin.

Dénomination arabe: ترمس بري، لفيلية، بسيلة

Plante de 20-50 cm, munie de poils appliqués - folioles linéaires-oblongues avec une largeur de 1.5- 4 mm pour les types sauvages et de 6 mm maximum pour les types cultivés alors que *L. albus* présente 12-20 mm et *L. luteus* 8-15 mm. , - fleurs d'une couleur bleu clair ou foncé et teinté e de violet , longues de 12-14 mm, alternes, assez rapprochées, en grappes peu interrompues - pédicelles plus courts que le tube du calice - calice bractéolé, à lèvre supérieure bipartite, bien plus courte que l'inférieure entière ou à 2-3 denticules - carène brusquement courbée et à bec long - gousse large de 10-12 mm, à suture supérieure ondulée, à 4-5 graines grosses, remplissant toute la cavité de la gousse, lisses, marbrées de taches blanches et de lignes noires. La domestication de *L. angustifolius* a été réalisée en fin des 1920 en Allemagne après la sélection de variétés à faible taux d'alcaloïdes (Hackbarth et Troll, 1956) (Figure 5).

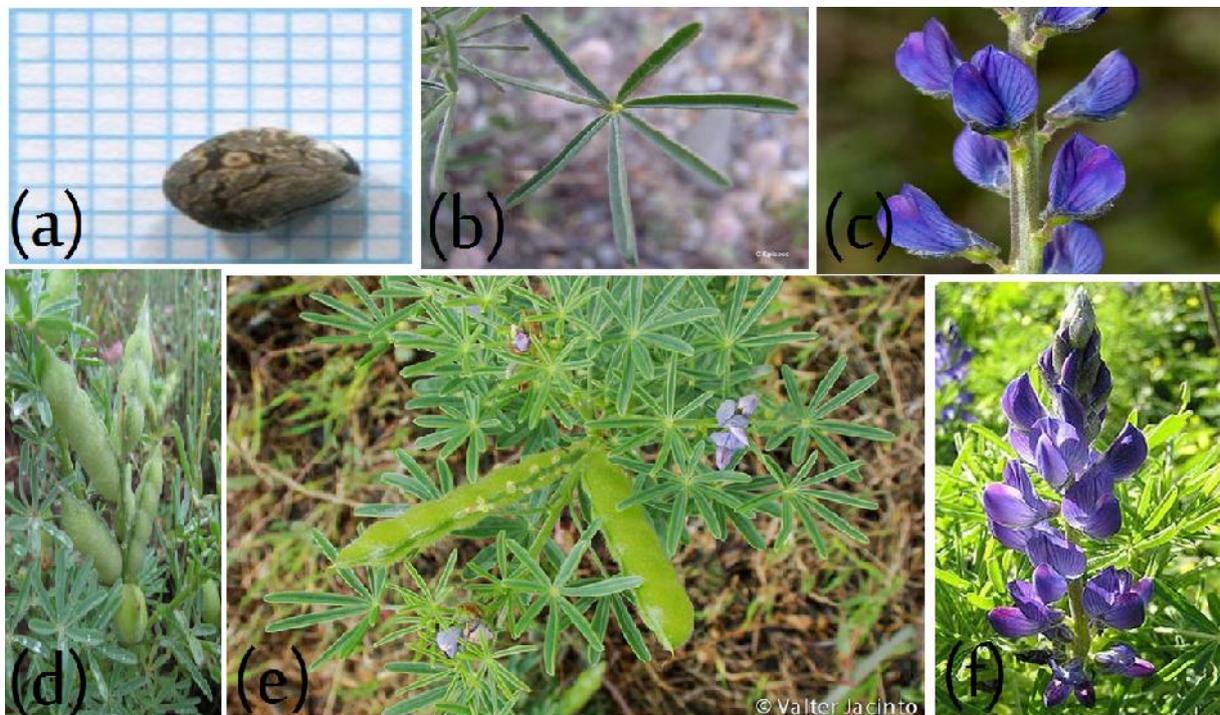


Figure 5: Caractères botaniques du *lupinus angustifolius*. (a) : Aspect des graines, (b) : Aspect des feuilles, (c) : Aspect des fleurs, (d) : Aspect des gousses, (e) : Aspect morphologique de la plante, (f) : Aspect des grappes.

3.5 Lupin d'Algérie

Le genre *Lupinus* n'est pas très répandu en Algérie, selon Medjahdi et al. (2009). Il serait considéré comme faisant partie des plantes rares.

Les variétés essayées et cultivées durant la période coloniale ont totalement disparu. Malgré son importance comme aliment du bétail (mise au point de concentré), le lupin essayé n'a jamais pu sortir des stations expérimentales. A l'état spontané, Quezel et Santa (1962) mentionne la présence de quelques espèces spontanées au nord du pays et d'une espèce dans le Hoggar dont *L. angustifolius*, *L. micranthus*, *L. Luteus* et *L. tassilicus* (Quezel et Santa, 1962).

Au niveau des stations ITGC (surtout à Khemis Miliana), plusieurs essais ont été menés sur du lupin (blanc et bleu). Cependant la culture n'est jamais sortie des stations expérimentales.

En 1987 à l'INA, a été réalisé un essai de comportement sur différentes variétés et les résultats étaient très intéressants (18 quintaux de grains par hectare et plus). Au département de Zootechnie de l'INA, plusieurs travaux de substitution du tourteau de soja par le grain de *Lupinus mutabilis* ont été menés dans l'aliment du poulet.

Malheureusement cette admirable plante ne tolère pas les sols riches en calcaire (le cas des sols calcaires algériens). Celui-ci bloque le fer du sol et la plante ne se développe pas. Les recherches actuelles se concentrent sur des variétés tolérantes au calcaire. La prospection des écotypes locaux de lupin reste à réaliser.

3.6 Intérêt et Utilisation du lupin

Dans un contexte mondial de demandes croissantes en matières premières riches en protéines, depuis plusieurs années, un grand effort de recherches est concentré sur la sélection et l'utilisation de protéagineux. Parmi les protéagineux, le lupin est le mieux pourvu en protéines (Froidmont et Leterme, 2005). Les lupins sont des plantes dont les graines ont une forte teneur en protéines (43-50%) et contiennent aussi des fibres (25,5%), des sucres (13,5%), des matières grasses (12,5%) et des minéraux (5,5%). Plusieurs espèces sont riches en différents types d'alcaloïdes toxiques (lupanine, hydroxylupanine, spartéine,...) donnant un goût amer aux graines (Wink, 1992). Cependant, on dispose de variétés sélectionnées dépourvues ou à faible teneur en alcaloïdes qu'on nomme les lupins doux (Gladdstones, 1998).

Leur utilisation joue un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols agricoles. Le fait est que les plantes, comme toutes légumineuses, accumulent des concentrations d'azote importantes dans leurs tissus. Une partie de cet azote, particulièrement au niveau des racines, est éventuellement réincorporé au sol lors de la décomposition des tissus, donc le lupin est classé dans la catégorie des « engrais verts ». Ainsi les plantations de lupins permettent de rétablir la fertilité des sols grâce à son enracinement plus profond que beaucoup d'autres cultures (1.50 m), après la culture de plantes plus exigeantes, telles que les céréales et autres espèces, qui ont tendance à appauvrir les sols (McLenaghan, 2004; Sparks, 2002). De ce fait ils constituent un bon précédent : entant que culture principale introduite dans une rotation, ou culture dérobée (Dommergues *et al.*, 1999).

Ils permettent de mieux valoriser les terres légères : les lupins sont dénommés « les plantes d'or des sables » en raison de leur avantage de bien pousser sur les sols sablonneux (Bounejmate *et al.*, 1995).

La symbiose avec *Bradyrhizobium* permet un métabolisme azoté important dont les excès sont stockés sous forme de protéines. L'archéologie nous montre que différentes espèces de lupins ont très tôt fait partie de l'alimentation humaine.

Pour la santé, les lupins ont une excellente digestibilité et ne font pas monter le taux de cholestérol. D'après plusieurs études, une consommation habituelle de lupin prévient l'hypertension et réduit le niveau de cholestérol dans les corps. De plus, grâce aux propriété d'une substance appelée «tocophérol» le lupin serait utile pour la prévention du diabète de type 2 et également pour la prévention du cancer du colon (Poiret,2014).

0Les lupins présentent également d'intéressantes capacités de détoxification des sols contaminés par des métaux lourds (cadmium, cobalt, manganèse, nickel, plomb, zinc) (Petterson&Harris, 1995 ; Page *et al.*, 2006 ; Peñalosa *et al.*, 2007), par des hydrocarbures (Dashti *et al.*, 2009) ou par des produits chimiques (Bonvallot, 2004). Les recherches s'orientent également vers une sélection de bactéries directement capables de dégrader ou de neutraliser les contaminants (Mahé,2009).

La réintroduction de la culture de lupin en Algérie et notamment dans les zones sableuses et marginalisées du pays pourrait avoir un effet bénéfique sur le plan agricole mais aussi économique vu la contribution de cette légumineuse dans l'approvisionnement du sol en azote ainsi que le développement de l'élevage.

4. Description des Rhizobia

Le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote après les légumineuses est une bactérie communément appelée « rhizobium » (du grec rhiza : racine et bios : vie). on nomme « rhizobium » toute bactérie, quel que soit son genre, capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec une légumineuse et de stimuler la production des nodules (Frank, 1889). Actuellement, certains auteurs préfèrent substituer au terme de « rhizobia », qui est un terme dérivé du nom du genre *Rhizobium*, le terme de bactéries nodulant les légumineuses "BNL" (Zakhia *et al.*, 2004).

En général, les rhizobiums sont des bactéries du sol constituent entre 0.1- 8% de la flore bactérienne totale du sol (Sadowsky et Graham, 1998). sont des bactéries Gram négatif, mobile et non sporulantes, qui vivent à l'état libre dans le sol et se présentent sous forme de bâtonnets, réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994) et se différencient en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue à l'intérieur du nodule pour fixer l'azote (Perry *et al.*, 2004). Mise à part leur capacité à établir une symbiose avec les légumineuses (elles ont la particularité de posséder les gènes permettant la synthèse d'un complexe enzymatique nitrogénase qui permet cette fixation d'azote), aucun caractère cultural, morphologique, physiologique ou biochimique, ne peut distinguer les rhizobia des autres bactéries du sol (Rivas *et al.*, 2009).

4.1 Biodiversité des rhizobia

Les rhizobiums ont été décrits pour la première fois par Martinus Beijerinck à partir d'un nodule de racine d'une légumineuse (Beijerinck, 1888), et plus tard leur étude est considérablement enrichie. En 2016, Weir a fait une synthèse des travaux concernant la taxonomie des rhizobia , d'après cet auteur les rhizobia sont répartis en 13 genres et plus de 98 espèces symbiotique (<http://www.rhizobiums.co.nz/taxonomy/rhizobiums.html>), ce nombre étant en augmentation constante et cette classification est loin d'être définitive comparativement au grand nombre et à la vaste distribution des légumineuses hôtes, elle représente un champ en extension continué qui s'affine sans cesse et s'enrichit régulièrement de nouveaux taxons au gré des nouvelles progrès technologiques dans chacun des trois critères utilisés en taxonomie et surtout de l'isolement de nouvelles souches particulièrement dans les zones tropicales et méditerranéennes, où la diversité est encore mal documentée.

Jusqu'à l'année 2001, toutes les bactéries capables de former les nodules en symbiose avec les légumineuses ont été groupées dans le groupe des alpha-protéobactéries qui inclut les espèces des genres *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium (Ensifer)* (Graham, 2008 ; Velazquez et al., 2010), connue sous le nom de rhizobia. Cependant, (Sy et al., 2001) ont montré que *Crotalaria* forme des nodules lorsqu'elle est inoculée avec un Alphaproteobacteria du genre *Methylobacterium*. Toutefois il existe d'autres genres d'Alphaprotéobactéries, induisant des nodules, moins fréquemment isolés, cette association a été démontrée chez *Neptunia natans*, qui est nodulée par *Devosia* spp. (Rivas et al., 2002), *Lupinus albus* par *Ochrobactrum lupini* (Trujillo et al., 2005 ; Zurdo-Pineirro et al., 2007), *Trifolium repens* et *L. albus* par *Phyllobacterium trifolii* (Valverde et al., 2005), et *Lotononis* par *Microvirga* (Ardley et al., 2012).

Récemment, un certain nombre d'isolats ont été isolés à partir de nodules de légumineuses, capables de fixer l'azote mais phylogénétiquement situé à l'extérieur des Alphaprotéobactéries et appartenant au Bêtaprotéobactérie. Il s'agit de *Burkholderia*, isolés d'*Aspalathus carnosa* et de *Machaerium lunatum* (Moulin et al., 2001) et *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) isolés de *Mimosa pudica* et de *M. diplotricha*, (Chen et al., 2001 ; Chen et al., 2003 ; Vandamme et Coenye, 2004).

Il a également été décrit que certaines espèces de Gammaprotéobactéries, notamment les genres *Pantoea*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Leclercia* et *Pseudomonas*, ont été isolées de nodules de plusieurs espèces de *Hedysarum* et de *Robinia pseudoacacia* (Benhizia et al., 2004, Shiraishi et al., 2010 ; Madhi et al., 2011 ; Huang et al., 2012). Cependant, sa fonction dans les nodules n'a pas été clairement définie.

La taxonomie la plus récente des rhizobia est illustrée dans le Tableau 1.

4.2 Bactéries nodulants du lupin

Malgré l'intérêt agronomique, alimentaire et écologique de *Lupinus*, cette plante a été peu étudiée en ce qui concerne ses symbiotes. Des études d'inoculation croisée ont montré que les lupins partageaient un bassin rhizobien commun avec les autres légumineuses de la tribu Genistae et étaient effectivement nodulés par des rhizobia isolés à partir de *serradella* (*Ornithopus* L., tribu *Loteae*) et de rhizobia isolés à partir de *Lotus* L., *Anthyllis* L., et *Phaseolus* L. genres (St pkowski et al., 2007).

En général, les lupins sont nodulés par des rhizobiums à croissance rapide et lente du genre *Bradyrhizobium*, bien que ces derniers soient ceux qui sont plus fréquemment isolés de cette légumineuse (Barrera et al., 1997; Jarabo-Lorenzo et al., 2003).

Le lupin est une légume hôte promiscuité nodulée par des rhizobiums avec des génotypes chromosomiques très différents, appartenant généralement à plusieurs espèces à croissance lente de *Bradyrhizobium*: *B. japonicum* (Jarabo-Lorenzo et al., 2003), *B. canariense* (St pkowski et al., 2005), *B. elkanii* (Barrera et al., 1997) et *B. Lupini* (piex et al., 2015), Les travaux de Duran et al.,2013.2014 ont démontré que des souches à croissance très lente nodulaient *L. marie-josephae*, il s'agit de *B.valentinum*.

Cependant, des espèces à croissance rapide d'autres genres se sont avérées noduler des lupins: *Ochrobactrum lupini* (Trujillo et al., 2005) et *Phyllobacterium trifolii* (Valverde et al., 2005) et *Microvirga Lupini* (Ardley et al.,2012 ; Msaddak et al., 2017.2018)

4.3 Genre *Bradyrhizobium*

Ce genre a été défini pour inclure tout les rhizobia a croissance lente (environ 6-10h) et peuvent alcaliniser le milieu de croissance (Jordan,1982). Seules quelques espèces de *Bradyrhizobium* sont largement reconnues.

Actuellement, le genre *Bradyrhizobium* comprend 50 espèces proposées pour des souches originaires d'Europe, d'Afrique du Nord, d'Amérique du Sud et d'Asie (St pkowski et al., 2018).

Il est important de noter que les phylogénie du gène de l'ARNr 16S et de plusieurs autres marqueurs géniques qui sont couramment utilisés dans les études MLSA (analyse de séquence multi-locus) révèlent deux branches principales dans le genre *Bradyrhizobium*. (Gevers al., 2005). L'une des branches, *Bradyrhizobium* groupe I *B. japonicum* comprend actuellement 29 espèces, en plus de *B. japonicum* le deuxième groupe II de *B. elkanii* restant contient *B. elkanii* et 17 autres espèces. (Moreira et al., 2006). *Bradyrhizobium denitrificans* et *Bradyrhizobium oligotrophicum* ont tendance à grouper séparément des deux groupes I et II, outre les 50 espèces reconnues (St pkowski et al., 2018).

Ces dernières années, la caractérisation de différentes souches de *Bradyrhizobium* en comparant plusieurs techniques moléculaires a indiqué l'existence de 11 génotypes différents, trois dont correspondent aux souches connues, alors que 8 génotypes sont très distincts (St pkowski et al., 2018).

Tableau 1 : Majeures familles et genres de bactéries capables de noduler les légumineuses. (Desiraju et al., 2018; Shamseldin et al., 2017).

Rhizobium	Plante hôte
Classe α-Proteobacteries	
I Order Rhizobiales	
I Famille Rhizobiaceae	
Genre Rhizobium (98)	<i>Differentes plantes hôtes , Peas, Clover, Lupin, Soybean, Lotus, Phaseolus, Astragalus, Chickpea, Sesbania, Medicago, Mimosa, Indigofera, Hedysarum, Medicago, Populus, Vicia, Lespedeza, Oryza, Albizzia, Kummerowia, Dalbergia, Caragana, Trigonella, Sphaerophysa, Oxytropis, Mung bean, Vigna, Rosa, Leucaena, Dalea, Clitoria, Siratro, Cowpea, Lemna, Calliandra, Pongamia, Arachis, Pueraria</i>
Genre Ensifer (Sinorhizobium) (21)	<i>Glycine, Sesbania, Acacia, Medicago, Prosopis, Kummerowia, Leucaena, Abrus, Lotus, Argyrolobium, Psoralea</i>
Genre Allorhizobium (1)	<i>Neptunia</i>
Genre Shinella (1)	<i>Kummerowia</i>
Genre Pararhizobium (5)	<i>Tumor de fruits (non-symbiotic)</i>
II Famille Phyllobacteriaceae	
Genre Mesorhizobium (40)	<i>Differentes plantes hôtes , Chickpea, Lotus, Astragalus, Leucaena, Sesbania, Amorpha, Prosopis, Albizzia, Biserrula, Caragana, Anthyllis, Robinia, Alhagi, Anagyris, Acacia, Sophora</i>
Genre Phyllobacterium (8)	<i>Lathyrus, Argyrolobium, Astragalus, Brassica, Phaseolus, Lotus, Sophora</i>
Genre Aminobacter (1)	<i>Anthyllis</i>
III Famille Bradyrhizobiaceae	
Genre Bradyrhizobium (37)	<i>Glycine, Vigna, Lespedeza, Beta, Entada, Pachyrhizus, Lablab, Arachis, Cytisus, Retama, Aeschynomene, Acacia, Inga, Lupin, Phaesolus, Cowpea, Centrolobium, Erythrophleum, Neonotonia, Desmodium, Lupinus</i>
Genre Blastobacter (2)	<i>Aeschynomene</i>
Genre Photorhizobium (1)	<i>Aeschynomene</i>
IV Famille Hyphomicrobiaceae	
Genre Devosia (1)	<i>Neptunia</i>
Genre Azorhizobium (3)	<i>Sesbania</i>
V Famille Methylobacteriaceae	
Genre Methylobacterium (3)	<i>Crotalaria, Trifolium phyllosphere</i>
Genre Microvirga (4)	<i>Lupinus, Listia, Cowpea</i>
VI Famille Brucellaceae	
Genre Ochrobacterium (2)	<i>Lupinus, Cytisi</i>
II Order Burkholderiales	
Famille Burkholderiales	
Genre Burkholderia (17)	<i>Dalbergia, Machaerium, Mimosa, Lebeckia, Aspalathus, Papilionoid Legumes</i>
Genre Cupriavidus (Ralstonia) (2)	<i>Mimosa, Phaselous, Leucaena</i>

5. Interaction légumineuse-rhizobia

5.1 Mécanismes de la Nodulation

Les rhizobia vivent sous une forme libre dans le sol mais ne peuvent fixer l'azote que lors d'associations symbiotiques avec une plante hôte compatible en formant des organes spécifiques à la fixation biologique de l'azote : les nodules. Le processus de nodulation est très complexe, régulé à chaque étape par un échange de signaux nécessaires à l'interaction entre les deux espèces. La formation d'un nodule fonctionnel comporte plusieurs étapes: Pré-infection, l'infection, l'organogenèse et la fixation d'azote.

5.1.1 Pré-infection

L'étape préliminaire de l'interaction entre les rhizobiums et leurs plantes hôtes commence par un échange de signaux moléculaires entre les deux symbiotes. Les microsymbiontes présents dans les sols se multiplient dans la rhizosphère au niveau de la racine en catabolisant les métabolites exsudés par les racines les produits flavonoïdes ou isoflavonoïdes et d'autres molécules qui peuvent jouer le rôle de chimioattractants (Cooper, 2007). Les rhizobia sont en effet attirés vers les racines des légumineuses par un chimiotactisme positif (Franche *et al.*, 2009). La présence des flavonoïdes va induire chez les rhizobia la synthèse de lipochitoooligosaccharides (facteurs Nod), qui sont les molécules principales de signalisation (Perret *et al.*, 2000); ils jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules (Dénarié *et al.*, 1996).

L'attachement des rhizobia aux poils absorbants racinaires constitue une autre étape symbiotique précoce. Des facteurs de surface comme la protéine rhicadhésine, les polysaccharides capsulaires (CPS) ; les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) chez la bactérie et la lectine et autres adhésines chez la plante interviendraient dans l'attachement ou l'adsorption spécifique des micro-organismes sur les poils absorbants de leur hôte (Dazzo *et al.*, 1984).

5.1.2 Infection

L'infection consiste en la pénétration des rhizobiums en différents points du système racinaire (Hopkins, 2003). On distingue deux types d'infection : la voie intracellulaire et la voie intercellulaire.

Au cours de l'infection intracellulaire, la pénétration de la bactérie est facilitée par la courbure du poil racinaire (Root Hair Curling : RHC) en forme de « crosse de berger » qui crée une zone confinée dans laquelle la bactérie est entourée par la paroi végétale. Un cordon d'infection est initié à partir de ce point par hydrolyse de la paroi (Mateos et *al.*, 2001), invagination de la membrane végétale et production de matériel pariétal par la plante, Le cordon d'infection est une structure tubulaire qui croît à l'intérieur de la cellule et dans laquelle la bactérie prolifère (Gage, 2004).

L'infection intercellulaire se fait généralement au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, ou bien parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Pawlowski et Bisseling, 1996). Les rhizobia progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection.

5.1.3 Développement du nodule

En parallèle de la progression d'infection, l'organogenèse nodulaire se met en place. Le primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, se différencie en nodule mature (Brewin, 1992). Les rhizobiums se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte (Franche et *al.*, 2009). Ils s'arrêtent leurs divisions et commencent à produire des enzymes et d'autres molécules nécessaires à la fixation d'azote.

Les rhizobia subissent des changements morphologiques et métaboliques, aboutissant à une différenciation en bactéroïdes, qui sont entourés par une membrane nommée "membrane peribactéroïdienne" qui a une structure et une fonction spéciale pour l'interaction plante-microorganisme et l'échange des métabolites ainsi que des molécules signales. Les bactéroïdes intracellulaires avec leurs membrane peribactéroïdienne constituent le symbiosome (Chrispeels et Sadava, 2003).

La prolifération des bactéroïdes enfermée dans leur membrane (symbiosome) qui s'accompagne d'une division mitotique des cellules corticale de la racine conduit à la formation de nodosités racinaires fonctionnelles qui sont chargés de pigments appelés "leghémoglobine", synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (Madigan et Marilinko, 2007).

Chez les légumineuses deux types de nodules peuvent être distingués : déterminés et indéterminés suivant le site d'initiation des divisions cellulaires du cortex et la persistance ou non du méristème. (Pawlowski et Bisseling, 1996) (Figure 6).

5.1.4 La symbiose fixatrice d'azote

Le processus de fixation d'azote se fait *via* une enzyme appelée nitrogénase pouvant être inactivée de façon irréversible si elle entre en contact avec de l'oxygène. La léghémoglobine a donc pour fonction de réguler la concentration d'oxygène dans le nodule à une valeur très faible, de l'ordre de 10 nM (Ott *et al.*, 2005). Une fois que les nodules sont matures et que le processus de fixation d'azote est fonctionnel, les nodules sont généralement de couleur rosée du fait de la présence de cette léghémoglobine. En revanche, la présence de nodules blancs indique que la symbiose n'est pas fonctionnelle. C'est le cas par exemple lorsque la souche de rhizobia *Phyllobacterium trifolii* infecte la plante *Trifolium repens* (Valverde *et al.*, 2005).

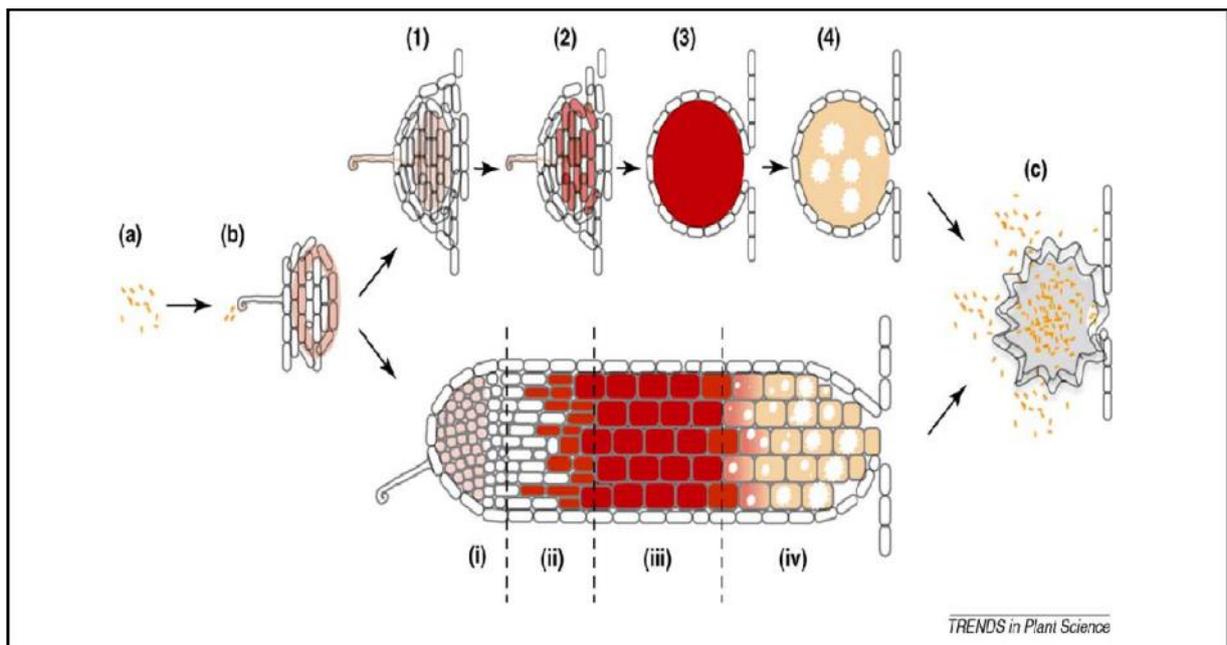


Figure 6 : Les différents stades de la formation des nodosités de type déterminé (les stades de développement des nodules sont numérotés de 1 à 4) et indéterminé (les stades de développement des nodules sont numérotés de i à iv) (a) les rhizobia peuvent être présents en tant que saprophytes. (b) Rapprochement du rhizobium et déformation du poil racinaire pour permettre aux bactéries de pénétrer dans la plante et la formation de cordon d'infection, (stade 1 et i). Quand, le cordon de l'infection arrive au centre de la future nodosité, il se ramifie et les rhizobia sont libérés et se développent dans une membrane cellulaire (symbiosome). (le stade de l'infection, 2 et ii). Les rhizobia, ensuite, s'agrandissent et se différencient en bacteroïdes qui fixent l'azote. (stade 3 et iii). Après une période de fixation active de l'azote pour laquelle la durée dépend du stade développement de la plante et des conditions environnementales, les nodosités vieillissent (stade 4 et iv). (c) une fraction des rhizobia de différencies a l'intérieur de la nodosité est capable de se diviser et revenir à un mode de vie saprophyte lorsqu'ils sont libères dans la rhizosphère (d'après Schumpp and Deakin, 2010).

5.2 Les bases moléculaires de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse

Au cours de l'interaction symbiotique, les bactéries vont pénétrer la racine de la plante hôte et être internalisées dans un compartiment intracellulaire à l'intérieur d'un organe spécialisé nouvellement formé : la nodosité. La formation de ces nodosités, qui permettent des échanges métaboliques étroits et un transfert très efficace de l'azote fixé vers la plante, est le résultat d'une interaction complexe très coordonnée entre les deux partenaires.

Les plantes doivent être capables de rapidement discerner parmi la multitude de micro organismes du sol ceux qui sont des symbiotes potentiels de ceux qui sont pathogènes. Ainsi l'interaction symbiotique va débiter par un dialogue moléculaire entre les deux partenaires qui va leur permettre de se reconnaître et de préparer la plante hôte à accueillir son symbiote (figure 7).

5.2.1 Génétique de la nodulation chez la légumineuse

5.2.1.1 Le signal plante : les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires produits par la plante, les plus importants de la perspective symbiotique (Perret et *al.*, 2000).

Ces substances phénoliques sont les facteurs les plus subtils qui aident les associés à s'assortir (Broughton et *al.*, 2000). leur structure comprend des flavones, flavonols, flavanols, flavanones, isoflavonoïdes et isoflavans (Hassan and Mathesius, 2012).

Les fonctions des flavonoïdes sont variées (Ex : chimioattractifs des rhizobia et sont des inducteurs des gènes *nod* qui sont nécessaires pour permettre à la souche de noduler son hôte). La structure et la quantité de flavonoïdes produites dépendent de l'espèce végétale (Broughton et *al.*, 2000).

Une espèce donnée de rhizobium va être capable de reconnaître des flavonoïdes particuliers produits par la plante hôte, ce qui détermine un premier niveau de spécificité dans l'interaction symbiotique (Peters et *al.*, 1986).

Par exemple, *Sinorhizobium meliloti* va répondre à la lutéoline, un flavonoïde sécrété par la luzerne, alors que *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* reconnaît la naringénine, un flavonoïde produit par son hôte le pois. (Caetano-Anollés et *al.*, 1988).

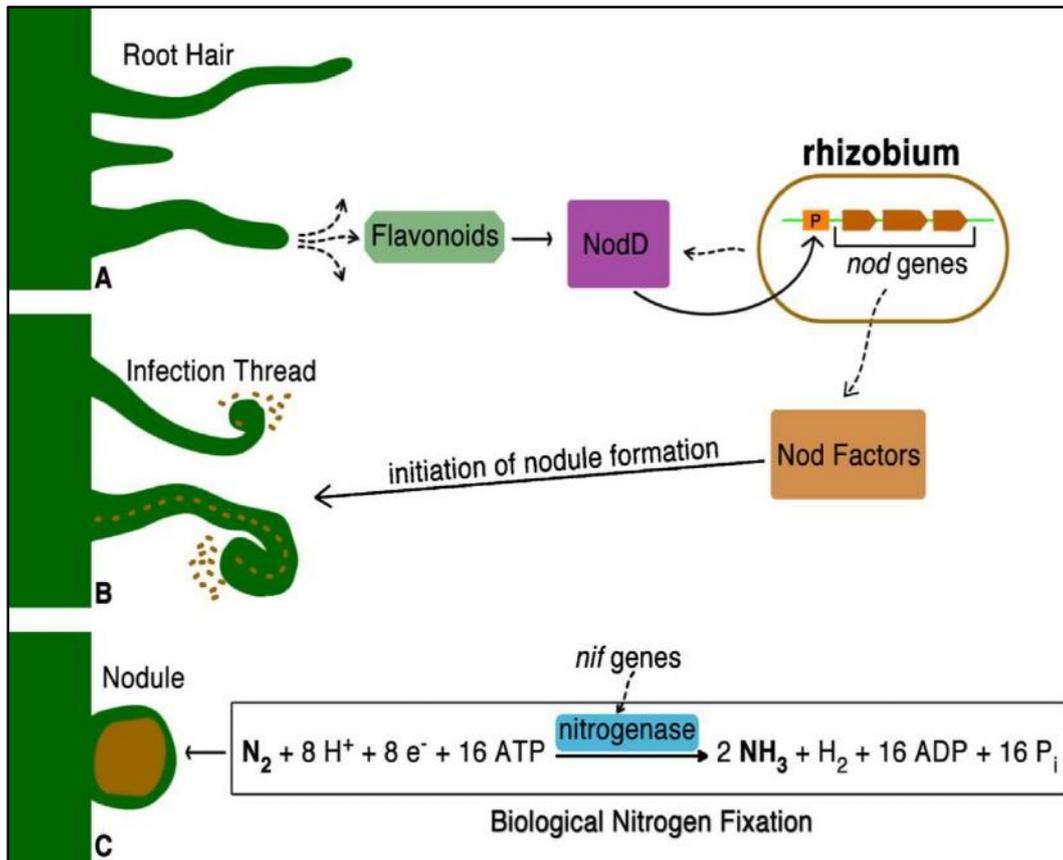


Figure 7 : Interaction entre le rhizobium et sa plante hôte (Laranjo et al., 2014).

5.2.2 Génétique bactérienne de la nodulation

Chez la bactérie, un certain nombre de gènes est nécessaire pour la nodulation. Ces gènes sont impliqués dans le dialogue moléculaire: ils permettent de reconnaître les signaux de la plante.

En général des flavonoïdes, qui activent le programme symbiotique précoce de la bactérie, et déterminent donc en retour la synthèse et la sécrétion des signaux bactériens, les facteurs Nod (Shamseldin et al., 2008 ; Gough, 2009).

Ces gènes sont généralement localisés sur un grand plasmide appelé plasmide Sym, dans le cas de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, ils sont situés sur le chromosome (Sharma et al., 1993).

Les gènes *nod* codent pour des enzymes de la voie de biosynthèse des facteurs Nod et ils peuvent être classés en trois groupes : les gènes *nod* régulateurs, les gènes *nod* communs et les gènes *nod* spécifiques (Skorupska et al., 2010).

5.2.2.1 Gènes de la nodulation (*nod*)

Regroupent trois ensembles de gènes qui semblent négocier les premières étapes de la nodulation:

- Les gènes *nod* régulateurs (Spaink, 2000), comprenant notamment le gène *nodD* (parfois en plusieurs copies dans le génome des rhizobiums), et codent pour des protéines qui, en présence de signaux sécrétés par la plante (flavonoïdes), activent l'expression des autres gènes *nod* dits gènes *nod* communs. Les gènes *nodD* codant pour des récepteurs spécifiques de signaux de la plante constituent un premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte.

- Les gènes *nod* communs (gènes de structures) (*nodABC*), sont des gènes clés de la nodulation, codent pour les enzymes impliquées dans la synthèse du lipochitoooligosaccharide. Ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des facteurs Nod (Masson-Boivin et al., 2006 ; Roche et al., 1996 ; Bladergroen et Spaink, 1998). Ces gènes sont conservés presque chez tous les rhizobia étudiés, ils sont fonctionnellement équivalents entre les espèces rhizobiales (Schultze et al., 1992 ; Roche et al., 1996). L'exception est l'absence des gènes *nod* communs dans le génome des souches de *Bradyrhizobium* sp. ORS 278 et BTAi1, symbiotes fixateurs d'azote de certaines espèces d'*Aeschynomene* ; cette symbiose, ne faisant apparemment pas intervenir de facteurs Nod, est appelée Nod-indépendante (Giraud et al., 2007 ; Bonaldi et al., 2011).

