

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre :

N° de série :

THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

OPTION : Biochimie et Microbiologie Appliquée

Par

NASSIRA RIAH

Thème

Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien

Soutenue le : 23/09/2014

Jury

| | | |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|
| Président : | Amar BENGUEDOUAR | Professeur à l'Université Constantine 1 |
| Directeur de thèse : | Abdelhamid DJEKOUN | Professeur à l'Université Constantine 1 |
| Co-directrice de thèse : | Gisèle LAGUERRE | Directrice de recherche, LSTM Montpellier |
| Co-directeur de thèse : | Philippe DE LAJUDIE | Directeur de recherche, IRD Montpellier |
| Examineurs: | Abdelhadi GUECHI | Professeur à l'Université de Sétif |
| | Noredine KACEM CHAOUCHE | Professeur à l'Université Constantine 1 |
| | Gilles BENA | Directeur de recherche, IRD Montpellier |

Année universitaire 2014-2015

Remerciements

Je tiens tout d'abord à rendre un vibrant hommage à ma co-directrice de thèse Gisèle Laquerre à qui je dédie cette thèse et qui a suivi mon encadrement pendant 18 mois au cours de mon stage au Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM). Sa disponibilité, ses conseils éclairés, et les directives qu'elle m'a donné m'ont permis de mener à terme cette recherche.

J'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse Pr Abdelhamid DJEKOUN qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de ma reconnaissance pour ses conseils, ses encouragements et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail.

Je ne saurais présenter ce travail sans exprimer à Philippe De Lajudie co-directeur de thèse et Gilles Bena auteur correspondant de l'article ma profonde gratitude pour l'aide, le soutien et les précieux conseils qu'ils m'ont prodigué. Je tiens à les remercier également pour tout le temps qu'ils m'ont accordé avec beaucoup d'enthousiasme dans l'élaboration de l'article et de la thèse.

Un merci tout particulier au directeur du Laboratoire LSTM : Michèle LEBRUN pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie également les membres de jury pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce travail : Mr Amar BENGUEDOUAR Professeur à l'Université Constantine 1, Mr Abdelhadi GUECHI Professeur à l'Université de Sétif, Mr Kacem Chaouche Noredine professeur à l'Université Constantine 1 et Gilles Bena de L'IRD de Montpellier.

Mes plus vifs remerciements vont également à Naima Rezkallah et Christine Le Roux pour leur amitié, leur soutien, leur encouragement et leur disponibilité au cours de mon séjour à Montpellier.

Je n'oublie pas d'adresser mes vifs remerciements aux agriculteurs qui m'ont accueillis et permis de réaliser mes expérimentations au champ ainsi que Nour Eddine Bouderbela, les frères Achouri, Abla, Chahra et Amira. Je remercie aussi Kheir Eddine, Hichem, Tarek et Réda pour leur aide.

Merci également à Hassina, , Mouna, Souad et Ilhem pour leur précieuses aides et leur patience, sans oublier mes chères amies Linda, Hind, Leila, Maya, Rym...qui m'ont toujours encourager et soutenu sans cesse. Merci même à ceux que j'ai oublié de citer.

Je tiens particulièrement à remercier les doctorants de mon équipe au LSTM Imène, Souhir, Caroline, Géraldine, Marie Matilde, Katia, Remy, Wassim, sans oublier de saluer tous les membres du LSTM qui m'ont si bien accueilli durant mon stage.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont participé de loin ou de près dans l'élaboration de cette thèse.

Ces remerciements ne peuvent se terminer sans remercier ma famille, ma mère, mon père, mon mari pour toute sa patience, mes frères, ma sœur, mes belles sœurs et bien sûr mes enfants chéris : Adlen et Ilhem à qui je n'ai pas pu offrir beaucoup de temps au cours de la rédaction de cette thèse.

RESUME

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse conduit à la formation des nodules racinaires fixateurs d'azote atmosphérique. Ce processus naturel présente un intérêt économique et agronomique considérable. En Algérie, la production des légumineuses alimentaires et fourragères est affecté par les contraintes environnementales climatiques (températures élevées, déficit hydrique, etc.). Dans cette étude, un total de 237 isolats ont été isolés à partir des nodules racinaires collectés sur la lentille (*Lens culinaris*), le pois fourrager (*Pisum sativum*) et le pois protéagineux (*Pisum sativum*) cultivés au champ dans six sites représentant deux zones éco-climatiques contrastées, subhumide et semi-aride de l'est algérien. L'objectif principal était de déterminer le niveau de variabilité de la structure génétique des populations nodulantes de *Rhizobium* parmi les sites et les plantes d'isolement en conditions climatiques différentes. Nos isolats ont été caractérisés par PCR-RFLP de la région intergénique 16S-23S ANRr (IGS), et de la région symbiotique *nodD-F*. Ils se sont répartis dans 14 types IGS et 10 types *nod*. La combinaison de ces haplotypes a permis de regrouper les isolats en 26 différents génotypes IGS/*nod*. L'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr 16S a permis de classer tous les isolats comme *Rhizobium leguminosarum*. La variation du marqueur symbiotique (*nodD-F*) est faible avec la prédominance d'un type *nod g*, qui a été récupéré précédemment avec une fréquence élevée en Europe. En outre, l'analyse des séquences de l'IGS des souches étudiées a confirmé sa grande variabilité. Une analyse par AMOVA a montré une différenciation très significative dans la distribution des haplotypes IGS entre les populations des deux zones éco-climatiques. Cette différenciation se traduit par des différences dans les fréquences des génotypes dominants. A l'inverse, aucun effet de la plante hôte n'a été détecté. L'analyse phylogénétique basée sur les séquences du gène *nodD* suggère que la diversité symbiotique de ce gène dans les populations de rhizobiums nodulant le pois et la lentille en Algérie est relativement basse comparée à celle observée dans d'autres zones géographiques au monde.

Mots clés : Pois, lentille, nodosités, *Rhizobium*, diversité, symbiose, structure génétique des populations, Algérie, zones éco-climatiques.

SUMMARY

The symbiosis *Rhizobium*-legume leads to the formation of root nodules fixing atmospheric nitrogen. This natural process has a considerable economic and agronomic interest. In Algeria, the production of food and forage legume is affected by environmental and climatic stresses (high temperature, water deficit...). In this study, total of 237 isolates were isolated from root nodules collected on lentil (*Lens culinaris*), proteaginous and forage peas (*Pisum sativum*) grown in the field in six sites representing two contrasting eco-climatic zones, sub humid and semi-arid in Eastern Algeria. The main objective was to determine the degree of variability of the genetic structure of populations of *Rhizobium* nodulating among sites and isolated plants in different climatic conditions. Our isolates were characterized by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S-23S rRNA intergenic region (IGS), and the *nodD-F* symbiotic region. The combination of these haplotypes allowed to clustered the isolates into 26 distinct genotypes. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences allowed us to classify all isolates as *Rhizobium leguminosarum*. Results obtained showed that the variation of symbiotic marker (*nodD-F*) is low with the predominance of one haplotype *nod g*, previously recovered at high frequency in Europe. Sequence analysis of IGS further confirmed its high variability in the studied strains. An AMOVA analysis showed highly significant differentiation in the IGS haplotype distribution between populations from both eco-climatic zones. This difference was reflected by differences in dominant genotype frequencies. Conversely we could not detect any host plant effect. The *nodD* gene sequence based phylogeny suggests that symbiotic gene diversity in pea and lentil nodulating rhizobial populations in Algeria is low compared to that reported elsewhere in the world.

Keywords: Pea, lentil, nodules, *Rhizobium*, diversity, symbiosis, genetic structure of populations, Algeria, eco-climatic zones.

ملخص

يؤدي التعايش بين الريزوبيوم والبقوليات الى تشكيل عقد جذرية مثبتة لنتروجين الغلاف الجوي. هذه الظاهرة تمثل فائدة اقتصادية وزراعية معتبرة. يتاثر انتاج البقوليات الغذائية والعلفية في الجزائر بالضغوطات البيئية المناخية (درجات حرارة عالية ، ندرة المياه...). في هذه الدراسة ، تم عزل 237 عزلة من العقد الجذرية للعدس (*Lens culinaris*) ، البازلاء العلفية (*pisum sativum*) والبازلاء Protéagineux (*pisum sativum*) زرعت في حقول منتشرة في ستة مواقع تمثل منطقتين ذات مناخ بيئي متناقض ، شبه رطب وشبه جاف في شرق الجزائر. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تحديد تنوع البنية الوراثية لتجمعات الريزوبيوم المكونة للعقد الجذرية بين المواقع ونباتات العزل في ظروف مناخية مختلفة . تم تمييز العزلات بواسطة PCR-RFLP للمنطقة بين الجينات ADNr 16s-23S (IGS) والمنطقة التكافلية *nodD-F* حيث وزعت الى 14 نوع IGS و 10 انواع *nod*. سمح ربط هذه الانماط الفردية الى جمع العزلات ضمن 26 تركيبية وراثية مختلفة IGS/*nod*. أدى تحليل التطور الجيني لسلاسل ال ADNr 16S الى تصنيف جميع العزلات *Rhizobium leguminosarum*. أظهرت النتائج المحصل عليها أن تنوع الواسم التكافلي (*nodD-F*) ضعيف مع سيادة النمط *nodg* الذي عثر عليه سابقا مع تردد عالي في اوروبا. إضافة إلى ذلك ، فان تحليل سلاسل ال IGS للسلاسل المدروسة أكد تنوعها الكبير . أظهر تحليل AMOVA تمايز هام جدا في توزيع الأنماط المتنوعة لل IGS بين تجمعات المنطقتين المناخيتين. هذا التمايز يترجم باختلاف ترددات التركيبات الجينية السائدة. على العكس لم يتم الكشف عن اي تأثير لنبات العزل. يشير تحليل التطور الجيني على أساس سلاسل المورثة *nodD* أن التنوع التكافلي لهذه الأخيرة في تجمعات الريزوبيوم المشكلة للعقد الجذرية عند العدس و البازلاء في الجزائر منخفض نسبيا بالمقارنة مع تلك التي لوحظت في مناطق جغرافية أخرى في العالم.

كلمات مفتاحية : البازلاء ، العدس،العقد الجذرية ، الريزوبيوم ،التنوع ، التكافل، التركيبية الجينية للتجمعات ، الجزائر، مناطق ذات مناخ بيئي.

Liste des figures

- Figure 1 :** Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S des procaryotes portant des gènes *nif* (Franche et al., 2009).....6
- Figure 2 :** Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques de légumineuses *Papilionoideae* (Zhu et al., 2005).....10
- Figure 3 :** Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' α , β et γ -protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums. (Masson-Boivin et al., 2009).....12
- Figure 4 :** Arbre phylogénétique Neighbour-joining basé sur le séquençage de l'ADN ribosomique 16S des souches types des symbiotes des légumineuses.....13
- Figure 5 :** Différents stades de développement des nodules de type indéterminé (à gauche, chez le pois) et déterminé (à droite, chez le soja) (Ferguson et al., 2010).....17
- Figure 6 :** Le dialogue moléculaire *Rhizobium*-Légumineuse. Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire (Lindström et al., 2010).....18
- Figure 7 :** Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques une des substitutions que l'on trouve chez plusieurs espèces de rhizobiums (Cullimore et al., 2001).....21
- Figure 8 :** Zones bioclimatiques de l'Algérie (Nedjraoui et Bédrani, 2008).39
- Figure 9 :** Analyse en composantes principales des sols en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques.....50
- Figure 10 :** Profils électrophorétiques des produits d'amplification de l'IGS 16S-23S de l'ADNr sur gel d'agarose de quelques isolats.....54
- Figure 11 :** Différents Profils électrophorétiques de restriction *HaeIII* par RFLP de la région IGS 16S-23S de l'ADNr.....54
- Figure 12 :** Profils électrophorétiques des produits d'amplifications de la région symbiotique *nodD-F* sur gel d'agarose de quelques isolats.....55
- Figure 13 :** Différents Profils électrophorétiques de restriction *HaeIII* par RFLP de la région symbiotique *nodD-F*.....55
- Figure 14 :** Courbes de raréfaction obtenues pour le génotype IGS/*nod* de l'ensemble des populations du pois fourrager.....56
- Figure 15 :** Courbes de raréfaction obtenues pour le génotype IGS/*nod* de l'ensemble des populations du pois protéagineux.....57
- Figure 16 :** Courbes de raréfaction obtenues pour le génotype IGS/*nod* de l'ensemble des populations de la lentille.....57

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 17 : Distribution des types IGS des populations des rhizobiums dans les zones subhumide (a) et semi-aride (b)..... | 67 |
| Figure 18 : Distribution des types <i>nod</i> des populations de rhizobiums dans les zones subhumide (a) et semi-aride (b)..... | 70 |
| Figure 19 : Structure des populations des rhizobiums selon les génotypes IGS/ <i>nod</i> dans les zones subhumide (a) et semi-aride (b)..... | 72 |
| Figure 20 : Structure des populations des rhizobiums selon les génotypes IGS/ <i>nod</i> chez le pois fourrager, le pois protéagineux et la lentille..... | 73 |
| Figure 21 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) basé sur l'alignement de 907 pb des séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S..... | 76 |
| Figure 22 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) basé sur l'alignement de 470 pb des séquences nucléotidiques de l'IGS de l'ADNr 16S-23S..... | 78 |
| Figure 23 : Arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) basé sur l'alignement de 535 bp de séquences <i>nodD</i> | 79 |

Liste des tableaux

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Zones éco-climatiques, coordonnées géographiques des sites d'expérimentation..... | 39 |
| Tableau 2: Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN et le séquençage..... | 45 |
| Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des sols..... | 49 |
| Tableau 4 : Densité des populations des rhizobiums dans les différents sols..... | 51 |
| Tableau 5 : Nombre des isolats par plante et par site..... | 52 |
| Tableau 6 : Diversité et distribution des isolats des rhizobiums selon les types IGS en fonction de la plante hôte et la zone éco-climatique..... | 59 |
| Tableau 7 : Diversité génétique des populations des rhizobiums selon les types IGS en fonction de la plante hôte et la zone éco-climatique..... | 60 |
| Tableau 8 : Diversité et distribution des isolats des rhizobiums selon leur type <i>nod</i> en fonction de la plante hôte et de la zone éco-climatique..... | 61 |
| Tableau 9 : Diversité génétique des populations des rhizobiums selon leurs types <i>nod</i> en fonction de la plante hôte et de la zone éco-climatique..... | 62 |
| Tableau 10 : Diversité et distribution des isolats des rhizobiums selon les génotypes IGS/ <i>nod</i> en fonction de la plante hôte et de la zone éco-climatique..... | 64 |
| Tableau 11 : Diversité génétique des populations de rhizobiums selon leur génotype IGS/ <i>nod</i> en fonction de la plante hôte et de la zone éco-climatique..... | 65 |
| Tableau 12 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des types IGS..... | 66 |
| Tableau 13 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des types IGS..... | 67 |
| Tableau 14 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des types <i>nod</i> | 68 |
| Tableau 15 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de l'origine géographique et de la plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des types <i>nod</i> | 69 |
| Tableau 16 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des génotypes IGS/ <i>nod</i> | 71 |

Tableau 17 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'origine par AMOVA basée sur les fréquences des géotypes IGS/*nod*.....72

Tableau 18 : Numéros d'accessions des séquences utilisées dans les analyses phylogénétiques.....74

Liste des abréviations

| | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNr | ADN ribosomique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de polymérisation) |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction) |
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme des fragment d'ADN amplifiés) |
| RAPD | Random Amplification of Polymorphic DNA (Amplification aléatoire d'ADN polymorphe) |
| REP | Séquence répétitive extragène palindromique |
| ERIC | Enteric Repetitive Intergenic Consensus |
| MLSA | Multi-Locus Sequence Analysis |
| LCO | Lipo-chito-oligosaccharides |
| NJ | Neighbor-Joining |
| ML | Maximum Likelihood |
| IGS | Espace intergène |
| <i>R.</i> | <i>Rhizobium</i> |
| <i>B.</i> | <i>Bradyrhizobium</i> |
| <i>E.</i> | <i>Ensifer</i> |
| sv. | symbiovar |
| <i>Rlv</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> |
| <i>Rlt</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> symbiovar <i>trifolii</i> |
| <i>Rlp</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> symbiovar <i>phaseoli</i> |
| YMA | Yeast Mannitol Agar |