- Les gènes *nod* spécifiques (ou *hsn* pour « host specific nodulation »), : sont les déterminants majeurs de la spécificité de l'hôte. Chaque espèce de rhizobia est caractérisée par une combinaison donnée des gènes *nod*, qui codent pour des enzymes impliquées dans le griffage du squelette lipochitoooligosaccharidique du facteur Nod avec les substitutions qui confèrent la spécificité de l'hôte (Perret et al., 2000). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobia (Sharma et al., 1993).

5.2.2.2 Gènes de la fixation de l'azote

* Gènes *nif* :

En plus des gènes *nod* deux grandes catégories de gènes sont impliquées dans la fixation de l'azote dans les étapes tardives de la symbiose, Tout d'abord, les gènes *nif* (nitrogène fixation) qui sont chromosomiques pour de nombreux *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (Duhoux et Nicole, 2004), ou sont localisés sur les mégaplasmides des *Rhizobium* de régions tempérées (Gnanamanickam, 2007).

Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans les *Rhizobium* libres. Les gènes *nif* ont été séquencés ils sont au nombre de 20, organisés en unités de transcription, responsable de la structure de la nitrogénase et de son fonctionnement, Ces gènes comprennent les gènes structuraux de la nitrogénase *nifH*, *nifD*, *nifK* dont *nifH* code pour la réductase alors que *nifD* et *nifK* pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (Pelmont, 1995).

***Gènes *fix*:**

En plus des gènes *nif*, les gènes *fix* qui sont nécessaire à la fixation, mais ne contrôle pas la nitrogénase, ils ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques (Hopkins et Evrard, 2003).

5.2.2.3 Facteurs Nod

L'identification du signal Nod, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur rhizobia, est une étape essentielle dans la nodulation. Ils constituent des molécules indispensable pour la première étape de l'infection (Shamseldin et *al.*, 2008 ; Cooper, 2007).

Les facteurs Nod sont des lipochitoooligosaccharides (LCO) constitués d'un squelette de chitine. Ils sont constitués de 3 à 5 résidus de N-acétylglucosamine associés par des liaisons 1-4 (oligomère de chitine) et substitués par une chaîne d'acide gras du côté non-réducteur . Les facteurs Nod de toutes les espèces rhizobial appartiennent à la même famille chimique. Cependant, ils peuvent encore être décorés à l'aide de substitutions chimiques particulières, qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité d'hôte de chaque espèce rhizobienne. (Perret et *al.*, 2000).

Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Masson-Boivin et *al.*, 2006).

La biosynthèse et la sécrétion des facteurs Nod sont l'expression de gènes de nodulation où les gènes *nodABCD* qui codent pour la synthèse du noyau lipooligosaccharide de tous les facteurs Nod, et les gènes *hsn* qui codent pour les diverses substitutions des facteurs Nod (Debellé et *al.*, 2001).

6. La taxonomie bactérienne

Depuis la découverte du monde microbien, le souci des microbiologistes a toujours été l'étude des relations qui existent entre les organismes, d'identifier, de classifier et de nommer chaque nouveau microorganisme qu'ils découvraient, c'est ce qu'on appelle la taxonomie. (Vandamme *et al.*, 1996).

Il y a un siècle, cette discipline ne pouvait reposer que sur des critères phénotypiques restreints tels l'aspect microscopique, capacité à noduler une espèce de légumineuse pour un *Rhizobium* par exemple, les caractères culturels, etc., ces critères étaient insuffisants pour différencier certaines espèces et étaient par conséquent insatisfaisants (Janssen, 2006). La taxonomie bactérienne moderne se base sur plusieurs techniques qui se complètent les unes les autres (phénotypiques, génotypiques, phylogénétiques) et avec l'avancée des différentes techniques génotypiques et moléculaires, dont chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (protéines, acides gras, ADN...), une nouvelle approche est née, celle de la taxonomie polyphasique (Vandamme *et al.*, 1996 ; Zakhia et De lajudie, 2011).

Nous présentons ici un aperçu des principales techniques phénotypiques, génotypique et phylogénétique actuellement employées pour la caractérisation bactérienne, avec des exemples d'application de ces techniques puisés dans les bactéries nodulant les légumineuses.

6.1 Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques constituent la base pour la description formelle des taxa (Young *et al.*, 2003 ; Vandamme *et al.*, 1996). et sont celles qui ne sont pas directement basées sur l'ADN ou l'ARN. Elles font appel principalement aux caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques et symbiotiques dans le cas des rhizobies (Graham *et al.*, 1991).

Les critères morphologiques fournissent des renseignements concernant les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, présence de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores) et l'aspect des colonies observées sur la boîte de culture (taille, forme, couleur, état de la surface) (Vandamme *et al.*, 1996).

Les critères physiologiques et biochimiques regroupent les données de croissance de la bactérie à différentes températures, valeurs de pH, concentrations en sels et conditions atmosphériques (aérobies/anaérobies), résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, capacité d'utiliser différents carbohydrates et différentes sources d'azote, présence d'activité enzymatique, métabolisme de composés, etc (Vandamme *et al.*, 1996).

Ils sont très utiles en raison de leur rapport direct avec la nature et l'activité des enzymes et protéines de transport microbiennes. Puisque les protéines sont des produits génétiques, l'analyse de ces caractéristiques est une comparaison indirecte des génomes microbiens.

Les critères symbiotiques des rhizobia indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée. La première classification des rhizobia a été basée sur les tests de l'inoculation croisée entre les rhizobia et leurs plantes hôte et sur d'autres critères morphologiques et culturales (Willems, 2006).

Le développement des systèmes miniaturisés et automatisés tels que les API ou Biolog, la généralisation du traitement des données par ordinateur et l'analyse numérique ont rendu plus aisée la classification des microorganismes par l'approche phénotypique (Zakhia et De lajudie, 2011).

Les données phénotypiques étaient les premières à analyser au moyen de la comparaison numérique assistée par l'ordinateur. La taxonomie numérique a permis la comparaison d'un grand nombre de traits phénotypiques pour un grand nombre de souches. Les matrices des données montrant le degré de similitude entre chaque paire de souches et l'analyse des clusters ayant pour résultat des dendrogrammes ont indiqué une image générale de la consistance phénotypique d'un groupe particulier de souches. En effet, cette analyse d'un grand nombre de caractéristiques phénotypiques est taxonomiquement significative (Vandamme et *al.*, 1996).

6.2 Méthodes génotypiques

Les caractères génotypiques sont directement en rapport avec les acides nucléiques. Les progrès de la biologie moléculaire ont facilité le développement de diverses méthodes qui permettent une étude rapide et facile de ces molécules, en obtenant de l'information sur la véritable parenté des microorganismes. Ces méthodes sont basées sur l'analyse des molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau de l'ensemble du génome, soit en ciblant certains fragments du chromosome ou du plasmide bactérien. En effet, l'hybridation ADN-ADN, le pourcentage de G+C ou la cartographie chromosomique apportent des informations sur le génome bactérien dans sa globalité. On pourra également s'intéresser plus particulièrement à certains gènes qui reflèteront l'évolution bactérienne dans une approche phylogénétique et pourront être ultérieurement utilisés en tant qu'outils d'identification.

Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons beaucoup plus fines entre les bactéries et une classification plus rigoureuse. Si la classification des rhizobiums était longtemps basée sur leur capacité de nodulation et leurs caractéristiques morphologiques, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (Woese *et al.*, 1984), puis d'autres gènes dans le cadre des études MLSA, s'est progressivement imposé comme critère essentiel pour la taxonomie et la classification phylogénétique des rhizobiums indépendamment de leurs caractéristiques phénotypiques ou symbiotiques (Rivas *et al.*, 2009).

Actuellement, les méthodes dominantes dans la taxonomie moderne sont les méthodes génotypiques. Les avantages qui ont encouragé leur utilisation sont la stabilité et la fiabilité des systèmes de classification (Zakhia *et de* Lajudie, 2006). Parmi ces méthodes nous pouvons citer :

6.2.1 Les méthodes de typage basées sur la PCR

Les méthodes de typage génétique utilisent des techniques qui permettent de subdiviser le microorganisme étudié en un nombre distinct de types génotypiques. En particulier, de nombreuses techniques de typage moléculaire ont été développées sur la base de la réaction de PCR (PCR-RFLP, AFLP, RAPD, ERICPCR, REP-PCR, MLSA ...), relativement rapides à réaliser et simples à analyser. Ces outils sont actuellement les plus couramment utilisées dans les études de diversité des rhizobiums (Zakhia *et de* Lajudie, 2006). Nous nous limiterons à décrire la technique RAPD utilisée dans le cadre de notre étude.

6.2.1.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

La RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990), est une technique d'amplification par PCR des séquences aléatoires dispersées sur tout l'ADN génomique. La technique utilise une seule amorce de taille réduite (une dizaine de bases). Le nombre de sites correspondant à l'amorce utilisée peut varier d'une souche à une autre au sein de la même espèce. Le choix des amorces est empirique. Les profils obtenus permettent de différencier les souches d'une même espèce (Vinuesa *et al.*, 1998).

6.2.2 Gènes Impliqués dans les études taxonomiques et phylogénétiques

La phylogénie est l'étude des relations évolutives entre les organismes. La comparaison des séquences de quelques macromolécules est la façon la plus fiable pour obtenir une information sur les relations phylogénétiques. Ces relations phylogénétiques entre les bactéries ont été difficiles à appréhender, mais les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'estimer l'évolution bactérienne à l'aide de molécules qualifiées "d'horloges moléculaires universelles". Comme il a été déjà commenté, il s'agit de molécules présentes chez tous les organismes, avec la même fonction, très conservées et qui accumulent les mutations (variations de séquences) au cours du temps, permettant d'établir la phylogénie entre des organismes éloignés. En 1987, Woese a montré que les ARN ribosomiques remplissaient ces conditions.

L'ARNr 16S, composant de l'ARN de la petite sous-unité du ribosome d'environ 1500pb, a été établi comme la macromolécule de choix pour les analyses phylogénétiques monogéniques et l'identification des espèces (Lane *et al.*, 1985; Woese, 1987). L'ARNr 16S est un composant essentiel de la synthèse des protéines et est présent chez toutes les bactéries, woese 1987. La séquence la plus largement utilisée chez les rhizobiums est celle de l'ADNr 16S (Weisburg *et al.*, 1991). L'utilisation de la variation de la séquence de l'ADNr 16S pour un but taxonomique suppose que l'évolution du génome progresse à un taux constant et que les gènes soient hérités de manière stricte d'une génération à une autre sans aucun transfert latéral.

Pour l'étude phylogénétique, les séquences d'ARNr 16S se sont révélées utiles car le gène de l'ARNr 16S est hautement conservé dans les bactéries et que des espèces bactériennes très éloignées peuvent être comparées. Il est facile d'amplifier et de séquencer le gène à l'aide de gènes universels (Stackebrandt *et al.*, 1991). On suppose que l'homologie entre les séquences d'ARNr 16S de différentes bactéries reflète la relation phylogénétique entre ces organismes.

En dehors de l'ADNr 16S, l'utilisation d'autres marqueurs phylogénétiques est nécessaire pour parfois analyser plus finement le degré de parenté entre des groupes de bactéries et définir de nouvelles espèces bactériennes. Des études phylogénétiques récentes portant sur le séquençage d'autres gènes de fonctions conservées appelés gènes de ménage "housekeeping genes" ont été utilisées pour la détection et l'identification des espèces bactériennes et pour établir des relations phylogénétiques entre différents groupes de bactéries et de raffiner les phylogénies construites avec le *rrs* *vue* (Feil *et al.*, 2004 ; Hanage *et al.*,

2005). Ces gènes codent pour des protéines vitales assurant la maintenance du fonctionnement cellulaire (Stackebrandt et 2002 ; Maiden, 2006).

D'autre part, chez les bactéries qui établissent des interactions symbiotiques avec les légumineuses pour fixer l'azote, il est commun d'effectuer des phylogénies avec des séquences des gènes impliqués dans la nodulation (*nod*) (Eardly *et al.*, 1992; Haukka *et al.*, 1998; Laguerre *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2003). et dans la fixation de l'azote (*nif*) (Eardly *et al.*, 1992; Ueda *et al.*, 1995; Haukka *et al.*, 1998; Laguerre *et al.*, 2001), ces gènes peuvent avoir une histoire évolutive indépendante des autres gènes, leur comparaison phylogénétique avec des gènes de base révèle des transferts latéraux entre espèces et genres de *Rhizobium* (Ueda *et al.*, 1995 ; Sullivan *et al.*, 1995; Haukka *et al.*, 1998; Wernegreen et Riley, 1999 ; Laguerre *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 2001; Vinuesa *et al.*, 2005).

La classification résultant de l'analyse des gènes symbiotiques *nodC* et *nifH* reflète la spécificité d'hôte, tandis que la phylogénie basée sur 16S ADNr est indépendante de la plante hôte (Laguerre *et al.*, 2001). les gènes de symbiose ce sont donc des caractères inappropriés pour définir les espèces, mais qui peuvent et doivent être utilisés pour les descriptions de biovars et pour des études de biogéographie de *Rhizobium* (Laguerre *et al.*, 2001; Vinuesa *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2009). Les symbiovars peuvent être partagées par différentes espèces en raison des transferts latéraux de gènes symbiotiques (Rogel *et al.*, 2011).

6.3 Méthodes phylogénétiques

6.3.1 Construction d'arbres phylogénétiques

La phylogénie consiste à comparer des gènes ayant un taux de mutation faible. La similarité des mécanismes moléculaires, suggère l'existence d'un ancêtre commun à tous les organismes. Ceci peut être représenté par un arbre phylogénétique.

Les méthodes de reconstruction phylogénétique nous permettent de générer des arbres phylogénétiques, représentatifs de l'évolution entre les différents taxons , à partir des séquences nucléotidiques ou protéiques d'un marqueur phylogénétique. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées afin de construire cet arbre. Nous citons trois méthodes principales : Distance (phénétique), Maximum de parcimonie et Maximum de Vraisemblance.

6.3.1.1 Méthodes de distance

Ce sont des méthodes rapides de reconstruction d'arbre phylogénétique sans racine. Il s'agit de méthodes arithmétiques basées sur les mesures de distances entre séquences prises deux à deux, c'est à dire le nombre de substitutions de nucléotides ou d'acides aminés entre ces deux séquences (méthodes phénétiques). Les méthodes basées sur la distance utilisent des modèles de substitution de bases. Il existe deux méthodes basées sur la distance :

-L'UPGMA « Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean » est appelée (Méthode des groupes de paires non pondérées avec la moyenne arithmétique) a été proposé par Sokal et Michener (1958), c'est une approche directe de la construction d'un arbre phylogénétique à partir d'une matrice de distances. Cette méthode est la seule où les arbres résultants sont enracinés. Elle suppose un taux de substitution constant au fil du temps et des lignées phylogénétiques (connu sous le nom d'hypothèse de l'horloge moléculaire) (Kurtzman *et al*, 2010).

-NEIGHBOR-JOINING (la jointure voisine) a été proposée par Saitou et Nei (1987). C'est une méthode de construction d'un arbre phylogénétique sans racine, à partir d'un indice d'écart (distance ou dissimilarité entre séquences). Elle est basée sur la recherche d'une paire d'UTOs (unités taxonomiques opérationnelles) qui minimisent la longueur totale des branches de l'arbre et ceci à chaque étape de regroupement (Saitou et Nei, 1987). C'est actuellement la plus utilisée pour reconstruire des phylogénies par méthode de distance.

6.3.1.2 La méthode du maximum de vraisemblance ou « Maximum Likelihood-ML»

Le maximum de vraisemblance a été introduit par Neyman, cependant c'est Felsenstein qui, le premier, a développé un algorithme efficace applicable aux séquences nucléotidiques (Perrière et Brochier Armanet, 2010). c'est une méthode probabiliste, qui permet d'appliquer les différents modèles d'évolution (par exemple le modèle de Kimura qui prend en compte la différence entre transition et transversion) et d'estimer l'ordre des branchements et la longueur des branches en fonction du changement évolutif.

Plusieurs modèles existent pour affiner les reconstructions phylogénétiques et tester plusieurs paramètres (Yang, 1996). cette méthode est la méthode d'estimation la moins affectée par l'erreur d'échantillonnage (Swofford *et al.*, 1996), et donne de meilleurs résultats que les méthodes de distances et de parcimonie, permettant ainsi de comparer facilement les hypothèses. La contrepartie de cela étant bien sûr un temps de calcul bien plus élevé que ces deux méthodes (Strimmer, 1997).

6.3.1.3 Les méthodes de maximum de parcimonie

Ces méthodes ont été initialement développées pour être utilisées sur des données morphologiques (Hennig, 1966). La parcimonie, à la différence des méthodes de distances, considère chaque site individuellement pour l'ensemble des séquences. Elle est basée sur la théorie de rasoir d'Occam, qui spécifie que la meilleure hypothèse pour expliquer un processus est celle qui fait appel au plus petit nombre d'évènements (calculer le nombre minimal de substitutions) (Perrière et Brochier-Armanet, 2010).

Cette méthode est très appréciée car rapide en temps de calcul mais elle a certains inconvénients qui la rendent de moins en moins utilisée. En particulier, le manque de robustesse dans des phylogénies complexes, dans les quelles le MP peut donner des arbres "les plus parcimonieux" équivalents mais avec des topologies différentes, ce qui implique une impossibilité de choisir le meilleur arbre.

Chapitre 11

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique utilisés dans cette étude

Des campagnes de collecte de plantes nodulées de *lupinus angustifolius* ont été menées pendant la période du printemps dans différents sites de la wilaya d' El-Taref. Pour chaque site, des nodules de jeunes plantes ont été récoltés, référencés et conservés au frais dans des tubes de conservation contenant du CaCl₂.

Ces nodules ont servi à l'isolement des bactéries symbiotiques. Trois sites au total situés dans la région d'El Tarf près de trois lacs: le lac "Mellah" ,le lac "Oubeira" et le lac "Tonga" (12 plantes / site) ont été explorés (Figure 8).

Les coordonnées GPS et la caractéristique climatique de chaque site de prélèvement ont été consignés dans le Tableau 2.

Des échantillons de sols ont été systématiquement prélevés. Ces échantillons ont permis de déterminer la texture et le niveau de fertilité de chaque sol. La texture a été déterminée par une analyse granulométrique. Le niveau de fertilité a été déterminé par des analyses chimiques qui ont porté essentiellement sur le pH, la teneur du sol en matière organique ainsi que la teneur en azote (N) et le carbone organique, Ces analyses ont été effectuées dans le Laboratoire d'analyse physico -chimiques des matériaux .Ain M'lila-Oum Bouaghi-Algérie. (Les protocoles sont détaillés en annexe I)

Tableau 2: Coordonnées GPS des sites de collecte et leurs caractéristiques climatiques.

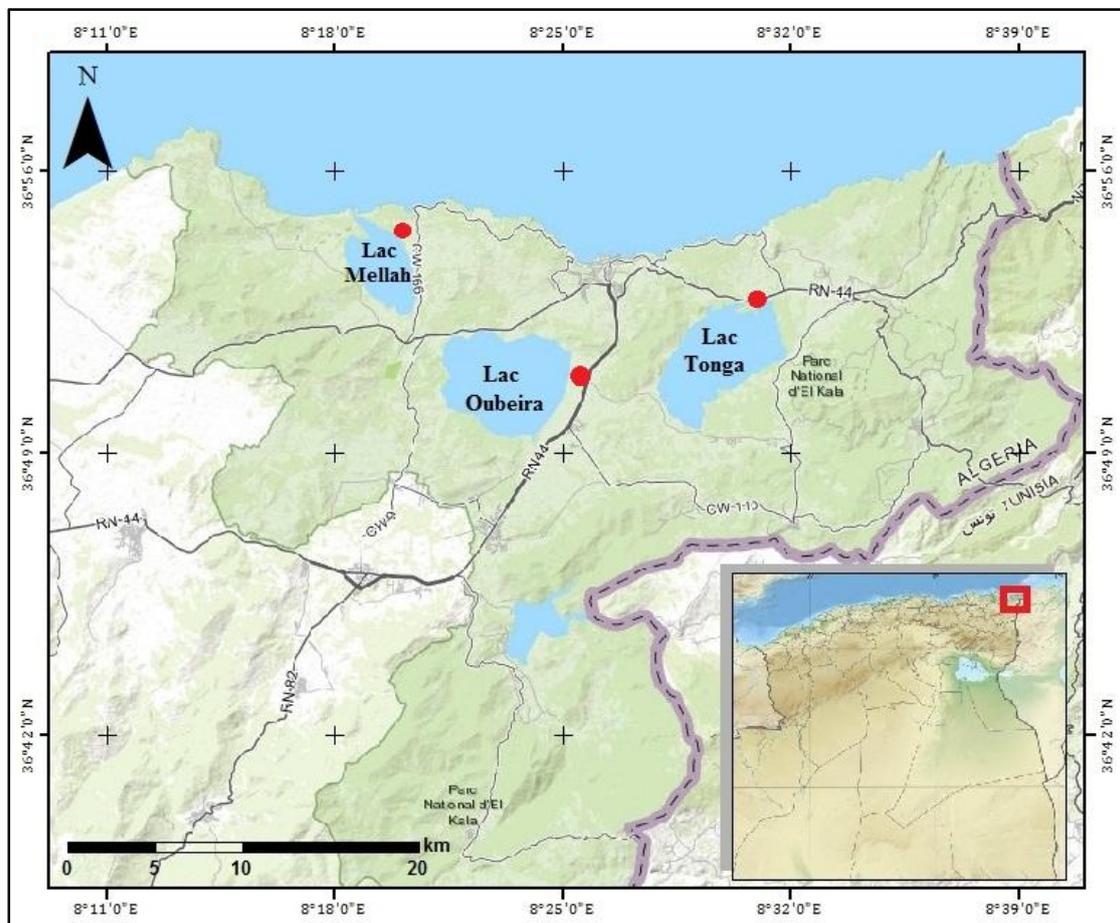
Sites	Coordonnées	Climat
Lac Mellah	36° 54'06.4 "N 8° 20'28.9" E	Humide
Lac Oubeïra	36° 50'21.4 "N 8° 25'38.8" E	Humide
Lac Tonga	36° 52'52.7 "N 8° 31'24.4" E	Humide

Les souches bactériennes étudiées ont été isolées à partir de nodules racinaires de *L. angustifolius* d'Algérie . pour leur nomenclature les isolats ont été identifiés par l'initiale de la plante [La], de laquelle ils ont été isolés, représentant le *Lupinus angustifolius* , suivi respectivement du site d'échantillonnage [M] , [O] ou [T] pour les isolats issus des trois lacs Mellah, Oubeira et Tonga , et enfin par le chiffre désignant le numéro de l'isolat.

Au cours de cette étude, différentes souches type représentant différentes espèces de *Bradyrhizobium* ont été utilisées comme souches de référence Tableau 3.

Tableau 3: Souches de références utilisées dans cette étude

Espèce	Souche	Plante hôte
<i>B. canariense</i>	BTA-1 ^T	<i>Chamaecytisus proliferus</i>
<i>B. elkanii</i>	USDA76 ^T	<i>Glycine max</i>
<i>B. japonicum</i>	USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>
<i>B. cytisi</i>	CTAW11 ^T	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. rifense</i>	CTAW71 ^T	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. diazoefficiens</i>	USDA 110 ^T	<i>Glycine max</i>

**Figure 8 :** Localisation géographique des sites d'échantillonnage

1.1 Isolement des bactéries à partir des nodules

Une sélection de nodules effectifs a été réalisée sur les racines des plantes collectées, ces nodules ont été lavés à l'eau pour éliminer les restes du sol.

A partir de ces nodules nous avons isolé et purifié des souches bactériennes présumées appartenir aux rhizobia . L'isolement a été fait selon le protocole de Vincent, 1970 ; Somasegaram et Hoben, 1985.

En effet, sous une hotte à flux laminaire, les nodosités ont été stérilisés en surface en les immergées dans de l'éthanol à 95% pendant 10 seconde, puis transférées immédiatement dans une solution de chlorure de mercure (HgCl_2) acidifié à 0.1% (w/v) (Annexe II) pendant 3 min. puis ils ont été rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les résidus du mercure. Postérieurement, ils ont été broyés indépendamment à l'aide d'une pince stérile. Des ensemencements à partir du broyat ont été effectués sur des boîtes de pétri contenant le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) additionné du rouge congo (Vincent, 1970), (Annexe II).

Les boîtes renversées ont été incubées dans l'étuve à 30°C pendant 12 jours favorisant ainsi la croissance des bactéries extraites des nodules. A partir des colonies formées par ces bactéries dans les boîtes, une série de repiquages a été effectuée régulièrement sur le milieu YMA (Annexe II). suivant la méthode des stries d'épuisement jusqu'à l'obtention de cultures pures exemptes de toutes contaminations.

Pour vérifier la technique de stérilisation utilisée et la stérilité externe du nodule un test de stérilisation est nécessaire, Prendre le nodule stérile et l'ensemencer en le faisant passer sur le milieu YMA+Rouge Congo , puis l'incuber à 30°C pendant 24 heures.

1.2 Maintien et conservation des souches

Le maintien des souches pour une utilisation courante est mené dans des boîtes de pétri contenant le milieu YMA conservées à 4°C. Un rappel de réensemencement doit être effectué tous les trois mois. pour une conservation à long terme, deux méthodes ont été utilisées:

La première méthode est la conservation sur YMA additionné de 3 g/l de CaCO_3 comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes à essai en 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. Après incubation à 30°C pendant 8 jours, les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

La deuxième méthode est la conservation par congélation à -20°C , en utilisant une solution de YMB (Yeast Mannitol Broth) (Annexe II) additionnée de 50% (v/v) de glycérol stérile (comme agent cryoprotecteur) distribuée dans des tubes Eppendorf . Des suspensions cellulaires ont été préparées dans le bouillon YMB et incubées à 30°C pendant 08 jours, puis mise en conservation dans des tubes Eppendorf (500 μl de la suspension bactérienne +500 μl du glycérol stérile). Chacune des souches a été préservée en trois tubes, pour une longue durée.

1.3 Authentification des isolats

La capacité d'induire la formation de nodosités sur la racine de la légumineuse hôte est un critère de base dans la caractérisation des rhizobia. Pour cela chaqu'un de nos isolats a été testé pour sa capacité à noduler la plante hôte *L.angustifolius*.

1.3.1 Stérilisation et germination des graines

Les graines de *Lupinus angustifolius* ont été stérilisées en surface avec de l'éthanol (95%) pendant 10 seconde, puis dans de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) pendant 3 mn, elles ont ensuite été lavées jusqu'a 10 fois avec de l'eau distillée stérile, et laissées à gonfler pendant 1 heures dans l'eau du dernier lavage. Les graines ont été mises à germer à l'obscurité dans des boites de pétri contenant de l'eau gélosée stérile à 1% (p/v) à 30°C durant 2 à 4 jours.

1.3.2 Inoculation des plantules

La culture des graines a été réalisée dans des flacons en verre (250 ml), les graines germées ont été transférées dans les flacons remplis d'une solution nutritive de Fahraeus (Vincent, 1970) (Annexe II) additionnée de CaCO_3 à 1% et fermés par des papier aluminium sous forme de bouchons perforés par deux trous, l'un par lequel on introduit la radicule de la graine germée et l'autre permettant l'introduction de l'inoculum. La suspension bactérienne a été apportée à raison de 1 ml ($\sim 10^8$ cellules ml^{-1}).

Les plantes ont été cultivées en chambre de culture (température ambiante, avec une photopériode de lumière/obscurité de 16/8 h). Trois répétitions ont été utilisées pour chaque souche et un traitement négatif sans inoculation en tant que témoin négatif .Le développement des nodules a été suivi au cours des 4 premières semaines après inoculation.

2. Caractérisation phénotypique

Les différents tests phénotypiques ont été réalisés sur l'ensemble des souches à caractériser en comparaison avec les différentes souches de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium*.

2.1 Caractérisation morphologique

La morphologie des colonies formées a été déterminée sur l'ensemble des souches isolées de *Lupinus angustifolius*. une analyse visuelle de la morphologie des colonies a été faite. les caractéristiques de la croissance bactérienne ont été observées : Aspect, forme, couleur, diamètre, etc.

2.2 Caractérisation cellulaire

La morphologie cellulaire a été observée au microscope optique par les deux technique :

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram permet de vérifier la pureté de la culture et de classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif.

- **Observation à l'état frais**

Elle permet de visualiser sous microscope la forme et la mobilité des bactéries. Cet examen permet aussi d'observer des granules de polyhydroxybutyrate (PHB); polymère dérivant de polyesters produit par les microorganismes en réponse à un stress donné à savoir une limitation nutritionnelle.

2.3 Vitesse de croissance : Test du bleu de bromothymol (BTB)

La vitesse de croissance des isolats se traduit par la capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YMA contenant l'indicateur coloré Bromothymol bleu (BTB) (Annexe II). Les bactéries à croissance lente montrent une réaction alcaline dans ce milieu et la couleur vire vers le bleu. Cependant les bactéries à croissance rapide donnent une réaction acide modifiant la couleur verte en jaune (Somasegaran et Hoben, 1994). Les boîtes inoculées ont été mises en incubation à 30°C pendant 08 jours.

2.4 Détermination du temps de génération

La croissance des isolats a été suivie par une mesure périodique de la densité optique à 630 nm en utilisant le spectrophotomètre de lumière U.V visible modèle UV- 1200. Les isolats ont été cultivés sur le bouillon YMB jusqu'à une densité optique (DO) voisine de 1.

Ces précultures ont été utilisées pour inoculer des erlenmeyers contenant 100 ml de milieu de culture YMB liquide de façon à obtenir une (DO) initiale voisine de 0.05.

Les cultures ont été incubées à 30°C dans un agitateur rotatif CERTOMAT BS-T (Sartorius, Allemagne) programmé à 150 t/min et à l'obscurité . la densité optique (DO) a été évaluée à t_0 après l'inoculation puis toutes les 24h et cela pendant 10 jours. Le temps de dédoublement des isolats a été calculé à partir de la phase exponentielle de la culture.

2.5 Tests physiologiques

La population bactérienne peut être influencée par plusieurs facteurs environnementaux comme le stress osmotique, stress acide et choc thermique. La tolérance de nos isolats à ces différents facteurs à été évaluée par trois tests différents en présence des souches de référence.

2.5.1 Effet du pH

Les isolats sont cultivés sur le milieu YMB ajusté à différents pH 4, 5, 6.8 , 7, 8 et 9 La croissance des souches est estimée par la mesure de la (DO) à 630nm après 08 jours d'incubation à 30°C pour chaque souche trois répétition ont été effectuées. Les résultats sont comparés au témoin ajusté à pH 6.8

2.5.2 Effet de la salinité

Les isolats sont cultivés sur le milieu YMB à différentes concentrations de NaCl 0.25% (43mM), 0.5% (85.5mM), 1% (171mM), 1.5% (256.5mM) et 2% (342mM). La croissance bactérienne est estimée par la mesure de la densité optique à 630nm après 08 jours d'incubation à 30°C.

2.5.3 Effet de la température

Les isolats sont cultivés sur le milieu YMB et incubés à différentes températures 4, 20, 26, 28, 30, 32, 34 et 37°C pendant 08 jours ,La mesure des densités optique (DO) de chaque culture a été faite à une longueur d'onde de 630 nm .

2.6 Tests nutritionnels

2.6.1 Assimilation de la source de carbone

L'assimilation des différentes sources de carbone a été évaluée en utilisant le milieu liquide YMB où l'extrait de levure est remplacé par 0.1% de NH_4Cl comme source d'azote (Somasegaram et Hoben, 1985) et le mannitol est remplacé par l'un des sucres présentés dans le Tableau 4 à raison de 1% pour chaque sucre. Les milieux préparés ont été servis dans des tubes à raison de 5 ml/tube puis inoculés par les microorganismes préalablement mis en suspension. Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 08 jours. La croissance des souches est évaluée par la mesure de la densité optique (DO) à 630 nm.

2.6.2 Utilisation de la source d'azote

Pour ce test les isolats sont cultivés sur le milieu liquide YMB modifié où l'extrait de levure est remplacé par l'un des acides aminés présentés dans le Tableau 4 à raison de 1% pour chaque acide aminé. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 08 jours suivis par la mesure de la densité optique (DO) à 630nm.

Tableau 4 : Composés utilisés comme sources de carbone et d'azote

Source de Carbone		Source d'azote	
D-mannose	D-ribose	Glycine	Acide aspartique
D-Fructose	D-cellobiose	Proline	L- acide glutamique
D-galactose	L-arabinose	Cystéine	
D-raffinose	L-rhamanose	Lysine	
D xylose	Saccharose	Tryptophane	
D-glucose	Lactose		
Mannitol			

2.7 Tests biochimiques

Le but est de rechercher la présence de diverses enzymes synthétisées par nos bactéries isolées et les souches de références, qui jouent un rôle dans la symbiose tels que la cellulase, et d'autre enzymes spécifiques comme la nitrate réductase, La polygalacturonase et l'uréase.

2.7.1 Réduction des nitrates

Les bactéries sont mises en culture sur milieu liquide Tryptone-Yeast (TY) (Beringer, 1974) (Annexe II) contenant 0,1% de KNO₃ (p/v) pendant 8 jours à 30 °C. Après incubation, on ajoute dans chaque tube le réactif nitrate réductase 1 (Acide sulfanilique à 3% préparé dans l'acide acétique 5XM) et le réactif nitrate réductase 2 (anaphtylamine à 0,5% préparé dans l'acide acétique 5XM). L'apparition d'une coloration rouge indique que les nitrates sont réduits en nitrites. Un résultat négatif nécessite l'addition de la poudre de zinc pour vérifier la présence du nitrate dans le milieu ou non, après quelques minutes, l'apparition d'une tinte rouge signifie la présence des ions nitrate dans le milieu donc le résultat est négatif. Si on n'observe pas une coloration rouge l'absence des ions nitrate dans le milieu indique un résultat positif (Guiraud, 1998).

2.7.2 Hydrolyse de l'urée

L'urée est un composé organique qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent décomposer l'urée en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu de culture (Delarras, 2007 ; Lanotte et *al.*, 2007). Les isolats sont cultivés sur milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 % de rouge de phénol comme indicateur de pH.

Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20min puis refroidi, auquel on rajoute la solution d'urée stérilisée par filtration. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 08 jours. Les résultats sont évalués par un changement de la coloration du milieu. Une coloration rouge indigo indique l'hydrolyse de l'urée et donc l'alcalinisation du milieu alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.7.3 Activité cellulolytique

L'enzyme carboxy-méthyl-cellulase appelée aussi -1,4-D-glucanase ou CMCase est une enzyme qui joue un rôle dans la nodulation et la phase initiale du processus d'infection.

La détermination de la présence d'une activité endoglucanasique est réalisée selon la méthode modifiée du rouge Congo de (Struffi et *al.*, 1998) , composé capable de se lier de manière stable à une molécule non dégradable de Carboxy-méthyl-cellulose (CMC). Les isolats sontensemencées sur YMA contenant 0.25% de CMC. Après incubation à 30°C pendant 08 jours, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn à 30°C.

La solution de rouge congo est remplacée par une solution de NaCl 1 M à une température ambiante pendant 30 min. Un halo jaune-orangé entoure les colonies qui montrent une activité d'une endoglucanase indique la présence d'une cellulase.

2.7.4 Activité pectinolytique

Le milieu de culture utilisé est YMA modifié où le mannitol est remplacé par 0.1% d'inositol et additionné de 0.2% (p/v) de pectine (Na-polygalacturonate). L'incubation sera de 7 jours à 30°C. Après incubation, les boîtes sont rincées délicatement avec l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge de ruthénium 0.05% et laisser agir pendant 30 minutes. Un halo décoloré autour des colonies indique une activité polygalacturonasique (Struffi et *al.*, 1998).

3. Caractérisation génotypique et phylogénétique des isolats

Afin d'évaluer le degré de la diversité génomique des différents isolats obtenus à partir de nodules de *L. angustifolius*, différentes méthodes moléculaire ont été utilisées.

3.1 Isolement de l'ADN bactérien

L'ADN génomique total a été isolé à partir de chaque isolat en utilisant la méthode de la lyse alcaline établie par Rivas et *al.* 2001 à partir de cellules cultivées pendant 08 jours dans le milieu YMB à 30°C, une centrifugation a été effectuée afin de récupérer toutes les cellules bactérienne (culot).

L'ADN génomique a été mise en extrait avec 200 µl de solution de NaOH (0.05M) puis maintenue dans un thermobloc à 100 ° C pendant 4 min, suivie par l'addition de 200 µl de Tris-HCl 0.1M (pH 8,0) au mélange après une centrifugation à 13 000 tr / min pendant 3 min. Le surnageant contenant l'ADN total a été récupéré et placé dans de nouveaux tubes Eppendorf stériles et conservés à -20 ° C jusqu'à ce qu'il soit nécessaire.

3.2 Quantification de l'ADN

La quantification est déterminée en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop, model ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La relation DO_{260}/DO_{280} à été employée pour évaluer sa qualité.

3.3 Amplification de l'ADN

L'amplification de l'ADN extrait de chacun des isolats étudiés a été effectuée par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les réactifs et les concentrations du cocktail réactionnel varient en fonction du but de l'amplification notamment pour l'obtention des profils de bandes d'ADN (RAPD-PCR) ou le séquençage d'un fragment de gène Tableaux 5 et 6.

3.4 Analyse de la biodiversité des isolats selon les profils de RAPD

Parmi le grand nombre de techniques moléculaires, décrites actuellement pour l'étude de la diversité génétique bactérienne, il existe l'analyse de profils de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). est une technique d'amplification par PCR des séquences aléatoires dispersées sur tout l'ADN génomique . Le principe de la méthode est d'effectuer des réactions de PCR avec une seule amorce M13 dont la séquence est courte (9 à 10 pb) et choisie au hasard. Cette méthode présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques d'amplification par PCR dont principalement la facilité, la rapidité, ne nécessitent pas une quantité et une qualité d'ADN élevées (Sikora *et al.*, 1997), Les applications de cette méthode en rhizobiologie concernent plutôt les bradyrhizobia (Nuntagij *et al.*, 1997 ; Saeki *et al.*, 2000 ; Saleena *et al.*, 2001 ; Sikora *et al.*, 2002). Par conséquent, cette technique a fait l'objet de choix pour cette étude.

Tableau 5: Réactifs utilisés dans la PCR pour l'analyse des profils d'ADN(RAPD-PCR).

Réactifs (concentration initiale)	Volume par réaction (-l)
Eau miliQ stérile	19.05
Tampon	2,50
dNTPs	0,50
Amorce M13 (20 µM)	1.25
-	-
<i>Taq polymérase</i>	0,20
ADN (80 ng/µl)	1,50
Volume total	25,00

Tableau 6:Réactifs utilisé dans la PCR pour l'amplification des gènes.

Réactifs (concentration initiale)	Volume par réaction (-l)
Eau miliQ stérile	18.30
Tampon	2,50
dNTPs	0.50
Amorce (20 µM)	1,00
Amorce (20 µM)	1,00
<i>Taq polymérase</i>	0,20
ADN (80 ng/µl)	1,50
Volume total	25,00

3.5 Amplification par PCR des gènes taxonomique et symbiotiques des isolats

Des séquences d'ADN pour le gène ribosomique 16S, et les deux gènes de ménages *glnII* et *recA*, et le gène symbiotique *nodC* ont été utilisés dans ce travail pour la caractérisation moléculaire des souches.

L'amplification des séquences répétitives RAPD, du gène ribosomique 16S, des gènes de ménages *glnII*, *recA*, et le gène symbiotique *nodC* . a été réalisée en utilisant les amorces signalées dans le Tableau 7 ci-dessous.

Les conditions de température et les durées de chaque phase des cycles de PCR ont été établies selon chaque méthode en utilisant le thermocycleur de type GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Etats-Unis) Tableau 8.

Tableau 7: Amorces utilisées pour l'amplification des séquences répétitives RAPD, les gènes ARNr 16S, *glnII*, *recA* et *nodC* par PCR.

Profil	Amorce		Séquence	Référence
RAPD	Amorce	M13	5'GAGGGTGGCGGTTCT3'	(Rivas et al., 2006)
	Amorce	/	/	

Gène	Amorces		Séquences	Référence
ARNr 16S	Amorce F	27F	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'	(Rivas et al., 2007)
	Amorce R	1522R	5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3'	
	Amorce R	800R	5'TACCAGGGTATCTATCC3'	

<i>glnII</i>	Amorce F	<i>glnII</i> 12F	5'YAAGCTCGAGTACATYTTGGCT3'	(Vinuesa et al., 2005b)
	Amorce R	<i>glnII</i> 689R	3'TGCATGCCSGAGCCGTTCCA5'	

<i>recA</i>	Amorce F	<i>recA</i> 41F	5'TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG3'	(Vinuesa et al., 2005b)
	Amorce R	<i>recA</i> 640R	3'ACATSACRCCGATCTTCATGC5'	

<i>nodC</i>	Amorce F	<i>nodC</i> F	5'AYGTHGTYGAYGACGGTTC3'	(Laguerre et al., 2001)
	Amorce R	<i>nodC</i> I	3'CGYGACAGCCANTCKCTATTG5'	

Tableau 8 : Programmes d'amplification de l'ADN

Méthode		Obtention de profils	Séquençage de gène		
		RAPD-PCR	16S	<i>recA</i> , <i>glnII</i>	<i>nodC</i>
Dénaturation initiale		95°C 2'	95°C 2'	95°C 2'	95°C 2'
35 cycles	Dénaturation	94°C 1'	95°C 45"	94°C 1'	95°C 30"
	Hybridation	45°C 1'	55°C 45"	45°C 1'	55°C 30"
	Elongation	72°C 2'	72°C 2'	72°C 2'	72°C 45"
Extension finale		72°C 7'	72°C 5'	72°C 7'	72°C 5'
4°C		+			

3.6 Electrophorèse de l'ADN

L'électrophorèse en gel d'agarose permet le contrôle des fragments obtenus après amplification de l'ADN par PCR. Le pourcentage d'agarose a été adapté en fonction du but de chaque électrophorèse, 1.5% a été utilisé pour vérifier les fragments d'ADN destinés à être séquencés et pour analyser les profils d'ADN. Les gels d'agarose ont été préparés avec le tampon d'électrophorèse TBE (Tris-Borate-EDTA) à pH 8.5.

Des aliquotes de chaque produit amplifié par PCR ont été mélangés avec du tampon de charge à environ le 1/5 du volume.

Les marqueurs de poids moléculaire ont été utilisés lors de chaque migration électrophorétique afin d'estimer la taille des fragments amplifiés. Le marqueur (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) a été utilisé et déposé dans les puits situés au début, au milieu et à la fin du gel dans le cas d'électrophorèse des profils d'ADN ; cette répartition est obligatoire pour l'analyse comparative des profils électrophorétiques en utilisant le logiciel InfoQuest™ MFP Software.

Le marqueur a été déposé au niveau du premier puits du gel pour les fragments destinés au séquençage. Les produits PCR de l'ADNr 16S, du *nodC* et des gènes de ménage (*recA* , *glnII*) sont révélés par la présence de bandes uniques. Elles correspondent aux poids moléculaires d'environ 1500 pb, 700 pb, 500 pb et 600 pb respectivement .

L'électrophorèse a été menée pendant deux heures en appliquant un champ électrique de 70V et en utilisant le générateur de courant Power PAC 300 (Bio-Rad, Etats-Unis).

A la fin de chaque migration, la révélation des gels se fait sous UV grâce au BET (Bromure d'éthidium) additionné au préalable au gel d'agarose qui fluoresce sous UV, en utilisant l'équipement Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Etats-Unis). puis le gel est alors photographié.

3.7 Purification des fragments d'ADN amplifiés

Les échantillons pour les quels l'amplification par PCR a été satisfaisante (ADNr 16S, les gènes de ménages (*recA*, *glnII*) et aussi le gène symbiotique *nodC*), par leur spécificité et leur rendement, sont purifiés à l'aide du kit de purification "GeneJET PCR purification Kit" selon les instructions du fabricant. Dans certains cas la purification est réalisée à partir du gel d'électrophorèse par une purification de bande avec le kit de purification "GeneJET Gel Extraction Kit"

Cette purification permet d'éliminer les sels, les amorces, les enzymes et les dNTPs non incorporés. Le principe de ce kit repose sur le fait que dans un milieu à forte concentration saline et à un pH optimum (pH 7,5), l'ADN se fixe à une membrane de silice par liaison hydrogène. Les contaminants sont ensuite éliminés par un lavage alcoolique. Enfin, l'ADN adsorbé à la membrane est dilué par de l'eau milliQ.

3.8 Séquençage des produits d'amplification

Les isolats représentatifs des différents groupes obtenus à partir de RAPD-PCR ont été choisis pour le séquençage. Le milieu réactionnel destiné au séquençage a été préparé dans un microtube de 0.2 ml contenant l'ADN d'intérêt purifié et une seule amorce (Forward ou Reverse). La concentration de l'ADN ainsi que le choix de l'amorce dépendent respectivement de la taille et de la nature du gène à séquencer Tableau 9.

Le séquençage a été effectué par le service de séquençage de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC (Grenade, Espagne) en utilisant le système ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Etats-Unis) selon les instructions du fabricant. Les séquences ont été analysées dans un séquenceur automatique ABI PRISM model 3130 xl (Applied Biosystems, Etats-Unis).

Tableau 9: Quantités d'ADN et d'amorces requises pour le séquençage

Produit de PCR	Quantité d'ADN	Quantité d'amorce
100-200 pb	2-6ng	6,4 pmol
200-500 pb	6-20ng	
500-1000 pb	10-40 ng	
1000-2000 pb	20-80 ng	
>2000 pb	80-200 ng	

3.9 Analyse des profils électrophorétiques

L'analyse comparative des profils électrophorétiques de la RAPD a été menée à l'aide du logiciel InfoQuest™ MFP Software.

D'abord, les images du gel ont été sauvegardées sous forme du format TIFF. Celles-ci ont été converties et normalisées avec le marqueur de poids moléculaire avant d'être analysées avec le logiciel. La méthode de soustraction de fond et le coefficient de Dice ont été appliqués pour estimer le pourcentage de similitude entre les souches étudiées. Les matrices de similarité ont servi de base pour la construction d'un dendrogramme en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group of Mean Averages, Moyennes non Pondérées des Groupes Associés).

3.10 Analyse phylogénétique des séquences obtenues

Les séquences obtenues pour chaque région étudiée sont présentées sous forme d'électrophorègrammes où chaque pic de couleur correspond à une base, et à partir des quels la séquence est établie. Les séquences ont été analysées avec le logiciel d'analyse Chromas, corrigées, inversées et complémentées afin d'obtenir une séquence codante dans le sens 5' - 3'.

Les différents fragments d'une même séquence ont été assemblés par le programme Geneious Pro 5.6.7.software (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). Les séquences finales ont été analysées par le programme BLASTn NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), permettant de comparer chacune des séquences obtenues avec celles disponibles dans la banque de données GenBank qui donne une liste de celles qui présentent une grande similitude.

Les alignements des séquences obtenus à partir des isolats étudiés ainsi que les espèces bactériennes qui leur sont proches phylogénétiquement ont été effectués en utilisant le logiciel Clustal W Multiple Alignment (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998) .

Les analyses phylogénétiques ont été établies par le logiciel MEGA 7.0 (Kumar *et al.* 2016). Les distances ont été calculées selon Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980).

Les arbres phylogénétiques ont été élaborés selon la méthode de Neighbor joining (Saitou et Nei, 1987). un "Bootstrap" de 1000 réplifications a été utilisé pour estimer la probabilité de l'existence des différents nœuds les plus souvent rencontrés parmi tous les arbres générés.

Chapitre 111

Résultats et Discussions

1. Echantillonnage

Des nodules ont été prélevés sur des racines de plantes saines du *Lupinus angustifolius* (12 plantes / emplacement) poussant à l'état sauvage dans la région d'El-Taref. Le sol représentant chaque site de collecte de nodules a été prélevé afin d'y subir une série de tests pour déterminer sa texture et son niveau de fertilité.

1.1 Morphologie et répartition des nodules

Dans le cas de jeunes plantes, Le nombre de nodules qui se répartissent sur un système racinaire mesurant environ 20 cm, varie selon les plantules de 1 jusqu'à environ 20 nodules par plante. Les nodules jeunes présentent une forme sphérique et une couleur blanchâtre, ensuite évoluent dans le temps avec des contours irréguliers et prennent la couleur du sable avec une couleur brunâtre. Les nodules sénescents changent de couleur et deviennent totalement brun et complètement desséchés.

Les nodules prélevés mesurent le plus souvent entre 1 à 5 mm , et présentent des formes diverses . Les nodules qui se rattachent à la racine sont soit unique avec un seul point de croissance , soit multilobés avec une vascularisation qui se ramifie dans tous les lobes. Généralement les nodules se développent en grappes, soit à partir d'une seule ou multi-origine et parfois des nodules individuels encerclent toute la racine (Figure 9).

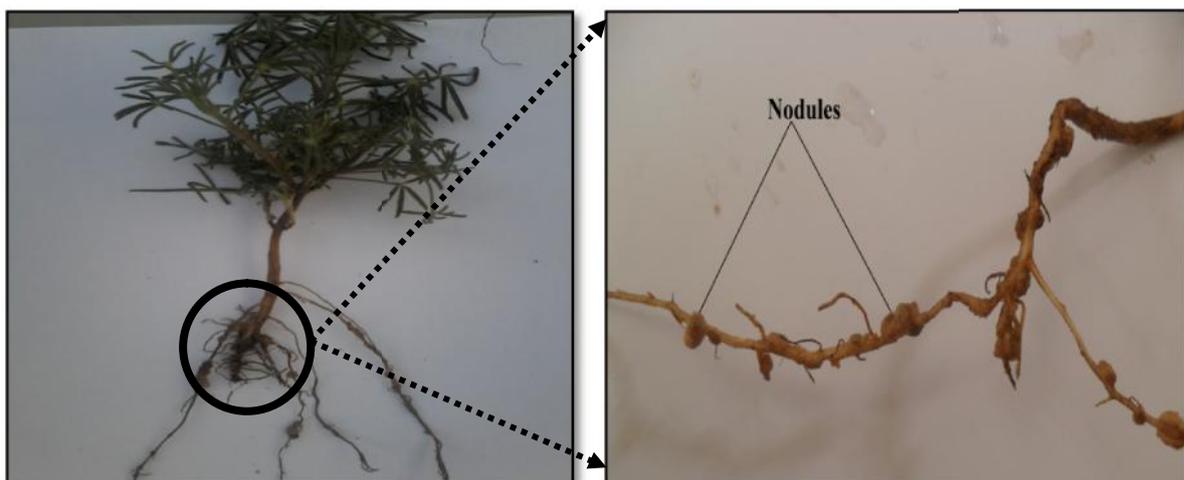


Figure 9: Racines nodulées de *Lupinus angustifolius*

2. Analyse pédologique des échantillons de sols

L'étude des propriétés des sols représente une étape très importante dans la détermination des caractéristiques édaphiques relatives à chaque site de collecte. La texture du sol a été déterminée par l'analyse granulométrique. Le niveau de fertilité a été déterminé par des analyses chimiques qui ont porté essentiellement sur le pH, la teneur du sol en matière organique ainsi que la teneur en azote, et en carbone. Les résultats des différentes analyses physico-chimiques des différents échantillons de sols ainsi que les Coordonnées GPS des sites sont présentés dans le Tableau 10. Les différents protocoles utilisés dans cette étude sont mentionnés en (Annexe I).

Tableau 10: Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sols collectés

Sites	Lac Mellah	Lac Oubeira	Lac Tonga
Coordonnées	36 ° 54'06.4 "N 8 ° 20'28.9" E	36°50'21.4 "N 8 ° 25'38.8" E	36 ° 52'52.7 "N 8 ° 31'24.4" E
Climat	Humide	Humide	Humide
Texture	Limono-sableux 87% Sable 3% Limon 10 % Argile	sableux 95% Sable 1% Limon 4 % Argile	Argilo-limoneux 10 % Sable 45 % Limon 45 % Argile
Humidité (%)	11.45	12.38	15.34
pH_{eau}	6.58	6.81	5.52
pH_{KCl}	6.23	6.44	5.03
Matière organique (%)	2.58	2.10	1.87
Carbone (%)	1.29	0.87	0.75
Azote (%)	0.14	0.08	0.09

2.1 Texture

L'analyse granulométrique décrit les proportions relatives des diverses tailles des particules solides du sol (argiles, limons et sables), permet d'apprécier la perméabilité, la rétention en eau, l'aération et la capacité d'échange cationique (Baize, 1988).

Les résultats de l'analyse granulométrique Tableau 10 montrent que les textures des trois sols présentent une texture limono-sableuse pour le 1^{er} site, pour le 2^{ème} site la texture est sableuse et le dernier site présente une texture argilo-limoneuse.

Ces sols ont une texture équilibrée, De plus, avec des teneurs élevées en sables, le sol présente une bonne perméabilité et une aération suffisante.

2.2 Le pH

Le pH (potentiel hydrogène) est la mesure de la concentration des ions hydrogène (H⁺) dans le sol, C'est le premier indicateur de toute évolution physico-chimique des sols. Il s'agit d'un paramètre relativement facile à mesurer.

Le pH du sol a été mesurée de deux façons différentes : le pH à eau et le pH au KCL. Le pH à eau a été déterminé à partir de la suspension des sols étudiés qui varie entre 5.52 et 6.81, Le pH des sols analysés est légèrement acide proche de la neutralité favorable pour la survie des populations de rhizobium dans le sol. Cependant, le pH au KCL indique des valeurs qui sont généralement inférieures à celle du pH à eau. La variation entre les deux mesures du pH ne dépasse pas généralement 1 unité.

Les conditions de l'environnement telles que l'acidité du sol, salinité, teneur excessive en azote et en micro-éléments sont les facteurs les plus déterminants qui affectent le processus de la symbiose dans le sol. Ainsi, la nodulation se trouve largement affectée dans les sols très acides (Zahran *et al.*, 1999).

2.3 Humidité (H)

L'humidité du sol (ou eau contenue dans le sol) détermine de façon essentielle la variation des caractéristiques de différents matériaux ou sols.

Les sols étudiés possèdent une humidité exprimée en % et varie entre 11.45 et 15.34 Les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

L'humidité joue un rôle important dans le maintien de la vie sur la Terre, sa première "utilisation" est de permettre la croissance de la végétation. Elle conditionne également la mise en place du peuplement végétal (germination des semences, émergence, implantation

du système racinaire, etc.). Son évaluation est donc importante en hydrologie et en agronomie, et constitue un paramètre d'alerte pour la désertification.

2.4 Les teneurs en carbone et en matière organique

La matière organique est une source importante d'éléments nutritifs pour les plantes et la connaissance de sa teneur totale dans le sol renseigne sur sa potentialité fertilisante. elle a également un rôle important dans la « fabrication » des agrégats. Autrement dit sur l'élaboration de la structure du sol instable.

Selon la classification de (Baize, 1988) qui montre les valeurs limites de la matière organique, Il a été considéré que les valeurs inférieures à 1.5% en matière organique correspondent à un sol pauvre. Une valeur intermédiaire a été déterminée entre 1.5% et 3.5%. Une valeur oscillante entre 3.6% et 6% a été considérée élevée . Les sols utilisés lors de cette étude est moyennement pauvre en matière organique car le pourcentage varie de 1% à 2%.

Les spécialistes s'entendent pour dire qu'un taux de 1,5 % est la limite critique théorique, au-dessous de laquelle la fertilité diminue rapidement. Il est souvent souhaitable de viser à maintenir un taux minimal de 2,5 % en général et même de 3,5 à 4 % dans les sols lourds (Doucet, 2006).

2.5 L'azote

L'azote est l'élément le plus variable et le plus déficient dans le sol. Sa teneur dépend du pourcentage de la matière organique, des amendements d'engrais mais également des espèces bactériennes fixatrices d'azote. La capacité de fixation d'azote par les légumineuses est influencée par la présence d'azote minéral dans le sol. Généralement, la présence d'une faible quantité de nitrate dans le sol favorise le processus de nodulation et par conséquent augmente la capacité fixatrice d'azote atmosphérique. Par contre une concentration élevée de nitrate empêche la nodulation (Eaglesham *et al.*, 1983; Huss-Danell, 1997; Wall *et al.*, 2000). Les résultats de l'azote mesuré au niveau des sols des différents sites ont confirmé sa faible teneur.

En général, d'après les résultats obtenus de l'analyse physico-chimique, les sols prospectés sont assez riches en nutriments, favorisant ainsi un bon développement végétal et en même temps la présence d'un nombre plus important de microorganismes.

3. Isolement des *Rhizobia nodulant lupinus angustifolius*

A partir des nodules frais de *L.angustifolius* ont été isolés et sélectionnés des isolats présentant morphologiquement différentes colonies sur boîtes de pétri contenant le milieu YMA. De cette manière un total de 80 isolats a été choisi. Le nombre et les noms des isolats obtenus à partir de chaque site sont illustrés dans le Tableau 11.

Tableau 11: Le nombre et la nomenclature des différents isolats isolés de *L.angustifolius*.

Sites	Nombre d'isolats	Nomenclatures des isolats
Lac Mellah	30	LaM
Lac Tonga	25	LaT
Lac oubiera	25	LaO
	Total	80

3.1 Test de nodulation

La capacité des bactéries d'infecter les racines de légumineuses et de former des nodules s'appelle "l'infectivité", alors que le terme "efficience" donne une indication de la capacité des plantes nodulées à fixer l'azote (Beck et coll., 1993).

Dans notre étude, le test de nodulation a été réalisé sur la plante hôte *L.angustifolius* pour évaluer la capacité de nos isolats de former des nodules sur les racines de leur plante hôte sous des conditions bactériologiques contrôlées.

Après une période de culture, on trouve que parmi les 80 isolats testés seulement 64 isolats ont répondu positivement au test de nodulation après 6 - 8 semaines par la formation de nodules roses-rouges. Cette couleur des nodules est une indication de l'activité du nodule, expliquée par la présence de la leghémoglobine, hémoprotéine fixatrice de dioxygène nécessaire pour la fixation d'azote.

4. Caractérisation phénotypique

La caractérisation phénotypique des différentes souches nodulant le lupin nous permettra d'une part de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches et d'autre part d'exploiter ces variations pour la sélection de candidats pouvant maintenir une capacité supérieure de fixation d'azote sous les variations des facteurs du milieu.

Les différents tests phénotypiques ont été réalisés sur les 17 souches représentatives appartenant aux différents groupes RAPD-PCR Tableau 12, en comparaison avec les différentes souches de référence appartenant au genre *Bradyrhizobium*.

4.1 Caractérisation morphologique des colonies

Cette caractérisation concerne les caractères morphologiques des colonies sur le milieu de culture ainsi que les caractères cellulaires via l'observation microscopique.

Tous les isolats cultivés sur YMA à 30°C forment au bout de 5 à 8 jours des colonies convexes circulaires avec un diamètre entre 1-2 mm, des bordures régulières, de couleur crème claire, un aspect humide, brillant, opaque à travers la lumière et de consistance muqueuse. Aucun isolat n'a eu la capacité de produire des pigments dans le milieu de culture. La production d'exopolysaccharides EPS varie d'un isolat à l'autre.

Cette morphologie correspond à une des caractéristiques habituelles des bactéries de la famille des Rhizobiaceae à croissance lente précisément le genre *Bradyrhizobium* . (Jordan, 1984) (Figure 10).

L'observation microscopique d'une suspension bactérienne, montre des bâtonnets aux extrémités arrondies, mobiles (Figure 11). La coloration de Gram a confirmée leur appartenance aux bactéries Gram négatif. Ces résultats sont en accord avec la description donnée pour le genre *Bradyrhizobium* isolés par Vinuesa et al. (2005).

4.2 Temps de génération et taux de croissance

L'évaluation du temps de génération dans le milieu YMB des souches est récapitulée dans le Tableau 12.

La moyenne des temps de génération de ces isolats était compris entre 8-41h en effet une minimale du temps de génération (8h) a été enregistrée pour la souche LaT46 alors que la souche LaO53 a montré un temps de génération supérieur à 40 h. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus pour les souches de références.

D'après le temps d'apparition des colonies sur le milieu YMA solide (de 5 à 8 jours) et d'après leurs caractéristiques morphologiques, les souches se sont montrées plus en accord avec la description décrite par Jordan (1982) pour les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* qui sont caractérisées par des temps de génération à 6h . Cette constatation a été donc confirmée par le temps de génération lent des souches.

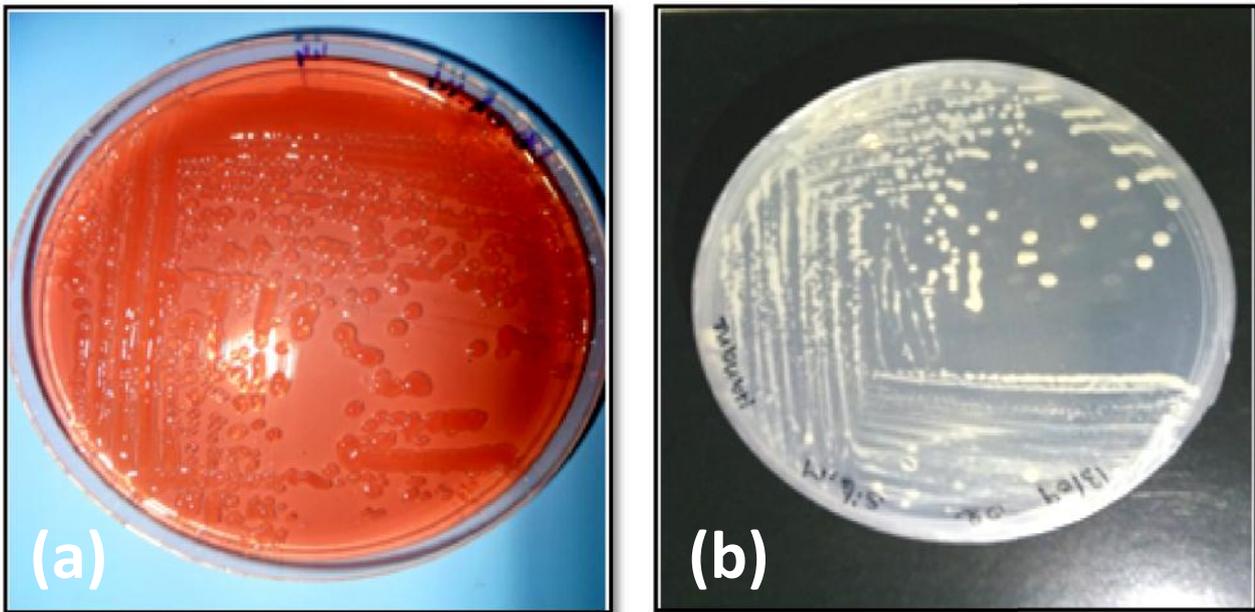


Figure 10 : l'aspect cultural des isolats de *L.angustifolius*, (a) sur le milieu YMA+ RC
(b) sur le milieu YMA

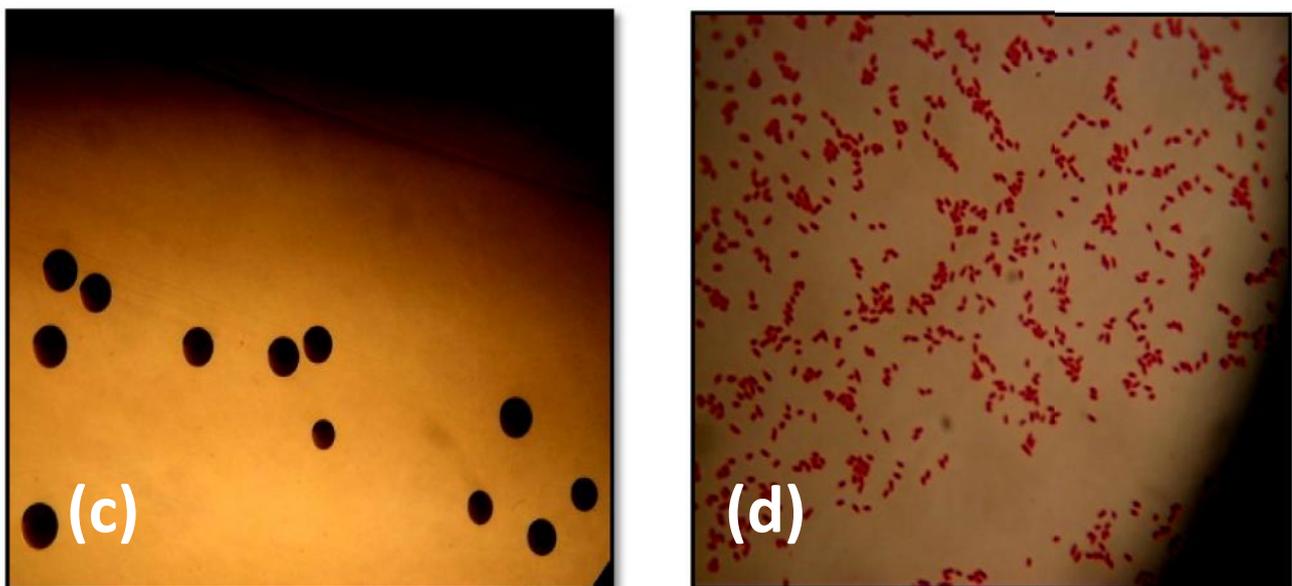


Figure 11: (a) Observation des colonies des isolats de *L.angustifolius* à la loupe binoculaire
(b) Observation microscopique d'une coloration de Gram des isolats de *L.angustifolius*.

Tableau 12: Résultat du taux de croissance et du temps de génération.

Souches	Temps de génération (h)	Taux de croissance (h ⁻¹)
LaO1	9.26	0.107
LaO10	17.36	0.057
LaM15	22.64	0.044
LaO17	16.25	0.061
LaT21	11.46	0.087
LaT23	8.74	0.114
LaT28	10.45	0.095
LaM34	9.49	0.105
LaM35	19.23	0.052
LaT41	18.51	0.054
LaT46	8.67	0.115
LaM50	40.27	0.024
LaO53	41.11	0.024
LaO54	9.47	0.105
LaM58	12.76	0.078
LaM77	24	0.041
LaT92	23.14	0.043
<i>B.canariense</i> BTA-1	07.06	0.141
<i>B.cytisi</i> CTAW11	9.76	0.102
<i>B.rifens</i> CTAW71	08.59	0.116
<i>B.japonicum</i> USDA6	07.74	0.129
<i>B.diazoefficiens</i> USDA 110	07.12	0.140

4.3 Caractérisation physiologique

4.3.1 Tolérance à la température

D'après les résultats montrés dans la figure 12 et (Annexe III), les souches étudiées y compris les souches de références sont capables de se développer dans un intervalle allant de 20°C à 34°C avec un optimum à 28°C pour la plupart des souches et aucune souche n'a été capable de croître dans les températures extrêmes 4°C et 37°C. Ceci a été souligné par Jordan (1984), qui a constaté que la croissance des rhizobia est très rare à ces températures.

Pour la plupart des Rhizobia, la température optimale de croissance est comprise entre 28°C et 31°C et de nombreuses rhizobia sont incapables de croître à 38°C (Zahran, 2001; Al Sherif et *al.*, 2004 ;Thami et *al.*, 2010).

Notre résultat est en concordance avec celui de Liu et *al* (2005) et Wei et *al* (2008) qu'ont rapporté que leurs bactéries nodulant les légumineuses ne peuvent guère supporter la température 4°C.

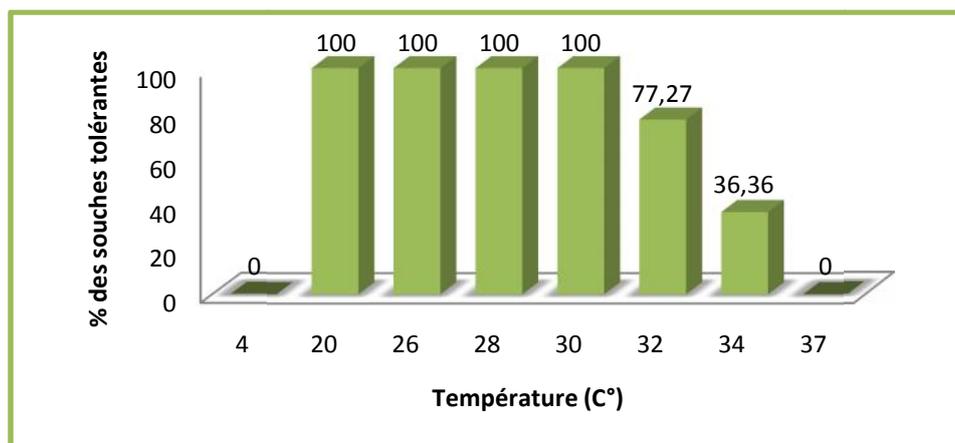


Figure 12 : Influence de la variation de la température sur la croissance des souches testées

Il a été rapporté que les basses températures sont parmi les principaux facteurs limitant la fixation d'azote par les *Rhizobia* dans les régions très humides ou froides (Zhang et Smith, 1996). L'action similaire des hautes températures a été également rapporté (Hungria et Franco, 1993)

Toutefois il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes, Bourebaba et *al* (2016) a montrée que quelque souches isolées de *L.micranthus* peuvent tolérer des températures allant jusqu'a 39°C, Moschetti et *al* (2005) ont constaté que les souches de

R.l. bv. viciae, prélevées à partir de plantes de *Vicia*, *Lathyrus* et *Pisum* dans différentes régions de l'Italie peuvent tolérer jusqu'à 37° et 44°C. Ces mêmes auteurs ont apporté que ces souches qui ont pu tolérer les hautes températures ont perdu en revanche leur capacité infective.

4.3.2 Tolérance au pH

Les résultats de la tolérance aux pH acides et alcalins de l'ensemble des souches de la collection sont présentés dans la figure 13 et détaillés en Annexe III.

D'après nos résultats 100% des souches étudiées présentent une large gamme de tolérance allant du pH 4 jusqu'à pH 8, Ces résultats montrent que les souches sont plus sensibles à l'alcalinité qu'à l'acidité. D'autre part, aucune souche n'a pu se développer au pH basique (pH 9). Les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par Sanchez-Canizares et *al.* (2011). En effet, ces derniers ont isolé des souches de *Bradyrhizobium* nodulant *Lupinus mariae-josephie*, qui ont une bonne croissance situé entre pH 4 et pH 8. aussi Maatallah et *al.* (2002) qui ont détecté la croissance de leur isolats à des valeurs de pH comprises entre pH 4.0 et pH supérieur à 7.5. Ainsi Raza et *al.* (2001) et Jordan (1984) ont trouvé que les isolats étudiés sont tolérants aux variations du pH (de 4.0 à 10). Le même résultat est retrouvé chez *R.l. bv viciae* nodulant 8 espèces de légumineuses sauvages (Moschetti et *al.*, 2005).