Table des matières

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Introduction | 1 |
| Chapitre 1. Synthèse bibliographique | 5 |
| 1. La fixation biologique de l'azote..... | 5 |
| 1.1. Généralités sur la fixation d'azote..... | 5 |
| 1.2. Diversité des microorganismes fixateurs d'azote..... | 5 |
| 2. La symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse..... | 7 |
| 2.1. Diversité des légumineuses..... | 8 |
| 2.2. Diversité taxonomique des rhizobiums..... | 9 |
| 2.3. La spécificité d'hôte..... | 11 |
| 3. Mécanisme de la nodulation..... | 14 |
| 3.1. Mode d'infection..... | 14 |
| 3.2. Structure et développement du nodule..... | 15 |
| 3.3. Processus de la fixation symbiotique de l'azote..... | 16 |
| 4. Les bases moléculaires de l'interaction <i>Rhizobium</i> -légumineuse..... | 18 |
| 4.1. Le dialogue moléculaire..... | 18 |
| 4.2. Les flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes <i>nod</i> | 19 |
| 4.3. Les gènes de nodulation et leur localisation..... | 19 |
| 4.4. Les facteurs Nod : Structure, biosynthèse et sécrétion..... | 20 |
| 5. La symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse sous stress environnemental..... | 21 |
| 6. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des rhizobiums..... | 23 |
| 6.1. Méthodes phénotypiques..... | 23 |
| 6.2. Méthodes génotypiques..... | 23 |
| 6.2.1. Séquençage de l'ADNr 16S et analyse phylogénétique..... | 24 |
| 6.2.2. Méthodes de typage génétique..... | 25 |
| 6.2.3. Gènes symbiotiques et analyse phylogénétique..... | 25 |
| 7. Méthodes phylogénétiques..... | 26 |
| 7.1. Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques..... | 26 |
| 7.1.1. Méthodes de distance..... | 26 |
| 7.1.2. Méthode du maximum de vraisemblance ou « Maximum Likelihood-ML»..... | 26 |
| 7.1.3. Méthodes de maximum de parcimonie..... | 27 |
| 7.2. Fiabilité de l'arbre phylogénétique..... | 27 |
| 7.2.1. Evaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques..... | 27 |
| 7.2.2. Enracinement de l'arbre..... | 27 |
| 8. Notre modèle d'étude : <i>Pisum Sativum-Rhizobium</i> et <i>Lens culinaris-Rhizobium</i> | 28 |
| 8.1. Données sur la culture du pois (<i>Pisum sativum</i> L.)..... | 28 |
| 8.1.1. Classification..... | 28 |
| 8.1.2. Origine et répartition géographique..... | 28 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 8.1.3. Ecologie et croissance..... | 28 |
| 8.1.4. Utilisations..... | 29 |
| 8.2. Données sur la culture de la lentille (<i>Lens Culinaris</i> L.)..... | 29 |
| 8.2.1. Classification..... | 29 |
| 8.2.2. Origine et répartition géographique..... | 30 |
| 8.2.3. Ecologie et croissance..... | 30 |
| 8.2.4. Utilisations..... | 31 |
| 8.3. Rhizobiums associés à la lentille et au pois, et distribution géographique..... | 31 |
| 8.4. Diversité génétique des populations de <i>R. leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> | 32 |
| 8.5. Facteurs abiotiques responsable de la variabilité des populations de Rlv..... | 33 |
| 9. Données générales sur la Situation de l'agriculture en Algérie..... | 34 |
| 9.1. Importance de la culture des légumineuses sous contraintes environnementales en Algérie..... | 35 |
| 9.2. Importance agronomique de la culture de la lentille et du pois en Algérie..... | 36 |
| 9.3. Production et importance économique de la culture du pois et de la lentille en Algérie..... | 36 |
| Chapitre 2. Matériel et méthodes..... | 38 |
| 1. Description des sites et échantillonnage des sols..... | 38 |
| 2. Matériel végétal et culture des plantes..... | 38 |
| 3. Dénombrement de <i>Rhizobium</i> présent dans le sol par la méthode MPN (Most Probable Number) à la date du semis..... | 40 |
| 4. Echantillonnage des plantes, Collecte et conservation des nodules..... | 40 |
| 5. Isolement de rhizobiums à partir des nodules racinaires..... | 40 |
| 5. 1. Désinfection des nodules..... | 40 |
| 5. 2. Etalement sur milieu YMA au rouge Congo..... | 41 |
| 6. Purification et conservation des isolats..... | 41 |
| 7. Tests de nodulation..... | 41 |
| 7. 1. Test de nodulation des isolats spécifiques au pois..... | 41 |
| 7. 2. Test de nodulation des isolats spécifiques à la lentille..... | 42 |
| 8. Méthodes moléculaires utilisées pour la caractérisation génotypique des rhizobiums..... | 42 |
| 8.1. Extraction de l'ADN pour la PCR..... | 42 |
| 8.2. Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)..... | 43 |
| 8.2.1. Amplification de l'IGS 16S-23S de l'ADNr..... | 43 |
| 8.2.2. Amplification de la région <i>nodD-F</i> | 44 |
| 8.3. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)..... | 44 |
| 8.4. Séquençage et analyse phylogénétique..... | 46 |
| 8.5. Analyses statistiques..... | 46 |
| 9. Indice de diversité..... | 47 |
| Chapitre. 3 Résultats et discussion..... | 48 |
| 1. Description des sols et densité des populations des rhizobiums..... | 48 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols..... | 48 |
| 1.2. Densité des populations des rhizobiums dans les différents sols..... | 50 |
| 2. Etude morphologique des isolats et test de nodulation..... | 51 |
| 2.1. Etude morphologique..... | 51 |
| 2.3. Test de nodulation..... | 52 |
| 3. Caractérisation génétique des rhizobiums..... | 53 |
| 3.1. Caractérisation des rhizobiums par PCR-RFLP..... | 53 |
| 3.1.1. Amplification d'ADN et Profils de restriction de la région IGS 16S-23S de l'ADNr..... | 53 |
| 3.1.2. Amplification d'ADN et profils de restriction de la région symbiotique <i>nodD-F</i> | 53 |
| 3.1.3. Courbes de raréfaction..... | 56 |
| 3.1.5. Répartition et diversité génétique des populations de rhizobiums..... | 58 |
| 3.1.5.1. Répartition et diversité génétique des types IGS dans les différents sites et en fonction de la plante d'origine..... | 58 |
| 3.1.5.2. Répartition et de diversité génétique des types <i>nod</i> dans les différents sites et en fonction de la plante d'origine..... | 59 |
| 3.1.5.3. Répartition et diversité génétique des génotypes IGS/ <i>nod</i> dans les différents sites géographiques et en fonction de la plante d'origine..... | 62 |
| 3.1.6. Structuration des populations des rhizobiums..... | 65 |
| 3.1.6.1. Structuration des populations des rhizobiums selon le type IGS..... | 65 |
| 3.1.6.2. Structuration des populations de rhizobiums selon le type <i>nod</i> | 68 |
| 3.1.6.3. Structuration des populations de rhizobiums selon les génotypes IGS/ <i>nod</i> | 70 |
| 3.2. Séquençage et analyse phylogénétique..... | 73 |
| 3.2.1. Analyse phylogénétique basée sur la séquence de l'ARNr 16S..... | 75 |
| 3.2.2. Analyse phylogénétique basée sur la séquence de l'IGS 16S-23S ADNr..... | 77 |
| 3.2.3. Analyse phylogénétique basée sur le gène <i>nodD</i> | 77 |
| 4. Discussion des résultats..... | 80 |
| 4.1. Les rhizobiums isolés du pois et de la lentille en Algérie sont affiliés à l'espèce <i>Rhizobium leguminosarum</i> | 80 |
| 4.2. Les niveaux de diversité génétique sont contrastés entre les loci symbiotique et chromosomique..... | 82 |
| 4.2.1. Diversité génétique du locus chromosomique..... | 82 |
| 4.2.2. Diversité génétique du locus symbiotique..... | 83 |
| 4.2.3. Diversité génétique du génotype IGS/ <i>nod</i> | 85 |
| 4.3. Facteurs influençant la structure des populations des rhizobiums..... | 87 |
| 4.3.1. Distance géographique..... | 87 |
| 4.3.2. Facteurs environnementaux..... | 88 |
| 4.4. Le facteur sol n'a pas d'influence sur la diversité génétique bactérienne..... | 89 |
| 4.5. La plante hôte n'a pas d'influence significative sur la diversité génétique bactérienne récupérée..... | 90 |
| Conclusion et perspectives..... | 92 |
| Références bibliographiques..... | 96 |

Annexes

Introduction

Introduction

En Algérie, la production des légumineuses fourragères et alimentaires constituent, en plus des céréales les défis majeurs de l'agriculture. Dans un contexte de sol pauvre en azote, les légumineuses sont intéressantes car elles ont la capacité de réaliser une symbiose fixatrice d'azote atmosphérique avec les bactéries rhizobiums du sol. Elles développent des nodules sur leurs racines, dans lesquelles les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac disponible pour la nutrition azotée de la plante. Cette symbiose présente des intérêts environnementaux et agronomiques puisqu'elle permet de réduire la consommation d'engrais chimiques azotés. Les légumineuses à grains sont une source majeure de protéines chez l'homme et la nutrition animale, elles sont fréquemment cultivées en rotation ou en association avec les céréales afin d'améliorer leur nutrition en azote, les rendements des cultures et la fertilité des sols (Corre-Hellou et *al.*, 2006).

La région de l'est algérien présente un climat méditerranéen relevant des étages bioclimatiques humide, subhumide et semi aride, elle se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées (FAO, 2006). Parmi les légumineuses alimentaires, la culture de la lentille a été favorisée par le Ministère Algérien de l'Agriculture depuis les années 2007-2008 (<http://www.minagri.dz>). La lentille est parmi les plus anciennes légumineuses cultivées en Asie occidentale, en Egypte et au sud de l'Europe; elle s'est probablement diffusée de l'Asie occidentale vers la Méditerranée, en Asie, en Afrique et en Europe (Brink et Belay, 2006). En Algérie, Beaucoup de variétés de lentilles longtemps cultivées ont disparu. De nos jours la lentille cultivée est soit locale de mélanges variables ou d'origine européenne. Plusieurs variétés ont été introduites, et plusieurs nouvelles d'entre elles ont été sélectionnées en fonction de leur capacité d'adaptation aux différentes conditions agro-climatiques rencontrées dans le pays (FAO, 2006).

La diversification des cultures fourragères est très limitée en raison de peu d'effort de recherche et de travaux qui ont été réalisés sur l'introduction de semences et la création variétale. Le pois protéagineux (*Pisum sativum*) a été introduit récemment en Algérie, mais les surfaces consacrées à sa culture restent limitées, malgré son importance stratégique. Bien que le genre *Pisum* soit assez bien représenté dans la flore algérienne, il semble que les variétés cultivées ont été introduites en totalité. Le pois fourrager (*Pisum sativum subsp. arvense*) a prouvé ses capacités d'adaptation et de production au niveau de toutes les zones du

nord de l'Algérie. Cette espèce qui a connu un développement conséquent dans les années 80 est sujette à un net recul en matière d'utilisation, malgré la sélection par l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures) de variétés très productives. Les expérimentations menées à l'ITGC ont démontré que l'association à base de pois fourrager (pois-avoine, pois triticale, pois-orge) est plus équilibrée que celle à base de vesce car cette dernière est souvent étouffée par la céréale utilisée (FAO, 2006).

Une des caractéristiques principales de l'association symbiotique légumineuse-*Rhizobium* est sa spécificité. En effet, une souche donnée infecte un nombre limité d'espèces végétales, appelé spectre d'hôte de la bactérie. La notion de symbiovar (Rogel et al., 2011), en suivant le concept pathovar classique pour les bactéries pathogènes des plantes a été défini pour différencier les rhizobiums d'une même espèce mais qui possèdent une gamme d'hôte différente. Par exemple, les trois symbiovars *phaseoli*, *trifolii* et *viciae* ont été créés au sein de l'espèce *Rhizobium leguminosarum* pour les souches nodulant les tribus *Phaseolus*, *Trifolium* et *Viciae* (incluant les genres *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* et *Lens*) respectivement (Jordan, 1984 ; Rogel et al., 2011). Des souches symbiovar *viciae* ont été détecté ultérieurement dans *Rhizobium fabae* (Tian et al., 2008) et *Rhizobium pisi* (Ramírez-Bahena et al., 2008).

Chez *R. leguminosarum* sv *viciae* (*Rlv*), le spectre d'hôte est déterminé par des gènes de nodulation (*nod*) porté par un plasmide symbiotique (pSym) (Laguerre et al., 1993). Certaines études ont mis en évidence la diversité du gène *nodD* parmi les souches de *Rlv* et la spécificité symbiotique vers les plantes hôtes (Laguerre et al., 1996 ; Zézé et al., 2001 ; Laguerre et al., 2003 ; Mutch et al., 2003 ; Mutch et Young 2004 ; Tian et al., 2007, Depret et Laguerre., 2008 ; Rashid et al., 2014).

Plusieurs travaux ont montré une grande diversité génétique dans les populations naturelles des rhizobiums nodulant les genres *Pisum*, *Vicia* et *Lathyrus*, en particulier *Rhizobium leguminosarum* (palmer et Young, 2000 ; Zhang et al., 2001 ; Laguerre et al., 2003 ; Moschetti et al., 2005 ; Mutch et Young, 2004 ; Depret et al., 2004 ; Depret et al., 2008 ; Aoki et al., 2010). *R. fabae* (Tian et al., 2008) et *R. pisi* (Ramirez-Bahena et al., 2008) ont été décrits par la phylogénie de ARNr, *atpD* et *recA*. *R. fabae*, isolé de *Vicia faba* en Chine et est capable de noduler le pois (Tian et al., 2008), et son gène *nodC* est similaire à celui du symbiovar *viciae* (Rogel et al., 2011). *R. pisi* nodulant le pois a été découvert pour reclasser une souche supposée correspondant à l'espèce *R. leguminosarum* (Ramirez-Bahena et al., 2008). Des souches isolées du *Pisum* au Pérou étaient phylogénétiquement proches de

R. leguminosarum et *R. etli* (Santillana et al., 2008). *R. etli* établit une symbiose efficace avec l'haricot, et il est phylogénétiquement proche de *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993). Des souches *R. etli* ont également été récupérées à partir des nodules du pois en Chine (yang et al., 2008).

Quelques études moléculaires sur *R. leguminosarum* sv *viciae* nodulant la lentille ont été réalisées (Hynes et O'Connell, 1990 ; Rashid et al., 2009, 2012, 2014 ; Zahran et al., 2013). Récemment, Rashid et al. (2012) ont publié une étude phylogénétique basée sur les gènes ARNr 16S, *recA*, *atpD* et *glnII* des souches de rhizobiums nodulant la lentille cultivée dans différentes régions du Bangladesh, montrant que la majorité d'entre elles peuvent représenter trois lignées distinctes dans le clade *R. etli* et *R. leguminosarum*. Rashid et al., (2014) ont montré que *R. leguminosarum* est le symbiote originel de la lentille, mais il a été associé à de nouvelles lignées au Bangladesh où il a été introduit.

L'impact agronomique et écologique des rhizobiums repose à la fois sur leur propriétés symbiotiques (nodulation, efficacité, spécificité et gamme d'hôte (Laguerre et al., 2007)) et leurs capacité d'adaptation aux contraintes environnementales affectant la fixation de l'azote, tels que les températures élevées, le stress hydrique, la salinité ou l'acidité du sol (Zahran, 1999 ; Serraj, et al., 1999 ; Abdelmoumene et al., 1999). Le génotype de la plante lui même influence la structure des populations des rhizobiums dans les nodules du pois (Depret et Laguerre, 2008), il est particulièrement sensible aux perturbations environnementales telles que les pratiques agricoles et la contamination des sols par des métaux lourds (Palmer et Young, 2000 ; Lakzian et al., 2002 ; Depret et al., 2004 ; Laguerre et al., 2006). Le déficit hydrique, les pluies irrégulières et la salinité des sols sont des facteurs majeurs limitant la croissance des plantes et la production agricole dans la zone méditerranéenne (L'Taief et al., 2009) particulièrement l'Algérie, et l'adaptation des rhizobiums aux conditions de sécheresse est variable (Athar et Johnson, 1997 ; Rehman et Nautiyal, 2002 ; BenRomdhane et al., 2009). le manque d'eau affecte la diversité des rhizobiums nodulant le pois chiche et réduit le nombre des nodules et la biomasse aérienne (BenRomdhane et al., 2009). Des isolats tolérants au stress salin sont aussi souvent tolérants au stress hydrique (Thami-Alami et al., 2010). Une grande diversité phénotypique et génotypique est souvent récupérée parmi les isolats des rhizobiums échantillonnés dans les zones arides et semi-arides, par exemple au Maroc (Elboutahiri et al., 2010) en Algérie (Boukhatem et al., 2012) et en Tunisie (Merabet et al., 2010 ; Zakhia et al., 2004 ; 2006).

Jusqu'en 2008, les légumineuses de la tribu des *Viciae* incluant le pois et la lentille étaient considérées noduler seulement par *R. leguminosarum* sv *viciae*. Depuis, *R. pisi* et *R. fabae* ont été isolés du pois et de la féverole respectivement. La plupart des études sur la diversité et l'écologie de *R. leguminosarum* sv *viciae* étaient conduites dans les zones de climat tempéré en Europe. A notre connaissance, aucune étude n'a été rapporté en littérature sur les rhizobiums nodulant le pois et la lentille adaptées aux contraintes de l'environnement en Algérie. Afin d'acquérir des connaissances dans ce contexte agro-environnemental sur les microsymbiotes nodulant ces deux légumineuses, et d'enrichir notre connaissance sur la structure et la diversité génétique des populations des rhizobiums associés aux légumineuses de la tribu des *Viciae* , spécifiquement avec le pois et la lentille d'intérêt agronomique. Nous avons examiné la structure et la diversité génétique des populations nodulantes isolées à partir du pois protéagineux, du pois fourrager et de la lentille cultivés dans six types de sols différents représentant deux conditions éco-climatiques contrastées subhumides et semi-arides de l'Est d'Algérie. Une meilleure connaissance de la diversité des systèmes symbiotiques et de leur fonctionnement contribue à la résolution des problèmes environnementaux. Ainsi, les principaux objectifs fixés dans cette étude sont :

- i) identifier les rhizobiums nodulant le pois et la lentille en Algérie ;
- ii) comparer et analyser la structure et la diversité génétique des populations nodulantes dans les différents sites géographiques situés dans les deux zones éco-climatiques ;
- iii) déterminer si la plante hôte exerce une sélection sur les populations nodulantes ;
- iv) étudier si les conditions environnementales, tels que : le type de sol, la distance géographique et les facteurs climatiques influencent l'abondance, la structure et la diversité génétique des populations naturelles de rhizobiums.

Pour atteindre nos objectifs, Les populations nodulantes ont été caractérisées par la méthode moléculaire PCR/RFLP de la région intergénique de l'ADNr 16S-23S (IGS 16S-23S) et de la région symbiotique *nodD-F*, ainsi que l'analyse phylogénétique des séquences de l'IGS 16S-23S, ARNr 16S et le gène *nodD*.

Enfin, les résultats obtenus de caractérisations, de la diversité et de la structure des différentes populations ont été analysés, comparés et discutés dans le chapitre résultats et discussion.

CHAPITRE 1

1. La fixation biologique de l'azote

1.1. Généralités sur la fixation d'azote

Constituant des acides aminés et nucléiques, l'azote est un élément essentiel pour toutes formes de vie. Dans les sols, les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles alors que cet élément constitue souvent, avec le manque d'eau et de phosphate, un principal facteur limitant la croissance des végétaux (Cleland et Harpole, 2010). L'azote est pourtant très abondant sur la planète puisque l'atmosphère contient 78% de diazote N_2 , mais cette forme est inaccessible à la plupart des êtres vivants. En effet les seuls organismes capables de l'utiliser sont des bactéries, dites diazotrophes, qui possèdent le complexe enzymatique réducteur appelé nitrogénase. En conditions de faible teneur en oxygène, cette enzyme catalyse la réduction de l'azote atmosphérique N_2 en ammoniac NH_3 (Day et *al.*, 2001 ; Downie, 2005). Cette fixation biologique de l'azote contribue approximativement à 16% de l'apport total d'azote dans les terres cultivées (Ollivier et *al.*, 2011). Au niveau du sol, les plantes ne peuvent assimiler cet élément que sous forme de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) par absorption racinaire. Cet azote assimilable ne représente cependant que 0,001% de l'azote total de la biosphère (Newton, 1998). Ainsi, en agriculture, l'apport d'engrais azotés vise à combler les besoins des cultures. Cependant, il est estimé qu'environ 50 % de cet azote épandu n'est pas absorbé mais lessivé, causant de graves problèmes environnementaux telle que la pollution des nappes phréatiques (Graham et Vance, 2000). Certaines plantes se sont affranchies de ce déficit en azote en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique gazeux. Au cours de cette association à bénéfice réciproque (mutualisme), la plante fournit de l'énergie et généralement une protection à son symbiote, tandis que celui-ci fournit en retour de l'azote sous des formes variées. Parmi ces associations symbiotiques, la symbiose entre les plantes de la famille des légumineuses et les bactéries collectivement appelées « rhizobiums » est une des plus étudiée.