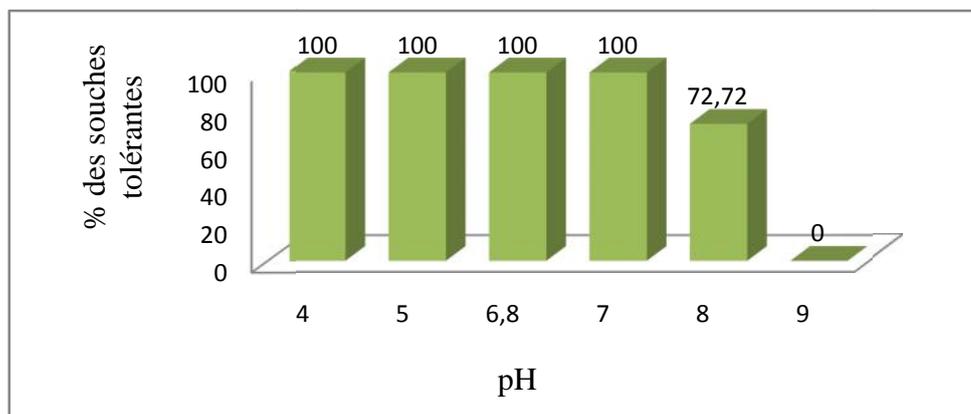


Figure 13 : Effet de la variation de pH sur la croissance des souches testées

Tous ces résultats montrent en général l'existence d'un certain degré de corrélation entre le pH des sols d'origine (légèrement acide avec un pH 6.58, 6.81 et 5.52) et l'intervalle de pH dans lequel les souches isolées ont été capables de croître. Toutefois, cette corrélation est une caractéristique généralement très variable entre les souches d'une même espèce.

Jordan (1984) a montré que les rhizobia à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité que les *Bradyrhizobium*. Cependant, certains auteurs ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la tolérance d'une souche au pH acide du milieu et la vitesse de sa croissance (Mohamed et al., 2000).

d'autres études ont montré que les rhizobia de la luzerne sont également sensibles à l'acidité (Howeison et Ewing, 1989 ; Brockwell et al., 1991 ; Graham, 1992 ; Graham et al., 1994 ; Del Papa et al., 1999).

4.3.3 Tolérance à la salinité

L'étude de l'effet du NaCl sur la croissance des souches isolées de *L. angustifolius* ainsi que les souches de référence en évaluant leur croissance en présence de concentrations croissantes de NaCl (Figure 14), montre que toutes les souches présentent le même comportement vis-à-vis du NaCl. En effet à 43 mM toutes les souches ont une bonne croissance. A partir de 85.5 mM la croissance des souches diminue pour s'annuler à 171 mM .

Ces résultats confirment ceux trouvés par (Jordan, 1982, Vinuesa et al., 2005 ; Chang et al., 2011 ; Chahboune et al., 2011, 2012, Wang et al., 2012, Guerrouj et al., 2013 Bourebaba et al., 2016). En effet, la croissance de la plupart des rhizobia particulièrement les *Bradyrhizobiums* tels que *B. cytisi*, *B. refens*, *B. japonicum*, *B. canariense*, *B. arachidis*, *B. lablabi*, *B. retama* est affectée dans un milieu de culture contenant 100mM ou plus de NaCl.

Il a été démontré que le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-*Rhizobia* en inhibant le processus d'infection ainsi que le développement des nodules (Farissi et al., 2014) En général, les premières étapes de la nodulation sont les plus sensibles au stress salin. Des résultats sont apportés par Wei et al (2008) où ils ont noté que les souches nodulant les genres *Astragalus* *Lespedeza* et *Hedysarum* sont incapables de croître à 5% de NaCl, Liu et al (2005) ont noté que tous les isolats sont sensibles à 4% de NaCl.

Miller et Wood (1996) ont rapportés que le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de la symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées ; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet du stress salin. Certains auteurs ont rapporté que les rhizobia sont plus tolérants au stress salin que leur plantes hôtes (Zahran, 1999, Swaraj et Bishnoi, 1999).

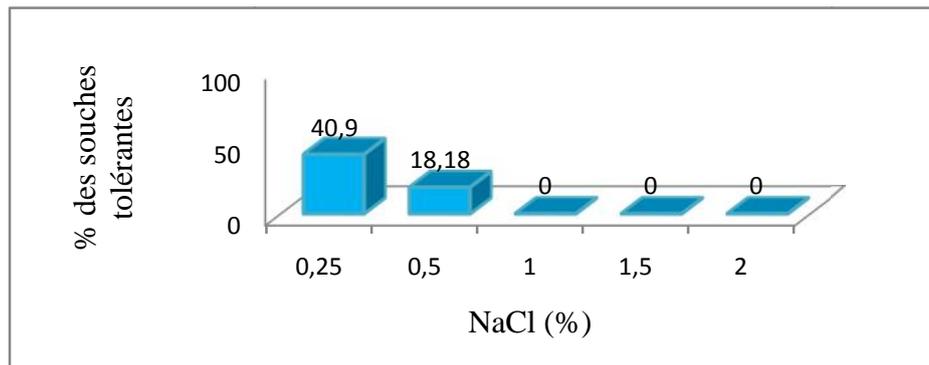


Figure 14: Effet de la salinité sur la croissance des souches testées

4.4 Caractérisation nutritionnelle

4.4.1 Utilisation de la source de carbone

La variabilité au niveau de la capacité d'utilisation des substrats carbonés entre les souches de différentes espèces et même entre les souches d'une même espèce, est très commune quand les substrats analysés sont variés et nombreux. Ainsi, dans la présente étude, la croissance des isolats a été testée sur un total de 13 substrats apportant les atomes de C pour le métabolisme cellulaire.

Les résultats indiqués dans la figure 15 et Annexe III montrent que toutes les souches testées ainsi que les souches de références sont différentes dans leur aptitude à assimiler les différents sucres.

En général, les souches ont présenté une grande facilité à utiliser les monosaccharides, comme sources de carbone. Ainsi, le D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-fructose, D xylose, D-ribose et L-arabinose et rhamnose ont été utilisés par toutes les souches étudiées. En effet, 100% de souches ont pu assimiler le mannitol : substrats communément utilisés pour la culture et le stockage des rhizobia. Un même pourcentage a été aussi obtenu avec l'arabinose et le galactose. L'étude menée par Chakrabati *et al.* (1981) a montré que parmi tous les *Bradyrhizobium* qu'ils ont testé, seules les souches de lupin ont été capables d'assimiler l'arabinose.

Aucune souches n'a pu se développer en présence de D-cellobiose et saccharose et un très peu de souches qui peuvent se développées en présence du Lactose et du Raffinose. Plusieurs études ont été réalisées sur la variabilité de la nutrition carbonée chez les Rhizobia (Graham, 1964 ; Zhang *et al.*, 1991; Stowers et Eaglesham, 1984). Il a été montré que les souches à croissance rapide possèdent une préférence pour les disaccharides (Stowers, 1985; van

Rossum *et al*, 1995), Cependant, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les trisaccharides (Stowers, 1985). ce qui est en accord avec nos résultats.

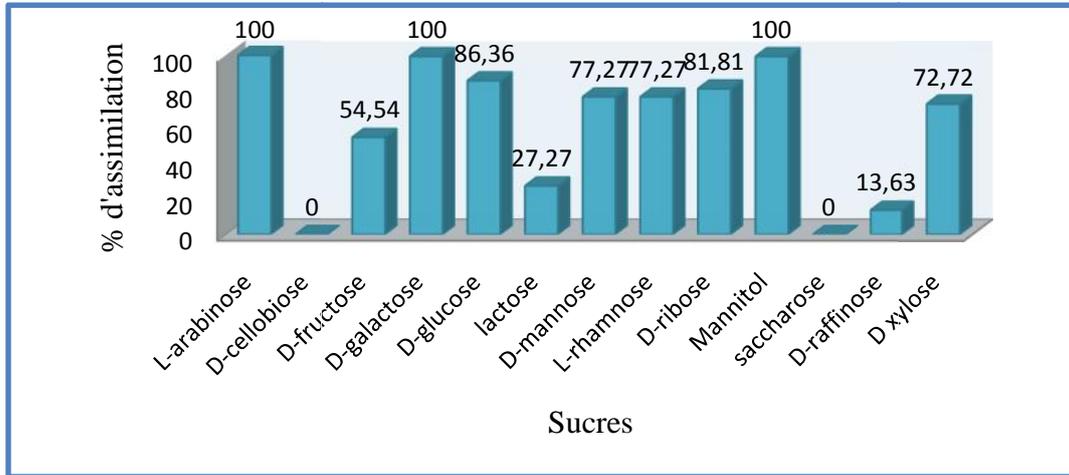


Figure 15: Assimilation de différents substrats carbonés par les souches étudiées

4.4.2 Utilisation de la source d'azote

Les résultats de l'assimilation de différents acides aminés comme seule source d'azote sont montrés dans la figure 16 Annexe III la croissance des souches a été testée en présence de huit acides aminés. Toutes ont été capables d'assimiler L-proline, L- acide glutamique, acide aspartique, Histidine, Tryptophane, Cystéine et Lysine et incapables de métaboliser la L-glycine sauf pour les souches LaM50 et LaO53 qui présentent une croissance très lente.

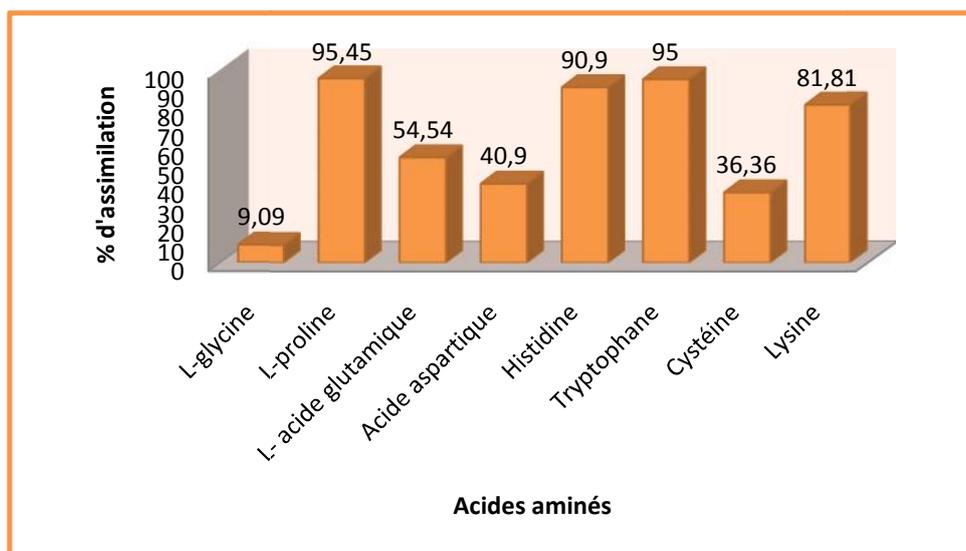


Figure 16: Assimilation de différentes sources d'azote par les souches étudiées

Les rhizobiums sont des bactéries chimioorganotrophes, ils peuvent utiliser une grande variété de composés comme source d'azote pour leur croissance Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994). Le spectre des composants qui peuvent être métabolisés paraît dépendant de la souche et peut refléter des différences d'adaptation à la rhizosphère de la légumineuse ou aux composants organiques du sol (Amarger, 2001). Alors que il existe certains acides aminés qui peuvent être des inhibiteurs de croissance (Jordan, 1984).

4.5 Caractérisation biochimique

4.5.1 Test du bleu de bromothymol (BTB)

Les résultats de ce test sont indiqués dans le tableau 13 Cette expérience ayant pour but de distinguer entre les souches à croissance rapide considérées comme des bactéries acidifiantes du milieu YMA additionné du BTB, et les souches à croissance lente produisant des composés alcalins Jordan (1984).

L'alcalinisation du milieu YMA additionné du bleu de bromothymol, (ceci est traduit par le virage de la coloration du milieu au bleu foncé) est manifestée par toutes les souches, indiquant que ces bactéries sont à croissance lente et appartenant au genre *Bradyrhizobium* (Figure 17).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Jordan (1984) et Xu et *al.*, 1995 qui considère que les bactéries qui alcalinisent le milieu sont dites à croissance lente et appartiennent au genre *Bradyrhizobium*.

4.5.2 Réduction des nitrates

Toutes les souches isolées de *L.angustifolius* dans cette étude ainsi que les souches de références réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge après l'addition des réactifs I et II de la nitrate réductase au milieu Tableau13, (Figure 17) ce qui confirme que toutes les souches testées possèdent donc une nitrate réductase, Les mêmes résultats ont été obtenus par Struffi et *al.*,(1998) et Mc Neil, 1982. La variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents *Rhizobia* (Mc Neil, 1982 ; Zahran, 1991; Luciński, 2002) ont rapporté que un excès du nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des *Rhizobia* aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective et effective .

Des travaux ont montré que la sensibilité au nitrate peut varier entre les différentes souches de *Bradyrhizobium* (Gibson et Harper, 1985) alors que d'autres travaux ont montré que le nitrate affecte la compétition des souches de *Bradyrhizobium japonicum* pour infecter le soja (Martensson *et al.*, 1989).

4.5.3 Hydrolyse de l'urée

L'activité de l'uréase joue un rôle essentiel dans le métabolisme d'azote des plantes, algues, quelques invertébrés, des mycètes ainsi que les procaryotes (bactéries) (Palinska *et al.*, 2000). L'aptitude à hydrolyser l'urée est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière. La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis *et al.* (1977).

La capacité des souches isolées de *L.angustifolius* ainsi que les souches de référence à hydrolyser l'urée est représentée dans le Tableau 13. En effet, toutes les souches ont une activité uréasique et alcalinisent le milieu en observant un virage de la couleur de l'indicateur de pH vers le rose fuchsia (Figure 17). ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium . Par contre les souches LaM50. LaO53 et les souches de référence CTAW11 isolée par Chahboune *et al.* (2011). n'ont donné aucune alcalinisation du milieu, ce qui indique l'absence de l'activité uréolytique pour ces souches.

4.5.4 Activité cellulolytique

L'hydrolyse de carboxy-methyl-cellulose CMC (le composant fondamental de la paroi végétale) se manifeste par un halo jaune orangé autour des colonies après coloration au rouge Congo. Toutes les souches ainsi que les souches de références ont montré une activité cellulolytique Tableau 13, (Figure 17), donc ces bactéries ont la capacité de dégradé la cellulose. Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par Jose *et al.*, 1996 et D'autres auteurs ont montré que *Rhizobium* produit l'enzyme cellulase qui dégrade les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, et facilite aux rhizobia de pénétrer à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire (Mateos *et al.*, 1992).

Actuellement l'activité de la cellulase est trouvée chez plusieurs espèces Rhizobiales : *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* , *B japonicum* , et les différentes souches de *R leguminosarium* (Baumberger *et al.*, 2002).

4.5.5 Activité pectinolytique

Après l'addition du rouge de ruthénium et le rinçage avec de l'eau, un halo clair est observé autour des colonies indiquant une réaction positive (Figure 17).

Les résultats montrent que toutes les souches ont une activité polygalactoranasique Tableau13. Les résultats obtenus pour cette étude se sont révélés en concordance avec ceux obtenus par Jose et al.,1996 qui supposent que le rhizobium produit les deux enzymes (la cellulase et la pectinase) qui dégradent les ponts glucidiques de la paroi cellulaire des cellules végétales, et facilitant ainsi la pénétration des rhizobia à travers les microfibrilles de la membrane cellulaire.

Tableau 13 : Résultat de la caractérisation biochimique des souches isolées de *L.angustifolius* ainsi que les souches de références

Souche	Test	BTB	Nitrate réductase	Uréase	Cellulase	Pectinase
LaO1		Alcalinisation	+	+	+	+
LaO10		Alcalinisation	+	+	+	+
LaM15		Alcalinisation	+	+	+	+
LaO17		Alcalinisation	+	+	+	+
LaT21		Alcalinisation	+	+	+	+
LaT23		Alcalinisation	+	+	+	+
LaT28		Alcalinisation	+	+	+	+
LaM34		Alcalinisation	+	+	+	+
LaM35		Alcalinisation	+	+	+	+
LaT41		Alcalinisation	+	+	+	+
LaT46		Alcalinisation	+	+	+	+
LaM50		Alcalinisation	+	-	+	+
LaO53		Alcalinisation	+	-	+	+
LaO54		Alcalinisation	+	+	+	+
LaM58		Alcalinisation	+	+	+	+
LaM77		Alcalinisation	+	+	+	+
LaT92		Alcalinisation	+	+	+	+
<i>B.canariense</i> BTA-1		Alcalinisation	+	+	+	+
<i>B.cytisi</i> CTAW11		Alcalinisation	+	-	+	+
<i>B.rifens</i> CTAW71		Alcalinisation	+	+	+	+
<i>B.japonicum</i> USDA6		Alcalinisation	+	+	+	+
<i>B.diazoefficiens</i> USDA 110		Alcalinisation	+	+	+	+

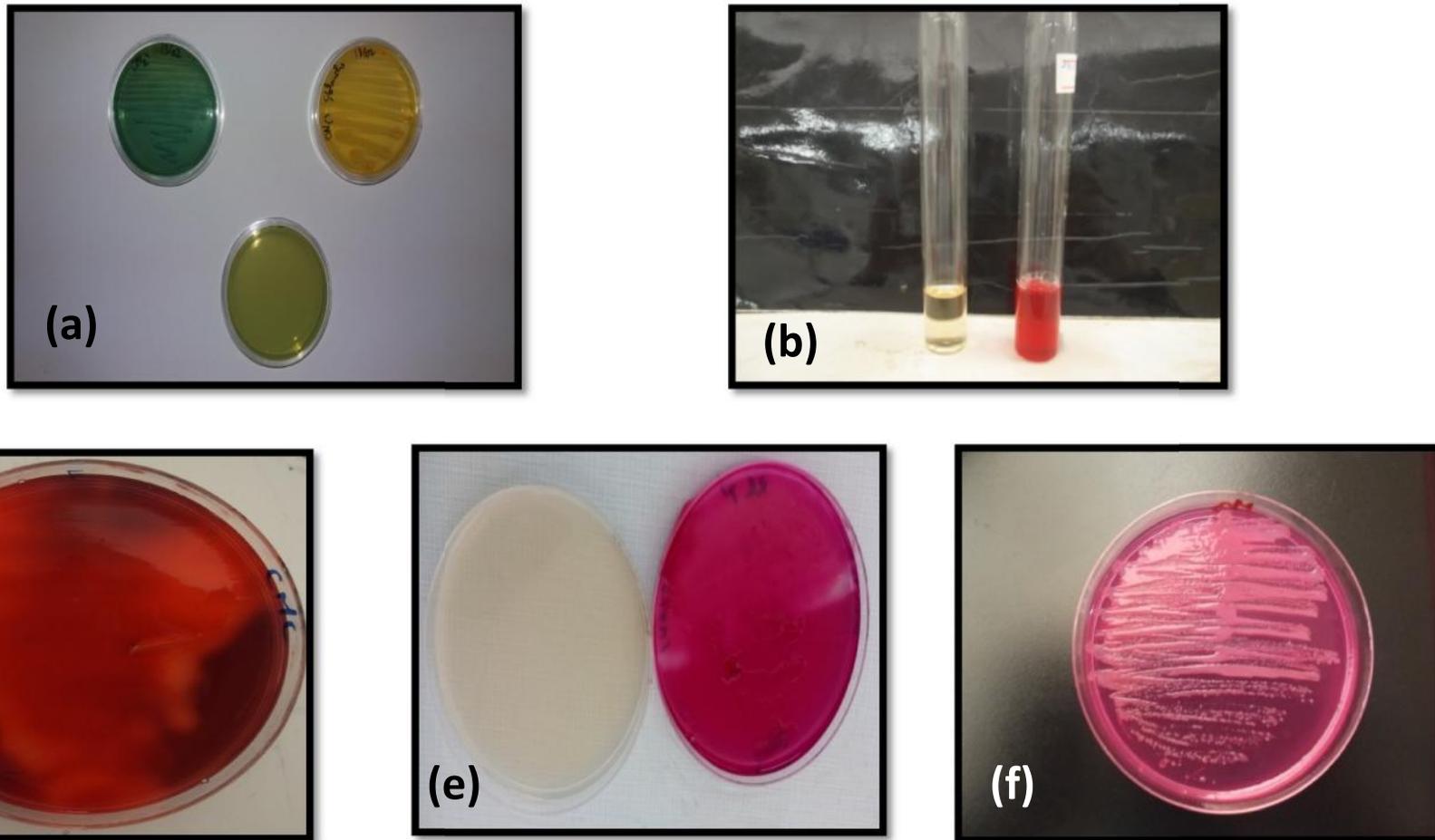


Figure 17 : Résultats de différents tests biochimiques (a) La croissance des souches sur YMA+BTB, (b) Réduction des nitrates, (d) Activité cellulosique, (e) l'hydrolyse de l'urée par les souches, (f) Activité Pectinolytique des souches

5. Caractérisation géotypique

5.1 Analyse de la biodiversité selon les profils de RAPD

Afin de déterminer la biodiversité des souches et de réduire leur nombre pour des tests plus détaillés. En utilisant une seule amorce M13, l'ADN génomique des 64 souches a été identifié par une technique aléatoire RAPD de l'ADN (Random Amplified Polymorphic DNA) , précédemment présentée comme une méthode discriminante rapide et simple de typage des souches. (Coutinho et *al.*, 1999; McInnes et *al.*, 2004 ; Rivas et *al.*, 2006 ; Velazquez et *al.*, 2010). En utilisant le programme InfoQuest, un dendrogramme a été construit sur la base de l'algorithme UPGMA, en analysant la similarité entre les différents profils des différentes bandes obtenues sur les gels d'agarose (Figure 18).

Les 64 souches obtenues dans cette étude ont été répartis en 17 profils différents à un niveau de similarité de 80% Tableau 14. Dont chaque profil regroupe un nombre variable de souches provenant soit du même site où de sites différents. De plus, aucune corrélation entre les profils et leur origine géographique n'a été trouvée.

Une souche choisie aléatoirement de chaque profil a été considérée comme représentative et son profil de bande d'ADN est montré dans la Figure 18.

Ces résultats mettent en évidence la grande diversité génétique des souches qui nodulent *L.angustifolius* dans les différentes localisations géographiques étudiées et confirment l'utilité de l'analyse des profils de RAPD pour la recherche de la biodiversité des rhizobia, comme il a été montré dans beaucoup d'études (Nuntagij et *al.*, 1997 ; Saeki et *al.*, 2000; Saleena et *al.*, 2001 ; Sikora et *al.*, 2002) , cette technique est utile aussi pour l'étude de la diversité infra-spécifique des *Bradyrhizobium* (Lunge et *al.*, 1994 ; Nishi et *al.*, 1996).

5.2 Analyse phylogénétique des isolats de *L.angustifolius*

La taxonomie bactérienne moderne vise l'intégration de toutes les données et les informations phénotypiques, géotypiques et phylogénétiques menant à une taxonomie polyphasique et une classification plus stable. Plusieurs techniques ont été proposées pour l'étude de la diversité taxonomique des rhizobiums et de leur classification. Parmi eux ,Les séquences d'ADNr 16S , les gènes de ménage (*recA* et *glnII*) , et le gène symbiotique (*nodC*) ces techniques ont été utilisées dans le cadre de notre étude pour la caractérisation moléculaire

des souches isolées des nodules. Seules les souches représentatives de chaque RAPD profil ont été analysées.

Tableau 14 : Différents groupes obtenus à partir de RAPD-PCR

Profil RAPD	Souches	Représentative de chaque groupe RAPD
I	LaO1, LaO74	LaO1
II	LaO10, LaO11, LaO49, LaO12	LaO10
III	LaM15, LaO19	LaM15
IV	LaO17, LaM48,LaO51	LaO17
V	LaT21, LaO16 ,LaM2	LaT21
VI	LaT23, LaT40, LaT47, LaT22,LaT20	LaT23
VII	LaT28, LaT71, LaT99,LaT27	LaT28
VIII	LaM34, LaM8, LaT18, LaM32	LaM34
IX	LaM35, LaM45, LaM13, LaM3	LaM35
X	LaT41, LaT26,LaM63, LaM69	LaT41
XI	LaT46, LaO29, LaM43, LaM57	LaT46
XII	LaM50, LaM88, LaM38, LaT39	LaM50
XIII	LaO53, LaO79, LaO82, LaO85, LaM36	LaO53
XIV	LaO54, LaO6, LaT33, LaM55	LaO54
XV	LaM58, LaM9	LaM58
XVI	LaM77, LaT25,LaO62	LaM77
XVII	LaT92, LaT60, LaO30,LaT24, LaM72, LaM90, LaT14	LaT92

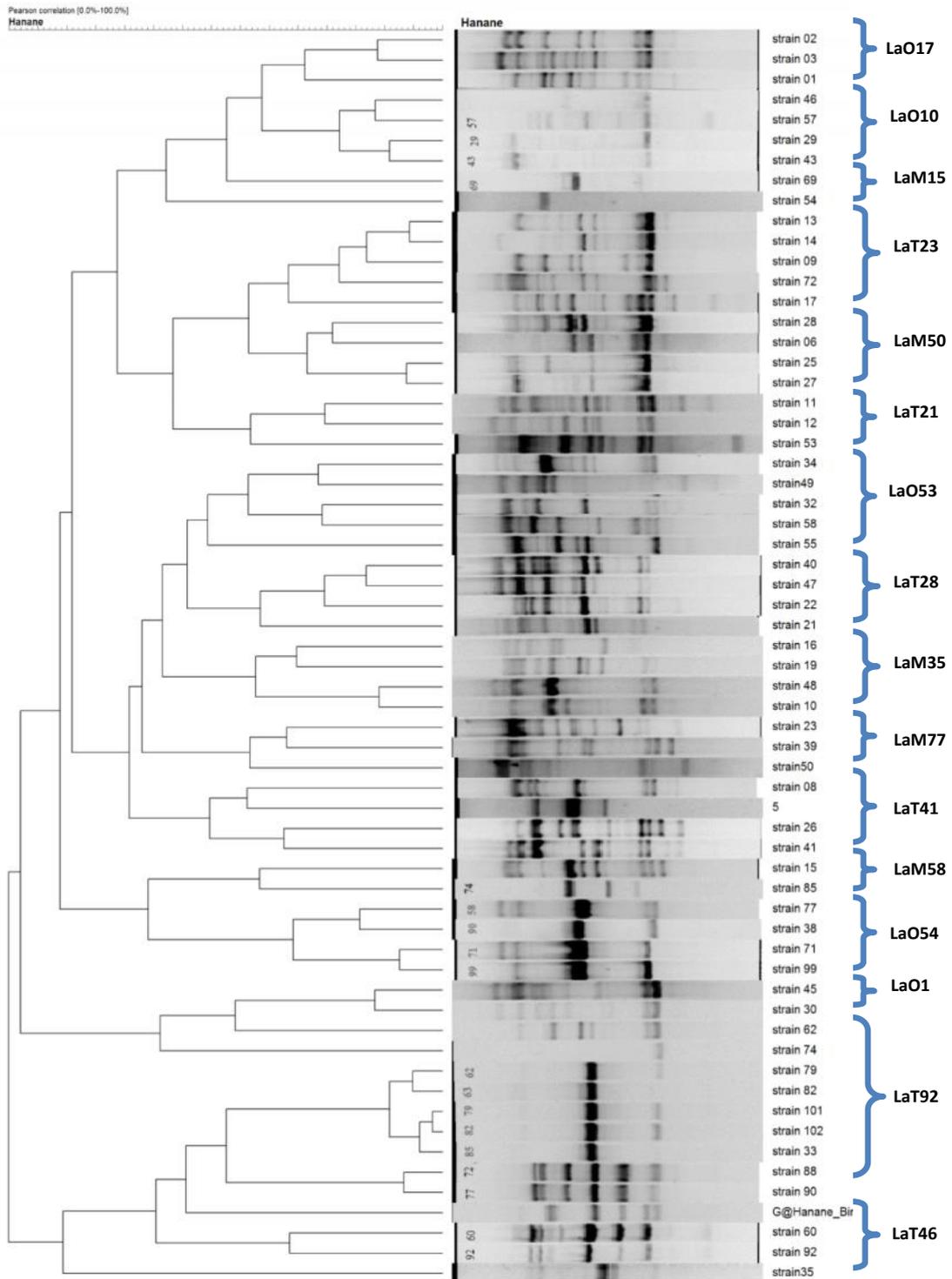


Figure 18: Dendrogramme résultant de l'analyse par RAPD -PCR des isolats nodulant *L.angustifolius*

Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la méthode de Neighbor Joining NJ (Saitou et Nei, 1987). Les séquences nucléotidiques obtenues à partir des produits de PCR de l'ADNr 16S, des gènes *recA*, *glnII* et *nodC* des souches utilisées dans les analyses phylogénétique ont été déposées dans la base de données (GenBank), Leurs numéros d'accession sont indiqués entre parenthèses après leurs noms dans les arbres phylogénétique.

5.2.1 Séquençage et analyse phylogénétique du gène ribosomique 16S

Comme expliqué précédemment, la classification phylogénétique des bactéries est basée sur le gène ribosomique 16S et par conséquent c'est le gène communément utilisé pour la classification des rhizobiums. L'amplification de la région 16S de l'ARNr a donné une bande unique de 1500 pb révélée par électrophorèse chez l'ensemble des isolats étudiés (Figure 19).

La position phylogénétique des 17 isolats représentatifs des différents groupes obtenus à partir de RAPD a été déterminée par comparaison des séquences partielles du gène ARNr 16S obtenues avec celles disponibles dans la banque de données Genbank en utilisant les différents services : BLASTn (Basic Local Alignment and search Tool) fournit par EBI (<http://www.ebi.ac.uk>), la base de donnée EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>), ou NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les recherches par BLAST et l'arbre phylogénétique de l'ADNr 16S (Figure 20) basé sur l'alignement des séquences nucléotidiques des isolats ainsi que celles de toutes les souches types des espèces décrites dans le genre *Bradyrhizobium*. En utilisant la séquence DSM9653^T de *Bosea thiooxidans* comme outgroup, les résultats ont indiqués que les 17 isolats représentatifs de chaque RAPD profil appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* de la classe des Alphaproteobacteria. et classés parmi le genre *Bradyrhizobium*.

L'arbre phylogénétique a indiqué que toutes nos souches représentatives apparaissent dans un clade unique (Clade I) et regroupées en quatre clusters différents.(I-II-III-IV), dont le cluster I représenté par les souches LaT92 et LaM77 qu'ont été identifiées comme membres de l'espèce *Bradyrhizobium diazoefficiens* USD110^T, Cluster II était composé des souches LaM50, LaO53 qui sont proches de *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T et *Bradyrhizobium rifense* CTAW71^T isolées de *Cytisus villosus* du Maroc par (Chahboune et al.,2011b, 2012). Cluster III a été représenté par une seule souche LaM54 qu'est regroupée à proximité de *Bradyrhizobium liaoningense* LMG18230^T, Alors que pour les 12 souches restantes, LaOl ,

LaO10, La017, LaT21, LaT23, LaT28, LaT41, LaT46, LaM15, LaM34, LaM35 et LaM58 sont regroupées avec *Bradyrhizobium lupini* USDA 3051^T dans le Cluster III.

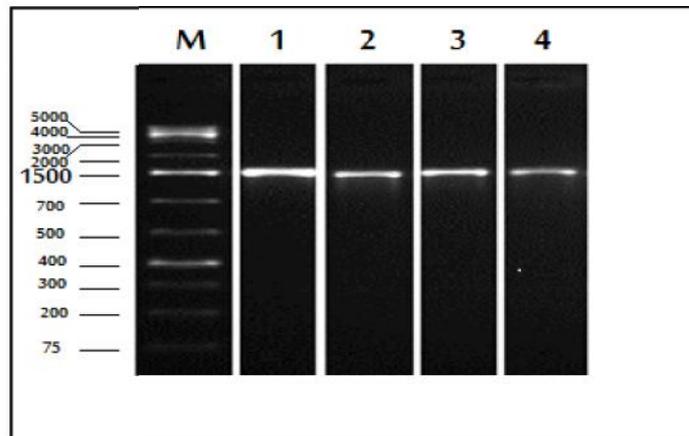


Figure 19: Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène ribosomique 16S. M: Marqueur de poids moléculaire III.

Bien que quelques auteurs aient rapporté que le genre *Lupinus* est nodulé principalement par les espèces du *Bradyrhizobium* (Barrera et al., 1997 ; Eckhardt et al., 1931 ; Jarabo-Lorenzo et al., 2003 ; Stepkowski et al., 2007; Velazquez et al., 2010), d'autres ont rapporté que quelques genres à croissance rapide peuvent noduler cette plante. Parmi les quelles les souches d'*Ochrobactrum* ont été isolées chez *L. honoratus* (Trujillo et al., 2005) et *Microvirga* chez *L. texensis* (Ardley et al., 2012) et *L. micranthus* (Msaddak et al., 2017). Aussi des souches de *Phyllobacterium* de *L. micranthus* (Msaddak et al., 2017). Pris ensemble, tous ces résultats et ceux trouvés dans cette étude suggèrent que les espèces de *Lupinus* soient nodulées principalement par le genre *Bradyrhizobium*.

Les grandes valeurs d'identité que présentent les séquences du gène ribosomique 16S de certains isolats étudiés par rapport aux souches de référence, n'impliquent pas une identification correcte au niveau de l'espèce. Parfois les valeurs d'identités qui sont supérieures à 99.5% peuvent correspondre à différentes espèces comme dans le cas de *R. etli* et *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993), *R. lusitanum* et *R. rhizogenes* (Valverde et al., 2006) et entre *B. elkanii* et *B. pachyrhizi* (Ramírez-Bahena, 2009). Par conséquent, l'étude d'autres marqueurs phylogénétiques est nécessaire, comme les gènes de ménage "housekeeping genes" qui sont très utiles pour différencier les espèces proches dans la famille des *Rhizobiaceae* (Gaunt et al., 2001; Kwon et al., 2005; Valverde et al., 2006).

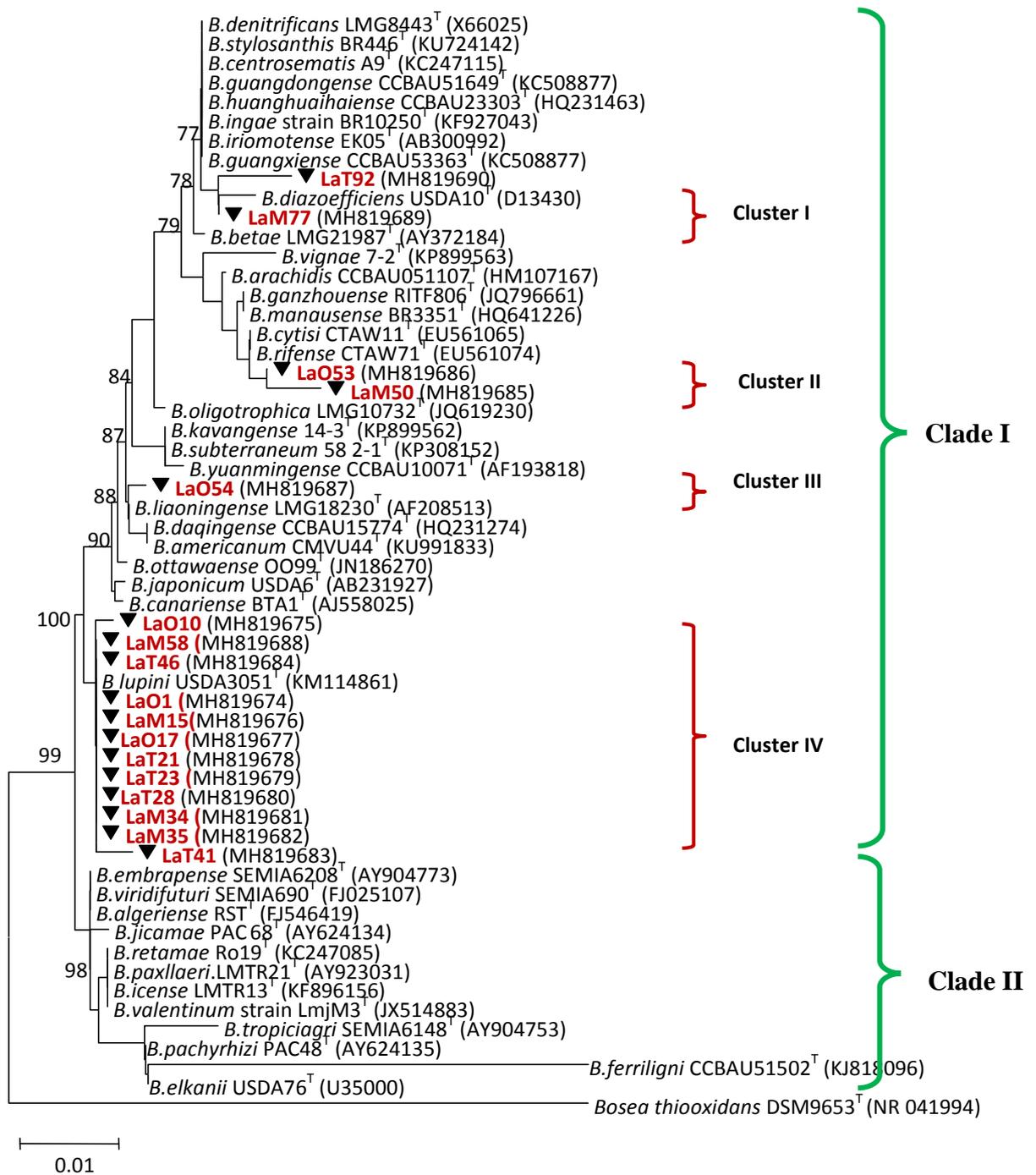


Figure 20 : Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement des séquences partielles d'ARNr 16S des souches des nodules de *L. angustifolius* sauvages et d'espèces phylogénétiquement apparentées du genre *Bradyrhizobium*. Les isolats sont indiqués en rouge avec le symbole noir. Les valeurs de bootstrap sont indiquées sous forme de pourcentages dérivés de 1.000 réplifications. Les valeurs inférieures à 70 ne sont pas affichées. Les numéros d'accèsion des séquences du gène d'ARNr 16S sont indiqués entre parenthèses après les noms des souches, L'arbre est enraciné avec *Bosea thiooxidans* DSM 9653^T. T:La souche type de l'espèce.