1.2. Diversité des microorganismes fixateurs d'azote

L'arbre phylogénétique basé sur la séquence de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S montre que les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à deux des trois règnes primaires, archaebactéries et eubactéries (Young, 1992), et sont présents chez les grands groupes bactériens (Figure 1). Chez les eubactéries la fixation d'azote est associée à une large diversité de métabolismes, bactéries anaérobies ou aérobies, bactéries photosynthétiques, cyanobactéries et actinomycètes (Blondeau, 1980). Certains fixateurs

d'azote sont associés à des plantes ou vivent à l'état libre dans le sol et les eaux. Pour les archées, la fixation d'azote semble être restreinte au groupe des méthanogènes.

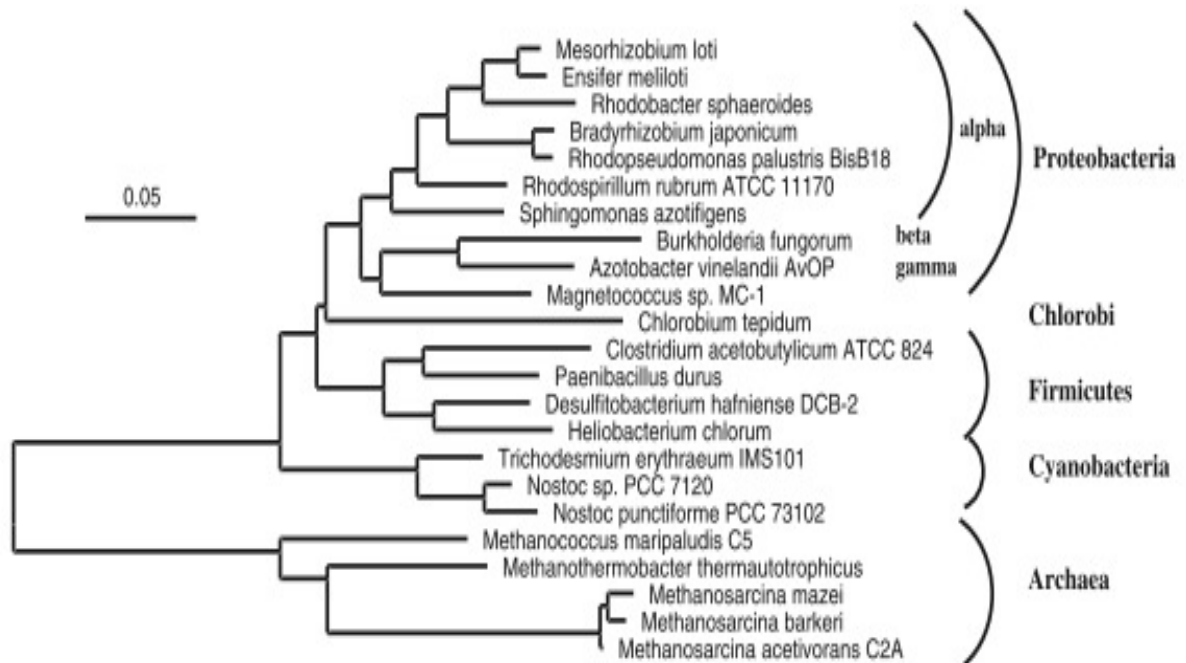


Figure 1 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S des procaryotes portant des gènes *nif* (Franche et al., 2009).

Les fixateurs libres, c'est-à-dire les bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique sans être en association symbiotique, comprennent des genres variés : bactéries aérobies *Acetobacter* (Gillis et al., 1989), *Azobacter* (Becking, 2006), *Azospirillum* (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000), bactéries anaérobies strictes *Clostridium* (Asami et Kiwamu, 2006) ou aérobies facultatives *Klebsiella* (Chelius et Triplett, 2000), *Pseudomonas* (Yan et al., 2008), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique *Rhodobacter* (Masepohl et al., 2005), *Rhodospirillum* (Selao et al., 2008), et des cyanobactéries (Meeks et Elhai, 2002).

Dans le cadre du mutualisme, deux groupes de végétaux forment des symbioses nodulaires avec des bactéries diazotrophes : les plantes actinorhiziennes, dont les partenaires symbiotiques sont des bactéries filamenteuses Gram positif du genre *Frankia* (Benson et Dawson, 2007 ; Franche et al., 2009), et les légumineuses qui s'associent aux rhizobiums (bactéries unicellulaires gram négatif). 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 (Rai et al., 2000 ; Duhoux et Nicole, 2004 ; 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 (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000 ; Cocking, 2003).

2. La symbiose *Rhizobium*-légumineuse

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. A la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes, via un dialogue moléculaire notamment, la bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Perret et al., 2000 ; Gibson et al., 2008). Certaines légumineuses sont également capables de former des nodules sur les tiges, appelés nodules caulinaires (Dreyfus et Dommergues, 1981 ; Giraud et Fleischman, 2004). L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires.

Les légumineuses permettent ainsi une réduction de l'utilisation des engrais chimiques azotés soit en utilisation directe (légumineuses alimentaires par exemple), soit lorsqu'elles

sont utilisées en rotation de culture en tant qu'engrais verts. Les légumineuses jouent donc un rôle essentiel dans les écosystèmes naturels, en agriculture et en agroforesterie, en colonisant des espaces pauvres en azote et en constituant une source majeure de fertilisants naturels et économiques pour les cultures. Cependant, beaucoup de légumineuses sont sensibles à la sécheresse et à l'acidité des sols, ce qui gêne l'expansion de ces cultures dans les régions à faible pluviométrie. Ainsi, l'identification d'espèces hôtes et rhizobiennes tolérantes au sel et/ou à l'acidité des sols sont une priorité dans le domaine de la recherche agricole (Graham et Vance, 2003). L'association symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses est très diverse et implique de nombreuses espèces chez les deux partenaires, végétal et bactérien.

2.1. Diversité des légumineuses

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobiums appartiennent toutes à la superfamille des *Fabaceae* (appelés aussi légumineuses), à l'exception d'une seule non-légumineuse, le genre *Parasponia* de la famille des *Ulmacées* (Trinick et Hadobas, 1988 ; Lafay et al., 2006). Les légumineuses représentent la famille des *Leguminosae* (ou *Fabaceae*), de l'ordre des *Fabales*, la sous classe des *Rosidae*, et la classe des *Dicotyledonae*. Elles forment une famille importante et variée des Angiospermes, la troisième après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Doyle et Luckow, 2003). La famille des légumineuses comprend plus de 700 genres et près de 20 000 espèces (Lewis et al., 2005) répartis en trois sous-familles : les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae* (Doyle et Luckow, 2003), divisées elles-mêmes en groupes de genres communément appelés tribus (Doyle, 2011). La nodulation par les rhizobiums est plus fréquente chez les deux sous-familles des *Mimosacées* et des *Papilionacées* (plus de 90% des espèces) (Doyle, 2011).

Les *Papilionoideae* comprennent plus des deux tiers des espèces des trois sous-familles. Cette sous famille est très cosmopolite et compte près de 14000 espèces réparties en 476 genres de légumineuses tropicales et tempérées. Les plantes sont principalement des herbacées mais comprennent aussi des arbres et des arbustes, Parmi les espèces étudiées (21% du total), 97% sont nodulées par les rhizobiums (Doyle et Luckow, 2003). Les *Papilionoideae* ont une grande importance au niveau de l'agriculture. Elles sont cultivées pour leurs graines riches en protéines ou pour leurs propriétés fourragères (MP3-Grain Legumes, 2010). Les *Papilionoideae* se divisent en deux groupes majeurs de plantes cultivées : les légumineuses tropicales (ou *Phaseoloides*) comme notamment les genres *Cajanus*, *Glycine* (soja), *Phaseolus* (haricot) et *Vigna* (vigne) regroupés dans la tribu *Phaseoleae*, et les légumineuses

tempérées (ou Galegoïdes) comme les genres *Cicer* (pois chiche), *Lens* (lentilles), *Lotus* (lotier), *Medicago* (luzerne), *Melilotus* (mélilots), *Pisum* (pois), *Trifolium* (trèfle) et *Vicia* (vesce), *Lens* et *Pisum* étant regroupés dans la tribu des *Viciae* (Figure. 2). Les *Mimosoideae* sont composés surtout d'arbres et d'arbustes présents dans les régions tropicales et subtropicales. Leur valeur particulière réside dans leur résistance à la chaleur, à la sécheresse, à la salinité et à l'alcalinité (Piha et al., 1995). Cette sous-famille renferme 77 genres et 3000 espèces ; parmi les espèces ayant été étudiées sur leur caractère symbiotique (10% environ), 90 % ont été trouvées nodulées (Doyle et Luckow, 2003). Enfin, les *Caesalpinioideae* comprennent 162 genres et environ 3000 espèces, majoritairement des arbres ou des arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales (Doyle et Luckow, 2003), dont seules 23% des espèces étudiées sont nodulées par les rhizobiums.

2.2. Diversité taxonomique des rhizobiums

La première bactérie nodulant une légumineuse a été isolée en 1888 par Beijerinck, et initialement nommée *Bacillus radicolica*, puis renommée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Plus tard, la taxonomie des rhizobiums a été fortement influencée par la plante hôte qu'ils sont capables de noduler (Fred et al., 1932). Dans la classification initiale des bactéries (Bergey et al., 1923), les rhizobiums ont été décrits comme Gram négatif, aérobie, bactéries non sporulantes, et le critère principal était leur capacité de nodulation. Plus tard, deux groupes de rhizobiums ont été distingués sur le critère de leur vitesse de croissance (Jordan, 1982) : le genre *Rhizobium* à croissance rapide, et le genre *Bradyrhizobium* à croissance lente.

Les premiers biovars ont été décrits dans l'espèce *R. leguminosarum* proposé par Jordan (1984). Selon cette proposition, les espèces *R. leguminosarum*, *R. trifolii* et *R. phaseoli* devenaient des biovars (ou symbiovar proposé par Rogel et al. (2011)) d'une seule et même espèce *R. leguminosarum* (Ramírez-Bahena et al., 2008).

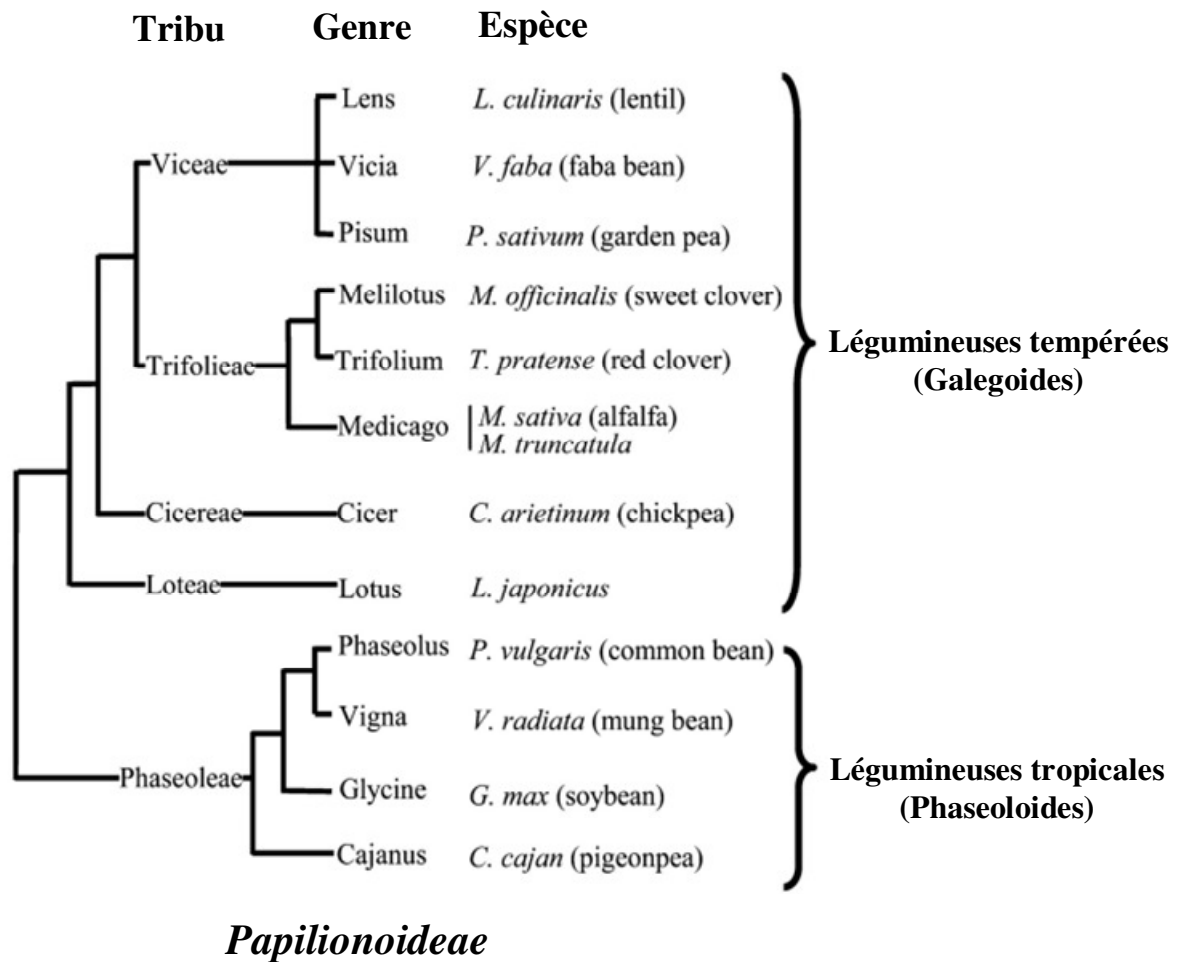


Figure 2 : Dendrogramme représentant les relations phylogénétiques de légumineuses *Papilionoideae* (Zhu et al., 2005) .

Actuellement, les rhizobiums sont répartis dans 13 genres et 98 espèces symbiotiques (<http://www.rhizobiums.co.nz/taxonomy/rhizobiums.html>). Quatre genres d' α -protéobactéries constituent les symbiotes majoritaires de la plupart des espèces de légumineuses rencontrées à travers le monde : *Rhizobium* (Franck, 1889), *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) (Chen et al., 1988 ; de Lajudie et al., 1994 ; Young, 2003), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), et *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982) (Figure. 3). Les espèces du genre *Sinorhizobium* ont été transférées dans le genre *Ensifer* par décision de la Commission judiciaire du Comité international sur la systématique des procaryotes (Tindall, 2008). Toutefois il existe d'autres genres d' α -protéobactéries, induisant des nodules, moins fréquemment isolés, ayant une distribution géographique réduite et un spectre d'hôtes limité, et découvertes plus récemment :

Azorhizobium (Dreyfus et al., 1988), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001 ; Jourand et al., 2004), *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005 ; Zurdo-Pineirro et al., 2007), *Devosia* (Rivas et al., 2002), *Shinella* (Lin et al., 2008), et *Aminobacter* (Maynaud et al., 2012). Par ailleurs, des symbiotes de légumineuses ont également été trouvés dans le phylum des β -protéobactéries (Figure 3), *Burkholderia* (Moulin et al., 2001 ; Chen et al., 2003a, 2005a), et *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (Chen et al., 2001 ; Chen et al., 2003a, b ; Vandamme et Coenye 2004). D'autres études auraient également identifié la présence de protéobactéries du groupe γ dans les nodules des légumineuses (Benhizia et al., 2004 ; Madhi et al., 2011 ; Huang et al., 2012), mais ces résultats restent sujet à controverse (Muresu et al. 2008). Il est intéressant de noter que certains genres de rhizobiums sont très proches de bactéries phytopathogènes comme *Agrobacterium* (α -protéobactérie) ou *Ralstonia* (β -protéobactérie) (Figure 3). Depuis la proposition de Woese, de classer les bactéries sur la base du séquençage de l'ADN ribosomique 16S (Woese et al., 1984), de profonds changements ont été apportés dans la taxonomie des symbiotes des légumineuses (Figure 4).

Cette classification des rhizobiums est loin d'être définitive, elle s'affine sans cesse et s'enrichit d'année en année de nouvelles espèces et nouveaux genres de bactéries grâce à l'exploration de la diversité des symbiotes associés aux légumineuses dans les différentes parties du monde.

2.3. La spécificité d'hôte

L'une des propriétés majeures de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse est sa spécificité. En général, chaque légumineuse ne peut être infectée que par une ou quelques espèces de rhizobiums (spectre d'hôtes de la légumineuse) et réciproquement, chaque souche de rhizobiums ne peut infecter qu'un nombre limité d'espèces de légumineuses (spectre d'hôtes bactérien). Il existe quelques exceptions, certains symbiotes à large spectre d'hôte sont capables de noduler un très grand nombre de légumineuses, comme la souche d'*Ensifer* sp. NGR 234 isolée de *Lablab purpureus* (Stanley et Cervantes, 1991), capable de s'associer avec près de 112 genres de légumineuses et même le genre *Parasponia* (Pueppke et Broughton, 1999). A l'opposé le partenaire bactérien *Azorhizobium caulinodans* n'est capable de s'associer qu'avec un seul hôte végétal, *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988). Certaines légumineuses ne peuvent établir des symbioses qu'avec un nombre restreint de microsymbiotes, comme le genre *Galega* qui ne forme des nodules qu'avec *Rhizobium galegae* (Lindstrom, 1989), alors que le siratro (*Macroptilium atropurpureum*) est

classiquement utilisé pour faire du piégeage à grand échelle car il s'associe avec une large diversité de rhizobiums.

La notion de symbiovar (sv) a été introduite pour différencier les bactéries d'une même espèce mais qui possèdent une gamme d'hôte différente. L'espèce *R. leguminosarum* est un des exemples les mieux décrits dans la littérature. Les symbiovars *phaseoli*, *trifolii* et *viciae* nodulent réciproquement les espèces des genres *Phaseolus*, *Trifolium* et *Vicia/Pisum*. Cette distinction en biovars repose sur le spectre d'hôte qui est lui-même lié au type de gènes symbiotiques hébergés par la souche (Jordan, 1984 ; Rogel et *al.*, 2011).