5.2.2 Séquençage et analyse phylogénétique des gènes *glnII* et *recA*

Les gènes de ménage (*glnII* et *recA*) ainsi que le gène symbiotique (*nodC*) ont été utilisés dans cette étude pour une analyse phylogénétique plus robuste et fiables.

L'amplification par PCR des gènes *glnII* et *recA* des 17 souches représentatives des différents profils obtenus de la RAPD-PCR, ont donné des bandes unique d'environ 0.7 et 0.6 Kb, respectivement (Figure 21), A partir des séquences obtenues, des arbres phylogénétiques ont été construits. En comparant les séquences obtenues avec ceux des souches types des différentes espèces de *Bradyrhizobium*. Les arbres phylogénétiques obtenues pour les gènes *glnII* et *recA* analysés individuellement (Figure 22.23), ou en concaténation (Figure 24), indiquent que toutes les souches isolées de *L.angustifolius* appartenant au genre *Bradyrhizobium*, présentant une grande diversité phylogénétique entre eux, se distribuent en 04 groupes différents (I-II-III-IV). Ils ont montré la même configuration que l'ARN 16S avec les mêmes quatre clusters, mais avec une résolution plus élevée.

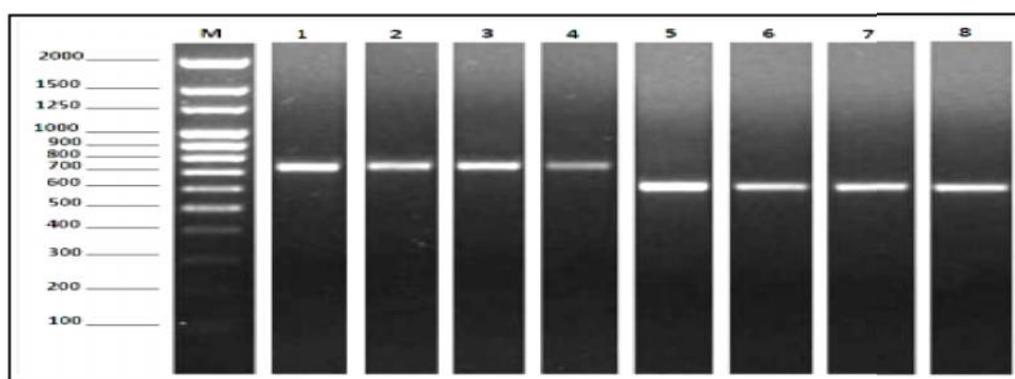


Figure 21: Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification des gènes *glnII*, *recA*. Les puits allant de 1 à 4 correspondent aux fragments du gène *glnII*, les puits de 5 à 8 correspondent aux fragments du gène *recA* M : marqueur de poids moléculaire 100 pb.

L'arbre phylogénétique basé sur la concaténation des gènes *glnII* et *recA*, montre que le cluster IV regroupe la majorité des souches 12 souches avec un pourcentage de 70.6%, qui sont proches de *B.canariense* BTA-IT (Vinuesa et al., 2005) et *B. lupini* USDA3051^T décrites récemment (Piex et al., 2015). répartis en deux sous-groupes distincts : l'un proche de *B. canariense* et l'autre proche de *B. lupini*. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus récemment par Bourebaba (2016) et Msaddak 2017 montrant que les souches isolées de *L. micranthus* sauvages d'Algérie / Espagne et la Tunisie appartiennent au genre *Bradyrhizobium* avec deux espèces dominantes *B.lupini* et *B.canariense*. Alors que nos résultats contrastaient avec le rapport de Stępkowski (2005.2011) qui montre que *B.japonicum* et *B.canariense* sont

les espèces dominantes de *Bradyrhizobium* nodulant les lupins européens (*L. angustifolius* et *L. luteus*). Contrairement à cela Dans cette étude, une seule souche appartient à *B.japonicum* dans le groupe III à été trouvée.

Cluster II définie par les souches LaM50 et LaO53 (11.8%) qui sont regroupé au voisinage de *B. rifense* et *B. cytisi*. Ces espèces ont été isolées pour la première fois à partir de *Cytisus villosus* poussant au Maroc et en Espagne (Chahboune et al.2011,2012), et aussi trouvées dans les nodule de *L.micranthus* sauvages d'Algérie / Espagne (Bourebaba et al.,2016) mais les isolats LaM50 et LaO53 ont été groupés seulement avec celles isolés des plantes d'Algérie mais pas avec celle isolés d'Espagne, qui soutient la suggestion d'un origine géographiques spécifiques des souches de *B. cytisi* (Bourebaba et al., 2016) . nos isolats montrés des valeurs de similarité d'environ 92,5%, 96,8% des gènes *recA* et *glnII*, respectivement, donc une valeur 96% des séquences concaténées , entre LaM50 / *B.rifense* et LaM50 / *B.Cytisi*. suggérant que les souches incluses dans ce Cluster pourrait représenter une différentes lignées au sein du genre *Bradyrhizobium*. Une analyse génomique supplémentaire est nécessaire pour confirmer ces résultats.

Les souches restantes constitué le cluster III comprenant seulement une souche LaO54 qui est groupé avec *B. japonicum* USDA 6^T. Les isolats de *Bradyrhizobium* de *Genistea* ont une affinité phylogénétique avec *B. japonicum* (Barrera et al., 1997) et aussi cette bactérie a été trouvée dans des nodules de *L. angustifolius* cultivés en Australie, en Pologne, en Afrique du Sud et en Espagne (Trujillo et al., 2005).

Les deux autres souches LaM77 et LaT92 constitué le Cluster IV groupé avec *B.daizoefficiens* USDA 110^T isolée du soja (*Glycine max*) (Kaneko et al.2002). Aucun des isolats de lupin apparentés à *B.daizoefficiens* n'avait été signalé précédemment. Cette espèce comprend plusieurs souches, la grande majorité isolée du soja, nous montrons ici qu'il peut également être trouvé dans les nodules de la plante *L. angustifolius* de l'Algérie . Des études antérieures ont montré que les *Bradyrhizobium* de *lupinus* étaient liées à des nombreux isolats de soja dans les arbres phylogénétiques des gènes de ménage (Barrera et al., 1997; Jarabo-Lorenzo et al., 2003 ; Stpkowski et al., 2003 ; Stpkowski et al., 2018 ; Vinuesa et al., 2005).

Les résultats obtenus de l'analyse de l'arbre phylogénétique des deux gènes *recA* et *glnII* en concaténation ont principalement renforcé ceux déduits de l'analyse phylogénétique des deux gènes prise individuellement et donnent les mêmes résultats.

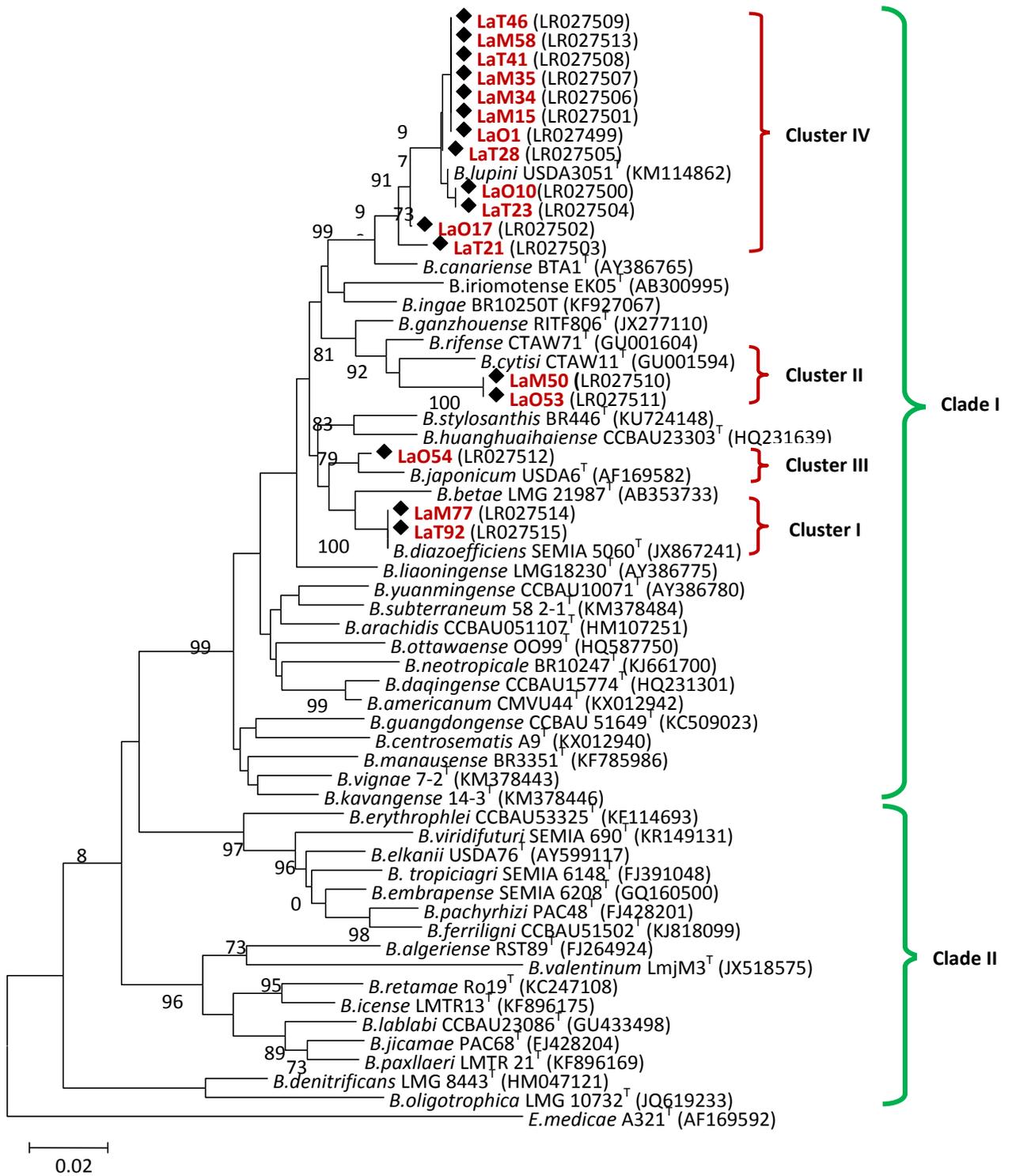


Figure 22 : Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement des séquences partielles du gène *glnII* des souches isolées des nodules de *L. angustifolius* et d'espèces phylogénétiquement apparentées au genre *Bradyrhizobium*. Les isolats sont indiqués en rouge, avec le symbole noir. Les valeurs de bootstrap sont indiquées sous forme de pourcentages dérivés de 1.000 réplifications. Les valeurs inférieures à 70 ne sont pas affichées. Les numéros d'accèsion des séquences du gènes *glnII* sont indiqués entre parenthèses après les noms des souches. L'arbre est enraciné avec *E. medicae* A321^T. T: la souche type de l'espèce.

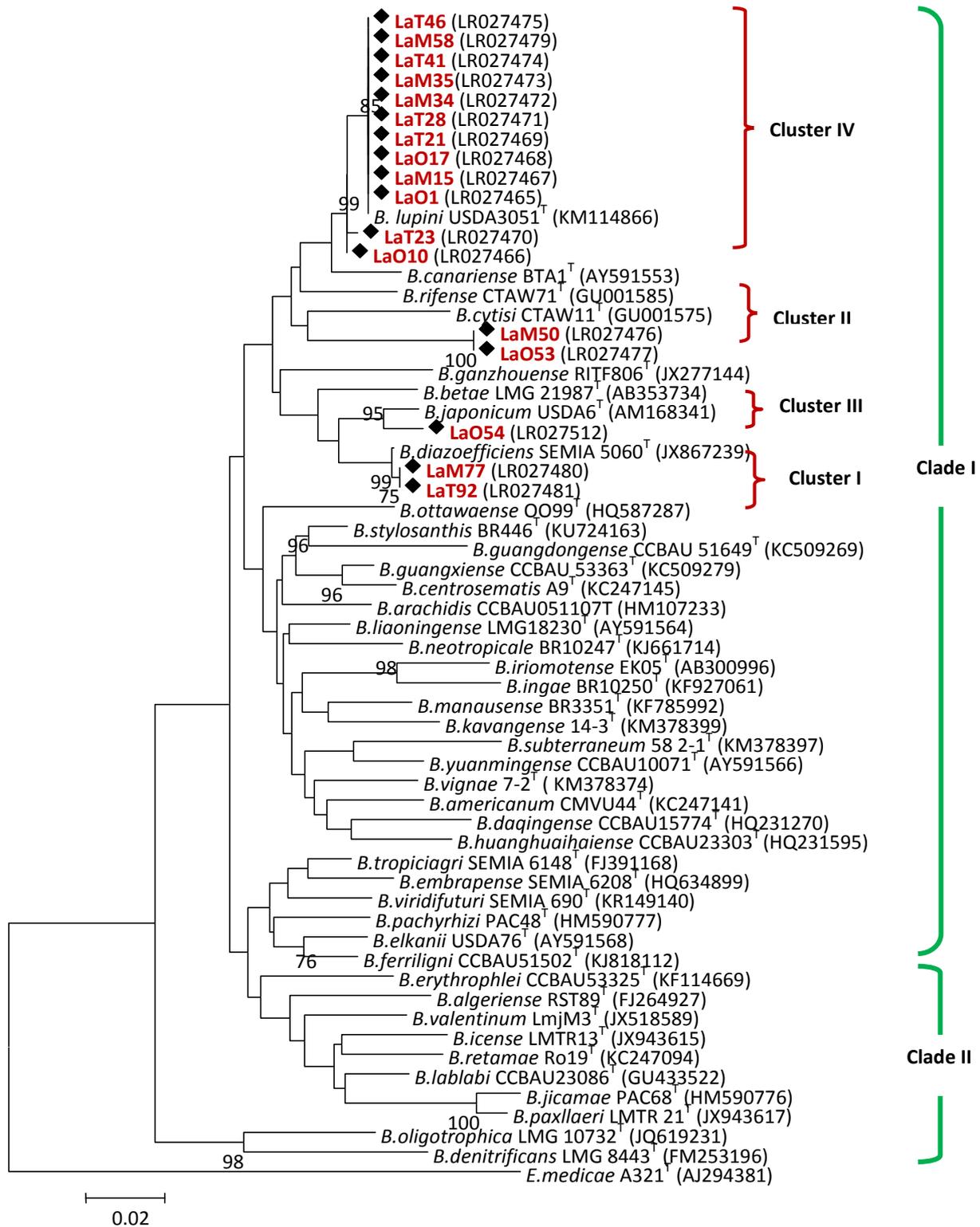


Figure 23 : Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement des séquences partielles du gène *recA* des souches isolées des nodules de *L. angustifolius* et d'espèces phylogénétiquement apparentées au genre *Bradyrhizobium*. Les isolats sont indiqués en rouge, avec le symbole noir . Les valeurs de bootstrap sont indiquées sous forme de pourcentages dérivés de 1.000 réplifications. Les valeurs inférieures à 70 ne sont pas affichées. Les numéros d'accèsion des séquences du gènes *recA* sont indiqués entre parenthèses après les noms des souches. L'arbre est enraciné avec *E. medicae* A321^T : la souche type de l'espèce.

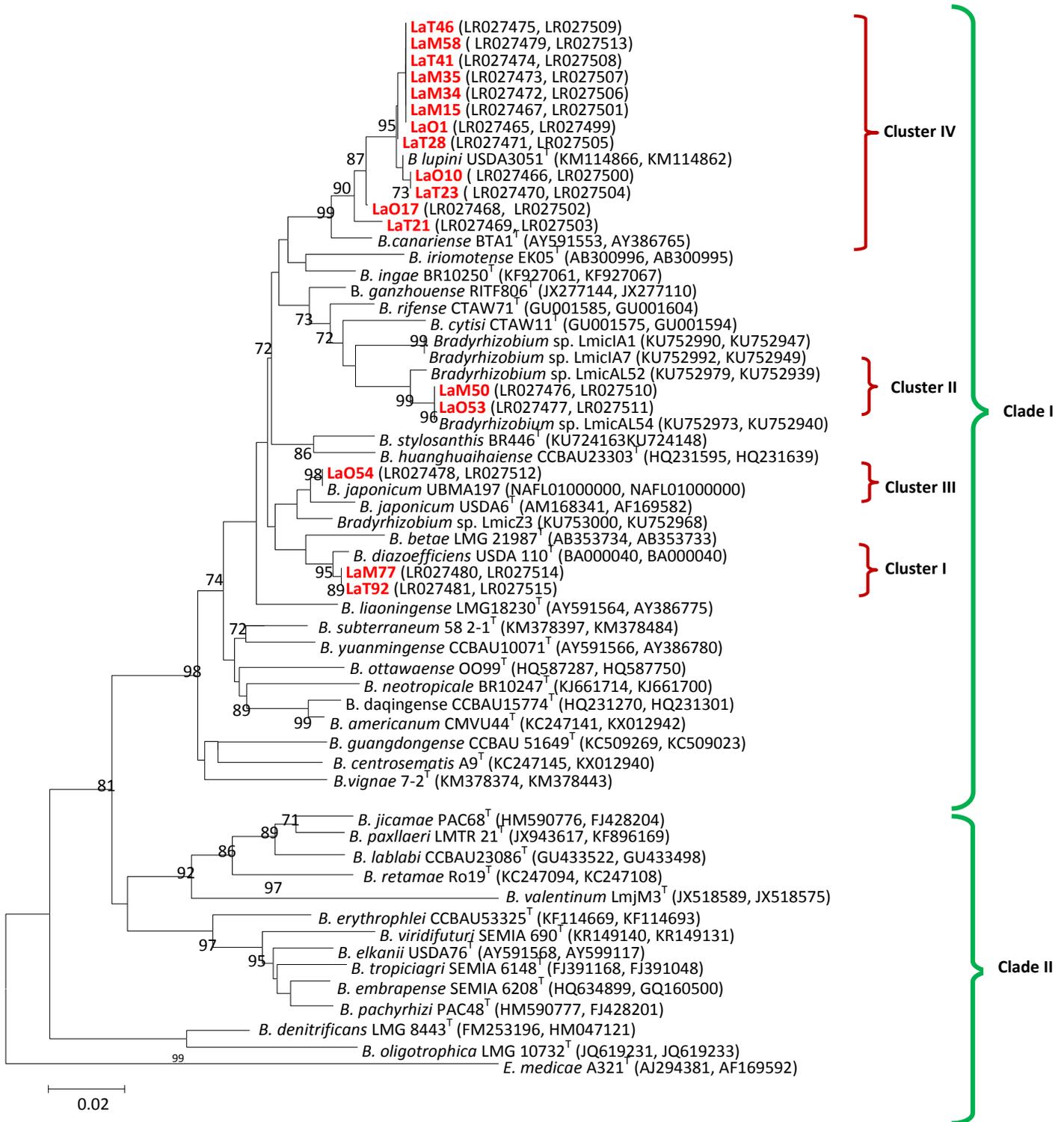


Figure 24 : Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement des séquences concaténées des gènes *recA*+*glnII* des souches isolées des nodules de *L. angustifolius* et d'espèces phylogénétiquement apparentées au genre *Bradyrhizobium*. Les isolats sont indiqués en rouge et en gras. Les valeurs de bootstrap sont indiquées sous forme de pourcentages dérivés de 1.000 répliquions. Les valeurs inférieures à 70 ne sont pas affichées. Les numéros d'accèsion des séquences des gènes *recA* et *glnII* sont indiqués entre parenthèses après les noms des souches. L'arbre est enraciné avec *E. medicae* A321^T. T: la souche type de l'espèce.

5.2.3 Séquençage et analyse phylogénétique de gène *nodC*

Bien que les phylogénies basées sur les gènes stables situés dans le chromosome soient nécessaires pour établir une taxonomie évolutivement significative, dans le cas des rhizobiums les études taxonomiques devraient inclure les gènes symbiotiques tels ceux de la nodulation et de la fixation d'azote. Ils sont considérés comme de bons marqueurs de la coévolution des rhizobiums avec leur plante hôte (Álvarez Martínez, 2007), pour révéler leur origine biogéographique (Aguilar *et al.*, 2004) et ils permettent de mieux comprendre la symbiose rhizobium-légumineuse.

Le gène *nodC* est responsable du processus de la nodulation chez toutes les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* (Laguerre *et al.*, 2001). Il code pour la protéine Nacetylglucosamine transférase qui confère la spécificité à l'hôte (Laguerre *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2007).

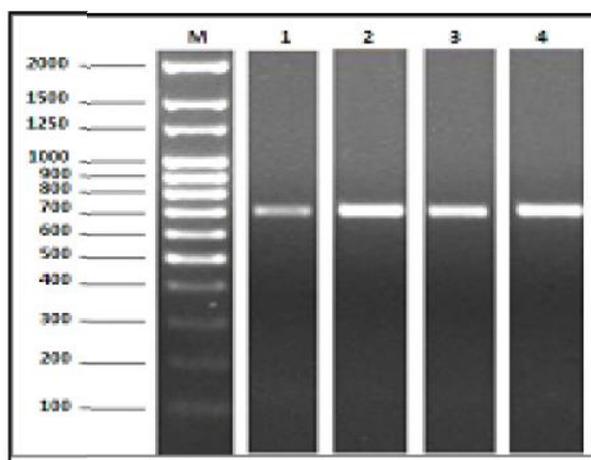


Figure 25: Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène *nodC* des souches isolées de *L.angustifolius* M : marqueur de poids moléculaire 100 pb.

L'amplification par PCR du gène symbiotique *nodC* a donné une bande unique d'environ 0.6 kb (Figure 25). L'analyse phylogénétique du gène symbiotique *nodC* des souches (LaO54 , LaM77, Lam15 et LaO53) choisies en tant que représentant de chaque groupe correspondant (I. II. III.IV). révéla que toutes les souches isolées de *L.angustifolius*, appartiennent au groupe de *Bradyrhizobium* symbiovar *genistearum* (Figure 26) le symbiovar *genistearum* décrit par Vinuesa *et al.*, 2005, qui inclut la plupart des souches nodulant le lupin précédemment décrites. De plus, de nombreuses souches nodulent un grand nombre de plantes de la tribu *Genisteeae*, telles que *Retama*, *Cytisus*, *Chamaecytisus*, *Spartium* en Afrique, en Amérique et en Europe. Les gènes *nodC* de UBMA197 et LmicZ3 se sont également regroupés au sein du symbiovar *genistearum* (Figure 26) et l'identité entre les

séquences aminoacidiques de LaO54 et UBMA197 et LmicZ3 étaient de 90,8% et 90,3%, respectivement.

Ces résultats indiquent que les souches de *B. japonicum* généralement appartiennent dans le symbiovar *glycinearum* ont acquis le gène *nodC* du symbiovar *génistearum*. C'est plus probable que plusieurs transferts horizontaux pourraient être responsables de l'apparition de *B.japonicum* nodulant plusieurs plantes de la tribu *Genisteae*.

Les phylogénies élaborées par les gènes symbiotiques sont incongrues avec celles basées sur les phylogénies du gène 16S de l'ARNr et des gènes de ménage. Du fait qu'il existe des groupements de souches appartenant au même cluster selon la phylogénie des gènes *sym* et qui ont été classées comme des espèces et même des genres différents selon l'analyse du gène 16S. Ce fait soutient l'hypothèse du transfert horizontal des gènes symbiotiques d'une espèce à l'autre via le plasmide Sym (Uchiumi *et al.*, 2004; Gogarten et Townsend, 2005 ; Lloret et Martínez-Romero, 2005 ; Sørensen *et al.*, 2005 ; Bailly *et al.*, 2007), comme il a été déjà démontré dans le cas des symbiotes de *Medicago* (Bailly *et al.*, 2007), entre les souches indigènes du Brésil et *B. japonicum* d'autres localisations géographiques (Gomes-Barcellos *et al.*, 2007) et aussi entre certaines souches de la Nouvelle Zélande et les souches de *M. loti* isolées de *Lotus corniculatus* (Sullivan *et al.*, 1995).

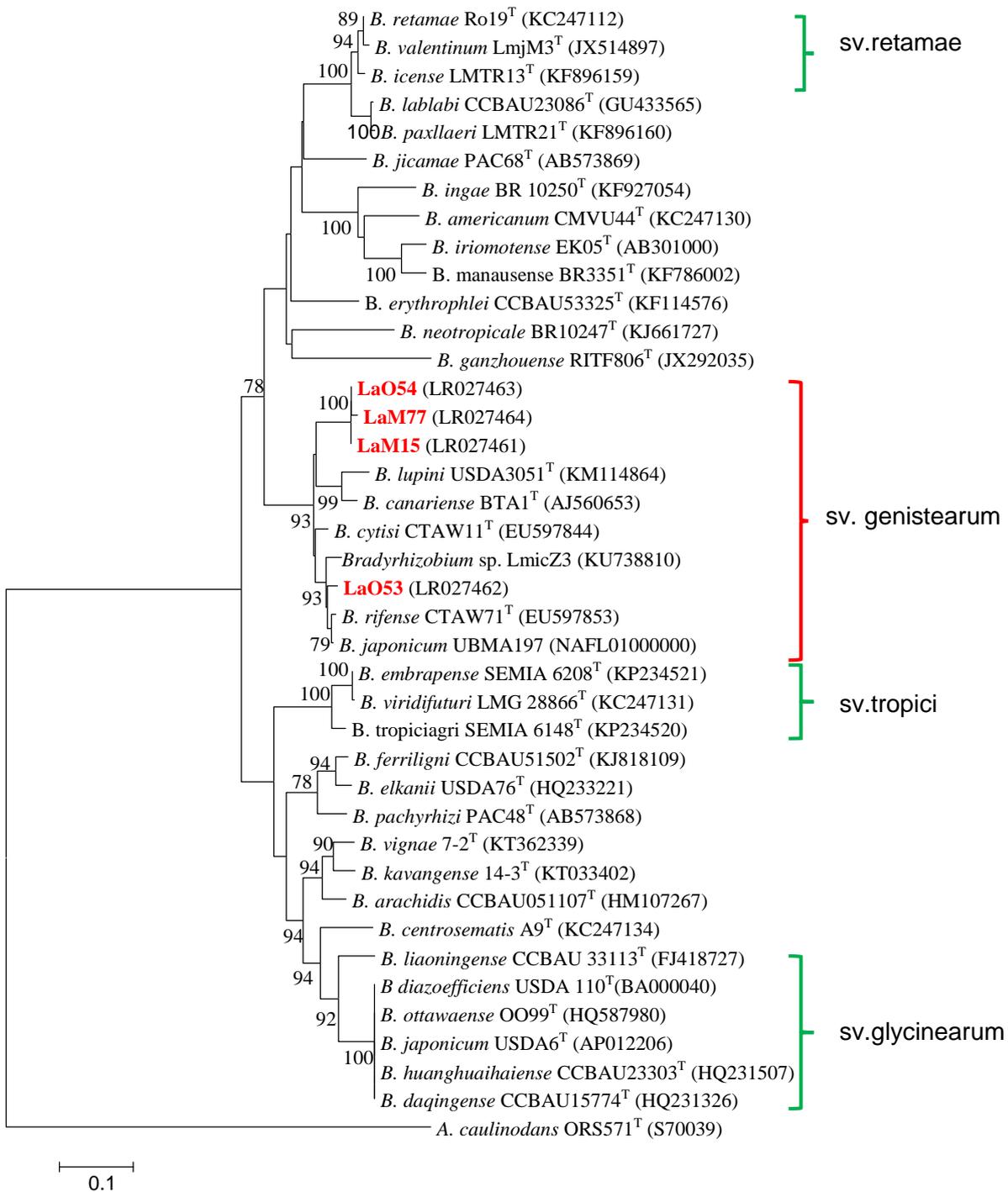


Figure 26 : Arbre phylogénétique Neighbor-joining (NJ), basé sur l'alignement de séquence du gène *nodC* des souches isolées des nodules de *L. angustifolius* et d'espèces phylogénétiquement apparentées au genre *Bradyrhizobium*. Les isolats sont indiqués en rouge et en gras, Les valeurs de bootstrap sont indiquées sous forme de pourcentages dérivés de 1.000 réplifications. Les valeurs inférieures à 70 ne sont pas affichées. Les numéros d'accèsion des séquences du gène *nodC* sont indiqués entre parenthèses après les noms des souches. L'arbre est enraciné avec *A. caulinodans* ORS571^T.T: la souche type de l'espèce.

Conclusion et Perspectives

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des populations naturelles des bactéries symbiotiques du *Lupinus angustifolius* . provenant de la région Nord-Est d'Algérie.

En effet, ce travail a permis d'atteindre les objectifs que nous sommes fixés au début, à savoir la caractérisation phénotypique, génotypique et l'analyse selon une taxonomie polyphasique des endosymbiotes isolés des nodules de *Lupinus angustifolius*.

Dans cette recherche un total de 80 isolats issus des nodosités fraîches de *Lupinus angustifolius* a été obtenu. Ces isolats ont été authentifiés par le test de nodulation sur leurs plantes hôte *L. angustifolius*, Les résultats analysés après un mois de culture se sont révélés positifs pour 64 isolats qui sont capable de réinfecter leur plante hôte.

les aspects morphologique et cultural des isolats sur les différents milieux de culture répondent aux critères des rhizobia connus dans la littérature et attribuent nos isolats à des souches qui ont une croissance lente (7jours) et confirmer leur appartenance au genre *Bradyrhizobium*.

L'analyse par PCR/RAPD a été adoptée comme un premier moyen de la caractérisation génotypique et phylogénétique des isolats , elle a été utilisée essentiellement pour la différenciation des isolats au niveau souche. Les 64 isolats obtenues dans cette étude ont été répartis en 17 profils différents dont chaque profils regroupe un nombre assez variable de souches.

Le séquençage partiel du gène ribosomique 16S a permis d'affirmer l'appartenance des 17 isolats représentatifs des différents groupes obtenus à partir de PCR-RAPD au genre *Bradyrhizobium*. Les résultats obtenus ont montré l'existence de 04 clusters différents parmi les 17 souches de *Bradyrhizobium* étudiées.

Les séquences des gènes de ménages *glnII* et *recA* ont permis de classer les 17 souches de *Bradyrhizobium* dans les mêmes 04 clusters précédemment identifiés avec l'ARNr 16S, dont le cluster I est représenté par deux souches qu'ont été identifiées comme membres de l'espèce *B. diazoefficiens*. le Cluster II définie par deux souches qui présentaient des valeurs de similarité 95% avec *B. cytisi* et pourraient représenter de nouvelles espèces au sein du genre *Bradyrhizobium*. pour le Cluster III contient une seule souche appartient à *B. japonicum*. et le dernier cluster IV regroupe la majorité des souches 12 souches qui sont proches de *B.canariense* et *B. lupini*

Les séquences de gène symbiotique *nodC* ont montré que toutes les souches appartiennent au symbiovar *genistearum*.

Les résultats de la caractérisation phénotypique (physiologiques, nutritionnels et biochimiques) a révélée une faible diversité entre les souches et les souches de références étudiées.

Toutes les souches de *Bradyrhizobium* testées ont été capables de renoduler le *L.angustifolius* mais incapables de former les nodules au niveau des racines de soja, ce qui confirme leur biovariété *genistearum*.

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives comme données de base pour les travaux de recherches futures et pourraient également être exploités quant à leur application sur le terrain par :

* La diversification des sites de prélèvement des nodules de *Lupinus* en tenant compte de toutes ses zones géographiques à travers l'Algérie .

* Des études similaires sur d'autres espèces de *Lupinus* afin d'améliorer la production fourragère.

*Cette caractérisation polyphasique doit être accompagné d'une hybridation ADN/ADN ou d'un séquençage total du génome des isolats de *Lupinus* pour donner un nom à une (des) nouvelle (s) espèces

*Enfin, il serait également souhaitable d'effectuer des essais à l'extérieur du laboratoire et d'évaluer les potentialités des couples symbiotiques et leurs pouvoir adaptatif aux différents environnements répondant ainsi aux objectifs du développement national et régional.

*L'établissement de stratégies d'amélioration efficace de la symbiose par la production d'inoculum de bonne qualité, c'est-à-dire l'étude de l'aptitude des souches sélectionnées à survivre et à maintenir leur potentiel symbiotique durant le stockage de l'inoculum, pendant l'inoculation au champ et durant les années suivantes (besoin de réinoculation).

*Il serait de première nécessité d'apprécier les vraies performances symbiotiques et adaptatives des souches étudiées par l'estimation de la fixation de l'azote (dosage), permettant ainsi la sélection des souches les plus efficaces.

Références Bibliographiques

-A-

- Aguilar**, O. M., Riva, O., Peltzer, E. (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 13548-13553.
- Ahnia**, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., Salmi, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Rey, L. (2014) *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. Antonie van Leeuwenhoek. 105,1121–1129.
- Aïnouche**, A. K., Bayer, R. J. (1999) Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on Internal Transcribed Spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Am. J. Bot. 86 (4), 590-607.
- Allen**, M. B., Arnon, D. I. (1955) Studies on Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. Plant Physiol. 30, 366-372.
- Allen**, O. N., Allen, E. K. (1981) The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. The University of Wisconsin in Press, Madison, 806 p.
- Álvarez Martínez**, E. R. (2007) Coevolución de Plantas Leguminosas Herbáceas de la Provincia Corológica Mediterránea Ibérica Occidental y de sus Endosimbiontes Bacterianos. En Microbiología y Genética. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Amarger**, N. (2001) *Rhizobia* in the field. En Advances in Agronomy. London (UK): Academic Press.
- Ardley**, J.K., Parker, M.A., De Meyer, S.E., Trengove, R.D., O’Hara, G.W., Reeve, W.G., Yates, R.J., Dilworth, M.J., Willems, A., Howieson, J.G. (2012) *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62 (11), 2579–2588.
- Asami**, S., Kiwamu, M. (2006) Evaluation of the Nitrogen-fixing Ability of Endophytic Clostridia based on Acetylene Reduction and Reverse Transcription-PCR Targeting the *nifH* Transcript and Ribosomal RNA. Microb. Environ. 21, 23–35.
- Ascherson**, P., Graebner, P. (1907) Synopsis der mitteleuropäischen Flora, Band III (Monocotyledones). Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig. 23 p.
- Azani**, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A. (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). Taxon. 66, 44–77.