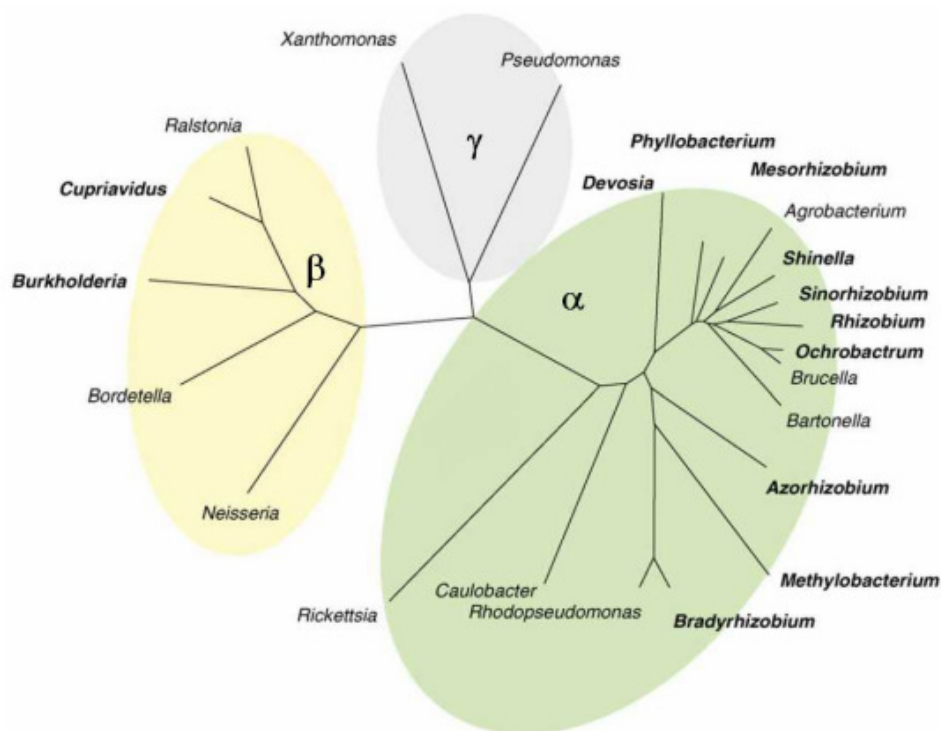


Figure 3 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' α , β et γ -protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson-Boivin et *al.*, 2009).

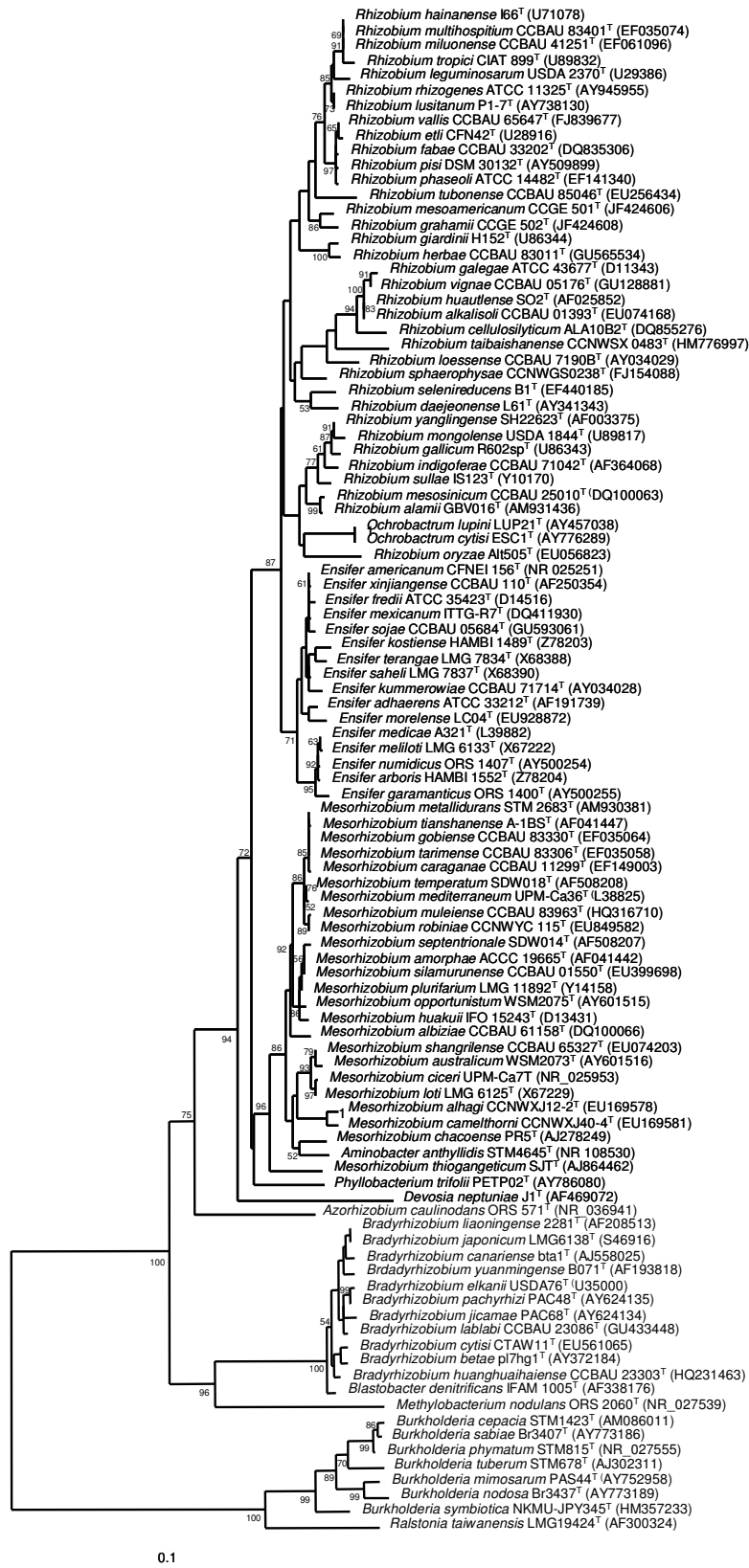


Figure 4 : Arbre phylogénétique Neighbour-joining basé sur le séquençage de l'ADN ribosomique 16S des souches types des symbiotes des légumineuses. Les valeurs de bootstrap (100 répétitions) sont indiquées aux points de branchements (seules les valeurs supérieures à 50% sont représentées).

3. Mécanisme de la nodulation

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 constitution d'un nodule fonctionnel peut être divisée en trois étapes : l'infection, l'organogénèse, et la fixation de l'azote.

3.1. Mode d'infection

L'étape préalable à l'infection s'initie par un dialogue moléculaire spécifique entre les deux partenaires (section 4.1). Par la suite, il s'ensuit l'attachement des bactéries à la surface des poils absorbants. Il a été proposé que des lectines végétales, protéines produites par les plantes à la surface des poils absorbants racinaires soient responsables de cette adhésion en se liant à des polysaccharides (LPS) de la paroi bactérienne (Laus et al., 2006, Williams et al., 2008). De plus, des protéines d'adhésion sont sécrétées par la bactérie comme la ricadhésine identifiée chez de nombreux rhizobiums (Smit et al., 1987). Les LPS jouent un rôle dans la suppression des réactions de défenses de la plante au cours de l'infection (Tellstrom et al., 2007). Ils jouent aussi un rôle majeur dans l'adaptation des rhizobiums contre les stress environnementaux (Skorupska et al., 2006).

Le mode d'infection le plus étudié et le plus courant est l'infection intracellulaire où l'entrée des bactéries dans la plante a lieu à travers des poils absorbants, et a été observé chez des légumineuses tempérées (exemples : *Medicago*, *Trifolium*, *Pisum*) et certaines légumineuses tropicales et subtropicales (exemples : *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine*) (Gage, 2004). En réponse aux facteurs Nod bactériens (lipochitoooligosaccharides produits par la bactérie via les gènes *nod* de nodulation), l'infection se caractérise par une réorientation de la croissance des poils absorbants conduisant à la formation d'une courbure (Root Hair Curling : RHC) en forme de « crosse de berger ». Au cœur de cette crosse, un espace clos est formé, à l'intérieur duquel les rhizobiums sont piégés et prolifèrent. Les bactéries induisent alors la formation d'un cordon d'infection intracellulaire par invagination de la paroi végétale, cordon au sein duquel les bactéries se multiplient. Le cordon progresse vers le site définitif de libération des bactéries : le primordium nodulaire qui devient ensuite le lobe nodulaire

Il existe aussi un mécanisme d'infection intercellulaire ou entrée par fissure « crack entry », observé par exemple chez *Sesbania. rostrata* (Pawlowski et Bisseling, 1996) et *Aeschynomene indica* et *Aeschynomene afraspera* (Bonaldi et al., 2011). Dans ce cas, les

bactéries profitent de fissures formées lors de l'émergence des racines latérales et colonisent les espaces intercellulaires en formant des poches d'infection. Les rhizobiums progressent ensuite vers le primordium nodulaire de manière intercellulaire ou deviennent intracellulaires en formant des cordons d'infection (Pawlowski et Bisseling, 1996).

3.2. Structure et 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, 1991 ; Trevaskis et *al.*, 2002). Les bactéries sont libérées du cordon dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose par lequel elles sont internalisées dans un compartiment constituant le symbiosome entouré d'une membrane péribactéroïdienne d'origine végétale (Oke et Long 1999 ; Day et *al.*, 2001 ; Brewin, 2004 ; Gage, 2004). Cette membrane assure la séparation des bactéries de la cellule hôte et contrôle l'échange de signaux et de nutriments entre les deux partenaires (Udvardi et Day, 1997). Une fois dans le symbiosome, les cellules bactériennes subissent de profonds changements physiologiques et morphologiques, se différenciant en bactéroïdes, formes fixatrices d'azote adaptées aux nouvelles conditions environnementales présentes dans le nodule (Mergaert et *al.*, 2006).

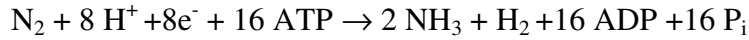
Chez les légumineuses deux types de nodules peuvent être distingués : déterminés et indéterminés suivant le site d'initiation des divisions cellulaires du cortex et la persistance ou non du méristème. (Hirsch, 1992 ; Pawlowski et Bisseling, 1996).

Chez les espèces tropicales (exemple : *Glycine*, *Phaseolus*...), les nodules de types déterminés sont initiés à partir du cortex externe dont la persistance du méristème est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Ce processus se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules (Figure 5).

Les nodules indéterminés caractéristiques de la sous-famille des *Mimosoideae* et de nombreuses espèces de *Papilionoideae* (exemple : *Lentille*, *Pisum*, *Trifolium*, *Vicia*...) (Sprent, 2007) sont formés à partir du cortex interne et ont un méristème apical persistant qui produit en continue de nouvelles cellules, ce qui se traduit par des nodules de forme allongée et organisés en zones histologiquement différentes (Hirsch, 1992). Ainsi le nodule est divisé en quatre zones distinctes (zone I à IV) (Figure 5). La forme et la structure du nodule sont corrélées à l'origine taxonomique de la plante hôte (Sprent, 2007).

3.3. Processus de la fixation symbiotique de l'azote

La fixation d'azote est la réduction du N₂ en NH₃ catalysée par le complexe enzymatique de la nitrogénase selon la réaction suivante (Kaminski et *al.*, 1998) :



La fixation de l'azote est un processus très exigeant en énergie, qui nécessite au moins 16 molécules d'ATP pour réduire une molécule de N₂ en NH₃. Le fonctionnement de la fixation d'azote nécessite la contribution des deux partenaires. La plante fournit un environnement microaérobie, de l'énergie et des sources de carbone nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase. Le bactéroïde fournit la machinerie génétique pour la synthèse de la nitrogénase responsable de la fixation de l'azote : ce sont les gènes *nif* et *fix*. Les gènes *fix* sont des gènes essentiels à la fixation d'azote mais sont rencontrés uniquement chez les micro-organismes fixateurs symbiotiques (Fisher, 1994 ; Lodwig et Poole 2003 ; Masson-Boivin et *al.*, 2009). Les gènes *nif* codent pour la biosynthèse de la nitrogénase, dont les gènes de structure *nifH*, *nifD* et *nifK*. Le complexe enzymatique nitrogénase est composé de deux sous unités fonctionnelles à groupement prosthétiques, la dinitrogénase réductase et la dinitrogénase. Le gène *nifH* code pour la dinitrogénase réductase (protéine Fe) constitué de deux chaînes identiques, alors que les gènes *nifD* et *nifK* codent pour et la dinitrogénase (protéine Mo-Fe) qui est un hétérotétramère (Fisher 1994 ; Newton, 2007). La nitrogénase est un complexe enzymatique très sensible à l'oxygène, qui est rapidement inactivé dans un environnement aérobie. La nodosité lui confère une niche protectrice grâce à la présence d'une protéine végétale, la leghémoglobine qui fixe l'oxygène et permet de le maintenir à faible pression partielle. Elle se lie à l'oxygène et permet ainsi de réguler la diffusion de l'oxygène aux bactéroïdes (Ott et *al.*, 2005).

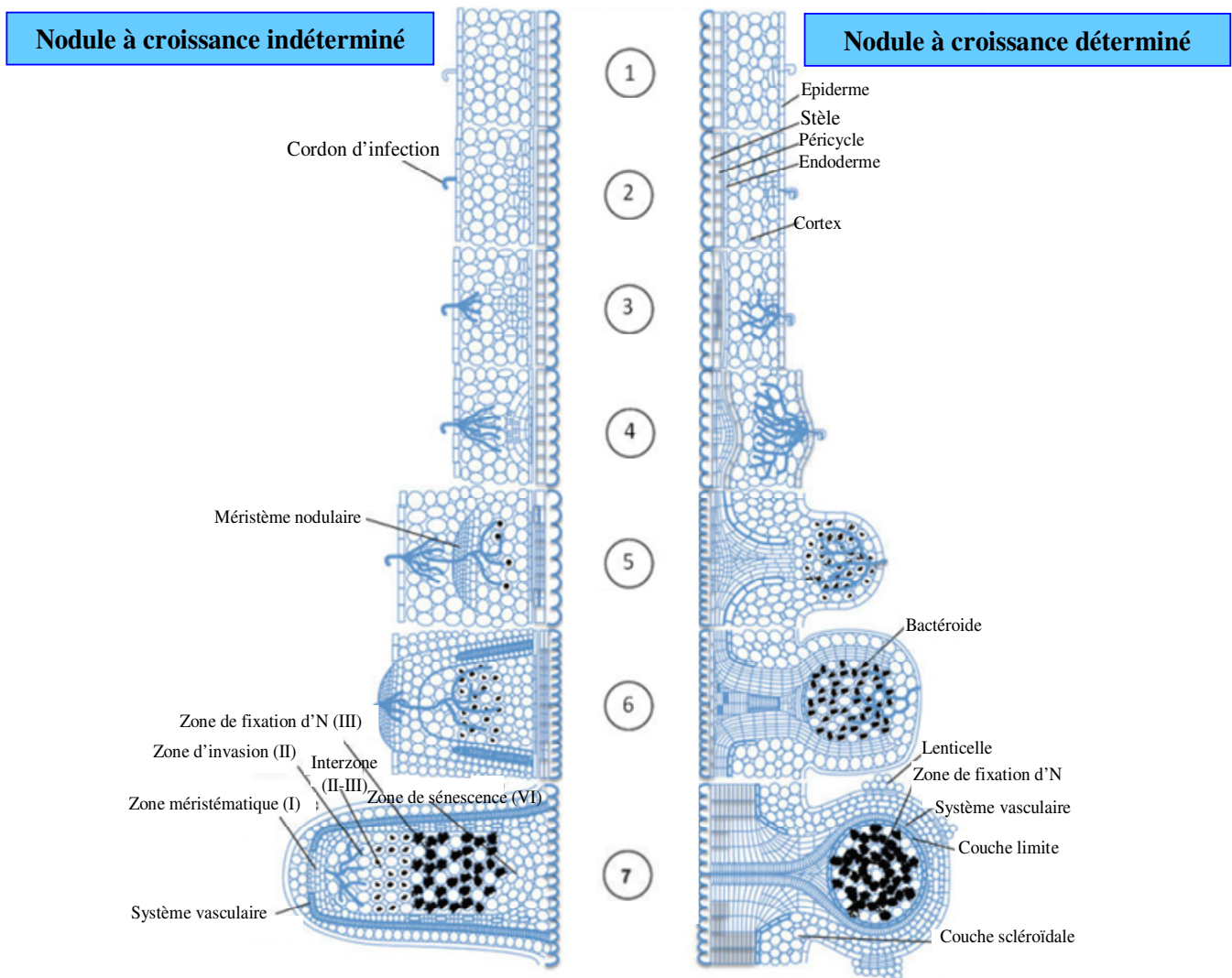


Figure 5 : Différents stades de développement des nodules de type indéterminé (à gauche, chez le pois) et déterminé (à droite, chez le soja). (1) Reconnaissance et attachement des rhizobiums sur le poil absorbant (2) Formation du cordon d'infection et division des cellules (3) Progression du cordon d'infection dans le cortex (4) Progression du cordon d'infection dans le cortex interne (5) le cordon d'infection s'achemine dans le cortex, invasion des rhizobiums dans le primordium nodulaire et formation du méristème avec différenciation des bactéroïdes (6) maturation (7) Nodule mature fixateur d'azote. L'ontogenèse du nodule de type indéterminé résulte par quatre zones distinguables : la zone méristématique (zone I) correspond à l'apex du nodule et contient des cellules dépourvues de bactéries, la zone d'infection (zone II) contient les cellules corticales nouvellement produites par le méristème qui sont envahies par des cordons d'infection rhizobiens où les bactéries sont libérées et se différencient en bactéroïdes, dans l'interzone II-III, la différenciation des bactéroïdes se poursuit et la fixation de l'azote commence, puis une zone de fixation (zone III) comprend les cellules contenant les bactéroïdes fixateurs au sein des symbiosomes, et enfin succède la zone IV de sénescence du nodule (Ferguson *et al.*, 2010).

4. Les bases moléculaires de l'interaction *Rhizobium*-légumineuse

4.1. Le dialogue moléculaire

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est le résultat de l'interaction complexe entre la bactérie et son hôte. Ces interactions débutent par une reconnaissance mutuelle faisant intervenir un dialogue moléculaire entre les deux partenaires (Figure 6). Les flavonoïdes libérés par les racines de la plante constituent le premier signal moléculaire ; ils sont reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes, les protéines NodD. L'activation de ces protéines conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol* collectivement appelés gènes *nod*) par l'intermédiaire de boîtes régulatrices (*nodbox*) situées en amont des gènes *nod*. Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochito-oligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod (Lerouge et *al.*, 1990 ; Dénarié et *al.*, 1996), qui sont ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques de la plante (Kouchi et *al.*, 2010). Ces facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, ils constituent le second signal moléculaire nécessaire à l'initiation nodulaire. Par la suite, l'activation de nombreux gènes permet la mise en place et le contrôle de l'infection et de la différenciation du nodule (Dénarié et *al.*, 1996 ; Perret et *al.*, 2000).

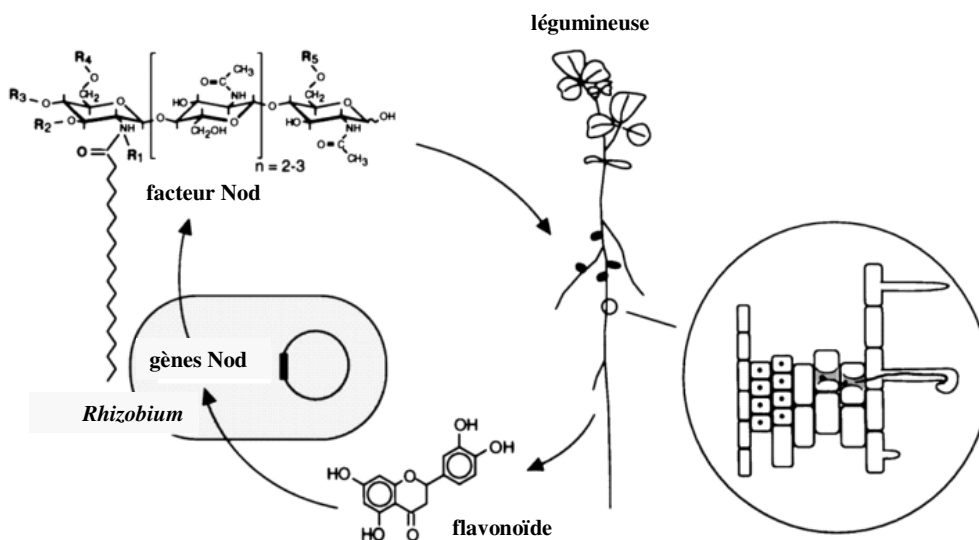


Figure 6 : Le dialogue moléculaire *Rhizobium*-Légumineuse. Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire (Lindström et *al.*, 2010).

4.2. Les flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes *nod*

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de nature aromatiques exsudés par les racines de la plante dans la rhizosphère. Ce sont les principaux signaux émis par la plante hôte et perçus par les rhizobiums dans le sol (Taylor et Grotewold, 2005 ; Gibson et *al.*, 2008), induisant l'expression des gènes de nodulation chez *Rhizobium* (Cooper 2007 ; Zhang et *al.*, 2009). Chaque plante exsude un mélange de différents flavonoïdes (Cooper, 2004 ; Perret et *al.*, 2000) dont les isoflavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses (Brencic et Winans, 2005).

4.3. Les gènes de nodulation et leur localisation

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).

- 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 (*nodABC*), appelés aussi gènes structuraux sont présents en copie unique (sauf exception) et sont impliqués dans la synthèse et la sécrétion de signaux symbiotiques bactériens extracellulaires, les facteurs Nod. Ces gènes sont présents chez presque tous les rhizobiums (Dénarié et *al.*, 1996), y compris les β -protéobactéries (Moulin et *al.*, 2001). Ces gènes *nodABC* jouent un rôle absolument essentiel dans la formation des nodosités. 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 responsables des substitutions qui s'opèrent sur le squelette de base du facteur Nod (Perret et *al.*, 2000). Ils confèrent des ornements variables aux facteurs Nod et jouent donc directement un rôle dans la spécificité.

La localisation et l'organisation des gènes *nod* sont différentes d'une espèce à l'autre parmi les rhizobiums. Chez *R. leguminosarum* par exemple, ils sont localisés sur le plasmide pRL10 (488 kb, Young et *al.*, 2006). Chez d'autres espèces, ces gènes sont regroupés en « îlot symbiotique » localisé sur un chromosome, comme chez *B. japonicum* (681 kb, Kaneko et *al.*, 2002).

4.4. Les facteurs Nod : Structure, biosynthèse et sécrétion

Les facteurs Nod sont des lipochitooligosaccharides (LCO) constitués d'un squelette de chitine, c'est-à-dire d'unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons β -1,4 (Figure 7). Une chaîne d'acide gras polyinsaturée est greffée par N-acylation sur l'atome d'azote du résidu glucosamine situé à l'extrémité non réductrice du squelette de chitine. Le nombre d'unités de N-acétyl-D-glucosamine constituant le facteur Nod est généralement compris entre 3 et 5 (Dénarié et *al.*, 1996). Les facteurs Nod peuvent encore être décorés à l'aide de substitutions chimiques particulières, qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité. (Perret et *al.*, 2000). La synthèse du squelette d'oligomères de chitine des facteurs Nod requiert l'activité de trois enzymes codées par les gènes *nodABC*. Le produit du gène *nodC*, N-acétyl glucosamyl-transférase permet l'élongation de la chaîne. Le gène *nodB* code une N-déacétylase responsable du clivage du résidu N-acétyl de la glucosamine terminale non réductrice, permettant ainsi au produit du gène *nodA*, une N-acyl-transférase, d'y ajouter la chaîne d'acide gras (Spaink, 2000 ; D'Haeze et Holsters, 2002). De plus, les gènes *nodE* et *nodF*, qui codent respectivement une β -cétol synthase et un transporteur d'acyle, sont impliqués dans la synthèse et le contrôle du niveau d'instauration de la chaîne d'acides gras (Perret et *al.*, 2000).

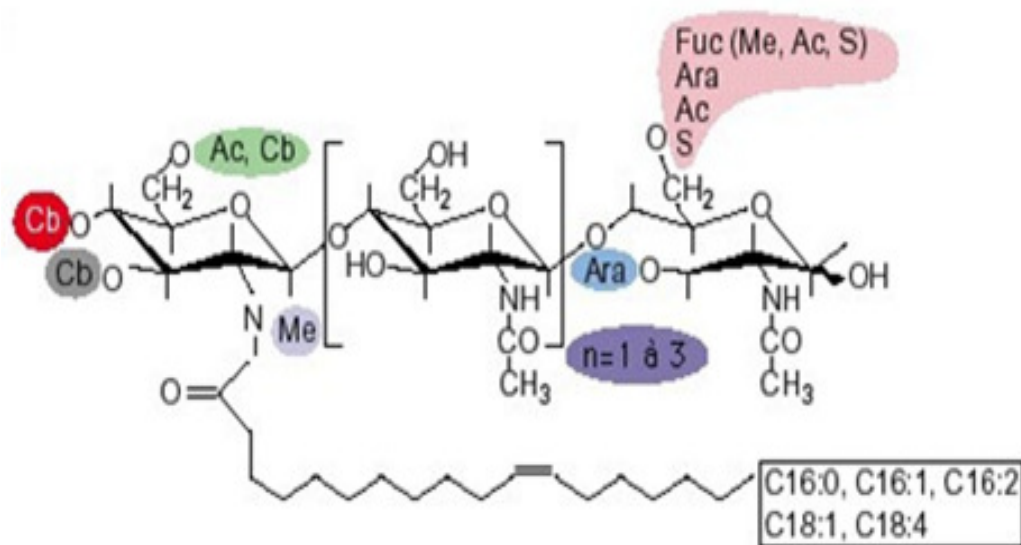


Figure 7 : Structure chimique d'un facteur Nod générique avec quelques une des substitutions que l'on trouve chez plusieurs espèces de rhizobiums. Ac : acetyl, Ara, arabinosyl; Cb, carbonyl; Fuc, fucosyl; Me, methyl; S, sulfuryl (Cullimore et *al.*, 2001).

5. La symbiose *Rhizobium*-légumineuse sous stress environnemental

D'une manière générale, les études agronomique et écologique des rhizobiums portent non seulement sur leurs propriétés symbiotiques (pouvoir de nodulation, efficacité, spécificité et spectre d'hôte) mais aussi sur leur capacité d'adaptation aux contraintes environnementales qui affectent la fixation de l'azote. Les principaux facteurs environnementaux limitant la relation symbiotique *Rhizobium*-légumineuse sont la sécheresse, la salinité, les hautes températures, les pH acides extrêmes (Zahran, 1999 ; Serraj, et *al.*, 1999 ; Abdelmoumene et *al.*, 1999). Diverses études ont montré que la diversité de l'espèce *R. leguminosarum* peut être influencée par d'autres facteurs biotiques et abiotiques tels que le type de sol, le génotype de l'hôte, les rhizodépôts, les pratiques agricoles (Palmer et Young, 2000 ; Mutch et Young, 2004 ; Bourion et *al.*, 2007 ; Lakzian et *al.*, 2001 ; Depret et *al.*, 2004). Une réduction de densité et de diversité de rhizobiums a ainsi été observée dans des sols pollués par des métaux lourds (Laguerre et *al.*, 2006). L'eau, et sa disponibilité, est l'un des facteurs environnementaux les plus vitaux pour affecter la croissance et la survie des microorganismes (Potts, 1994). De nombreux auteurs ont travaillé sur l'adaptation des rhizobiums aux conditions de sécheresse, et ont montré qu'il existe une variabilité de leur tolérance face au stress (Athar et Johnson, 1997 ; Rehman et Nautiyal, 2002 ; BenRomdhane et *al.*, 2009). Le

manque d'eau affecte la diversité des rhizobiums et induit une diminution significative dans le nombre et le rendement des nodules (Mnasri *et al.*, 2007 ; BenRomdhane *et al.*, 2009). Elboutahiri *et al.* (2010) ont trouvé une grande différence phénotypique et génotypique entre des isolats d'Ensifer *meliloti* échantillonnés en zones arides et semi-arides du Maroc. Dans ce cadre de contraintes abiotiques, le pH du sol, la température et la salinité ont souvent été montrés comme les principaux facteurs abiotiques dans la détermination de la diversité des rhizobiums (Moschetti *et al.*, 2005 ; Alexandre et Oliveira, 2013). La plage de température optimale de croissance de la plupart des rhizobiums est de 28 à 31°C ; beaucoup sont incapables de croître à 37°C. Au contraire une diversité élevée a été observée chez les populations de *Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae* (*Rlv*) isolées des sols à faible température des régions du nord du Canada (Drouin *et al.*, 1996). La capacité d'adaptation des bactéries face aux contraintes environnementales, est due à la grande plasticité de leur patrimoine génétique, et de transferts génétiques entre bactéries (Radnedge *et al.*, 2002 ; Batista *et al.*, 2007).

Les régions arides et semi-arides offrent des conditions optimales de lumière et de température pour la plupart des cultures, mais l'insuffisance des précipitations impose le besoin d'irriguer. Les plantes se développant sous climat Méditerranéen (été chaud et sec), sont périodiquement soumises à une combinaison de contraintes, incluant le manque d'eau, des températures élevées, mais aussi la limitation en N, P, et d'autres nutriments (Sánchez-Díaz, 2001). De même, dans le nord de la Chine, les cultures des vastes régions semi-arides et subhumides considérées comme des terres sèches sont affectées par ces deux grandes contraintes de la pénurie d'eau et de la carence en nutriments du sol (Li *et al.*, 2009). La salinité et la sécheresse constituent des contraintes majeures limitant considérablement la productivité végétale sur environ 40 % de la surface terrestre, notamment en régions méditerranéennes (FAO, 1988). En effet les travaux réalisés par L'Taief *et al.* (2009) ont montré que le déficit hydrique et l'irrégularité des pluies constituent, de ce fait, des facteurs limitant majeurs pour la production agricole en zone méditerranéenne.

La température et le stress hydrique affectent ainsi la fixation symbiotique de l'azote à différents niveaux, tels que la formation et la croissance nodulaire, la différenciation des bactéroïdes, le métabolisme du carbone et de l'azote, l'activité de la nitrogénase, la perméabilité nodulaire à l'oxygène (Zahran et Sprent 1986 ; Zahran , 1999 ; Sadowsky, 2005). Les facteurs édaphiques du sol jouent aussi un rôle important, la richesse du sol en azote est

un facteur inhibiteur de la fixation biologique, la synthèse de la nitrogénase est inhibée par la présence d'ions ammoniums ou nitrates, à un certain degré, dans le sol (Pietsch *et al.*, 2007). C'est ainsi que s'expliquent les effets dépressifs des engrais azotés sur la fixation de l'azote de l'air.

6. Méthodes appliquées à l'étude de la diversité des rhizobiums

La diversité des rhizobiums peut être évaluée par un ensemble de méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques.

6.1. Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques incluent toutes les techniques ne faisant pas appel aux acides nucléiques et reposent sur la détermination des caractéristiques morphologiques, biochimiques, et physiologiques des bactéries via des techniques standardisées (Vandamme *et al.*, 1996 ; 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). Les principales méthodes biochimiques sont basées sur la détermination de l'activité de différents enzymes caractéristiques de certains groupes de bactéries. L'étude des caractères physiologiques impliqués dans l'identification bactérienne repose sur la détermination de la vitesse de croissance, la capacité d'utiliser différentes sources de carbone, la croissance à différentes variations de température, du pH, de sels, d'antibiotiques et de métaux lourds. Ces analyses physiologiques sont souvent influencées par les facteurs environnementaux. Les caractéristiques phénotypiques classiques sont toujours admises comme étape primordiale pour la description et l'identification des souches d'une même espèce (Vandamme *et al.*, 1996). Il est important de noter que les taxonomistes bactériens prescrivent que ces critères phénotypiques soient pris en compte lorsqu'un auteur veut donner un nom à une nouvelle espèce.

6.2. Méthodes génotypiques

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 de plasmides bactériens. 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 leur caractéristiques phénotypiques ou symbiotiques (Rivas et *al.*, 2009). Graham et *al.* (1991) ont suggéré des normes minimales pour la validation de nouvelles espèces bactériennes, qui sont fondées sur les caractéristiques génotypiques (séquençage du gène ARNr 16S, hybridation ADN-ADN, analyse RFLP...) et la description des caractéristiques morphologiques et symbiotiques. Plusieurs techniques ont été proposées pour l'étude de la diversité taxonomique des rhizobiums et de leur classification. Nous nous limiterons à décrire les techniques utilisées dans le cadre de notre étude.

6.2.1. Séquençage de l'ADNr 16S et analyse phylogénétique

Les travaux de Carl Woese (1987) ont véritablement révolutionné l'approche taxonomique en microbiologie. Ils ont démontré que les séquences d'ADN ribosomiaux (ADNr 23S, 16S et 5S) présentes sous forme d'opérons étaient des marqueurs évolutifs relativement robustes de l'ensemble du génome, utiles pour l'étude des relations phylogénétiques et l'évolution des espèces microbiennes au cours du temps chez tous les microorganismes. Ces opérons peuvent être présents en un ou plusieurs exemplaires sur le chromosome (Jensen et Straus, 1993). C'est principalement l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S qui est le marqueur moléculaire le plus utilisé dans l'analyse des relations phylogénétiques bactériennes au niveau genre et espèces. Ce gène a comme avantage d'être présent chez tous les bactéries, d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables, de présenter une taille d'environ 1500 pb aisément séquençable et de fournir une séquence suffisamment informative (Ludwig, 2007 ; Woese, 1987). Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" pour l'amplification in vitro par PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage (Weisburg et *al.*, 1991). Dans les années 1990, l'ADN 16S est devenu le marqueur taxonomie le plus important chez les rhizobiums conduisant à la répartition des genres inclus dans la famille *Rhizobiaceae* et la création d'un nouvel ordre appelé "rhizobiales" proposé dans le *Bergey's Manual* (Kuykendall et *al.*, 2005). Ainsi l'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce. Stackebrandt et Goebel (1994) ont montré qu'en dessous de 97% de similarité de séquences ARNr 16S deux souches représentent potentiellement des espèces différentes. Plusieurs chercheurs ont utilisé

l'ADNr comme une approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de rhizobiums (Laguerre *et al.*, 1994 ; Vandamme *et al.*, 1996). Des études phylogénétiques récentes portant sur le séquençage d'autres gènes de ménage ont été utilisées pour la détection et l'identification des espèces bactériennes. Ces gènes codent pour des protéines vitales assurant la maintenance du fonctionnement cellulaire (Stackebrandt et 2002 ; Maiden, 2006).

6.2.2. Méthodes de typage génétique

Depuis une vingtaine d'années, les populations bactériennes sont fréquemment caractérisées par des méthodes moléculaires. En effet de nombreuses techniques sont disponibles pour comparer, caractériser des populations, identifier certains genres, espèces ou souches dans un échantillon. En particulier, de nombreuses techniques de typage moléculaire ont été développées sur la base de la réaction de PCR (PCR-RFLP, AFLP, RAPD, ERIC-PCR, 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 les technique PCR-RFLP utilisée dans le cadre de notre étude.

6.2.3. Gènes symbiotiques et analyse phylogénétique

Les gènes symbiotiques chez *Rhizobium* sont impliqués dans la nodulation (*nod*) et la fixation de l'azote (*nif*). Ils sont souvent regroupés en cluster de gènes ou « îlot symbiotique », latéralement transférables (Martínez-Romero *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré que l'histoire évolutive des gènes chromosomiques peut être différente de celle des gènes symbiotiques. Ces études s'appuient sur l'analyse phylogénétique comparée des séquences des gènes *nod*, *nif* et de l'ADNr 16S (Haukka *et al.*, 1998 ; Mergaert *et al.*, 1997, Laguerre *et al.*, 2001). 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). La comparaison entre la phylogénie de l'ADNr16S des rhizobiums et la phylogénie de leur légumineuse hôte permet également de conclure que la taxonomie des rhizobiums ne reflète pas les propriétés symbiotiques. La description des gènes symbiotiques est également utile pour l'identification correcte de β -rhizobiums et des études de biogéographie de *Rhizobium* (Rivas *et al.*, 2009). Les symbiovars peuvent être partagées par différentes espèces en raison des transferts latéraux de gènes symbiotiques (Rogel *et al.*, 2011).