-B-

- Bailly, X., Olivieri, I., Brunel, B., Cleyet-Marel, J. C., Bena, G. (2007)** Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J. Bacteriol.* 189, 5223-5236.
- Baize, D. (1988)** Guide des analyses courantes en pédologie, INRA, Paris, France, 172 p.
- Barrera, L.L., Trujillo, M.E., Goodfellow, M., Garcia, F.J., Hernandez-Lucas, I., Davila, G., van Berkum, P., Martinez-Romero, E. (1997)** Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1086–1091.
- Baudoin, J.P. (2001)** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (4) 221–230.
- Baumberg, I.C., Fraefel, N., Gottfert, M., Hennecke, H. (2003)** New *Nodw*-or *NifA*-regulated *Bradyrhizobium japonicum* Genes. *Am. Phyto.Soc.* 16, 342-351.
- Beck, D.P., Materon L.A., Afandi, F. (1993)** Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual. ICARDA, n19.Syria.389 p.
- Becking, J. (2006)** The family *Azotobacteraceae*. *Prokar.* 6, 759–783.
- Beijerinck, M.W. (1888)** Die bacterien der papilionaceenknollchen. *Botani. Zeit.* 46, 797-804.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., Squartini, A. (2004)** Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 462–468.
- Beringer, J.E. (1974)** R-Factor transfer in rhizobium legume. *J. Gen. Microbiol.* 84, 188-198.
- Bermúdez-Torres, K., Herrera, J. M., Figueroa Brito, R., Wink, M., Legal, L. (2009)** Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *Biocontrol.* 54, 459-466.
- Bladergroen, M.R., Spaink, H.S. (1998)** Current Opinion in Plant Biology, 1, 353–359.
- Bonaldi, K., Gargani, D., Prin, Y., Fardoux, J., Gully, D., Nouwen, N., Goormachtig, S., Giraud, E. (2011)** Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by Photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS285__: The Nod-Dependent Versus the Nod-Independent Symbiotic Interaction. *Mol.Plant-Microbe. Interact.* 24, 1359–1371.
- Bonvallot, V. (2004).** Des plantes au service de la dépollution. *Biofutur*, 23(242), 29-31.
- Boulila, F., Depret, G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S. et Laguerre, G. (2009)** Retama species growing in different ecological–climatic areas of north eastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 245–255.

Bounejmate, M., Thami-Alami i, H., El maadoudi, E. (1995) Culture du lupin blanc doux. *Terre et Vie*. 15-16.

Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Ahnia, H., Boulila, A., Temprano, F., Palacios, J.M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Rey, L. (2016) Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the western Mediterranean: Algeria and Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 266–274.

Brewin, N.J., Downie, J.A., Young, J.P.W. (1992) Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology*. M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York 3. 239-248.

Brink, M., Belay, G., Agrooh. (2006) Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1céréales et légumes secs, *Prota*. Wageningen, Pays-Bas.

Brockwell, J., Searle, S.D., Thies, J.E. & Woods M.J. (1999) Provisional recommendations for inoculant strains for 20 species of Acacia. *Proceedings of the Twelfth Australian Nitrogen Fixation Conference* (eds J. Slattery & E. Curran),. Aust. Soc.Nitro.Fixat, Rutherglen, Australia. 76 –78.

Broughton, W.J., Jabbouri S., et Perret X. (2000) Keys to symbiotic harmony. *J. Bact.*182, 5641-5652.

Bryan, J. A., Berlín, G. P. y Gordon, J. C. (1996) Toward a new concept of evolution of symbiotic nitrogen fixation in the Leguminosae. *Plant.Soil*, 151-159.

-C-

Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D. K., Bauer, W. D., (1988) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170, 3164 – 3169.

Chahboune, R., Barrijal, S., Moreno, S., Bedmar, E. J. (2012) *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. Isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* 35,302–305.

Chahboune, R., Barrijal, S., Moreno, S., Bedmar, E.J. (2011a) Characterization of *Bradyrhizobium* species isolated from root nodules of *Cytisus villosus* grown in Morocco. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 440–445.

Chakrabarti, S., Lee, M.S., Gibson, A.H. (1981) Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium* species. *Soil. Biol. Biochem.*13, 349–354.

Chang, Y.L., Wang, J.Y., Wang, E.T., Liu, H.C., Sui, X.H., Chen, W.X. (2011) *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea* grown in Southern China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2496-2502.

Chelius, M.K., Triplett, E.W. (2000) Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 783–787.

- Chen**, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., de Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P. (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. syst. Evol. Microb.* 51, 1729–1735.
- Chen**, W.M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G., Boivin-Masson C. (2003) Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* 185, 7266–7272.
- Chrispeels**, M.J., Sadava, D.E. (2003) *Plants, Genes, and Crop Biotechnology*. Johns and Bartlett Publishers, Boston.
- Clements**, J.C., Buirchell, B.J., Yang, H., Smith, P.M.C., Sweetingham, M.W., Smith, C.G. (2005a) Lupin. Chapter 9. In: Singh RJ, Jauhar PP (eds) *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement*. vol 1, grain legume. CRC Press, Florida, pp.213-323.
- Clements**, J.C., White, P.F., Buirchell, B.J. (1993) The root morphology of *lupinus angustifolius* in relation to other *Lupinus* species. *Aus. J. Agr. Res.* 44, 1367-1375.
- Cocking**, E.C. (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant. Soil.* 252, 169–175.
- Cooper**, J.E. (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1355-1365.
- Coutinho**, H.L.C., Oliveira, V.M., Lovato, A., Maia, A.H.N., Manfio, G.P. (1999) Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Appl. Soil. Ecol.* 13, 159–167.
- Cowling**, W. A., Buirchell, B. J., Tapia, M. E. (1998) *Lupin*. *Lupinus L.* (n° 23). Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 105 p.
- Cronquist**, A. (1988) *The Evolution and Classification of flowering plants*. Bronx, New York. U.S.A.: New York Botanical Garden.
- Crutzen**, P.J., Mosier, A.R., Smith, K.A., Winiwarter, W. (2007) N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* 7, 11191-11205.
- Curatti**, L., and Rubio, L. M. (2014). Challenges to develop nitrogen-fixing cereals by direct *nif*-gene transfer. *Plant Sci* 225, 130–37.

-D-

- Dashti**, N., Khanafer, M., El-Nemr, I., Sorkhoh, N., Ali, N. & Radwan, S. (2009) The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere*, 74(10), 1354-1359.
- Davet**, P. (1996) *Vie microbienne du sol et production végétale*. INRA ed. 383 p.

- Dazzo**, F. B. (1984) Leguminous root nodules. In: Experimental Microbial Ecology.
- De Felipe**, M. R. (2006) Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones, Edited by E. Bedmar, J. Gonzálo, C. Lluch y B. Rodelas. Granada: Sociedad Española de Microbiología (SEFIN). pp. 9-16.
- Debellé**, F., Moulin, L., Mangin, B., Dénarié, J., Boivin, C. (2001) Nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. Acta. Biochimia. Polonia. Mini. review.48 (2), 359–365.
- Del Papa**, M.F., Balagué, L.J., Castro, S.C., Wegeneger, C., Segundo, E., Martinez-Abarca, F.M., Toro, N., Niehaus, K., Pühler, A., Aguilar, O. M., Martinez-Drets, G., and Lagares, A. (1999) Isolation and characterization of alfalfa nodulating rhizobia present in acid soils of central Argentina and Uruguay. Appl. Environ. Microbiol. 65,1420-1427.
- Delarras**, C. (2007) Milieux de culture et tests biochimiques pour l'identification bactérienne. In Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. ISBN. EM inter. 126-172.
- Dénarié**, J., Debellé, F., Promé, J. C. (1996) *Rhizobium* lipo-chito-oligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu. Rev. Bioch. 65,503 – 535.
- Dommergues**, Y. R., 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. France.
- Dommergues**, Y., Duhoux, E., Diem, H.G. (1998) Les arbres fixateurs d'azote. Eds Espace 34, Editions Scientifiques et Culturelles. p 499.
- Doré**, T., Le Bail, M., Martin, P., Ney, B., Roger. Estrade J., (2006) L'agronomie aujourd'hui. Ed. Quae. Paris. 367p.
- Doucet**, R. (2006) Le climat et les sols agricoles. ed. Berger, Eastman, Québec. xv, 443pp.
- Downie**, J.A. (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. Current. Biol. 15, 6 .
- Doyle**, J.J., Luckow, M.A. (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant. Physiol. 131, 900–10.
- Doyle**, J.J. (2011) Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. Mol. Plant-Microbe Interact. 24, 1289–1295.
- Drummond**, C.S., Eastwood, R.J., Miotto, S.T., Hughes, C.E. (2012) Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): testing for key innovation with incomplete taxon sampling. Syst. Biol. 61,443–460.

Duhoux, M., Nicole, M. (2004) Biologie Végétale. Associations et Interactions chez les plantes Dunod. Efron, B. 1979. Bootstrap methods: an other look at the jackknife. *Annals.Statist.* 7, 1–26.

Durán, D., Rey, L., Navarro, A., Busquets, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. (2014) *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. *Syst.Appl. Microbiol.* 37, 336–341.

Durán, D., Rey, L., Sánchez-Cañizares, C., Navarro, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. (2013) Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 128–136.

-E-

Eaglesham, A. R. J., Szalay, A. A. (1983) Aerial stem nodules on *Aeschynomenes* spp. *Plant.Sci.Lett.* 29, 265-272.

Eardly, B. D., Young, J. P., Selander, R. K. (1992) Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1809-1815.

Eastwood, R. J., Hughes, C. E. (2008) Origins of domestication of *Lupinus mutabilis* in the Andes. In J. A. Palta & J. B. Berger (Eds.), *Proceedings of the 12th International Lupin Conference—Lupins for health and wealth*. Fremantle, Australia, pp. 373-379.

Eckhardt, M.M., Baldwin, I.R., Fred, E.B. (1931) Studies on the root-nodule bacteria of *Lupinus*. *J. Bacteriol.* 21, 273–285.

Elmerich, C. (1993) Fixation biologique de l'azote. *Annales de l'Institut Pasteur.* 4, 133–153.

-F-

Farissi, M., Aziz F., Bouizgaren A., Ghoulam, C. (2014) La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *Int J , Innovat. Sci. Res.* 11(1) , 96-104.

Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., Spratt, B. G. (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *FEMS Microb. Rev.* 186, 1518-1530.

Ferval, M. (2014) Des outils moléculaires aux outils biochimiques : caractérisation des relations de parenté au sein du genre *Lupinus* (*Fabaceae*) avec une attention spéciale sur le complexe *L. montanus* au Mexique. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse 3 Paul Sabatier. 35p.

Foster, C. M., Horner, H. T., Graves, W. R. (1998) Nodulation response of woody Papilionoid species after inoculation with rhizobia and soil from Hawaii, Asia and North America. *Plant.Soil.* 205, 103-111.

Franche ,C., Lindström, K., Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant. Soil.* 321, 35–59.

Frank, B. (1889) Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Bet. Dtsch. Bot. Ges.* 7, 332–346.

Froidmont, E., Leterme, P. (2005) La valorisation des protéagineux dans l'alimentation du bétail. *Unité de Zootechnie. France.* 1-7.

Fuentes, E., Planchuelo, A.M. (2000) Wild lupins as pioneers on Riverside sand Banks in: van Santen, E., Wink, M., Weissmann, S., Römer, P. (Eds.), *Lupin, an ancient crop for the new millennium. Proceedings of the 9th International Lupin Conference*, Klink, Germany, p. 316-319.

-G-

Gage, D., et Margolin, W. (2000) Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr. Op .Microbiol.* 3(6), 613–7.

Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., Young, J. P. W. (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2037-2048.

Geddes, B.A., Ryu, M.H., Mus, F., Garcia Costas, A., Peters, J.W., Voigt, C.A., Poole, P. (2015) Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N-fixation to cereals. *Curr. Op. Biotechnol.* 32, 216–222.

Gevers, D., Cohan., F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F.L., Swings, J. (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 733–739.

Gibson, A.H., E. Harper, J. (1985) Nitrate Effect on Nodulation of Soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Science - Crop. Sci.* 25.

Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Döbereiner, J., De Ley, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. syst. Bacteriol.* 39, 361–364.

Giraud, E., Moulin, L., Vallen, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuill, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C., Sadovsky, M. (2007) Legume symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science.* 316, 1307–1312.

Gladstones, J. S. (1998) Distribution, origin, taxonomy, history and importance. In J. S. Gladstones, C. Atkins & J. Hamblin (Eds.), *Lupins as crop plants: biology, production and utilization*. Wallingford, UK: CAB International. (p. 1-37).

Gnanamanickam, S.S. (2007) Plant-associated bacteria. SpringerVerlag, Dordrecht, The Netherlands, 423-505.

Gomes-Barcellos, F., Menna, P., da Silva Batista, J. S., Hungria, M. (2007) Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. Appl. Environ.Microbiol. 73, 2635-2643.

Gough, C. (2009) *Medicago truncatula*, un modele pour l'étude des endosymbioses racinaires. Biofutur. 298, 30-32.

Graham, P. H., Parker, C. A. (1964) Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. Plant.Soil. 20, 383-386.

Graham, P., Vance, C.P. (2000) Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. Field. Crops.Res. 65, 93–106.

Graham, P.H. (2008) Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. In: Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds) Nitrogen-fixing leguminous symbioses. Springer, Dordrecht, 23–43 pp.

Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferray, M., Conriy, M.J., Hammer, B.E., Martínez, E., Aarans, S.R. Quinto, C., (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and initial on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. In: Can. J. Microbiol., 40, 198-207.

Graham, P.H., Sadowsky, M.J., Kersters, H.H., Barnet, Y.M., Bradley, R.S., Cooper, J.E., De Ley, D.J., Jarvis, B.D.W., Roslycky, E.B., Strijdom, B.W., Young, J.P.W. (1991) Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. Int. J. syst. Bacterio. 41, 582–587.

Graham, P. H. (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Canadian Journal of Microbiology. 38 (6), 475-484.

Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M.E., Abdelmoumen, H., Quiñones, M. A., El Idrissif, M.M., Velázquez, E., Fernández-Pascualb, M., Bedmar, E.J., Peix, A. (2013) Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp.nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. Syst.Appl. Microbiol. 36(4), 218-223.

Guiraud, J. P . (1998) Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris.

-H-

Hackbarth, I., Troll, H.J. (1956) Lupins as grain legumes and foddercrops. In: Handbuch der Pflanzenzu chtung. Verlag PaulParey, Berlin, IV, pp 1–51 .

Hanage, W. P., Kaijalainen, T., Herva, E., A., S., Syrjänen, R., Spratt, B. G. (2005) Using Multilocus Sequence Data to define the *Pneumococcus*. J. Bacteriol. 187, 6223-6230.

Hassan, S., and Mathesius, U. (2012) The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling : opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J.exprim.Botany*. 63(9),3429-3444.

Haukka, K., Lindström, K., Young, P.W. (1998) Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 419–426.

Hennig, W. (1966) *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana.

Hopkins, W.G., (2003) *Physiologie végétale*. 1re éd. Bruxelles: De Boeck, xvii, 514 p.

Howieson, J.G., Ewing, M.A. (1989) Annual species of *Medicago* differ greatly in their ability to nodulate on acid soils. *Aust. J. Agric. Res.* 40, 843–850.

Huang, B., Chengqun, L.V., Yili Zhao, Rong, H. (2012) A Novel Strain D5 Isolated from *Acacia confuse*. *PLoS ONE*, Edited by Luis Herrera-Estrella, 7. 11, 49236 p.

Hughes, C. E. et Eastwood, R. (2006) Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(27), 10334-10339.

Hungria, M. and Franco, A. A. (1993) Effects of high temperatures on nodulation and N₂ fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant. Soil* 149, 95-102.

Huss-Danell, K. (1997) Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *Phytol.* 136, 375–405.

-I-

Iglesias, O., Rivas, R., Garcia-Fraile, P., Abril, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2007) Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 210-216.

ITIS (Integrated Taxonomic Information System) (2019) Search in plant kingdom for Scientific Name containing "*Lupinus*". <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>.

-J-

Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Donate-Correa, J., Rivas, R., Velázquez, E., Hernández, M., Temprano, F., Martínez-Molina, E., Ruiz-Argüeso, T., León-Barrios, M. (2003) Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 611–623.

Jarvis, B. D. W., Mc lean, T. S. Robertson, I. G. C., Fanning, G. R. (1977) Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* 20, 42-52.

Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1998) Multiple sequence alignment with ClustalX. Trends. Biochem. Sci. 23, 403-405.

Jordan, D.C. (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol.32(1), 136-139.

Jordan, D.C. (1984) Family III. *Rhizobiaceae*. Conn 1938.p.234-254. In :N.R Krieg and J.H. Holt (ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Vol 1. The William and Wilkins Co., Baltimore. 234- 242.

José, M.I., Velázquez, E., Pedro; F. M., Claudino,R.B., Emilio, C., Eustoquio, M.M. (2001) Cellulase isoenzyme profiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups. Plant.Soil .229, 35-39.

Journet, E.P., van Tuinen, D., Gouzy, J., Crespeau, H., Carreau, V., Farmer, M.J., Niebel, A., Schiex, T., Jaillon, O., Chatagnier, O., Godiard, L., Micheli, F., Kahn, D., Gianinazzi-Pearson, V. et Gamas, P. (2002) Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. Nucleic. Acids. Res. 30, 5579-5592.

-K-

Kaneko,T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto,S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA research. 9, 189.

Kasprzak, A., Šafář, J., Janda, J., Doležel, J., Wolko, B. & Naganowska, B. (2006) The bacterial artificial chromosome (BAC) library of the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Cel. Molecul. Biology. Lett, 11(3), 396-407.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol.16, 111–120.

Koltz, M. J. P. J. (1863) Le lupin, sa culture et ses usages. Iris - lilliad - Université Lille 1.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger data sets. Mol. Biol. Evol . 33(7), 1870–1874.

Kurlovich, B.S. (1995) “The Gene Bank and Breeding of Grain Legumes (lupine,vetch, soya and bean)” -Theoretical basis of plant breeding, Volume 3 (eds. B.S. Kurlovich and S.I. Repeyev), St. Petersburg, VIR, 423 p.

Kurlovich, B.S., Stankevich, A.K. (2002) Classification of Lupins. In: Kurlovich,B.S. (Ed.), Lupins. Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding,Publishing House “Intan”, St. Petersburg, pp. 39–88.

Kurtzman, C.P.,Boekhout T., Fell, J.W. (2010) The Yeasts, A Taxonomic Study. 5th Edition. Copyright Elsevier B.V. All rights reserved. Elsevier science: 2354p.

Kwon, S. W., Park, J. Y., Kim, J. S., Kang, J. W., Cho, Y. H., Lim, C. K., Parker, M. A., Lee, G. B. (2005) Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*

and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 263-270.

-L-

Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol.* 147, 981-993.

Lane, D. L., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D., Sogin, M. L., and Pace, N. R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82, 6955-6959.

Langer, R. H. M., Hill, G. D. (1991) *Agricultural Plants*, 2^{eme} edition. Cambridge University Press, New York.

Lanotte, P., Mereghetti, L., et Quentin, R. (2007) Démarche de l'examen bactériologique. In Denis F, Ploy M.C, Martin C, Bingen E, Quentin R. (eds). *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. Elsevier Masson SAS. 5-32.

Lapeyronie, A. (1982) *Les Productions fourragères méditerranéennes: tome 1*, Maisonneuve & Larose. Paris.

Laranjo, M., Alexandria, A., Oliveiraa, S. (2014) Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus Marta. *Microbiol. Res.* 169 (1), 2-17.

Le Gall, J., Senez, J.C. (1960) Influence of nitrogen fixation on the growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Comp. Rend. Hebdomad. Seanc. Academ. Scienc.* 250, 404-406.

Léveque, C et Mounolou J.C. (2001) *Biodiversité : Dynamique biologique et conservation*. Ed. Dunod. Paris. 248p.

Lewis, G., Schrire, B., MacKinder, B., Lock, M. (2005) *Legumes of the world*. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.

Liu J., Wang E.T. and Chen W.X. (2005) Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China, *Syst. Appl. Microbiol.*, 28, 465-477.

Lloret, L., Martínez-Romero, E. (2005) Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Lati. Am. Microbiol.* 47, 43 - 60.

Lograda, T., Chaker, A.N., Chalard, P., Ramdani, M., Chalchat, J.C., Silini, H. & G. Figueredo. (2009) Chemical composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Genista numidica* Spach. and *G. saharae* Coss et DUR. *Asian J. plant. Science.* 8 (7), 495-499.

Lucinski, R., Polcyn, W., Rotayczak, L. (2002) Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta. Biochimia. Polonia.* 49 (2), 537-546.

Lunge, V. R., Ikut, A. N., Fonseca, A.S.K., Hlrigoyen, D., Stoll, M., Bonatto, S. and Ozaki, L.S. (1994) Identification and inter-relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). World J. Microbiol. Biot. 10, 678-652.

-M-

Maâtallah, J., Berraho, E. B., Munoz, S., Sanjuan, J., et Lluch, C. (2002) Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. Agro. 22, 321-329.

Madigan, M., Martink, J. (2007) Brock Biologie des microorganismes 11e edition. Edition Person Education France. p. 599-601, 676-681.

Magnússon, B., Magnússon, S.H., Sigurdsson, B.D. (2004) Plant succession in areas colonized by the introduced Nootka lupin in Iceland in: van Santen, E., Hill, G.D. (Eds.), Wild and cultivated lupins from the tropics to the poles. *Proceedings of the 10th International Lupin Conference*, Canterbury, New Zealand, p. 19-24.

Mahdhi, M., Fterich, A., Rejili, M., Rodriguez-Llorente ID, Mars, M. (2011) Legumenodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. Anna. Microbiol. 62, 61–68.

Mahé, F. (2009) Phylogénie, éléments transposables et évolution de la taille des génomes chez les lupins. Thèse Doctorat, Université de Rennes 1. N° d'ordre : 3913. 49 p.

Maiden, M.C. (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. Annual Review. Microbiol. 60, 561–588.

Martensson, A.M., Brutti, L., Ljunggren, H. (1989) Competition between strains of *bradyrhizobium japonicum* for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. plant Soil. 117, 219-225.

Masepohl, B., Drepper, T., Klipp, W. (2005) Nitrogen Fixation in the Photosynthetic Purple *Bacterium Rhodobacter capsulatus*. Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free Living Bacteria, vol. II (Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J. R. and Newton, W. E., eds.), pp. 141-173.

Masson-Boivin, C., Bontemps, C., Golfier, G., Gris-Liebe, C., Talini, L. (2006) Détection et typage du gène nodC à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. Les Actes du BRG, 6, 97-110.

Mateos P.F., Jiménez - Zurdo J.L., Chen J.A.S., Squartini S.K., Haack E.M., Molina D.H., Hubbell F., et Dazzo B., (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. 58 (6), 1816-1822.

Mc Neil, D.L. (1982) Variations in Ability of *Rhizobium japonicum* Strains To nodulate Soybeans and Maintain Fixation in the Presence of Nitrate. Appl. Environ. Microbiol. 44, 647-652.

- McInnes**, A. & Thies, Janice & Abbott, Lynette & Howieson, John. (2004) Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities - A review. *Soil Biology & Biochemistry* - Soil. Biol. Biochem. 36. 1295-1308.
- McLenaghan**, R. D., Randhawa, P. S., Condrón, L. M. and Hong, J. Di (2004) Increasing Phosphate Rock availability using a Lupin Green Manure Crop. 3rd Australian New Zealand Soils Conference, 5 – 9 December 2004, University of Sydney, Australia.
- Medjahdi**, B., Ibn Tattou, M., Barkat, D., Benabedli, K. (2009) La flore vasculaire des monts ds trara (Nord Ouest Algérie) .*Acta Botanica Malacitana*. 34, 57-75.
- Meeks**, J.C., Elhai, J. (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free living and plant associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 94 – 121.
- Miller**, K .J., J.M Wood. (1996) Osmoadaptation by rhizosphère bacteria. *Ann. Review. Microbiol.* 50, 101-136.
- Mohamed**, S. H., Smouni, A., Neyra, M., Kharchaf, D. and Filali-maltouf, A. (2000) Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant. Soil.* 224, 171 - 183.
- Moreira**, F.M.S., Cruz, L., de Faria, S.M. (2006) *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Syst. Appl. Microbiol.*;29, 197– 206.
- Moschetti**, G., Peluso ,AL., Protopapa, A., Anastasio ,M., Pepe, O., Defez, R. (2005) Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP–16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum biovarviciae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 28, 619–631.
- Moulin**, L. (2002) Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène *nod A* à l'identification de rhizobia au sein des bêta-protéobactéries. Thèse de doctorat. Université Claude Bemard-LyonI.289p.
- Moulin**, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson C. (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*. 411, 948–950.
- Msaddak**, A., Durán, D., Rejili, M., Mars, M., Ruiz-Argüeso, T., Imperial, J., Pala-cios, J., Rey, L. (2017) Diverse bacteria affiliated with the genera *Microvirga*, *Phyllobacterium* and *Bradyrhizobium* nodulate *Lupinus micranthus* growing in soils of Northern Tunisia. *Appl. Environ. Microb.* 83, 2820-16.
- Msaddak**, A., Rejili, M., Durán, D., Rey, L., Palacios, J.M., Imperial, J. (2018) Definition of two new symbiovars, sv. *lupini* and sv. *mediterraneense*, within the genera *Bradyrhizobium* and *Phyllobacterium* efficiently nodulating *Lupinus micranthus* in Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 487–493.

-N-

Naganowska, B., Wolko, B., Śliwińska, E. & Kaczmarek, Z. (2003) Nuclear DNA National Academy of Sciences of the United States of America, 103(27), 10334-10339.

Nielsen, R. L. (2006) N Loss Mechanisms and Nitrogen Use Efficiency. Purdue Nitrogen Management Workshops.

Nishi, C.Y.M., Boddey, L.H., Vargas, M.A.T. and Hungria, M. (1996) Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. Symbio. 20, 147-162.

Nuntagij, A., Abe, M., Uchiumi, T., Seki, Y., Boonkerd, N. Higashi, S. (1997) Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from soybean cultivation in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 43(3), 183-187.

-O-

Ott, T. V., Dongen, J.T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., Udvardi, M.K. (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Curr. bio. 15, 531–535.

-P-

Page, V., Weisskopf, L. & Feller, U. (2006) Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. New Phytologist, 171(2), 329-341.

Palinska, K. A., Jahnus, T., Rippka, N.T. (2000) *Prochlorococcus marinus* strain pcc 9511, apicoplanktonic cyanobacteris synthesize the smallest uréase. Microbiol. 146, 3099-3107.

Pascual, H. (2004) *Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), nueva y sorprendente especie oï-descubierta en España. An. Jardin. Botánico. 61, 69-72

Pawłowski, K. et Bisseling, T. (1996) Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? Plant. Cell. 8, 1899-1913.

Pawłowski, K., et Bisseling, T. (1996) Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features?. Plant .Cell. 8, 1899-1913.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Flores-Félix, J.D., Alonso de la Vega, P., Rivas, R., Mateos, P.F., Igual, J.M., Martínez-Molina, E., Trujillo-Toledo, M.E., Velázquez, E. (2015) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 1213–1219.

Pelmont, J. (1995) Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires. 2, 541-572.

- Peñalosa, J. M., Carpena, R. O., Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M. J. (2007).** Chelate assisted phytoextraction of heavy metals in a soil contaminated with a pyritic sludge. *Science of The Total Environment*, 378(1-2), 199-204.
- Peret, B. (2007)** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier III (France).70p.
- Perret, X., Staehelin C., Broughton, W.J. (2000)** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbio. Molec. Bio. Rev.* 64, (1), 180-201.
- Perrière, G., et Brochier-Armanet, C. (2010)** Concepts et méthodes en phylogénie moléculaire. Springer-Verlag France : p250.
- Perry, B.J., Akter, M.S., Yost, C.K . (2016)** *Rhizobium* Research ;Interactions végétalesmicrobes centrées sur *Rhizobium* .*Front. Microbiol.* 7, 1873.
- Perry, J.J., staley J.T. & S. Lory. (2004)** Microliologie. Edition Dunod, Paris. *Phytolo.* 147, 449–481.
- Pesson, P. J. Louveaux, J. (1984)** Pollinisation et productions végétales. *Sci. Paris.*
- Peter, H. J. (2006)** Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3),1719–1728.
- Peters, N. K., Frost, J. W., Long, S. R. (1986)** A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Sci.* 233, 977 - 980.
- Peterson, B. K., Hare, E. E., Iyer, V. N., Storage, S., Conner, L., Papaj, D. R. (2009).** Big genomes facilitate the comparative identification of regulatory elements. *PLoS ONE*, 4(3), e4688.
- Pinochet, X., Salon, C., Jeuffroy, M. H., Touraine, B. et Cleyet-Marel, J. C. (2006)** Amélioration de la gestion de l'azote par les bactéries favorables à la croissance des plantes. Académie d'Agriculture. 25 octobre 2006.
- Plitmann, U. et Heyn, C. C. (1984)** Old World *Lupinus*: Taxonomy, evolutionary relationships and links with New World species. In *Proceedings of the Third International Lupin Conference* (p. 55-66). La Rochelle, France.
- Poiret D., 2014 :** le lupin a son pourcentage élevé en protéines. édition :Mr plante. disponible à l'adresse : <http://www.mr-plantes.com/2014/04/le-lupin-a-son-pourcentageeleve-en-protéines/>.

-Q-

Quezel, P., et SANTA, S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome 1. Ed. Centre national de la recherche scientifique. Paris ; France.

-R-

- Ramirez-Bahena**, M.H, Peix, A, Rivas, R., Raul, Camacho, M, Rodriguez-Navarro, D.N., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Willems, A., Velazquez, E. (2009) *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. Int. J. Syst. Evol. Microb. 59, 1929-1934.
- Rao**, D.L.N., Mohanty, S.R., Chinmayee, A, Nagvanti, A. (2018) Rhizobial Taxonomy- Current Status. IUNFC Newsletter. 3, 1- 4.
- Raymond**, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., Blankenship, R. E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. Mol. Biol. Evol. 21, 541-554.
- Raza**, S., Jornsgard ,B., Abou-Taleb, H., & Christiansen J. L. (2001) Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. Lett. Appl. Microbiol. 32 (6), 379-383.
- Rees**, D. C., Howard, J. B. (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. Chem. Biol. 4, 559-566.
- Ricklefs** et Miller. (2005) Ecologie. Ed. De Boeck université. Paris. 858p.
- Rivas**, R., García-Fraile, P., Velázquez, E. (2009) Taxonomy of bacteria nodulating legumes. Microbiol. Insi. 2, 51-69.
- Rivas**, R., Laranjo, M., Mateos, P. F., Oliveira, S., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2007) Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. Lett. Appl. Microbiol. 44, 412-418.
- Rivas**, R., Peix, A., Mateos, P.F., Trujillo, M.E., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2006) Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulate chickpea in different Spanish soils. Plant. Soil 287, 23-33.
- Rivas**, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P.F and Martínez- Molina, E. (2001) A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. Electrophoresis 22, 1086- 1089.
- Rivas**, R., Velazquez, E., Willems, A., Vizcaino, N., Subba-Rao, N.S., Mateos, P.F., Gillis, M., Dazzo, F.B., Martínez-Molina, E. (2002) A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5217-5222.
- Roche**, P., Maillet, F., Plazenet, C., Debelle, F., Ferro, M., Truchet, G., Promé, J. K., Dénarié, J. (1996) The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 15305-15310.
- Rogel**, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martinez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. Sys. App. Microbio. 34, 96-104.

Rose, M.R. et Mueller L.D. (2006) Evolution and ecology of the organism. Ed. Pearson. 693p.

-S-

Sadowsky, M.J. and Graham, P.H. (1998) Soil biology of the Rhizobiaceae. 155-172 p

Saeki, Y., Akagi, I., Takaki, H. Nagatomo, Y. (2000) Diversity of indigenous *Bradyrhizobium* strains isolated from three different Rj-soybean cultivars in terms of randomly amplified polymorphic DNA and intrinsic antibiotic resistance. *Soil. Sei Plant. Nutr.* 46(4), 917-926.

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.

Saleena, L. M., LOGANATHAN, P., RANGARAJAN, S. and NAIR, S. (2001) Genetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from Arachishypogaea. *Can. J. Microbiol.* 47(2), 118-122.

Sánchez-Cañizares, C., Rey, L., Durán, D., Temprano, F., Sánchez-Jiménez, P., Navarro, A., Polajnar, M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. (2011) Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 207–215.

Schultze, M., Quiclet-Siret, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D., Kondorosi, A. (1992) *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 192-196.

Schumpp, O., and Deakin, W.J. (2010) How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. *Trends in Plant Science* 15 (4), 189-195.

Segovia, L., Young, J. P., Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 374-377.

Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., and Sadowsky, M. J. (2017) Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbio.* 71, 91–109.

Shamseldin, A.M., El-Saadani, M., Sadowsky, and An., Chung, S. (2009) Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) by analysis of *nodC*, ARDRA and rDNA sequence analysis. *Soil. Biol. Biochem.* 41, 45-53.

Sharma, P. K., Kundu, B.S., Dogra, R. C. (1993) Molecular mechanism of host specificity in legume-rhizobium symbiosis. *Biotech. Adv.* 11, 741-779.

- 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.
- Sikora, S.**, Redzepovic, S., bradic, M. (2002) Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. Microbiol. Res. 157(3), 213-219.
- Sikora, s.**, redzepovic, s., pejic, i. and kozumplik, v. (1997) Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting. J Appl. Microbiol. 82(4), 527-531.
- Sokal. R.R.**, et Michener, C. D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. of Kans. Sci. Bull. 38, 1409-1438.
- Somasegaran, P.** and H. J. Hoben. (1985) Methods in legume-*Rhizobium* technology, Niftal. Hawaii, 128-138.
- Somasegaran, p.** and hoben, H.J. (1994) Handbook for Rhizobia.. Springer Laboratory. Paia, Hawaii, USA. 450p.
- Spaink, H.P.** (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 54, 257–288.
- Sparks D. L. 2002.** Advances in Agronomy. Volume 76. Academic Press, London.
- Sprent, J.I.**, James, E.K. (2007) Legume evolution : where do nodules and mycorrhizas fit in?. Plant. Physiol. 144, 575–581.
- Stackebrandt, E.**, Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, A.D. K.a. P, Maiden, M.C.J., Nesme, X., Swings J., Tru, H.G., Ward, A.C et al. (2002) Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1043–1047.
- Stackebrandt, E.**, Witt, D., Kemmerling, c., Kroppenstedt, R., and Liesack, W. (1991) Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1468-1477.
- Steenhoudt, O.**, Vanderleyden, J. (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS. Microbiol. Rev. 24, 487–506.
- Stępkowski, T.**, Banasiewicz, J., Granada, C.E., Andrews, M., Passaglia, L.M.P. (2018) Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the tribe *Genisteeae*. Gene 9 (3), 163, <http://dx.doi.org/10.3390/genes9030163>, pii: E163.
- Stępkowski, T.**, Hughes, C.E., Law, I.J., Markiewicz, L., Gurda, D., Chlebicka, A., Moulin, L. (2007) Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. Appl. Environ. Microbiol. 73, 3254–3264.