7. Méthodes phylogénétiques

7.1. Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques

La phylogénie moléculaire permet de comprendre les relations de parenté, de retracer l'historique évolutif d'une espèce ou d'un groupe taxonomique supérieur des organismes. De nos jours, l'ADN et les séquences de protéines sont largement utilisés pour déduire la phylogénie des organismes. Les arbres phylogénétiques basés sur certains gènes marqueurs permettent de schématiser et d'appréhender ces relations rapidement. Nous citons trois méthodes principales et différentes pour la reconstruction des arbres phylogénétiques: Distance (phénétique), Maximum de parcimonie, Maximum de Vraisemblance.

7.1.1. Méthodes de distance

Ce sont des méthodes de reconstruction d'arbre phylogénétique sans racine basée sur la recherche d'OTU (Operational Taxonomic Units, le plus souvent équivalent à une séquence). Ces méthodes sont rapides et bien adaptées aux séquences présentant un degré de similarité élevé. Plusieurs méthodes ont été développées pour construire un arbre phylogénétique à partir d'une matrice de distance.

- UPGMA « Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean » : c'est une méthode très simple, basée sur le groupement des séquences les plus similaires, indépendamment de leur vitesse d'évolution et de leurs parentés phylogénétiques, sans déterminer d'ancêtre commun (Goodfellow, 1971). En règle générale, on lui préfère maintenant des méthodes plus avancées.

- la méthode de Neighbor-Joining (NJ), développée par Saitou et Nei (1987), est une amélioration de la précédente autorisant des différences de vitesse d'évolution entre branches. C'est actuellement la plus utilisée pour reconstruire des phylogénies par méthode de distance. Cette méthode a l'avantage d'être rapide et bien adaptée aux séquences présentant un degré de similarité élevé.

7.1.2. Méthode du maximum de vraisemblance ou « Maximum Likelihood-ML»

C'est une méthode dite de caractères, 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). La méthode de ML est considérée comme la plus fiable pour reconstruire l'histoire évolutive des séquences. Par contre, c'est une technique qui nécessite des temps de calcul très longs.

7.1.3. Méthodes de maximum de parcimonie

La méthode de parcimonie permet de construire des arbres de classification hiérarchique après enracinement, qui permettent de refléter la structure de parenté d'un ensemble de taxons. Cette méthode utilise des algorithmes basés sur les caractères plutôt que de distances (Land et Doig, 1960). Plusieurs programmes utilisent la méthode de maximum de parcimonie pour la reconstruction d'un arbre, dont MEGA 5 (Tamura et *al.*, 2011). Cette méthode est rapide en temps de calcul, mais moins précise que la méthode ML.

7.2. Fiabilité de l'arbre phylogénétique.

7.2.1. Evaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques

La robustesse des nœuds d'un arbre phylogénétique peut être évaluée par la technique de ré-échantillonnage grâce au test de "bootstrap". Cette méthode, introduite par Felsenstein (1985), est largement appliquée, avec beaucoup de succès. Elle permet de ré-échantillonner les données introduites dans les programmes de calcul en construisant autant d'arbres qu'il y a eu de ré-échantillonnages. Chaque ré-échantillonnage est un tirage au sort des sites (ou des caractères) avec remise, donc dans chaque réplication de bootstrap certains sites ou caractères peuvent être présents plusieurs fois, tandis que les autres peuvent être absents. Chaque réplication produit un nouvel alignement "artificiel", qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche. Seules les branches avec un fort % (au moins 75%) sont considérées comme robustes.

7.2.2. Enracinement de l'arbre

Pour orienter et enraciner un arbre, la séquence choisie ne doit :

- ni être trop éloignée des autres données, pour ne pas induire des erreurs dans la topologie de l'arbre et pouvoir reconnaître les caractères ancestraux et dérivés.
- ni être trop proche des séquences pour représenter un vrai "outgroup". L'utilisation de plus d'un "outgroup" améliore en général l'évaluation de l'arbre.

8. Notre modèle d'étude : *Pisum sativum*-*Rhizobium* et *Lens culinaris*-*Rhizobium*

8.1. Données sur la culture du pois (*Pisum sativum* L.).

8.1.1. Classification

L'espèce *Pisum sativum* appartient au genre *Pisum*, classé dans la tribu des *Fabeae* (ou *Viciae*), qui regroupe diverses espèces de plantes herbacées annuelles, réparties en cinq genres : *Lathyrus* L. (gesse/pois doux, environ 160 espèces), *Lens* (lentilles, 4 espèces), *Pisum* L. (pois, 3 espèces), et *Vicia* L. (vesces ; environ 140 espèces) et le genre monotypique *Vavilovia* (Smýkal et al., 2011). La classification la plus récente du genre *Pisum*, après avoir compté plusieurs espèces, ne regroupe plus que trois espèces (Smýkal et al., 2011 ; Cieslarová et al., 2011) :

- *P. sativum* L.
 - Subsp. *sativum* (comprend var. *sativum* et var. *arvense*)
 - Subsp. *elatius*
- *P. fulvum*
- *P. abyssinicum*

8.1.2. Origine et répartition géographique

Les premières traces de culture du pois datent du début du Néolithique et a accompagné les céréales dans l'apparition de l'agriculture au Proche-Orient. Il était dans l'Antiquité et au Moyen Âge un aliment de base en Europe et dans le bassin méditerranéen ; l'association du pois, ou de la fève, et du blé procurant une alimentation équilibrée notamment en protéines (Benoît et al., 2006). La FAO considère l'Éthiopie et l'Asie occidentale comme centres de diversification, avec des centres secondaires dans le sud de l'Asie et la région méditerranéenne. Actuellement, on trouve *Pisum sativum* dans tous les pays tempérés et dans la plupart des hautes terres tropicales (comme exemple l'Afrique centrale (partie est) et orientale (en Éthiopie)) (Brink et Belay, 2006).

8.1.3. Ecologie et croissance

La culture du pois a besoin d'un climat relativement frais ; les températures moyennes doivent être comprises entre 7-24°C. *Pisum sativum* est cultivé jusque dans les régions où les précipitations ne dépassent pas 400 mm, mais la pluviométrie idéale se situe entre 800 et 1000

mm par an. Le pois est légèrement sensible à la photopériode, les jours longs favorisant la floraison. Il pousse sur des sols de toutes natures, dotés de niveaux de fertilité modérés, bien drainés et à pH de 5,5 à 7 (Brink et Belay, 2006).

Le cycle végétatif du pois est d'environ 140 jours pour les variétés de printemps pouvant descendre à 90 jours pour les variétés ultra-précoces et de 240 jours pour les variétés d'hiver. Le grain du pois protéagineux a un gros calibre et une haute teneur en protéines, toutes les variétés sont à fleurs blanches. Toutes les variétés du pois fourrager sont à fleur anthocyanée (Benoît et *al.*, 2006 ; Cieslarová et *al.*, 2011).

8.1.4. Utilisations

L'espèce *Pisum sativum* fournit plusieurs types d'aliments tant pour l'homme que pour les animaux (Benoît et *al.*, 2006 ; Brink et Belay, 2006) :

- Le pois frais (85% d'eau) : les graines sont récoltées au stade avant maturité, on obtient les petits pois verts de maraîchage classés comme légume frais.
- Le pois sec (15% d'eau) : les graines sont récoltées à maturité au stade sec, soit le pois cassé classé comme un légume sec, soit le pois protéagineux destiné à l'alimentation animale.
- Les jeunes pousses feuillées sont aussi consommées en légume, particulièrement en Asie.
- La plante entière fournit un fourrage aux ruminants, soit en sec, soit en vert, frais ou ensilé. On utilise aussi à cet effet la paille, c'est-à-dire les fanes restant sur le terrain après la récolte des gousses ou des graines. En général, on appelle pois fourrager tout type de pois destiné à l'alimentation animale, y compris les pois secs en grains qui sont appelés pois protéagineux. Le pois est aussi une plante importante dans une rotation, car il fixe l'azote atmosphérique et joue ainsi un rôle dans le rétablissement de la fertilité du sol (Brink et Belay, 2006).

8.2. Données sur la culture de la lentille (*Lens Culinaris* L.)

8.2.1. Classification

L'espèce *Lens culinaris* (lentille cultivée) appartient au genre *Lens*, classé dans la tribu des *Viciae*. Lors d'une révision récente du genre *Lens* (Brink et Belay, 2006), 4 espèces sont retenues :

- *Lens culinaris* : a été divisée en quatre sous espèces principales :
 - subsp. *culinaris* (la lentille cultivée),
 - subsp. *odemensis*,
 - subsp. *orientalis*,
 - subsp. *tomentosus*.
- *Lens ervoides*
- *Lens nigricans*
- *Lens lamottei*

La lentille cultivée est classée en deux groupes selon la taille de la graine. Le groupe *macrosperma* prédominant principalement en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique (diamètre supérieur à 6 mm), tandis que Le groupe *microsperma* (diamètre inférieur à 6 mm) domine en Asie, en Egypte, et en Ethiopie (Brink et Belay, 2006).

8.2.2. Origine et répartition géographique

Le centre d'origine de la lentille cultivée se situe au Proche-Orient (Zohary, 1972), d'où elle s'est diffusée vers la Méditerranée, en Asie, en Afrique et en Europe, c'est un des plus anciens légumes secs cultivés (Brink et Belay, 2006). La lentille est maintenant cultivée partout dans le monde : sous-continent indien, Moyen-Orient, Afrique du Nord, Europe du Sud, le Nord et le Sud d'Amérique et en Australie (Chahota et *al.*, 2007).

8.2.3. Ecologie et croissance

La lentille pousse à des températures moyennes de 6-27°C, mais elle ne convient pas aux régions tropicales chaudes et humides. Elle nécessite une pluviométrie annuelle d'environ 750 mm et un temps sec au moment de la récolte. La lentille est une culture de saison fraîche avec une résistance modérée à la sécheresse et haute température, et généralement elle a besoin de jours longs pour fleurir. Elle peut se cultiver sur de nombreux types de sols, depuis les sols sableux à argileux assez lourds La plante ne supporte pas les sols gorgés d'eau, et elle ne tolère ni l'inondation, ni la salinité. Un pH avoisinant 7 convient le mieux à la lentille (Saskatchewan Pulse Growers, 2000 ; Brink et Belay, 2006). Le cycle de croissance est de 80–110 jours pour les cultivars à cycle court et de 125–130 jours pour les cultivars à cycle long (Brink et Belay, 2006). La couleur des graines varie selon les variétés des plus pâles

(vert pâle, blond, rose) au plus foncé (vert foncé, brun, violacé...) (Vandenberg et Slinkard, 1990).

8.2.4. Utilisations

La lentille cultivée (*Lens culinaris*) est une légumineuse importante et populaire utilisée principalement pour l'alimentation humaine, la paille peut également être utilisée comme aliment de qualité supérieure pour le bétail ou en tant que source de matières organiques pour l'amélioration des sols (Saskatchewan Pulse Growers, 2000). La lentille est surtout cultivée pour ses graines mûres qui sont consommées principalement en sauce et en soupe. Les jeunes gousses, les graines germées et les feuilles se consomment comme légume. Les graines de lentille peuvent servir de nourriture parfois aux animaux, en particulier les volailles pour leur procurer des protéines. La lentille se cultive parfois pour le fourrage ou comme engrais vert (Brink et Belay, 2006).

8.3. Rhizobiums associés à la lentille et au pois, et distribution géographique

Parmi la diversité des associations symbiotiques répertoriées, les légumineuses de la tribu des *Viciae* comprenant principalement les genres *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* et *Lens* a longtemps été considéré comme ne pouvant établir la symbiose qu'avec une seule espèce bactérienne, *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae*. Outre le biovar *viciae*, l'espèce *R. leguminosarum* comprends deux autres biovars : le symbiovar *trifolii* qui nodule les plantes du genre *Trifolium* et le symbiovar *phaseoli* qui nodule les plantes du genre *Phaseolus* (Jordan, 1984). Cette classification a changé quand Ramírez-Bahena et al. (2008) ont révisé le statut taxonomique de *R. trifolii*, *R. phaseoli* et *R. leguminosarum*, en intégrant *R. trifolii* dans *R. leguminosarum* et conservant *R. phaseoli* comme espèce distincte (Rivas et al., 2009). D'autres espèces de *Rhizobium* ont, depuis, été décrites pour des souches capables de noduler certaines espèces de légumineuses de la tribu des *Viciae*, comme *Rhizobium fabae*, isolé à partir de nodules *Vicia faba* en Chine et capable de noduler le pois (Tian et al., 2008), avec des gènes *nodC* semblables à ceux trouvés chez le biovar *viciae* (Rogel et al., 2011). Une souche nodulant *Pisum* et d'origine géographique inconnue a été classée dans une nouvelle espèce, *Rhizobium pisi* (Ramirez-Bahena et al., 2008). Yang et al. (2008) ont identifié 2 souches parmi 42 nodulant *Pisum* cultivé en Chine comme *Rhizobium etli*, connu comme symbiote efficace du haricot et phylogénétiquement proche de *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993). Enfin, très récemment une nouvelle espèce nodulant *Vicia faba* dans différentes régions géographiques (Espagne, Pérou et Tunisie) a été proposée dans le genre *Rhizobium*,

Rhizobium laguerreae, nommée ainsi en hommage et à la mémoire de Gisèle Laguerre (Saïdi et al., 2014). Bien que la littérature comporte plusieurs publications concernant les légumineuses de la tribu des *Viciae*, montrant notamment que le pois, la féverole et la gesse, partagent le même symbiote *R. leguminosarum* dans différentes régions au monde (Laguerre et al., 2003 ; Mutch et Young, 2004 ; Moschetti et al., 2005 ; Santillana et al., 2008 ; Álvarez-Martínez et al., 2009 ; Tian et al., 2010 ; Rashid et al., 2012), très peu d'études sur la diversité et la taxonomie des rhizobiums nodulant la lentille ont été réalisées (Hynes et O'Connell, 1990 ; Moawad et Beck, 1991 ; Laguerre et al., 1992 ; Géniaux et Amarger, 1993 ; Rashid et al., 2009, 2012, 2014). Une étude très récente a montré que *Rlv* est le symbiote de la lentille en Turquie, en Syrie (Moyen-Orient) et en Allemagne (Europe), tandis que de nouvelles espèces du genre *Rhizobium* nodulent la lentille au Bangladesh (Rashid et al., 2014). Rashid et al. (2014) ont suggéré que *R. leguminosarum* symbiovar *viciae* est le symbiote originel de la lentille. Suite à ces résultats, il était intéressant d'étudier la diversité génétique de rhizobiums nodulant la lentille dans différentes régions géographiques dans le monde.

8.4. Diversité génétique des populations de *R. leguminosarum* sv. *viciae*

R. leguminosarum sv. *viciae* (*Rlv*) est capable de noduler toutes les espèces de légumineuses appartenant à la tribu des *Viciae* comprenant les genres *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* et *Lens*. Cependant, un certain nombre d'études utilisant des légumineuses cultivés de la tribu des *Viciae* ont montré des différences génétiques entre les souches de *Rlv* qui les nodulent à travers tous les continents (Laguerre et al., 2003 ; Mutch et Young 2004 ; Moschetti et al., 2005 ; Santillana et al., 2008 ; Álvarez-Martínez et al., 2009 ; Tian et al., 2010 ; Rashid et al., 2014). Álvarez Martínez et al. (2009) ont suggéré une origine commune en Europe pour les souches de *R. leguminosarum* nodulant la tribu de *Viciae*, d'où elles auraient diffusées à d'autres continents. Divers travaux ont montré que dans les populations de *Rlv* isolées des nodosités racinaires, toute une variété de génotypes sont capables de noduler la même plante hôte (Young et al., 1987 ; Hynes et O'Connell , 1990 ; Laguerre et al., 1992 ; Laguerre et al., 2003 ; Tian et al. 2010 ; Mutch et al., 2004 ; Tian et al., 2010). Cependant, la dominance d'un génotype particulier varie en fonction du génotype végétal (Hynes et O'Connell , 1990 ; Laguerre et al., 1992 ; Laguerre, 2003 ; Mutch et al., 2004 ; Tian et al., 2010). En effet, la diversité et la structure des populations retrouvées dans les nodosités ne sont pas toujours le reflet de la structure des populations naturelles du sol (Hynes et O'Connell, 1990 ; Laguerre et al., 1992 ; Louvrier et al., 1996). Pour un même sol étudié, la structure des populations nodulantes se montre différente selon la plante piège utilisée (Hynes et O'Connell, 1990 ;

Laguerre et *al.*, 1992 ; Laguerre et *al.*, 2003). Ainsi, lorsqu'une légumineuse est en présence d'une population de *Rhizobium* qui lui est spécifique, celle-ci sélectionne préférentiellement certains génotypes pour former des nodosités racinaires. Cette sélection en fonction de la plante hôte peut être liée aux exsudats racinaires de rhizodépôt qui constituent des sources de carbone et d'énergie pour les microorganismes rhizosphériques, et de flavonoïdes privilégiant la nodulation par certains types de *Rlv* (Hynes et Oconnell, 1990 ; Perret et *al.*, 2000 ; Cooper, 2007 ; Maj et *al.*, 2010). Seules quelques études ont montré qu'au sein d'une même espèce végétale, la diversité génétique de la plante hôte influence la structure de la diversité génétique des populations de rhizobiums associées. A titre d'exemple différentes populations de *Rlv* associées à différentes lignées de pois (Depret et Laguerre, 2008) ou de fèves (Tian et *al.*, 2007). Ainsi, quelques souches bactériennes semblent être spécifiques du cultivar végétal. Par ailleurs, Harrison et *al.* (1987) ont décrit que le cultivar de trèfle n'a pas d'effet sur la structure des populations de *R. leguminosarum sv. trifolii*.

8.5. Facteurs abiotiques responsable de la variabilité des populations de *Rlv*

La survie saprophyte et la diversité des populations des rhizobiums dans les sols dépendent de leur capacité à résister à un certain nombre de facteurs abiotiques, parmi lesquelles le type de sol, les températures élevées, le stress hydrique, la salinité et l'acidité du sol. Les *Rlv* sont absents ou présents à de faibles densités dans les sols acides de pH inférieur à 5 (Amarger, 1980), et une faible diversité des *Rlv* est corrélée à un faible pH avec des niveaux élevés d'azote et de phosphate du sol (Palmer et Young, 2000). Au contraire une diversité élevée a été observée chez les populations de *Rlv* isolées des sols à faible température des régions du nord du Canada (Drouin et *al.*, 1996). Une réduction de densité et de diversité de *Rlv* est également observée dans les sols pollués par des métaux lourds (Lakzian et *al.*, 2002 ; Laguerre et *al.*, 2006). Yang et *al.* (2008) ont rapporté que les facteurs environnementaux, tels le pH, la teneur en eau et la température du sol affectent la répartition et la diversité de *Rlv* nodulant le pois dans différentes régions géographiques subtropicales en Chine. Toutefois Tian et *al.* (2010) ont identifié plusieurs populations de *Rlv* selon leurs origines géographiques en Chine. Une nouvelle étude a montré que les génotypes *Rlv* nodulant le pois dans deux vallées adjacentes de l'Himalaya sont différents, ces 2 vallées étant séparées par un passage d'une haute montagne, ce qui expliquerait la différence des conditions environnementales et en représentant une frontière naturelle entre deux populations microbiennes distinctes (Rahid et *al.*, 2012).

9. Données générales sur la Situation de l'agriculture en Algérie

L'Algérie couvre une superficie de 2 381 741 km² et est limitée au Nord par la mer Méditerranée. Elle recèle un milieu naturel très diversifié mais en matière agricole, elle n'est pas autosuffisante et accuse chaque année un déficit important. Face aux besoins d'une démographie galopante et d'une urbanisation rapide se pose la question cruciale d'une gestion durable des ressources naturelles en agriculture. Actuellement, l'agriculture est une des priorités du gouvernement qui a lancé depuis l'année 2000 le PNDA (Plan National de Développement de l'Agriculture) et a accordé diverses subventions pour sa modernisation. Le territoire algérien recouvre deux types de régions : une zone saharienne dominante (84 % du territoire) et une zone côtière (16 %). L'agriculture est surtout concentrée dans la région nord du pays où l'on trouve les meilleures terres et les conditions climatiques les plus favorables. La surface des terres agricoles est de 20 % de la superficie totale du pays soit à peu près 47 millions d'hectares, dont 8 millions d'hectares de surface agricole utile (SAU), 32 millions d'hectares de parcours et 7 millions d'hectares de forêt. La surface irriguée ne représente que 7 % de la SAU. Les principales cultures algériennes sont les céréales (33 %), l'arboriculture (6 %), les fourrages (6 %) et les cultures maraîchères (3 %). L'agriculture oasienne est fortement dominée par la phoeniciculture, activité développée dans les régions sahariennes. Le pays est très dépendant des importations pour ses besoins, tels que les produits de base (céréales, légumes secs, lait, oléagineux, alimentation fourragère) (http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/6-_Algerie_cle021b11.pdf ; FAO, 2012). Le secteur agricole est dépendant des aléas climatiques (sécheresse) et souffre d'une productivité insuffisante. Les zones à déficit hydrique occupent une position charnière bien particulière en Algérie. Elles reçoivent de 100 à 300 mm de pluie en moyenne annuelle et couvrent de très grandes surfaces. Elles sont caractérisées par une longue sécheresse estivale (4 à 6 mois) et par des conditions édapho-climatiques très contraignantes à la survie des êtres vivants. Néanmoins, cet écosystème reste un milieu vivant pourvu d'un couvert végétal particulier, adapté aux stress édapho-climatique d'une part et anthropogène d'autre part (Nedjraoui, 2003). En fonction des facteurs climatiques et des facteurs édaphiques, on peut définir les zones agroécologiques de l'Algérie (Smadhi et al., 2001). Les caractères édaphiques et climatiques déterminent la répartition de la végétation naturelle et les potentialités agricoles. Par ailleurs, l'avenir de l'agriculture et du secteur agroalimentaire algérien dépend de la capacité de la recherche agronomique et agroalimentaire à résoudre les problèmes fondamentaux.

9.1. Importance de la culture des légumineuses sous contraintes environnementales en Algérie

Dans le bassin méditerranéen, la symbiose *Rhizobium*-légumineuse est une composante importante de cet agrosystème vu ses intérêts agronomiques, économiques et écologiques. En effet, cette symbiose peut, lorsqu'elle fonctionne bien, assurer une nutrition azotée adéquate aux plantes et garantir une production convenable permettant ainsi aux agriculteurs d'épargner le coût des fertilisants chimiques et soulager l'environnement de leur pollution. Cependant, en Algérie ce processus naturel est affecté par plusieurs contraintes abiotiques parmi lesquels le stress hydrique, le stress salin et les variations de température (Merabet *et al.*, 2006 ; Boulila, 2009 ; Amrani *et al.*, 2010 ; Boukhatem *et al.*, 2012). Dans les zones arides et semi arides, comme c'est le cas de l'Algérie, la contrainte du déficit hydrique et l'irrégularité des pluies constituent l'un des facteurs majeurs limitant la production des espèces végétales. Chez les légumineuses, cet effet est d'autant plus perceptible que la fixation symbiotique de l'azote est très sensible à la contrainte déficit hydrique (Ben Romdhane *et al.*, 2009 ; L'Taief *et al.*, 2009 ; Cesar *et al.*, 2011). En Algérie, la culture des légumineuses alimentaires (légumes secs) fait partie du paysage agricole depuis des millénaires dans différentes zones agro-écologiques du pays, et sont utilisées dans la rotation avec les céréales car elles enrichissent le sol en azote. Les légumes secs ont une importance stratégique dans l'alimentation parce qu'ils constituent une importante source protéique susceptible de remplacer les protéines animales difficilement accessibles pour une large couche de la population algérienne, ils sont aussi calorifiques et riches en glucides que le blé. Seul 1/3 de la consommation est couverte par la production nationale. La superficie totale des terres occupées par toutes espèces confondues de légumineuses sèches (fève, pois sec, pois chiche, lentille, haricot...) a été estimée à seulement 80000 hectares; Le haricot est le moins cultivé car il consomme beaucoup d'eau (FAOSTAT-Agriculture, 2011).

Bien que les légumineuses alimentaires cultivées aient bénéficié de quelques programmes de développement, la production agricole en légumes secs n'a pas connu l'amélioration escomptée. Les raisons de cette situation sont d'ordre technique, socio-économique et climatiques (http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/6-_Algerie_cle021b11.pdf).

Les légumineuses fourragères du genre *Vicia* peuvent être utilisées comme foin ou en grain pour l'alimentation du bétail. Elles se cultivent en association avec une céréale fourragère (l'avoine, l'orge ou le triticale). En effet, dans les régions semi-arides où les

précipitations ne dépassent pas les 400 mm/an, l'alimentation des troupeaux est basée essentiellement sur le grain, les sous-produits des céréales, l'association vesce-avoine et la végétation des terres laissées en jachère. Une telle alimentation ne permet guère un élevage intensif et productif ; au contraire, elle l'expose aux caprices du climat et aux carences chroniques en matières azotées digestibles (Mebarkia et Abdelguerfi, 2007).

9.2. Importance agronomique de la culture de la lentille et du pois en Algérie

En Algérie les espèces de légumineuses alimentaires les plus cultivées sont la lentille (*Lens culinaris* L.) le pois chiche (*Cicer arietinum* L), le pois (*Pisum sativum* L), la fève (*Vicia faba* L.) et le haricot (*Phaseolus* L.). La culture des légumineuses alimentaires a fait l'objet de beaucoup d'attention de la part des services agricoles pour augmenter les superficies et améliorer les niveaux de rendements, mais les résultats n'ont pas été à la hauteur des efforts consentis (Abdelguerfi, 2003). La diversification des cultures fourragères est très limitée, parmi les espèces cultivées, le pois fourrager est utilisé pour l'alimentation du bétail soit comme fourrage vert, soit sous forme de grains. Cette espèce, qui a connu un développement conséquent dans les années 1980 subit un net recul en matière d'utilisation. Il est à noter aussi que le pois est utilisé en associations fourragères sèches (pois-avoine, pois-triticales, pois-orge). Bien que le genre *Pisum* soit assez bien représenté dans la flore algérienne, il semble que la totalité des variétés cultivées aient été introduites. Le pois protéagineux a été introduit très récemment, et sa culture est restée assez limitée malgré son importance stratégique (FAO, 2006). En Algérie, on distingue les lentilles de culture locales et les lentilles de culture européenne. Les premières, cultivées depuis les temps ancestraux sont des mélanges variables de formes diverses. Beaucoup de variétés anciennement cultivées ont disparu. Pour ce qui est de la richesse floristique, il n'existe pas en Algérie, de mise au point permettant d'avoir une idée précise. Il faut signaler que quelques variétés de lentille ont été sélectionnées dans les différentes zones agro-climatiques incluant des variétés locales (FAO, 2006). La culture de cette légumineuse enrichit également le sol en azote, donc induit une diminution en apport en engrais et assure un assolement et une rotation (graminées et légumineuses) pour optimiser l'exploitation agricole et la diversification de la production agricole.

9.3. Production et importance économique de la culture du pois et de la lentille en Algérie

A travers le monde, le pois et la lentille sont deux des plus importantes légumineuses à graines. La production mondiale de lentilles en 2011 a été estimée à près de 4,4 millions tonnes sur une aire totale de 4,2 millions d'hectares (FAOSTAT-Agriculture, 2011). Les principaux pays producteurs sont le Canada (1531900 t sur 998400 ha) et l'Inde (943800 t sur 1597400 ha). En Afrique du nord, le Maroc (45438 t sur 57980 d'ha) est le principale pays producteur. La FAO a estimé la production mondiale de pois secs en 2011 à environ 9,8 millions tonnes produites sur 6,2 millions d'ha. Les plus grands pays producteurs sont le Canada (2115600 t sur 914200 ha), la Fédération de Russie (2021000 t sur 1110800 ha), la France (670079 t sur 187111 ha) et l'Inde (593200 t sur 727200 ha). La production annuelle de pois sec en Afrique du nord pour l'année 2011 était d'environ 66749 tonnes sur une superficie de 73152 ha, l'Algérie est classée en troisième position (7435 t sur 9943 ha) après le Maroc (39788 t sur 50240 ha) et la Tunisie (12900 t sur 10043 ha) (FAOSTAT-Agriculture, 2011). Durant la même année, les légumes secs ont enregistré des hausses pour les quantités importées à l'exception des lentilles et des pois secs qui ont connu des baisses et qui s'explique par l'accroissement de la production locale annuelle (Ministère du Commerce, 2011). Néanmoins, la production locale de la lentille (3800 tonnes sur 3700 ha) reste très faible au regard des importations qui s'élèvent à 93432 tonnes (FAOSTAT-Agriculture, 2011). Le petit pois frais est un légume aux grandes qualités nutritives, gustatives et culinaires qui expliquent l'extension rapide de sa culture dans les différentes parties du monde. En Algérie, les conditions climatiques et du sol sont très favorables à sa culture, qui, en 2011, s'étendait sur 32641 hectares avec une production de 127680 tonnes (FAOSTAT-Agriculture, 2011).

CHAPITRE 2

1. Description des sites et échantillonnage des sols

Les plantes ont été cultivées dans six champs d'expérimentations situés à l'est algérien, allant de zones climatiques subhumides (El-Harrouch, Ben-Azzouz, El-Taref) à semi-arides (Constantine, Souk Naâmane, Oum El Bouaghi) (Figure. 8). Quatre échantillons de sol bien séparés ont été collectés au moment du semis à partir de chaque site à des profondeurs de 0-30 cm, puis regroupés et tamisés à travers un tamis de 2 mm et ensuite conservés à 4°C avant utilisation pour le test MPN et les analyses physicochimiques. Le tableau 1 représente les zones éco-climatiques et les coordonnées géographiques correspondant aux différents sites d'expérimentations. La texture du sol a été déterminée par analyse granulométrique. La fertilité chimique du sol a été caractérisée par des analyses chimiques qui ont porté essentiellement sur le pH, la teneur du sol en matière organique, la teneur en azote, ainsi que la mesure de la conductivité électrique dans le but d'estimer la salinité des sols. Ces caractéristiques physico-chimiques des sols ont été analysées à l'Agence Nationale des Ressources Hydrauliques-Antenne Régionale Est-Constantine (ANRH).

Les sites échantillonnés à Oum El Bouaghi et Souk Naâmane n'ont pas été cultivés avec des légumineuses depuis au moins 30 ans. La lentille a été cultivée dans le site de Constantine deux ans avant notre échantillonnage. Une association de vesce avec l'orge et le blé ont été cultivées dans le site d'El-Taref il y a 5 ans. Le site d'El-Harrouch avait des antécédents de culture de fèves, et de pois depuis près de 20 ans avant notre échantillonnage. L'histoire culturelle de Ben-Azzouz est inconnue.

2. Matériel végétal et culture des plantes

L'étude a été menée sur trois légumineuses, le pois protéagineux (*Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var *sativum* cv *Messire*), le pois fourrager (*Pisum sativum* L. subsp. *sativum* var. *arvense* cv *Sefrou*) et la lentille (*Lens culinaris* L. cv. *P B Dahra*). La nouvelle classification du *Pisum* a été proposée par Smýkal et al. (2011) et Cieslarová et al. (2011). Les 2 cultivars du pois cv. *Messire* et cv *Sefrou* sont des variétés introduites, sélectionnées en France et au Maroc, respectivement. Le cultivar *P B Dahra* de la lentille est d'origine locale. Dans chaque site d'expérimentation, chacun des trois cultivars a été cultivé sur une parcelle de 1 m², la densité de semis était de 100 graines non traitées par m². Les plantes cultivées en plein champs n'ont pas été arrosées. Les cultures ont été conduites jusqu'au stade début de floraison.

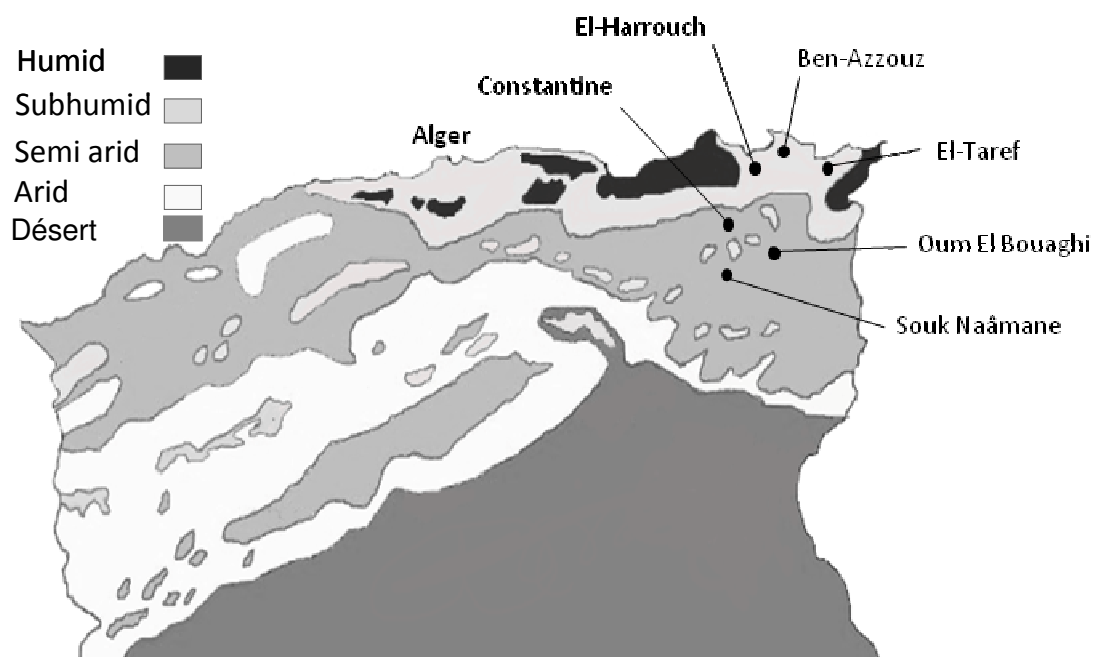


Figure 8 : Zones bioclimatiques de l'Algérie (Nedjraoui et Bédrani, 2008). Les flèches indiquent les sites d'échantillonnage.

Tableau 1 : Zones éco-climatiques, coordonnées géographiques des sites d'expérimentations.

| Sites | Zones | Coordonnées géographiques |
|----------------|------------|---------------------------|
| El-Taref | Subhumide | 36°46'08"N–7°51'24"E |
| Ben-Azzouz | Subhumide | 36°52'45"N–7°18'31"E |
| El-Harrouch | Subhumide | 36°42'27"N–6°47'09"E |
| Constantine | Semi-aride | 36°20'27"N–6°44'42"E |
| Souk Naâmane | Semi-aride | 35°53'42"N–6°24'19"E |
| Oum El Bouaghi | Semi-aride | 35°50'04"N–7°15'57"E |

3. Dénombrement de *Rhizobium* présent dans le sol par la méthode MPN (Most Probable Number) à la date du semis

Une estimation du nombre le plus probable (NPP) de rhizobiums capables de noduler le pois et la lentille a été réalisée pour chaque échantillon de sol selon la technique d'infection des plantes Vincent (1970) comme décrit par Louvrier et *al.* (1995). La plante piège utilisée est une variété locale de vesce (Ecoloc/Djbel babour/ALG06), elle a été cultivée dans des tubes en verre contenant un milieu gélosé incliné de Fahraeus (Annexe 1). Les graines de vesces ont été désinfectées par une solution aqueuse saturée d'hypochlorite de calcium à 3% pendant 6 min, suivie de 10 rinçages à l'eau distillée stérile. Puis elles ont été mises à germer dans des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée stérile (10g/l) pendant 48-72 heures à 25°C et à l'obscurité. Dans des conditions stériles, on dépose deux graines germées de vesce sur la gélose inclinée. Les plantes se développent en chambre de culture à 25°C jour et 16°C nuit et une photopériode de 10-14 heures. Une série de dilution de sol de 10^{-1} à 10^{-8} a été préparée pour l'inoculation des plantes. Chaque graine de vesce a été inoculée par 1 ml après l'apparition de la première feuille, quatre répétitions ont été réalisées pour une même dilution. La croissance des plantes a été suivie jusqu'à l'apparition des nodules racinaires au bout de 2 à 3 semaines après l'installation de la graine. A partir du nombre des tubes positifs (présence de nodules) et de la table 3.5_A de Fisher et Yates (Annexe 2) (Vincent, 1970), on estime la valeur du nombre le plus probable de *Rhizobium* par gramme de sol en tenant compte de l'humidité du sol. L'intervalle de confiance qui encadre cette valeur a été évaluée à partir de la formule de Cochran (Annexe 2) (Cochran, 1950).

4. Echantillonnage des plantes, Collecte et conservation des nodules

La récolte de 12 plantes par parcelle a été effectuée au stade début floraison (12 semaines). Quatre nodules par plante (soit 48 par parcelle) ont été prélevés au hasard et séchés sur du papier filtre. Les nodules ont été déposés sur une couche de coton dans des flacons en verre remplis au quart de leur volume par du CaCl₂ (Annexe 4) et conservés à 4°C.