Stępkowski, T., Moulin, L., Krzyżńska, A., McInnes, A., Law, I.J., Howieson, J.(2005) European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.*71, 7041–7052.

Stępkowski, T., Zak, M., Moulin, L., Króliczak, J., Golińska, B., Narożna, D., Safronova, V.I., Mańczak, C.J. (2011) *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* 34,368–375.

Stępkowski, T., Czaplinska, M., Miedzinska, K., Moulin, L. (2003) The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 483-494.

Stowers, D.M., et Eaglesham, R. J. A.(1984) Physiology and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. *Plant.Soil.*77, 3-14.

Stowers, M. D. (1985) Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 89-108.

Strimmer, K. S. (1997) Maximum likelihood methods in molecular phylogenetics. Doctoral Thesis. University of Munich. Herbert Utz Verlag.

Struffi, P., Corich, V., Giacomini, A., Benguedouar, A., Squartini, A., Casella, S et Nuti, M.P. (1998) Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.*84 , 81-89.

Sullivan, J. T., Heather, N. P., Lowther, W. L., Scott, D. B., Ronson, C. W. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8985-8989.

Swaraj, K., Bishnoi, N.R. (1999) Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 37 (9) ,843-848.

Swofford, D. L., Olsen, G. J., Wadell P. J. & Hillis D. M. (1996) Chapter 11: Phylogenetic inference. In: *Systematic Biology* (Hillis, D. M., Moritz, C., and Mable, B. K., eds.). Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts.

-T-

Taiz, L., Zeiger, E. (2003) *Plant Physiology*. 3rd edition, Panima Publishing Corporation, New Delhi-Bangalore,1-690.

Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J. (2005) Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant.Soil.* 270, 223-232.

Thami-Alami, I., Elbouthiri, N., Udupa, S.M. (2010) Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco. In: Porqueddu C, Rios S (eds) *The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity*. Zaragoza, Cihem/cibio/fao/seep, pp 265–269.

The Legume Phylogeny Working Group. (2013) Legume phylogeny and classification in the 21st century : Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon.* 62 , 217–248.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 24, 4876-4882.

Torche, A., Benhizia, H., Rosselli, R., Romoli, O., Zanardo, M., Baldan, E., Alberghini, S., Tondello, A., Baldan, B., Benguedouar, A., Squartini, A., Benhizia, Y. (2014) Characterization of bacteria associated with nodules of two endemic legumes of Algeria, *Hedysarum naudinianum* and *H. perrauderianum*. *Ann. Microbiol* 64,1065–1071.

Trujillo, M.E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1318–1327.

-U-

Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K., Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M., Minamisawa, K. (2004) Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.* 186, 2439-2448.

Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., Matsuguchi, T. (1995) Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* fragment. *J. Bacteriol.* 177, 468-472.

-V-

Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., Velázquez, E. (2006) *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2631-2637.

Valverde, A., Velazquez, E., Fernandez-Santos, F., Vizcaino, N., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Igual, J.M., Willems, A. (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Food. Microbiol.* 55,1985–1989.

Van Rossum, D., Schuurmans, F.P., Gillis, M., Muyotcha, A., van Verseveld, H.W., Stotthamer, A.H., Boogerd, F.C. (1995) Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating Peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl. Env. Microbiol.* 61 , 1599-1609.

Vandamme, P., Coenye, T. (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 54, 2285–2289.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial syst. *Microbio. Res.* 60,407–438.

Velázquez, E., Valverde, A., Rivas, R., Gomis, V., Peix, A., Gantois, I., Igual, J.M., León-Barrios, M., Willems, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. (2010) Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 97, 363–376.

Vilain, M. (1997) La production végétale : les composantes de la production. Ed. TEC et DOC. 478p.

Vincent, J.M. (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. In: IBP Handbook, Blackwell, Oxford, UK.

Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D., Martínez-Romero, E. (2005b) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoideae: Genisteeae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 569–575.

Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., Werner, D. (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2096-2104.

-W-

Wall, L. G., Hellsten, A., Huss-Danell, K. (2000) Nitrogen, phosphorus, and the ratio between them affect nodulation in *Alnus incana* and *Trifolium pratense*. *Symbio.* 29, 91-105.

Wang J.Y., Zhang, Y. M., Wang, R., Liu, H. C., Wang, E. T., Sui, X. H. & Chen, W. X. (2012) *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *Int J Syst. Evol. Microbiol.* 63, 616–624.

Wang, H., Noren, A. (2006) Metabolic regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 160-161.

Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z., Chen, W. X. (2003) Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1575- 1583.

Wei, G. H., X. Y., Yang, Z. X., Zhang, Y. Z., Yang, and K., Lindstrom. (2008) Strain *Mesorhizobium* sp. CCNWGX035; A stress tolerant isolate from *Glycyrriza glabra* displaying a wide host range of nodulation. *Pedosphere* 18, 102-112.

Weir, B.S. (2016) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. Last updated: X Jan, 2016.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.

Willems, A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, 287, 3–14.

Williams, J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.

Wink, M. (1992) The role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. In E. A. Bernays (Ed.), *Insect-plant interact.* 4, 131-166.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271.

Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G. (1984) The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5, 315–326.

-X-

Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan, H. (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706-711.

-Y-

Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He, S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., Wang, Y., Elmerich, C., Lin, M., Jin, Q. (2008) Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the Nat. Acad. of Sci. U. S. A.* 105, 7564 – 7569.

Yang, Z. (1996) Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. *J. Mol. Evol.* 42, 587–596.

Young, J.M. (2003). The genus name *Ensifer Casida* 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination “*Sinorhizobium adhaerens*” Casida 1982. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(6), 2107-2110.

-Z-

Zahran, H. H., Ahmad, M. S., Abdel-Fatteh, M., Zaki, A. Y. (1999) Phenotypic characteristics, cross nodulation and nitrogen fixation of root nodule bacteria isolated from wild leguminous plants in Egypt. *Proc. Int. Symp. Biol. Nit. Fix. and Crop Prod.* 77-90.

Zahran, H.H. (2001) Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and Biotechnology. *J. Biotechnol.* 91, 143-153.

Zakhia, F., de Lajudie, P. (2006) Modern bacterial taxonomy: techniques review-application to bacteria that nodulate leguminous plants (BNL). *Cana. J. Microbiol.* 52, 169–181.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., de Lajudie, P. (2004) Characterisation of Legume-Nodulating Bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. *Syst. App. Microbio.* 27, 380–395.

Zhang, F. T. C., Charles, B. Pan, and D. L. Smith. (1996) Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum nod* genes at low temperatures. *Soil. Biol. Bioch.* 28, 1579- 1583.

Zhang, X.X., Harper, R., Karsisto, M., Lindström, K. (1991) Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 104–113.

Zurdo-Pineiro, J.L., Rivas, R., Trujillo, M.E., Vizcaino, N., Carrasco, J.A., Chamber, M., Palomares, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velazquez, E. (2007) *Ochrobactrum cytisi* sp. nov. isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *Int. J. syst. evol. microbiol.* 57, 784–788.

Annexes

Annexe I Analyse physico-chimique du sol

* Préparation des échantillons de sols pour analyse physico-chimique

L'échantillon destiné au laboratoire est soumis à différents traitements:

- réception - identification - séchage à l'air.
- réduction des mottes.
- tamisage (avec pesée du refus si nécessaire) sur tamis 2mm.

1- Analyse granulométrique :

- La granulométrie a été déterminée par la méthode internationale à la pipette de Robinson.
- Dans un bécher de 600 ml, mettre 15g de terre fine séchée et tamisée.
- Ajouter 50 ml de l'eau oxygénée (H_2O_2) à 20 volumes. Le H_2O_2 est utilisé pour éliminer la matière organique.
- Recouvrir le bécher afin d'éviter les projections pendant la période de l'effervescence.
- Mettre le bécher sur un bain de sable dont la température ne dépasse pas 85 à 90°C pendant 24h. Si une ébullition trop forte se manifestait, l'eau oxygénée se décompose très rapidement. Si la terre est humifère l'effervescence peut produire une mousse abondante risquant de déborder, ce phénomène peut être évité en ajoutant quelques gouttes d'alcool éthylique.
- A la fin de l'effervescence, faucher pendant 2 h pour éliminer l' H_2O_2 en excès et terminer par 10 min d'ébullition (on peut accélérer l'élimination de l'excès d'eau oxygénée en ajoutant quelques gouttes d'ammoniaque).
- S'assurer que toute l'eau oxygénée a disparu en versant quelques gouttes du liquide chaud 60°C dans une solution de permanganate de potassium, en présence d'eau oxygénée le permanganate de potassium se décolore.
- Laisser refroidir puis transvaser à l'aide d'un jet de pissette dans un flacon de sédimentation à large ouverture et jaugé de 750 ml.
- Verser dans le flacon, 15 ml d'hexaméthaphosphate de sodium 50 g/l. Cette solution alcaline a pour rôle de disperser les particules qui ont tendance à s'agglomérer.
- Compléter avec de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge 750 ml.
- Agiter le flacon durant une heure sur un agitateur magnétique.
- Porter le flacon à proximité de la pipette de Robinson qui doit être placée dans une pièce à température constante.

***Prélèvement des argiles, des limons fins et des limons grossiers (particules à w 50 microns):**

- Maintenir la température à 20°C, agiter immédiatement par retournement répété de manière à mettre en suspension toute la terre.
- Poser très rapidement le flacon et laisser décompter pendant 46 secondes à 20°C.
- Au bout de 46 secondes et à 10cm de profondeur, Prélever 10ml de liquide.
- Transvaser les 10 ml prélèvements et l'eau de rinçage de la pipette dans une capsule en verre pyrex.
- Porter la capsule dans une étuve à dessiccation à température 105°C
- Après évaporation totale, peser la capsule et son contenu sec.
- Par différence avec le poids de la capsule vide, déterminer le poids P1 de sédiment. (Argile + limons fins + limons grossiers + hexaméthaphosphate de sodium) contenu dans 10 ml de suspension.

***Prélèvement du mélange des argiles et des limons fins (particules à $\emptyset < 20$ microns):**

- Après agitation et retournement du liquide, laisser déposer durant 4 min 48 seconds. Et de la même façon que précédemment, prélever 10 ml du liquide.
 - Transvaser le prélèvement dans une capsule en verre pyrex.
 - Faire évaporer puis peser la capsule.
- Par différence avec le poids de la capsule vide, déterminer le poids P2 du sédiment (Argile + limon fin + hexaméthaphosphate de sodium) contenu dans 10 ml de suspension.

***Prélèvement des argiles (particules à $\emptyset < 2$ microns):**

- Agiter et laisser sédimenter 8h et effectuer le prélèvement de 10 ml.
- Peser comme précédemment P3 (Argile + hexaméthaphosphate de sodium) dans 10 ml de suspension.

***Prélèvement de l'hexaméthaphosphate de sodium :**

- Verser 15 ml d' hexaméthaphosphate de sodium dans un flacon jaugé de 750 ml. Compléter le volume au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée.
- Agiter puis faire un prélèvement à la pipette Robinson comme précédemment.
- Transvaser le prélèvement dans une capsule en verre pyrex.
- Faire évaporer puis peser la capsule et son contenu sec P₄.

- Déterminer comme précédemment le poids correspondant à la surcharge en hexaméthaphosphate de sodium contenu dans 10 ml de suspension.
- D'après les pesées P_1 , P_2 , P_3 et P_4 calculer les taux des Argiles, limons fins et limons grossiers.
- Tamiser et peser les sables fins et sables grossiers, pour les sables grossiers utiliser un tamis de 200 μm et pour les sables fins un tamis de 50 μm .

2-Détermination de l'humidité résiduelle des échantillons de sols

- Peser 5 g de l'échantillon de sol tamisé à 2 mm dans une coupelle en aluminium préalablement taré.
- Placer l'ensemble à l'étuve à $105^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ jusqu'à masse constante pendant une nuit, soit environ 15 heures suffit généralement.
- Puis peser l'ensemble.
- Déterminer l'humidité résiduelle (HR) de l'échantillon de sol préparé pour l'analyse en pourcentage :

$$\text{HR (\%)} = ((m_0 - m_1) / m_0) * 100$$

m_0 est la masse (en g) de la prise d'essai

m_1 est la masse de la prise d'essai après séchage

3-Mesure du pH (pH_{eau} , pH_{KCl})

Le pH fait partie d'une des plus importantes caractéristiques physico-chimiques des sols, car la spéciation, et donc la mobilité et la biodisponibilité des éléments traces métalliques sont liées à sa valeur. Le pH est défini par la relation :

$$\text{pH} = - \log a [\text{H}^+]$$

Les mesures de pH_{eau} et pH_{KCl} sont effectuées selon AFNOR (AFNOR X31-103/AFNOR X31-104).

Principe

- La mesure du pH s'effectue sur une suspension de terre fine.
- Le pH_{eau} mesure l'acidité réelle et prend en compte les ions H_3O^+ libres dans la solution du sol.

- Le pH_{KCl} mesure l'acidité potentielle qui prend en compte les ions H_3O^+ libres dans la solution du sol et ceux déplacés par le KCl .

Mode opératoire

- Après étalonnage du pH mètre (Sartorius) avec les solutions étalon à $pH = 4 ; 7$ et 10 Peser
- 10 g de sol sont mis en suspension dans 25 mL d'eau distillée / ou de chlorure de potassium KCl (1 mol.L^{-1}) dans un bêcher de 50 ml.
- Agiter pendant 1heure sur une plaque d'agitation
- Puis laissés au repos pendant 2heures
- Plonger l'électrode avec précaution dans le liquide surnageant et effectuer la mesure.
- Laisser la lecture se stabiliser durant plusieurs secondes.

Classification des sols en fonction du pH

Valeur du pH (pH_{eau} , pH_{KCl})	Qualification du sol
<à5	Fortement acide
Entre 5 et 6	Franchement acide
Entre 6 et 6.6	Légèrement acide
Entre 6.6 et 7.4	Neutre
Entre 7.4 et 7.8	Légèrement alcalin
> à 7.8	Alcalin

4-Dosage du carbone et de la matière organique

4-1 Le taux de carbone :

- Utiliser un sol finement broyé et passé au tamis (0.2 mm).
- Peser 0.25 g de sol, introduire la prise dans un ballon pyrex avec réfrigérant ascendant, ajouter 10 ml de solution de bichromate à 8% et 15 ml d'acide sulfurique H_2SO_4 pure.
- Porter à ébullition douce pendant 5 min après la chute de la première goutte de condensation.
- Laisser refroidir puis transvaser dans une fiole jaugée de 100 ml et ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau de rinçage du ballon.
- Homogénéiser le contenu de la fiole qui doit être à une température de $20^\circ C$ puis prélever 20 ml de ce liquide.
- Mettre les 20 ml dans un bêcher en verre ordinaire de 400 ml et y ajouter :

- 200 ml d'eau déminéralisée.
- 1.5g de fluorure de sodium (FNa) en poudre.
- 3 à 4 gouttes de diphénylamine. (Indicateur coloré, qui vire au vert foncé lorsque l'excès de bichromate est réduit).
- Placer le bécher sur un agitateur magnétique sur monté d'une burette graduée au 1/20 du millilitre.
- Agiter puis titrer l'excès de bichromate avec une solution de MOHR à 0.2N (la couleur passe du bleu foncé au bleu-vert).
 - Soit X le volume (ml) de la solution de Mohr versée.
 - Le témoin est réalisé avec ou sans sable calcimé. Soit Y le volume de solution de MOHR versée. Le taux de carbone de l'échantillon est calculé par la formule suivante :

$$C\% = (Y - X) \times 0.615 \times (5 \times 100) / p$$

P: poids de la prise d'essai.

4-2 Le taux de la matière organique (MO%)

Connaissant le taux de carbone, le taux de matière organique est calculé par la formule :

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

Interprétation

Taux de matière organique (%)	Terre
<1	Très pauvre
1à2	pauvre
2à4	moyenne
>4	riche

5-Dosage de l'azote total (N) (Méthode de KJELDAHL)

- Transférer une masse connue d'échantillon séché à l'air (entre 0.2 g et 1 g) dans un réacteur de minéralisation.
- Ajouter 4 ml d'acide salicylique/acide sulfurique et agiter jusqu'à ce que la solution d'acide soit bien mélangée au sol.
- Laisser reposer quelques heures (ou pendant la nuit).

- Ajouter 0.5 g de thiosulfate de sodium pentahydraté à l'aide d'un entonnoir dont la tige descend dans la partie bombée du matras.
- Chauffer le mélange avec précaution sur le dispositif de minéralisation jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de mousse.
- Refroidir le réacteur, ajouter 1.1 g du catalyseur de minéralisation et chauffer le mélange réactionnel jusqu'à ce qu'il devienne clair.
- Pour cela, porter doucement à ébullition le mélange pendant un maximum de 5 h (en générale, 2 h) de façon que l'acide sulfurique se condense approximativement à 1/3 du col du réacteur.
- S'assurer que la température de la solution ne dépasse pas 400 °C.
- Lorsque la minéralisation est terminée, laisser refroidir le réacteur et ajouter lentement et sous agitation 20 ml d'eau déminéralisée.
- Agiter le réacteur afin d'amener tout produit insoluble dans l'appareil de distillation.
- Rincer trois fois à l'eau pour achever le transfert.
- Ajouter 5 ml d'acide borique dans une fiole de 100 ml et placer celle-ci en sortie du condenseur, de manière à ce que son extrémité plonge dans la solution.
- Ajouter 20 ml d'hydroxyde de sodium dans l'entonnoir de l'appareillage et laisser couler doucement dans le ballon de distillation.
- Distiller environ 40 ml de distillat, rincer l'extrémité du condenseur, ajouter quelques gouttes d'indicateur coloré au distillat et titrer avec l'acide sulfurique jusqu'à virage au violet.

Expression des résultats

La teneur en azote Kjeldahl (N) est exprimée en milligrammes par gramme de matières sèches et est donnée par l'équation (1) : H_2O

$$N = \frac{(V_1 - V_2) \times c(H^+) \times 14}{m} \times (100 + w_{H_2O})/100$$

où

V_1 est le volume, en millilitres, d'acide sulfurique utilisé pour le dosage de l'échantillon.

V_0 est le volume, en millilitres, d'acide sulfurique utilisé dans l'essai à blanc ; m est la masse, en grammes, de l'échantillon de sol séché à l'air .

$C(H^+)$ est la concentration en H^+ de l'acide sulfurique utilisé dans l'essai (si H_2SO_4 0.01 M, $c(H^+) = 0.02$ M).

14 est la masse molaire de l'azote.

w_{H_2O} est la teneur en eau, exprimée en pourcentage en masse, de l'échantillon.

Annexe II Milieux de culture et solutions utilisés

1- Milieux de culture bactérienne

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

Mannitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20g
NaCl	0.10 g
Extrait de levure	0.50 g
H ₂ O distillée	1.0 litre

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Milieu gélosé YMA (Yeast Mannitol Agar, Vincent, 1970)

YMB	1.0 litre
Agar	15 g

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Milieu YMA au rouge Congo (YMA+RC) (Vincent, 1970)

YMA	990ml
Solution stock de Rouge Congo*	10 ml

* (0.25g de Rouge Congo dissous dans 100 ml d'eau distillée)

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Milieu de culture TYA (Beringer, 1974)

Tryptone	5.00 g
Extrait de levure	3.00 g
CaCl ₂ H ₂ O	0.87 g
Agar	15 g

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Milieu YMA au Bleu de bromothymol (YMA+BTB) (Vincent, 1970)

YMA	990ml
Solution stock de BTB*	10 ml

* (0.5 g de BTB dissous dans 100 ml d'éthanol)

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

2-Les solutions utilisées**Solution de culture des plantes (Solution nutritive de Fahraeus, Vincent, 1970)**

CaCl ₂	0.100 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.120 g
K ₂ HPO ₄	0.100 g
Na ₂ HP0 ₄ 2H ₂ O	0.150 g
Citrate ferrique	0.005 g
Solution stock des oligoéléments*	10 ml

Solution stock des oligoéléments en g/l

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

Le pH est ajusté à 6.8, Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Solution de chlorure de mercure acidifié

La composition chimique de cette solution en g/l d'eau distillée est :

HgCl ₂	1.00 g
HCl 1N	5 ml

Annexe III Résultats des tests phénotypiques

1- La croissance des souches étudiées et les souches de références sous différents pH (moyenne des DO)

Souche \ pH	pH4	pH5	pH6.8	pH7	pH8	pH9
LaO1	0.125	0.147	0.356	0.321	0.015	0.06
LaO10	0.125	0.214	0.414	0.147	0.102	0.034
LaM15	0.224	0.154	0.356	0.058	0.147	0.012
LaO17	0.136	0.215	0.258	0.059	0.025	0.036
LaT21	0.118	0.142	0.324	0.226	0.064	0.054
LaT23	0.130	0.315	0.447	0.114	0.124	0.055
LaT28	0.251	0.198	0.256	0.098	0.085	0.036
LaM34	0.235	0.258	0.325	0.088	0.014	0.014
LaM35	0.153	0.354	0.536	0.057	0.145	0.052
LaT41	0.225	0.247	0.423	0.045	0.067	0.058
LaT46	0.114	0.359	0.325	0.124	0.114	0.024
LaM50	0.151	0.214	0.452	0.025	0.025	0.024
LaO53	0.214	0.369	0.421	0.147	0.158	0.015
LaO54	0.147	0.312	0.365	0.035	0.123	0.019
LaM58	0.214	0.319	0.512	0.124	0.025	0.010
LaM77	0.319	0.213	0.326	0.045	0.042	0.035
LaT92	0.415	0.101	0.258	0.123	0.123	0.017
<i>B.canariense</i> BTA-1	0.210	0.145	0.369	0.036	0.075	0.026
<i>B.cytisi</i> CTAW11	0.148	0.157	0.425	0.134	0.142	0.061
<i>B.rifens</i> CTAW71	0.258	0.220	0.315	0.121	0.132	0.045
<i>B.japonicum</i> USDA6	0.157	0.321	0.475	0.065	0.142	0.032
<i>B.diazoefficiens</i> USDA 110	0.125	0.253	0.394	0.031	0.231	0.012

2- La croissance des souches étudiées et les souches de références sous différentes Concentrations de NaCl (moyenne des DO)

Souche \ NaCl	0.25%	0.5%	1%	1.5%	2%
LaO1	0.125	0.014	0.024	0.011	0.023
LaO10	0.024	0.025	0.015	0.047	0.010
LaM15	0.036	0.042	0.051	0.089	0.048
LaO17	0.025	0.034	0.025	0.023	0.058
LaT21	0.128	0.023	0.014	0.045	0.058
LaT23	0.125	0.018	0.058	0.036	0.065
LaT28	0.020	0.035	0.020	0.014	0.059
LaM34	0.045	0.123	0.024	0.052	0.047
LaM35	0.036	0.025	0.058	0.064	0.020
LaT41	0.038	0.017	0.042	0.024	0.075
LaT46	0.031	0.032	0.025	0.036	0.024
LaM50	0.015	0.019	0.014	0.033	0.021
LaO53	0.051	0.147	0.058	0.020	0.042
LaO54	0.114	0.025	0.087	0.012	0.056
LaM58	0.051	0.015	0.012	0.020	0.054
LaM77	0.064	0.018	0.025	0.012	0.015
LaT92	0.118	0.018	0.024	0.014	0.050
<i>B.canariense</i> BTA-1	0.038	0.034	0.041	0.015	0.035
<i>B.cytisi</i> CTAW11	0.153	0.019	0.036	0.014	0.014
<i>B.rifens</i> CTAW71	0.125	0.123	0.014	0.025	0.023
<i>B.japonicum</i> USDA6	0.153	0.014	0.040	0.035	0.032
<i>B.diazoefficiens</i> USDA 110	0.139	0.147	0.024	0.031	0.029

3- La croissance des souches étudiées et les souches de références sous différentes Températures (moyenne des DO)

Température Souche	4°C	20°C	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	37°C
LaO1	0.025	0.315	0.224	0.326	0.526	0.165	0.089	0.051
LaO10	0.024	0.198	0.214	0.447	0.547	0.168	0.075	0.026
LaM15	0.036	0.258	0.200	0.558	0.415	0.047	0.033	0.025
LaO17	0.030	0.354	0.302	0.459	0.348	0.135	0.120	0.014
LaT21	0.051	0.215	0.228	0.326	0.661	0.202	0.102	0.058
LaT23	0.025	0.142	0.135	0.414	0.414	0.259	0.120	0.059
LaT28	0.020	0.123	0.220	0.498	0.558	0.056	0.089	0.084
LaM34	0.021	0.258	0.324	0.588	0.335	0.354	0.023	0.015
LaM35	0.017	0.354	0.315	0.257	0.245	0.115	0.045	0.051
LaT41	0.021	0.214	0.214	0.345	0.265	0.250	0.036	0.025
LaT46	0.031	0.147	0.335	0.224	0.658	0.285	0.014	0.014
LaM50	0.015	0.214	0.235	0.425	0.458	0.359	0.052	0.058
LaO53	0.051	0.319	0.324	0.347	0.342	0.014	0.064	0.023
LaO54	0.014	0.213	0.377	0.335	0.459	0.015	0.024	0.035
LaM58	0.051	0.359	0.283	0.224	0.247	0.210	0.036	0.047
LaM77	0.064	0.214	0.425	0.445	0.420	0.048	0.125	0.058
LaT92	0.018	0.154	0.394	0.523	0.375	0.258	0.012	0.042
<i>B.canariense</i> BTA-1	0.038	0.369	0.261	0.436	0.324	0.158	0.214	0.025
<i>B.cytisi</i> CTAW11	0.053	0.312	0.124	0.734	0.221	0.165	0.123	0.036
<i>B.rifens</i> CTAW71	0.025	0.110	0.245	0.421	0.399	0.135	0.025	0.014
<i>B.japonicum</i> USDA6	0.053	0.234	0.398	0.365	0.445	0.202	0.210	0.015
<i>B.diazoofficiens</i> USDA 110	0.039	0.147	0.265	0.431	0.387	0.259	0.201	0.078

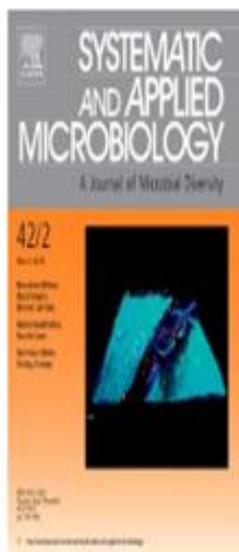
4-L'assimilation des différentes sources d'azote par les souches étudiées et les souches de références (moyenne des DO nm).

Acide aminé Souche	L- glycine	L- proline	L- acide glutamique	acide aspartique	Histidine	Tryptophane	Cystéine	Lysine
LaO1	0.017	0.214	0.024	0.126	0.215	0.365	0.101	0.524
LaO10	0.021	0.147	0.014	0.147	0.147	0.068	0.126	0.336
LaM15	0.031	0.258	0.100	0.058	0.215	0.247	0.035	0.041
LaO17	0.064	0.354	0.102	0.059	0.148	0.235	0.047	0.030
LaT21	0.053	0.014	0.028	0.226	0.061	0.022	0.058	0.147
LaT23	0.039	0.154	0.035	0.114	0.214	0.159	0.059	0.314
LaT28	0.020	0.215	0.220	0.098	0.258	0.356	0.126	0.236
LaM34	0.021	0.142	0.124	0.088	0.235	0.154	0.014	0.287
LaM35	0.053	0.123	0.115	0.057	0.145	0.215	0.015	0.115
LaT41	0.025	0.247	0.114	0.045	0.065	0.050	0.078	0.466
LaT46	0.014	0.315	0.035	0.124	0.258	0.185	0.084	0.043
LaM50	0.101	0.198	0.135	0.025	0.358	0.359	0.025	0.353
LaO53	0.145	0.258	0.024	0.147	0.342	0.214	0.036	0.239
LaO54	0.025	0.354	0.077	0.035	0.259	0.415	0.125	0.220
LaM58	0.024	0.319	0.083	0.124	0.247	0.210	0.114	0.045
LaM77	0.036	0.213	0.025	0.045	0.420	0.148	0.015	0.288
LaT92	0.018	0.359	0.194	0.123	0.375	0.258	0.051	0.218
<i>B.canariense</i> BTA-1	0.030	0.214	0.061	0.036	0.324	0.358	0.025	0.267
<i>B.cytisi</i> CTAW11	0.051	0.157	0.124	0.134	0.321	0.365	0.114	0.436
<i>B.rifens</i> CTAW71	0.025	0.369	0.145	0.121	0.299	0.222	0.058	0.325
<i>B.japonicum</i> USDA6	0.014	0.312	0.198	0.065	0.345	0.120	0.142	0.214
<i>B.diazoefficiens</i> USDA 110	0.051	0.110	0.165	0.031	0.210	0.314	0.123	0.625

5-L'assimilation des différents substrats carbonés par les souches étudiées et les souches de références (moyenne des DO nm)

Acide aminé Souche	L- Arabinose	D- Cellobiose	D- Fructose	D- Galactose	D- Glucose	Lactose	D- Mannose	L- Rhamnose	D- Ribose	Mannitol	Saccharose	D- Raffinose	D Xylose
LaO1	0.243	0.030	0.224	0.101	0.136	0.025	0.258	0.024	0.321	0.633	0.023	0.015	0.047
LaO10	0.245	0.022	0.014	0.100	0.258	0.035	0.126	0.036	0.245	0.514	0.014	0.026	0.235
LaM15	0.436	0.041	0.100	0.124	0.368	0.036	0.358	0.118	0.359	0.645	0.025	0.147	0.045
LaO17	0.123	0.055	0.102	0.135	0.351	0.047	0.042	0.130	0.214	0.612	0.015	0.058	0.065
LaT21	0.213	0.026	0.128	0.298	0.421	0.118	0.259	0.247	0.157	0.415	0.026	0.059	0.258
LaT23	0.174	0.033	0.035	0.200	0.214	0.036	0.247	0.114	0.369	0.210	0.047	0.026	0.065
LaT28	0.435	0.017	0.220	0.104	0.258	0.095	0.015	0.336	0.215	0.488	0.058	0.114	0.214
LaM34	0.376	0.021	0.037	0.230	0.365	0.024	0.198	0.287	0.147	0.378	0.059	0.056	0.147
LaM35	0.139	0.031	0.043	0.512	0.268	0.058	0.258	0.015	0.215	0.315	0.026	0.032	0.258
LaT41	0.089	0.064	0.054	0.345	0.247	0.056	0.014	0.366	0.148	0.478	0.014	0.021	0.054
LaT46	0.376	0.052	0.062	0.621	0.235	0.032	0.351	0.143	0.361	0.544	0.025	0.124	0.255
LaM50	0.288	0.017	0.354	0.245	0.102	0.021	0.182	0.053	0.045	0.321	0.078	0.052	0.156
LaO53	0.198	0.099	0.319	0.354	0.099	0.124	0.059	0.239	0.053	0.299	0.084	0.091	0.327
LaO54	0.226	0.024	0.213	0.432	0.210	0.052	0.356	0.220	0.124	0.345	0.025	0.055	0.256
LaM58	0.013	0.017	0.013	0.321	0.314	0.065	0.214	0.221	0.215	0.477	0.036	0.021	0.148
LaM77	0.584	0.047	0.278	0.420	0.420	0.150	0.158	0.188	0.214	0.602	0.025	0.020	0.258
LaT92	0.261	0.019	0.194	0.368	0.375	0.185	0.053	0.018	0.235	0.389	0.014	0.046	0.358
<i>B.canariense</i> BTA-1	0.213	0.055	0.061	0.235	0.324	0.025	0.214	0.167	0.235	0.420	0.015	0.091	0.365
<i>B.cytisi</i> CTAW11	0.145	0.051	0.312	0.234	0.098	0.013	0.154	0.236	0.024	0.317	0.051	0.084	0.256
<i>B.rifens</i> CTAW71	0.314	0.055	0.110	0.521	0.097	0.057	0.215	0.225	0.013	0.422	0.025	0.025	0.047
<i>B.japonicum</i> USDA6	0.388	0.021	0.054	0.365	0.241	0.120	0.142	0.114	0.214	0.423	0.014	0.036	0.236
<i>B.diazeofficiens</i> USDA10	0.270	0.020	0.036	0.231	0.354	0.222	0.123	0.125	0.285	0.384	0.058	0.025	0.358

Article publié



Source Normalized Impact per Paper (SNIP): 1.309 ⓘ

SCImago Journal Rank (SJR): 1.367 ⓘ

Impact Factor: 3.899 (2017) ⓘ

5 Year Impact Factor: 3.644 (2017) ⓘ

Volumes: Volume 42 Issues: 6 issues

Supports Open Access | ISSN: 07232020

Publication Schedule >

[Go to Journal Website](#) ↗

Description

United States of America ▾

Sales tax will be calculated at check-out

Print - Annual Subscription **\$603.00**
(Jan-Dec 2019) ⓘ

[Add to Cart](#)

[Looking for institutional subscriptions?](#)

[Tax Exempt Orders](#)

[Terms & Conditions](#)

[Additional Subscription Help](#) ↗



Contents lists available at ScienceDirect

Systematic and Applied Microbiology

journal homepage: www.elsevier.de/syapm



Phylogenetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius* grown wild in the North East of Algeria

Hanane Mellal^a, Benhizia Yacine^a, Leila Boukaous^a, Sabra Khouni^a,
Ammar Benguedouar^a, Antonio Castellano-Hinojosa^{b,*}, Eulogio J. Bedmar^b

^a Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Département de Microbiologie, Université Frères Mentouri – Constantine 1, Algeria

^b Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2018

Received in revised form 24 January 2019

Accepted 25 January 2019

Keywords:

Bradyrhizobium

Lupinus

Bacterial diversity

Housekeeping genes

Symbiotic genes

Phylogenetic tree

ABSTRACT

From a total of 80 bacterial strains isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius* grown wild in the North-Eastern Algerian region of El Tarf, 64 plant host-nodulating strains clustered into 17 random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting groups. The nearly complete 16S rRNA gene sequence from the representative strain of each group revealed they were closely related to members of the genus *Bradyrhizobium* of the Alphaproteobacteria, but their affiliation at the species level was not clear. Sequencing of the housekeeping genes *glnII* and *recA*, and their concatenated phylogenetic analysis, showed that 12 strains belong to *B. lupini*, other 2 strains affiliated with *B. diazoefficiens* and that 1 strain was closely related to *B. japonicum*. The remaining two strains showed similarity values $\leq 95\%$ with *B. cytisi* and could represent new lineages within the genus *Bradyrhizobium*. Sequencing of the symbiotic *nodC* gene from 4 selected bradyrhizobial strains showed they were all similar to those of the species included in symbiovar *genistearum*.

© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Within the Genisteeae tribe of the Fabaceae, the genus *Lupinus* comprises around 275 species, most of them from diversity centers in Southern and Western North America, the Andean areas of South America in the New World and only 15 species native to the Mediterranean regions and Africa in the old World [1,2,17,24]. Legumes are well-known because of their ability to establish symbiotic associations with soil bacteria, collectively known as rhizobia, that fix atmospheric dinitrogen (N_2) within the nodules formed in the roots, and occasionally on the stems, of the plants. *Lupinus* species are nodulated predominantly by slow-growing rhizobia classified within the genus *Bradyrhizobium*, including *B. japonicum*, *B. lupini*, *B. canariense* and *B. elkanii* species [30,36,37,41]. Also, fast growing bacteria have been isolated from *Lupinus*, among them *Ochrobactrum lupini* from *L. honoratus* [38] and different strains of *Microvirga* from *L. texensis* [3] and *L. micranthus* [27,28].

Lupines are of great economical interest because their seeds have a high protein and lipid content [6]; in addition, they can contain quinolizidine alkaloids on which lupines rely for chemical defense against herbivores and microorganisms, and for competition with other plants [11,22,29,45]. They have a deep, wide root system which allows the plants to thrive in soils holding little water and nutrients, which together with their N_2 -fixing capacity enable them to be used for cover crops and pasture improvement, green manure, soil stabilization and recovery of degraded soils [18]. Lupines are adapted to a range of highly divergent climatic and environmental conditions. With the exception of *L. mariae-josephae* [14], which is nodulated by *B. valentinum* [13], they rarely develop in calcareous alkaline soils with a pH higher than 6.8 [15], grow well in poor nutrient soils, are tolerant to dry conditions, salt excess, and heavy metal contamination [26,40]. Native lupine species from the Old World have traditionally been grouped into smooth-seeded and rough-seeded species [1,2], of which the smooth-seeded *L. angustifolius*, *L. albus* and *L. luteus* are the most abundant [15] and thrive in areas surrounding the Mediterranean Basin and Africa [2,5,12,17]. The Mediterranean climate is often characterized by irregular rainfall distribution and hot dry summers. In this region, most soils (about 25 million ha) are eroded and shallow, with low organic matter content, in some cases lower than the desertification index (<17 g organic matter kg^{-1}) [20,39].

* Corresponding author at: Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, CSIC P.O. Box 419. 18080-Granada, Spain.
E-mail address: ach@ugr.es (A. Castellano-Hinojosa).

<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.01.003>

0723-2020/© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Table 1
Physicochemical properties of the soils.

Character	Site		
	Lake Mellah	Lake Oubéira	Lake Tonga
GPS coordinates	36°54'06.4"N 82° 02'8.9"E	36°50'21.4"N 8°25'38.8"E	36°52'52.7"N 8°31'24.4"E
Texture	Sandy-loam	Sandy	Silty-clay
	87% sand	95% sand	10% sand
	3% silt 10% clay	1% silt 4% clay	45% silt 45% clay
pH _{water}	6.58	6.81	5.52
Organic matter (%)	2.58	2.10	1.87
Carbon (%)	1.29	0.87	0.75
Nitrogen (%)	0.14	0.08	0.09

L. angustifolius, common names narrow leaf lupine and blue lupine, grows wild under those conditions in the wetlands of the coastal plain in the Northeast region of El Tarf in Algeria. In this country, like in others around the Mediterranean Basin, blue lupins are of great interest in sustainable agriculture; they are also increasingly employed in both human and animal nutrition and for medicinal and cosmetic purposes [46]. However, data on the bacterial species that can be found in nodules of wild-grown *L. angustifolius* have not been reported. Therefore, the primary objective of this research was to identify the rhizobial symbionts within nodules of *L. angustifolius* plants growing in the Northeast area of the Algerian Tarf region. Sequence analysis of the housekeeping genes 16S rRNA, *glnII* and *recA* showed that the isolates belonged to *B. lupini*, *B. cytisi*, *B. japonicum* and *B. diazoefficiens*. PCR amplification was used to look for the symbiotic gene *nodC*, and it was studied by sequencing and phylogenies.

Materials and methods

Sampling sites, isolation of bacteria from nodules and culture conditions

Nodules were collected from roots of healthy *L. angustifolius* plants growing wild in the vicinity of lakes Tonga, Oubéira and Mellah (12 plants/location) (supplementary Fig. S1). The lakes make part of a complex of wetlands located on the coastal plain near the town of El Kala (36°53'N; 8°29'E) in El Kala National Park in the North Eastern region of El Tarf (Algeria). Location of the sampling sites is shown in Fig. S1, and the main physicochemical properties of the soils are indicated in Table 1.

Nodules were surface-sterilized with 0.25% HgCl₂ for 5 min, rinsed thoroughly with sterile distilled water, placed independently in Petri dishes and, finally, crushed in a drop of sterile water with a sterile glass rod. The resulting suspension was streaked onto Petri dishes containing solid yeast extract-mannitol (YEM) medium [42] supplemented with 0.025 g Congo Red/L and incubated at 30 °C for 12 d. After incubation, the colony-forming units (CFUs), which represented all of the colony types that could be distinguished by microscopic observation, were chosen. After identification, rhizobial strains used in this study were routinely grown on YEM medium.

DNA isolation and PCR amplifications

Essentially, bacterial genomic DNA was isolated after growth of the cells in liquid YEM medium, collected by centrifugation in a microfuge and extracted by addition of 200 µl 0.05 M NaOH and heating at 100 °C for 4 min. Then, 200 µl Tris-HCl (pH 8.0) was added and the mixture centrifuged at 13000 rpm for 3 min. Finally, the supernatant containing the DNA was recovered and kept at –20 °C until use. The quantity of DNA was determined using a

Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop ND1000, Thermo Fisher Scientific, USA).

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-polymerase chain reactions (RAPD-PCR) were performed using primer M13 (5'-GAGGTGGCGTTCT-3') according to Rivas et al. [33]. The DNA bands present in each electrophoretic lane were coded for input into a database including all the strains studied, and Jaccard's similarity coefficient was calculated to construct the distance matrix from which a dendrogram was built using the unweighted pair group with arithmetic mean (UPGMA) using the Quantity One software (Bio Rad). PCR amplifications of 16S rRNA gene fragments were carried out by using the primers 27F, 1522R and 800R [34]. The primer pairs *glnII* 12F and *glnII* 689R and *recA* 41F and *recA* 640R were used for amplification of the *glnII* and *recA* genes, respectively [43]. The primers *nodCF* and *nodCI* were used for amplification and sequencing of the *nodC* gene [25]. Amplification products were purified with the GeneJET PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific), verified by electrophoresis in agarose gels and subjected to cycle sequencing using the same primers as for PCR amplification, with ABI Prism dye chemistry. The products were analyzed with a 3130 × 1 automatic sequencer at the sequencing facilities of Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain. All the obtained sequences were compared with those from GenBank using the BLASTN program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and the EzBioCloud Database (<https://www.ezbiocloud.net/>) [47], and aligned using the Geneious software (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). Distances were calculated according to Kimura's two-parameter model [21]. Neighbour-joining [35] and maximum likelihood [16] phylogenetic reconstructions gave similar results, therefore only maximum likelihood phylograms are presented. MEGA 7.0 was used for all the phylogenetic analyses [23]. Identity values were calculated by pairwise analysis and gaps were not considered. Accession numbers of the nucleotide sequences used in this study are shown in the figure trees.

Nodulation tests

The isolates were tested for nodulation on *L. angustifolius* and soybean (*Glycine max* L. Merr., cv. Williams). Seeds of *L. angustifolius* were surface-sterilized by immersion in 95% ethanol (v/v) for 10 s, scarified using 98% sulfuric acid for 3 min, washed several times with sterile water and left in water for 1 h. Soybean seeds were surface-sterilized by adding 96% ethanol (v/v) for 30 s, H₂O₂ 15% (v/v) for 8 min, and finally washed with sterile water. Finally, the seeds were placed on Petri dishes containing 1% agar-water and allowed to germinate in the dark at 30 °C for 2–4 d. Seedlings were transferred to 500 ml flasks containing the N-free Fahraeus nutrient solution [42] supplemented with 1% (w/v) CaCO₃ and closed with 2-hole-perforated plastic caps, one for inserting the sprout rootlet and the other for inoculation of the seedlings, as previously described [32]. Two days old seedlings were inoculated independently with 1 mL of bradyrhizobial suspensions (~10⁸ cells mL⁻¹) and kept at room temperature for 6–8 weeks under a 16.0/8.0 h light/dark photoperiod. Non-inoculated plants were used as a control. Indirect effectiveness of the nodules for nitrogen fixation was estimated by visual assay of red leghemoglobin presence in cross-sections and by the dark green intensity of the leaves compared to uninoculated control plants.

Results

16S rRNA, *glnII*, *recA* and *nodC* phylogenetic analyses

A total of 80 bacterial strains were isolated from root nodules of wild-grown *L. angustifolius*. Strains were named La, represent-

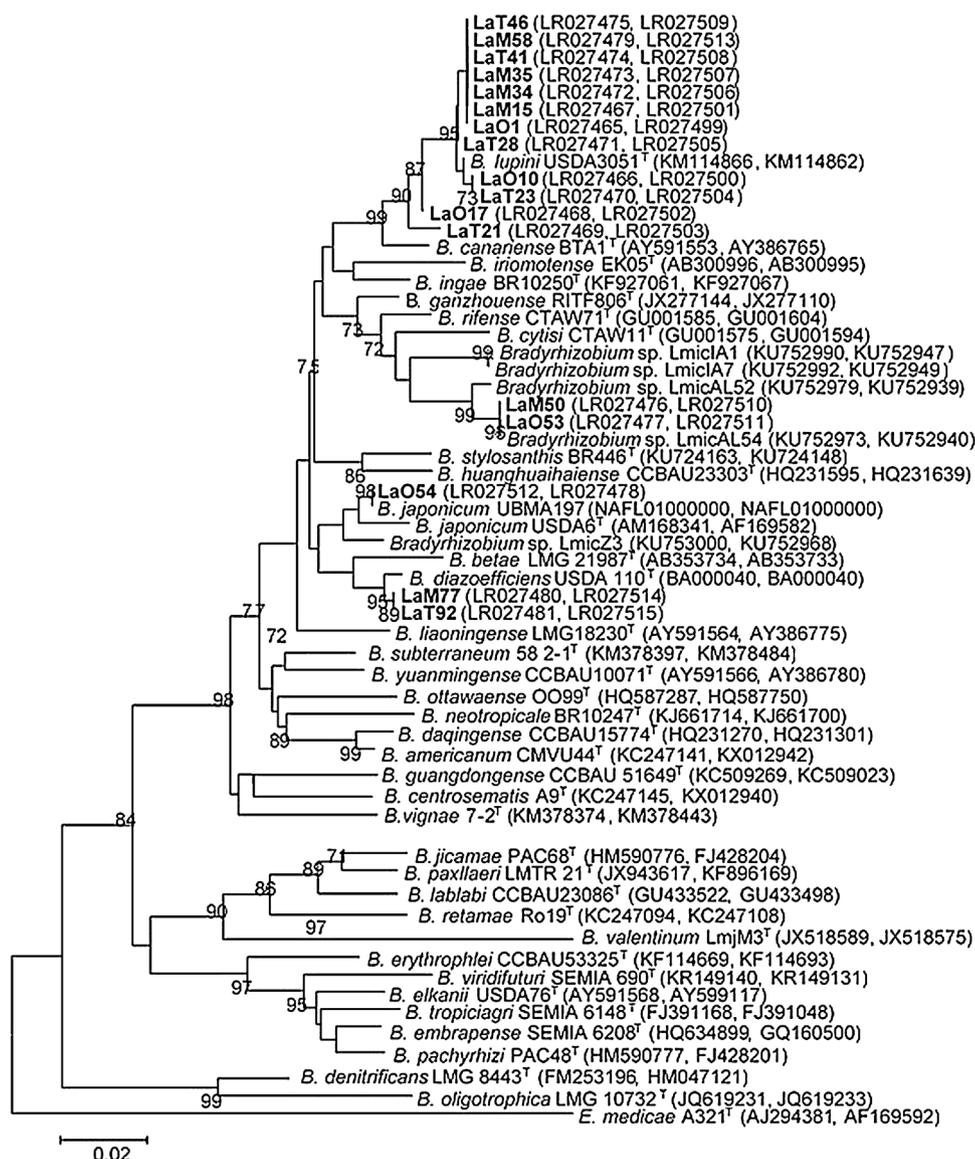


Fig. 1. ML phylogenetic tree based on concatenated partial *recA* + *glnII* sequences of strains from nodules of wild-grown *L. angustifolius* and phylogenetically related species within the genus *Bradyrhizobium*. The analysis was based on 870 nucleotides. Isolates are denoted in bold. Bootstrap values are indicated as percentages derived from 1000 replications. Values lower than 70 are not shown. Bar, 2 nucleotides substitution per 100 nucleotides. The tree is rooted with *Ensifer medicae* A321^T.

ing *L. angustifolius* followed by the letters either M, T or O for the strains isolated from lakes Mellah, Tonga or Oubéira, respectively. Out of the 80 isolates, only 64 formed effective nodules when used to inoculate *L. angustifolius*, the original host plant from which they were isolated; further characterization of the remaining 16 strains was not pursued in this study. After RAPD-PCR fingerprinting, the 64 isolates were represented by 17 different profiles at 80% similarity (Table 2). The nearly complete sequence of the 16S rRNA gene from a representative strain of each RAPD group showed that all of them were members of the genus *Bradyrhizobium* within the family Bradyrhizobiaceae of the Alphaproteobacteria. The phylogenetic tree (supplementary Fig. S2) inferred from the 16S rRNA gene sequences revealed that the strains LaT92 and LaM77 showed 99.5 and 99.4% identity with *B. diazoefficiens* USDA 110^T, respectively, the strains LaM50 and LaO53 had 99.6 and 99.4% identity with *B. cytisi* CTAW11^T/*B. rifense* CTAW71^T, respectively, the strain LaM54 shared 99.9% identity with *B. daqingense* CCB AU 15774^T, and that the remaining 12 strains, LaO1, LaO10, LaO17, LaT21, LaT23, LaT28, LaT41, LaT46, LaM15, LaM34, LaM35 and LaM58 showed identity values higher than 99.5% with *B. lupini* USDA 3051^T. PCR ampli-

fication of the *glnII* and *recA* genes yielded single DNA bands of approximately 0.7 and 0.6 kb that were sequenced, respectively. A concatenated phylogenetic tree based on the obtained *recA* and *glnII* sequences (Fig. 1) revealed that strains LaO1, LaO10, LaM15, LaO17, LaT21, LaT23, LaT28, LaM34, LaM35, LaT41, LaT46 and LaM58 grouped with *B. lupini* USDA 3051^T with identity values higher than 98.2%, that strains LaM50 and LaO53 affiliated with the *B. cytisi* CTAW11^T lineage with which they shared 94.9% identity values, that LaO54 was closely related to *B. japonicum* USDA 6^T with 98.2% identity, and that strains LaM77 and LaT92 clustered with *B. diazoefficiens* USDA 110^T with 97.0% identity. Phylogenetic trees based on individual *glnII* (supplementary Fig. S3) and *recA* sequences (supplementary Fig. S4) gave similar results to those obtained for the concatenated tree, with no further insights into the affiliation of the isolates. Utilization of the primer pair nodCF/nodCI resulted in amplification (approximately 0.6 kb) of the *nodC* gene from strains LaM15, LaO53, LaO54 and LaM77 that were chosen as the representative strains for each of the corresponding clusters they were grouped. A phylogenetic tree (Fig. 2) showing the relationship between the *nodC* genes from those strains and other

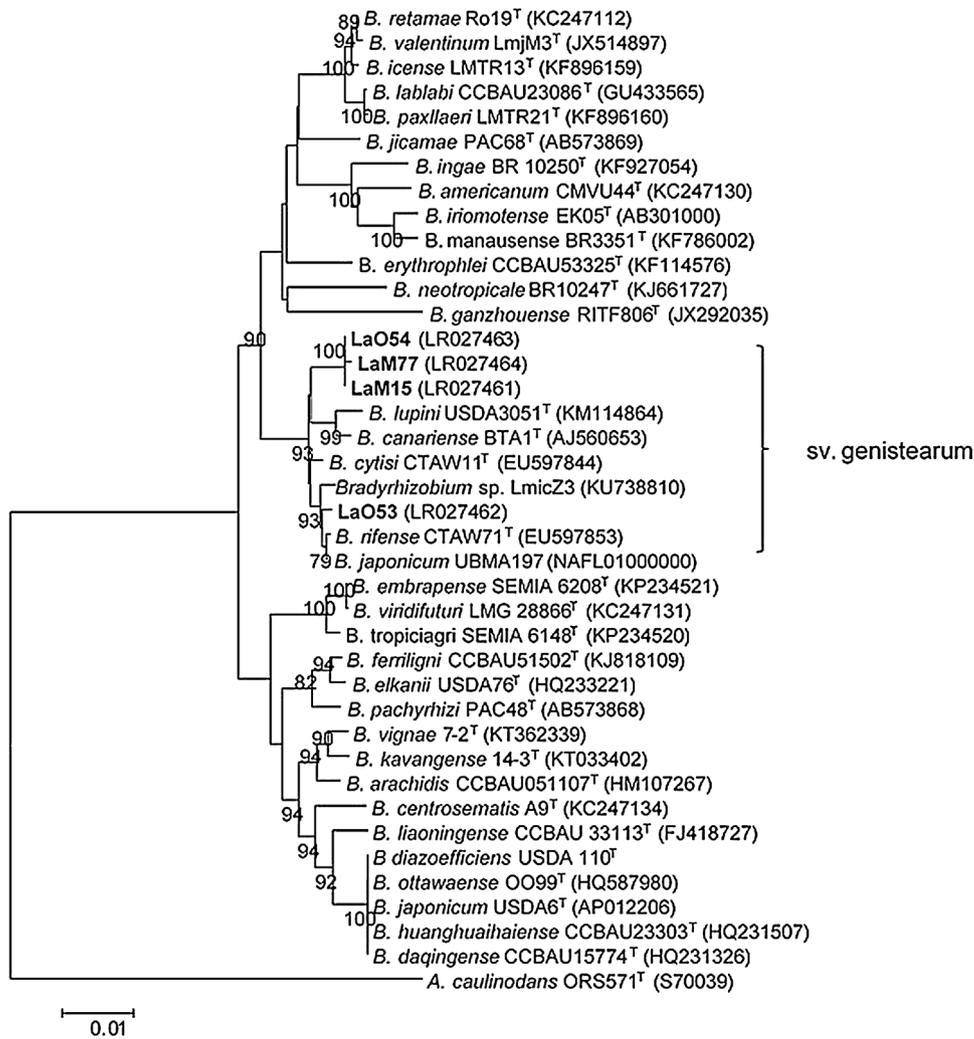


Fig. 2. ML phylogenetic tree based on *nodC* sequences of strains from nodules of wild-grown *L. angustifolius* and phylogenetically related species within the genus *Bradyrhizobium*. *Bradyrhizobium* symbiovars are also shown. The analysis was based on 580 nucleotides. Isolates are denoted in bold. Bootstrap values are indicated as percentages derived from 1000 replications. Values lower than 70 are not shown. Bar, 1 nucleotide substitution per 100 nucleotides. The tree is rooted with *Azorhizobium caulinodans* ORS571^T.

Table 2
Identification of bradyrhizobial strains from root nodules of wild-grown *L. angustifolius*. Strains in bold were chosen as the representative strains of each RAPD-PCR group.

Strain	RAPD-PCR pattern	Closest relative genus on basis of 16S rRNA gene
LaO1, LaO74	I	<i>Bradyrhizobium</i>
LaO10, LaO11, LaO49, LaO12	II	<i>Bradyrhizobium</i>
LaM15, LaO19	III	<i>Bradyrhizobium</i>
LaO17, LaM48, LaO51	IV	<i>Bradyrhizobium</i>
LaT21, LaO16, LaM2	V	<i>Bradyrhizobium</i>
LaT23, LaT40, LaT47, LaT22, LaT20	VI	<i>Bradyrhizobium</i>
LaT28, LaT71, LaT99, LaT27	VII	<i>Bradyrhizobium</i>
LaM34, LaM8, LaT18, LaM32	VIII	<i>Bradyrhizobium</i>
LaM35, LaM45, LaM13, LaM3	IX	<i>Bradyrhizobium</i>
LaT41, LaT26, LaM63, LaM69	X	<i>Bradyrhizobium</i>
LaT46, LaO29, LaM43, LaM57	XI	<i>Bradyrhizobium</i>
LaM50, LaM88, LaM38, LaM39	XII	<i>Bradyrhizobium</i>
LaO53, LaO79, LaO82, LaO85, LaM36	XIII	<i>Bradyrhizobium</i>
LaO54, LaO6, LaT33, LaM55	XIV	<i>Bradyrhizobium</i>
LaM58, LaM9	XV	<i>Bradyrhizobium</i>
LaM77, LaT25, LaO62	XVI	<i>Bradyrhizobium</i>
LaT92, LaT60, LaO30, LaT24, LaM72, LaM90, LaT14	XVII	<i>Bradyrhizobium</i>

bradyrhizobial species revealed that all 4 strains belonged to symbiovar genistearum of the genus *Bradyrhizobium* with identities higher than 91.9%.

Plant nodulation tests

The bradyrhizobial strains LaM15, LaO53, LaO54 and LaM77 identified in this study produced effective symbiosis with their original host and did not form nodules on soybean. Visible differences in plant growth parameters of the plants were not observed.

Discussion

In this study we report on the isolation and identification of bradyrhizobial strains from root nodules of *L. angustifolius* grown in the natural environment of the Algerian North Eastern region of El Tarf, which is characterized by high thermal amplitudes and low rainfall. Soil data (Table 1) revealed a light texture and very low levels of C and N, which confirms severe ecological conditions for living organisms. RAPD fingerprinting was used to group the 64 effective strains, which showed 17 different patterns (Table 1). This technique has been used to cluster bacteria at the subspecies or strains level and has proved to be a powerful tool for studies of

microbial ecology and evolution [31] and references therein]. Out of the 64 bradyrhizobial strains, 20, 19 and 25 were isolated from root nodules of plants grown near the lakes Tonga, Oubéira and Mellah, respectively. Since these three lakes have very similar environmental conditions, the results suggested no biogeographical differences among the isolates.

The nearly complete sequence of the 16S rRNA gene of a representative isolate of each RAPD group showed that all the 17 strains were members of the genus *Bradyrhizobium* (Fig. S2). Fast-growing strains capable of nodulating *L. angustifolius* were not found.

Because *Bradyrhizobium* species have highly conserved 16S rRNA gene sequences, the analyses of various core genes have been used to elucidate the taxonomic affiliations among them. In this study, the housekeeping genes *glnII* and *recA* were selected because they gave the best relative performance when used as molecular markers, either individually or in combination, for assessing the evolutionary genetics of *Bradyrhizobium* species [44]. Individual (supplementary Figs. S3 and S4) and concatenated (Fig. 1) *glnII* and *recA* gene phylogenies showed that 12 strains (70.6%) affiliated with *B. lupini* USDA3051^T, 2 strains (11.8%) grouped with *B. cytisi* CTAW11^T, other 2 strains (11.8%) clustered with *B. diazoefficiens* USDA 110^T, and that 1 strain (5.9%) was closely related to *B. japonicum* USDA6^T. *Bradyrhizobium* has been isolated from 30 out of 33 lupine species, which makes the bacterium to be the predominant genus nodulating *Lupinus* [37] and references therein]. Our results agree with those by Bourebaba et al. [5] which show that most strains isolated from *L. micranthus* grown wild in Algeria and Spain belonged to the *B. lupini*/*B. canariense* lineage. Also, Msaddak et al. [27] concluded that *L. luteus* root nodule symbionts in Northern Tunisia are mostly strains within the *B. canariense*/*B. lupini* group. All these findings reinforce the idea that *B. lupini* and *B. canariense* are common symbionts in regions with a high diversity of Genisteeae such as occurs at both sides of the Mediterranean Sea [37].

The strains LaM50 and LaO53 clustered with *B. cytisi* CTAW11^T, a species first isolated from *Cytisus villosus* growing in Morocco and Spain [7,8] and also found in nodules of *L. micranthus* from soils in Algeria and Spain [5]. It is noteworthy that the strains LaM50 and LaO53 grouped with those isolated from plants grown in Algeria but not with those from Spain (Fig. 1), which lends support to the suggestion of a specific geographical origin for *B. cytisi* strains [5]. The similarity values $\leq 95\%$ in the *glnII* and *recA* sequences between *B. cytisi* CTAW11^T and strains LaM50 and LaO53 suggest they may form different lineages within the genus *Bradyrhizobium*.

Following the paper by Barrera et al. [4], other authors showed that *Bradyrhizobium* isolates of Genisteeae have phylogenetic affinity with *B. japonicum* and that this bacterium has been found in nodules of *L. angustifolius* grown in Australia, Poland, South Africa and Spain [37]. In this sense, the strain LaO54 in this study clustered with the *B. japonicum* strains LmicZ3 and UBMA197 isolated from root nodules of *L. micranthus* [5] and *L. angustifolius* [9] grown in North East Africa, respectively. Based on genotypic and phenotypic evidence, the reclassification of former *B. japonicum* group Ia strains into a novel species named *B. diazoefficiens* was proposed by Delamuta et al. [10]. This species includes several strains, the great majority isolated from soybean; here we show that it can also be found within nodules of wild-grown *L. angustifolius* plants in North East Africa.

The phylogenetic analysis of the symbiotic *nodC* gene of strains LaM15, LaO53, LaO54 and LaM77 revealed they grouped with sequences (Fig. 2) that define the symbiovar genistearum described by Vinuesa et al. [43] including strains nodulating *Lupinus*, *Retama*, *Cytisus* and *Chamaecytisus* in Africa, America and Europe [5,7,8,19]. The *nodC* gene of UBMA197 and LmicZ3 also clustered within the symbiovar genistearum (Fig. 2) and the identity between the aminoacidic sequences of LaO54 and UBMA197 and LmicZ3 was

of 90.8% and 90.3%, respectively. These results agree with those which show that *B. japonicum* strains isolated from lupines belong to the symbiovar genistearum [4,9,37,43][4,9,37,43 and references therein]; this, in turn, indicate that strains LaM15, LaO53, LaO54 and LaM77 have acquired the *nodC* gene of the symbiovar genistearum. It is more likely that multiple horizontal transfers could be responsible for *B. japonicum* nodulating member of the Genisteeae. After nodule isolation, the strains isolated in this study were able to establish new effective symbiosis with their host plant and none of them nodulated soybeans. These results confirm affiliation of the *Lupinus*-isolated strains within the symbiovar genistearum and that they are true symbionts of *L. angustifolius*.

Acknowledgments

This study was supported by the ERDF-cofinanced grants PEAGR2012-1968 from Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (Junta de Andalucía, Spain), AGL2015-64582-C3-3-R from MINECO. ACH is recipient of a grant of MEC (FPU 2014/01633).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.01.003>.

References

- [1] Ainouche, A.K., Bayer, R.J. (1999) Phylogenetic relationships in *Lupinus* (*Fabaceae*: *Papilionoideae*) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Am. J. Bot.* 86, 590–607.
- [2] Ainouche, A.K., Bayer, R.J., Misset, M.T. (2004) Molecular phylogeny, diversification and character evolution in *Lupinus* (*Fabaceae*) with special attention to Mediterranean and African lupines. *Plant Syst. Evol.* 246, 211–222.
- [3] Ardley, J.K., Parker, M.A., De Meyer, S.E., Trengove, R.D., O'Hara, G.W., Reeve, W.G., Yates, R.J., Dilworth, M.J., Willems, A., Howieson, J.G. (2012) *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotonoidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2579–2588.
- [4] Barrera, L.L., Trujillo, M.E., Goodfellow, M., Garcia, F.J., Hernandez-Lucas, I., Davila, G., van Berkum, P., Martinez-Romero, E. (1997) Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1086–1091.
- [5] Bourebaba, Y., Durán, D., Bouhila, F., Ahnia, H., Bouhila, A., Temprano, F., Palacios, J.M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Rey, L. (2016) Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the western Mediterranean: Algeria and Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 266–274.
- [6] Cerletti, P. (1983) Lupin seed proteins. In: Hudson, B.F.J. (Ed.), *Developments in food proteins 2*, Applied Sci. Publ., Ripple Rd, Barking, Essex, pp. 133–171.
- [7] Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2011) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* in Morocco. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2922–2927.
- [8] Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Barrijal, S. (2012) *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 302–305.
- [9] Chekireb, D., Crovadore, J., Brachmann, A., Chablais, R., Cochard, B., Lefort, F. (2017) Whole-genome sequences of 14 strains of *Bradyrhizobium canariense* and 1 strain of *Bradyrhizobium japonicum* isolated from *Lupinus* spp. in Algeria. *Genome Announc.* 5, e00676–17.
- [10] Delamuta, J.R.N., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M.A. (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3342–3351.
- [11] De la Vega, R., Gutierrez, M.P., Sanz, C., Calvo, R., Robredo, L.M., de la Cuadra, C., Muzquiz, M. (1996) Bactericid-like effect of *Lupinus* alkaloids. *Ind. Crops Prod.* 5, 141–148.
- [12] Drummond, C.S., Eastwood, R.J., Miotto, S.T., Hughes, C.E. (2012) Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): testing for key innovation with incomplete taxon sampling. *Syst. Biol.* 61, 443–460.
- [13] Durán, D., Rey, L., Navarro, A., Busquets, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. (2014) *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 336–341.
- [14] Durán, D., Rey, L., Sánchez-Cañizares, C., Navarro, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. (2013) Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus*

- mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 128–136.
- [15] Fernández-Pascual, M., Pueyo, J.J., Felipe, M.R., Golvano, M.P., Lucas, M.M. (2007) Singular features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* symbiosis. *Dyn. Soil Dyn. Plant* 1, 1–16.
- [16] Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum-likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
- [17] Gladstone, J.S. (1974) Lupins of the Mediterranean region and Africa. *Western Aust. Dept. Agric. Tech. Bull.* 26, 1–48.
- [18] Gladstone, J.S. (1988) In: Gladstone, J.S., Atkins, C.A., Hamblin, J. (Eds.), *Lupinus as Crop Plants: Biology, Production and Utilization*, CABI, Wallingford, pp. 1–37.
- [19] Guerrouj, K., Ruiz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M.H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M.A., El Idrissi, M.M., Velázquez, E., Fernández-Pascual, M., Bedmar, E.J., Peix, A. (2013) Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 218–223.
- [20] Holland, J.M. (2004) The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agric. Ecosyst. Environ.* 103, 1–25.
- [21] Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- [22] Kinghorn, A.D., Balandrin, M.F. (1984) Quinolizidine alkaloids of the Leguminosae: structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities, in: Pelletier, W.S. (Ed.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, vol. 2, Wiley, New York, pp. 105–148.
- [23] Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger data sets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- [24] Kurlovich, B.S., Stankevich, A.K. (2002) Classification of lupins. In: Kurlovich, B.S. (Ed.), *Lupinus: Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding*, Publishing House "Intan", St. Petersburg, pp. 39–88.
- [25] Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147, 981–993.
- [26] Martínez-Alcalá, I., Walker, D.J., Bernal, M.P. (2010) Chemical and biological properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* alter soil heavy metal fractionation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 595–602.
- [27] Msaddak, A., Durán, D., Rejili, M., Mars, M., Ruiz-Argüeso, T., Imperial, J., Palacios, J., Rey, L. (2017) Diverse bacteria affiliated with the genera *Microvirga*, *Phyllobacterium* and *Bradyrhizobium* nodulate *Lupinus micranthus* growing in soils of Northern Tunisia. *Appl. Environ. Microb.* 83, e02820–16.
- [28] Msaddak, A., Rejili, M., Durán, D., Rey, L., Palacios, J.M., Imperial, J. (2018) Definition of two new symbiovars, sv. *lupini* and sv. *mediterraneanense*, within the genera *Bradyrhizobium* and *Phyllobacterium* efficiently nodulating *Lupinus micranthus* in Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 487–493.
- [29] Muzquiz, M., de la Cuadra, C., Cuadrado, C., Burbano, C., Calvo, R. (1994) Herbicide-like effect of *Lupinus* alkaloids. *Indus. Crops. Prod.* 2, 273–280.
- [30] Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2015) Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 17–42.
- [31] Ramírez-Bahena, M.H., Vargas, M., Martín, M., Tejedor, C., Velázquez, E., Peix, A. (2015) Alfalfa microsymbionts from different ITS and *nodC* lineages of *Ensifer meliloti* and *Ensifer medicae* symbiovar *meliloti* establish efficient symbiosis with alfalfa in Spanish acid soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4855–4865.
- [32] Riah, N., Béna, G., Djekoun, A., Heulin, K., De Lajudie, P., Laguerre, G. (2013) Genotypic and symbiotic diversity of *Rhizobium* populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 368–375.
- [33] Rivas, R., García-Fraile, P., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2007) Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 181–187.
- [34] Rivas, R., Peix, A., Mateos, P.F., Trujillo, M.E., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2006) Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulate chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil* 287, 23–33.
- [35] Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- [36] Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., Sadowsky, M.J. (2017) Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis* 71, 91–109.
- [37] Stępkowski, T., Joanna, B., Granada, C.E., Andrews, M., Passaglia, L.M.P. (2018) Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the Tribe Genisteeae. *Genes* 14, E163.
- [38] Trujillo, M.E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1318–1327.
- [39] Van-Camp, L., Bujarrabal, B., Gentile, A.R., Jones, R.J.A., Montanarella, L., Olazabal, C., Selvaradjou, S.K. 2004 Reports of the technical working groups established under the Thematic Strategy for soil protection, III. In: *Organic Matter*, European Commission, EUR 21319 EN/3.
- [40] Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M.J., Esteban, E., Peñalosa, J.M., Carpena, R.O. (2006) Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water Air Soil Pollut.* 177, 349–365.
- [41] Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J.D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M.E., Mulas, R., González-Andrés, F., Martínez-Molina, E., Peix, A. (2017) The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. In: Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. (Eds.), *Probiotics and Plant Health*, Springer Singapore, pp. 41–70.
- [42] Vincent, J.M. 1970 A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. In: *IBP Handbook*, Blackwell, Oxford.
- [43] Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D., Martínez-Romero, E. (2005) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 569–575.
- [44] Vinuesa, P., Rojas-Jiménez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S., Prasad, B.N., Moe, H., Selvaraju, S.B., Thierfelder, H., Werner, D. (2008) Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6987–6996.
- [45] Wink, M. (1992) The role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions, in: Bernays, E.A. (Ed.), *Insect Plant Interactions*, vol. 4, IRC Press, Boca Raton, pp. 131–166.
- [46] Wolko, B., Clements, J.C., Naganowska, B., Nelson, M.N., Yang, H. (2011) *Lupinus*. In: Kole, C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, Springer, Berlin, pp. 153–206.
- [47] Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J. (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1613–1617.

nom et prénom :MELLAL Hanane

Doctorat 3^{ème} cycle : Option Ecologie Microbienne

Titre : Symbiose *Rhizobium*-Lupin. Biodiversité des microsymbiotes et leur caractérisation à partir des nodules racinaires de la Légumineuse *Lupinus angustifolius*.

Résumé

Dans cette étude un total de 80 isolats bactériens isolés à partir des nodules racinaires de *Lupinus angustifolius* poussant à l'état sauvage dans la région Nord-Est Algérien dans la wilaya d'El Tarf. Le test de nodulation a confirmé la capacité de 64 isolats à induire la formation de nodules sur leur plante-hôte d'origine. La RAPD-PCR, aboutie à la répartition de ces isolats en 17 profils différents. Le séquençage partiel du gène ribosomique ARNr 16S de chaque représentant de groupe a affirmé l'appartenance des souches étudiées au genre *Bradyrhizobium*. Cependant l'affiliation au niveau de l'espèce n'a pas été établie. Pour cette raison l'étude phylogénétique basée sur le séquençage des gènes de ménage (*glnII*, *recA*) ainsi que des gènes symbiotique (*nodC*) a été menée. Cette analyse a confirmée et préciser les résultats précédents. En effet, elle montre leur distribution en quatre grands groupes phylogénétiquement différents. Toutes les souches étudiées appartiennent au groupe *Bradyrhizobium* symbiovar *genistearum*. Les souches ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à savoir : les caractères cultureux, cellulaires, nutritionnels, physiologiques et biochimiques. Cette analyse confirme la biodiversité au niveau des souches isolées de *Lupinus angustifolius* de l'Algérie.

En se basant sur les résultats obtenus, Cette étude a révélé la diversité des rhizobia nodulants *Lupinus angustifolius* avec quelque espèce potentiellement nouvelle de *Bradyrhizobium*, nécessitant une caractérisation taxonomique supplémentaire pour la confirmation et la description formelle.

Mots clés : *Lupinus angustifolius*, *Bradyrhizobium*, Nodules, Gènes de ménage, Gènes symbiotique, Biodiversité.