5. Isolement de rhizobiums à partir des nodules racinaires

5. 1. Désinfection des nodules

Les nodules déshydratés ont été réhydratés dans l'eau distillée pendant une nuit, puis stérilisés par immersion 5 à 10 min dans l'éthanol, ensuite transférés immédiatement dans une solution de chlorure de mercure (HgCl₂) acidifié à 0,1% pendant 2 à 4 min en fonction de leur taille. Les nodules sont ensuite lavés plusieurs fois à l'eau distillée stérile.

5. 2. Etalement sur milieu YMA au rouge Congo

Dans une boîte de pétri en verre stérile, on dépose quelques gouttes d'eau distillée stérile bien séparées, dans chacune d'elles est déposée un nodule qui sera écrasé avec une pince stérile. Une oëse du broyat est prélevée puis étalée sur milieu YMA contenant du rouge Congo (Annexe 1). Les boîtes ensemencées selon la méthode de stries sont incubées à une température de 28°C pendant 3 à 5 jours.

6. Purification et conservation des isolats

Dans des conditions aseptiques, une colonie à purifier est transférée dans un tube à essais contenant 5 ml du milieu YMB (Annexe 1). Après incubation à 28°C dans un bain marie agitateur pendant 48 heures, une oëse du milieu est ensemencée sur milieu YMA au rouge Congo. Cette méthode de repiquage peut être répétée jusqu'à l'obtention des colonies pures.

Les isolats sont repiqués en tubes sur pente gélosée de milieu YMA (Annexe 1) additionné de CaCO₃ (1g/l) sur lequel ils peuvent être conservés pendant 6 mois à plus d'un an à 4°C (Vincent, 1970). C'est à partir de ces tubes que toutes les cultures ultérieures ont été réalisées.

Pour une conservation de longue durée, les souches sont cultivées dans du milieu YMB, cette culture bactérienne liquide est mise dans un tube de cryoconservation à un volume égal avec du glycérol (w/v) à 20% puis congelée à -80°C.

7. Tests de nodulation

Chaque isolat a été testé pour sa capacité à noduler la plante à partir de laquelle il a été isolé.

7. 1. Test de nodulation des isolats spécifiques au pois

Les graines de pois ont été stérilisées en surface avec de l'éthanol (95%) pendant 5 mn, puis dans de l'acide sulfurique concentré pendant 5 mn, elles ont ensuite été lavées 10 fois avec de l'eau distillée stérile, et laissées à gonfler pendant 2 heures dans l'eau stérile du dernier lavage. Les graines ont été mises à germer dans des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée stérile à 1% à 25°C durant 2-3 jours. Deux graines germées ont été déposées sur un mélange sable-vermiculite (4:1) dans un système de jarre de Léonard (Annexe 3) humidifiée avec la solution nutritive de Fahraeus à pH 6,8 (Annexe 1, Vincent, 1970). Chaque graine a

été inoculée par 1 ml de la suspension bactérienne ($\sim 10^9$ cellules ml^{-1}). Les plantes ont été cultivées en chambre de culture sous des conditions de température de 25°C jour et 16°C nuit avec une photopériode de 10-14 heures. Deux traitements non inoculés ont été inclus en tant que témoin négatif. Le développement des nodules a été suivi au cours des 4 premières semaines après inoculation.

7. 2. Test de nodulation des isolats spécifiques à la lentille

La culture de la lentille a été réalisée dans des tubes à essais (22 × 20 mm). Les graines ont été désinfectées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3% pendant 5 min, rincées à l'eau stérile et laissées dans la dernière eau de rinçage pendant 1 heure, puis mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée stérile à 1% à 25°C durant 2-3 jours. Les graines germées ont été transférées dans des tubes remplis de solution nutritive de Fahraeus additionnée de CaCO_3 à 1% et fermés par des bouchons en plastique 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 ($\sim 10^7$ cellules) par graine dès l'apparition des racines latérales. Les plantes ont été cultivées en chambre de culture (température 22°C jour/18°C nuit, photopériode 10-16 heures, humidité 60% jour/70% nuit d'humidité). Chaque traitement a été répété deux fois. Deux traitements non inoculés ont été inclus en tant que témoin. Le développement des nodules a été suivi au cours des 4 premières semaines après inoculation.

8. Méthodes moléculaires utilisées pour la caractérisation génotypique des rhizobiums

La caractérisation génotypique des rhizobiums a été effectuée par PCR-RFLP (restriction fragment polymorphism of PCR amplified fragments) pour l'analyse de la variabilité de deux régions d'ADN: la région *nodD-F* située sur le plasmide symbiotique (pSym), qui comprend le gène *nodD* et la région intergénique entre le gène *nodD* et le gène *nodF*, et la région intergénique de l'ADNr IGS 16S-23S (Laguerre et al., 1996 ; Laguerre et al., 2003). Nous avons également réalisé le séquençage de ces 2 régions d'ADN, et le séquençage partiel du 16S ADNr.

8.1. Extraction de l'ADN pour la PCR

L'extraction de l'ADN total destiné à l'amplification par PCR, a été réalisée à partir des colonies bactériennes cultivées sur milieu gélosé YMA à 28°C pendant 24 à 48 heures. Les cellules jeunes ont été traitées à la protéinase K (Laguerre et al., 1997). L'équivalent

d'environ 10 µl de cellules (une oëse métallique pleine) est mis en suspension dans 200 µl de tris HCl à 5mM (pH 8,2) auquel est ajouté 10 µl de protéinase K à 1.3 mg/ml d'eau milliQ. Ce mélange est incubé à 55°C pendant une nuit, puis la protéinase K est dénaturée à 100°C pendant 10 min. Ces cellules traitées peuvent être conservés plusieurs semaines à - 20°C. C'est à partir de cette suspension cellulaire, utilisée comme ADN cible, qu'ont été effectuées les différentes réactions de PCR.

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

La réaction en chaîne par polymérase (PCR, Polymerase chain reaction) permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN cible pour faciliter son étude.

8.2.1. Amplification de l'IGS 16S-23S de l'ADNr

Les deux amorces utilisées, FGPS1490 et FGPS132'-38 (Tableau 2) proviennent de deux régions de l'ADNr 16S (FGPS1490) et 23S (FGPS132'-38) encadrant la région intergénique (IGS) (Annexe 4).

La réaction d'amplification (PCR) s'effectue dans un volume final de 25 µl contenant 100 µM de chaque dNTP, 0,2 µM de chaque amorce, le tampon PCR à 1X, 1,5 mM de MgCl₂ (mêlé au tampon), 0,03U/ µl de Taq ADN polymérase (Promega) et 2 µl d'ADN. La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, USA). Le programme d'amplification comporte une étape de dénaturation initiale de 3 min à 95°C, 35 cycles PCR (dénaturation 1 min à 94°C, hybridation 1 min à 55°C, extension 1 min 45 s à 72°C) et un cycle final d'extension de 3 min à 72°C.

Afin de vérifier la qualité de la réaction d'amplification, 2,5 µl de produits PCR additionné de 2,5 µl de tampon de charge ont été séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (MP Biomedicals) à 1% dans lequel a été ajoutée une goutte de BET (3,75 µl à 0,624 mg/ml). Ce gel a été placé à 100 V pendant 45 min dans une solution de tampon TAE (Tris-Acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3). Le Smart Ladder (Eurogentec) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. La visualisation a été faite sous UV à l'aide d'un imageur (Bioprint, Vilber Lourmat) relié à une imprimante et à un réseau informatique. La présence de l'ADN est révélée grâce à la fluorescence du BET piégé entre les molécules.

8.2.2. Amplification de la région *nodD-F*

Les amorces NBA12 et NBF12' (Tableau 2) correspondant respectivement à une partie des séquences promotrices très conservées chez *Rhizobium* des gènes *nodA* et *nodF* (Annexe 4) (Laguerre et al., 1996) encadrant le gène *nodD*. En plus du *nodD*, ces amorces permettent d'amplifier la région intergénique entre *nodF* et *nodD*.

Le mélange réactionnel de 25 µl contenant 200 µM de chaque dNTP, 0,4 µM de chaque amorce, le tampon PCR à 1X, 1,5 mM de MgCl₂ (mêlé au tampon), 0,03U/ µl de Taq ADN polymérase (Promega) et 2,5 µl d'ADN. La réaction de PCR et l'électrophorèse sur gel d'agarose ont été réalisées dans les mêmes conditions indiquées précédemment.

8.3. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction est une technique qui a pour but de couper les fragments d'ADN amplifiés par PCR. L'ADN est clivé grâce à une enzyme de restriction au niveau d'un site spécifique, appelé site de restriction de l'enzyme constitué de quelques paires de bases. La taille des fragments de restriction obtenus a été analysée par électrophorèse. L'enzyme choisie est *HaeIII* et qui reconnaît le site de restriction de la séquence 5'-GG▼CC-3'.

Un mélange réactionnel d'un volume final de 10 µl a été préparé par 1 µl de tampon réactionnel 10X spécifique de l'enzyme *HaeIII* (Promega), 10 U d'enzyme (1 µl), 8µL de produits PCR. La digestion a été réalisée à 37°C pendant une nuit. Les fragments de restriction obtenus après ajout de 2 µl de tampon de charge ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% (Nusieve 3:1, Tebu-Bio), placé à 100 V pendant 3 heures 30 min dans du tampon TBE (Tris-Borate 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3). Le marqueur VIII (Eurogentec) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le gel a été ensuite coloré par une solution de BET (100 µl de BET à 10mg/ml dans un 1 litre d'eau) durant 15 min, puis rinçage à l'eau pendant 15min. le gel a été visualisé sous UV à l'aide du même imageur que pour la PCR.

Les profils de bandes caractéristiques ainsi obtenus ont été comparés entre eux afin de pouvoir différencier les profils génotypiques des souches bactériennes précédemment isolées.

Tableau 2: Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN et le séquençage

| Région ADN | Amorces | Séquence de l'Amorce | Référence de la séquence d'origine |
|-----------------------|-------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|
| IGS 16S-23S de l'ADNr | FGPS1490 | 5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3' | Navarro et Nesme (1992) |
| | FGPS132'-38 | 5'-CCGGGTTTCCCATTTCGG-3' | Ponsonnet <i>et al.</i> (1994) |
| <i>nodD-F</i> | NBA12 | 5'-GGAT(CG)GAATCATCATCTA(CT)(AG)G(AC)(AG)TGG-3' | Laguerre <i>et al.</i> (1996) |
| | NBF12' | 5'-GGATCRAAAGCATCCRCA(CG)TATGG-3 | Laguerre <i>et al.</i> (1996) |
| | NODDRL2' | 5'-CTC(CG)C(CG)(CG)A(AT)CCA(GT)ATG(CT)T(CT)CC-3' | Laguerre <i>et al.</i> (1996) |
| ADNr 16S | fD1 | 5'-CCGAATTCGTTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' | Weisburg <i>et al.</i> (1991) |
| | rD1 | 5'-CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3' | Weisburg <i>et al.</i> (1991) |
| | 16S-1080r | 5'-GGGACTTAACCCAACATCT-3' | Zakhia <i>et al.</i> (2006) |

8.4. Séquençage et analyse phylogénétique

Un représentant de chaque haplotype répertorié dans l'approche PCR-RFLP a été séquencé. Les produits PCR (régions IGS et *nodD-F*) ont été purifiés en utilisant le PureLink™ PCR KIT de Purification (Invitrogen™). La région *nodD-F* a été séquencée en utilisant l'amorce interne NODDRL2' (Tableau 2). Le gène ADNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces universelles fD1 et rD1 (tableau 2) tel que décrit par Laguerre et *al.* (1994). Le mélange réactionnel de 25 µl contenant 200 µM de chaque dNTP, 0,1 µM de chaque amorce, le tampon PCR à 1X, 1,5 mM de MgCl₂ (mélangé au tampon), 0,03U/ µl de *Taq* ADN polymérase et 2,5 µl d'ADN. La réaction de PCR et l'électrophorèse sur gel d'agarose ont été réalisées dans les mêmes conditions indiquées précédemment. Les produits PCR de l'ADNr 16S ont été purifiés à l'aide du Kit PureLink™ PCR KIT (Invitrogen™), puis partiellement séquencés en utilisant l'amorce 16S-1080r (Zakhia et *al.*, 2006).

Après purification, la quantification de l'ADN a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% grâce au marqueur Smart ladder ou par spectrométrie à l'aide d'un appareil NanoDrop (NP-1000 spectrophotometre). Les produits PCR purs ont été séquencés auprès de la société Genoscreen© (Lille, France).

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été vérifiées et corrigées à l'aide du logiciel Chromas Pro (version 1.5), puis comparées avec celles de GenBank en utilisant le programme BLASTN sur le site www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Les analyses phylogénétiques ont été exécutées sur la plate-forme phylogeny.fr (Dereeper et *al.*, 2008). Les arbres phylogénétiques ont été construits par la méthode Neighbor-joining (Nj) (Saitou et Nei, 1987) et par la méthode de maximum de vraisemblance (Guindon et Gascuel, 2003). Les « gaps » ont été retirés de l'alignement.

8.5. Analyses statistiques

Les distributions des génotypes au sein des populations de rhizobiums ont été statistiquement comparées entre les zones climatiques, et entre les plantes d'origine par analyse moléculaire de la variance (AMOVA) en utilisant le logiciel Arlequin version 2.000 (Schneider et *al.*, 2000). Des analyses par raréfaction ont confirmé la taille suffisante de notre échantillonnage (nombre d'isolats) pour permettre des comparaisons directes de la richesse en génotypes entre les populations en utilisant le logiciel EstimateS (<http://viceroy.eec.uconn.edu/estimates>, version 8.2.0 for Windows, 2009). Le nombre des

génotypes dominants a été estimé par le calcul de l'indice inverse de diversité de Simpson, $1/D = 1/\sum [ni (ni - 1)/N (N - 1)]$, ni est le nombre de type et N est le nombre des individus dans une population (Hill, 1973). les différences significatives pour les indices de diversité entre les populations ont été testées à l'aide du logiciel PAST (Hammer et *al.*, 2001 ; Hill et *al.*, 2003).

9. Indice de diversité

L'indice de diversité est un critère utilisé pour évaluer la diversité d'une population. L'indice de Simpson D (Simpson, 1949) est un des indices les plus souvent utilisés pour quantifier la biodiversité d'un habitat. Il donne plus de poids aux espèces (ex. génotypes) abondantes qu'aux espèces rares. La diversité des types *nod*, types IGS et génotypes IGS/*nod* a été évaluée en considérant la richesse d'espèces et l'indice de diversité de Simpson, qui intègrent à la fois la mesure de la richesse (nombre d'espèces par échantillon) et la régularité de la distribution des espèces. Dans notre cas le nombre des génotypes dominants a été estimé par le calcul de l'indice inverse de diversité de Simpson (1/D). Le chiffre 1 est la valeur la plus basse possible de cet indice, il représenterait une population contenant un seul type dominant. Plus la valeur de l'indice est grande, plus la diversité est élevée. La valeur maximale est le nombre d'espèces dans l'échantillon.

CHAPITRE 3

1. Description des sols et densité des populations des rhizobiums

1.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les résultats des analyses physico-chimiques des différents échantillons de sols figurent dans le tableau 3. Ces analyses ont permis de déterminer la texture et le niveau de fertilité de chaque sol, l'analyse granulométrique a révélé des différences de texture : les sols d'El-Taref et Ben-Azzouz (zone subhumide) et le sol de Constantine (zone semi-aride) sont de texture équilibrée (limono- sablo- argileux). Les sols de El-Harrouch (zone subhumide) et de Oum El Bouaghi (zone semi-aride) sont de texture limoneuse, le sol de Souk Naâmane (zone semi-aride) est limono-sableux. Le pH des sols est légèrement alcalin (7,7 à 8,1), et est un peu plus élevé en zone semi-aride qu'en zone subhumide. Les sols de la zone semi-aride se distinguent des sols de la zone subhumide par des conductivités électriques (CE) plus élevées (respectivement 1,8 à 2,1 millimhos/cm et 0,6 à 1,1 millimhos/cm), un résultat probablement lié à la salinité des sols de la zone semi-aride, bien qu'un sol soit considéré comme salin pour une CE supérieure à 2 millimhos/cm (Baize, 2000). Le sol de Constantine présente les teneurs les plus élevées en matière organique (3,3 ‰) et en azote (1,4 ‰).

Pour une discrimination des sols, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur tous les paramètres physico-chimiques mesurés (Figure 9). Le premier axe, F1 (47,32% de la variation totale) a séparé Constantine et El Harrouch des autres sites, basés principalement sur la matière organique, C, N et le % de saturation, tandis que l'axe F2 (26,16% de la variation totale) a été principalement expliqué par la conductivité électrique (EC) en séparant les trois sites subhumides des autres. Cette analyse par ACP a permis de décrire et représenter les ressemblances entre les différents sites d'expérimentations par rapport à l'ensemble des variables mesurées.

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des sols

| Sites | Zone ^a | Type de sol ^b | Argile % | Limon fin % | Limon grossier % | Sable fin % | Sable grossier % | Matière organique % | Saturation % | pH (eau) | CE (millimhos cm ⁻¹) | Carbone (‰) | Azote (‰) | C/N |
|----------------|-------------------|--------------------------|----------|-------------|------------------|-------------|------------------|---------------------|--------------|----------|----------------------------------|-------------|-----------|-----|
| El-Taref | SH | LSA | 25 | 37 | 12 | 17 | 7 | 1.29 | 55 | 7.9 | 0.6 | 7.5 | 0.96 | 8 |
| Ben-Azzouz | SH | LSA | 17 | 22 | 20 | 29 | 7 | 1.221 | 50 | 7.7 | 0.8 | 7.1 | 0.5 | 14 |
| El-Harrouch | SH | L | 20 | 45 | 16 | 6 | 8 | 2.425 | 62 | 8.1 | 1.1 | 14.1 | 1.14 | 12 |
| Constantine | SA | LSA | 20 | 20 | 27 | 7 | 29 | 3.302 | 75 | 8.1 | 1.8 | 19.2 | 1.38 | 14 |
| Souk Naâmane | SA | LS | 14 | 12 | 7 | 35 | 27 | 1.548 | 50 | 8.1 | 2.1 | 9 | 1.14 | 8 |
| Oum El Bouaghi | SA | L | 12 | 40 | 15 | 22 | 6 | 1.565 | 55 | 8.1 | 1.8 | 9.1 | 0.8 | 11 |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride.

^b LSA, Limono- sablo- argileux ; L, Limoneux ; LS, Limono-sableux.

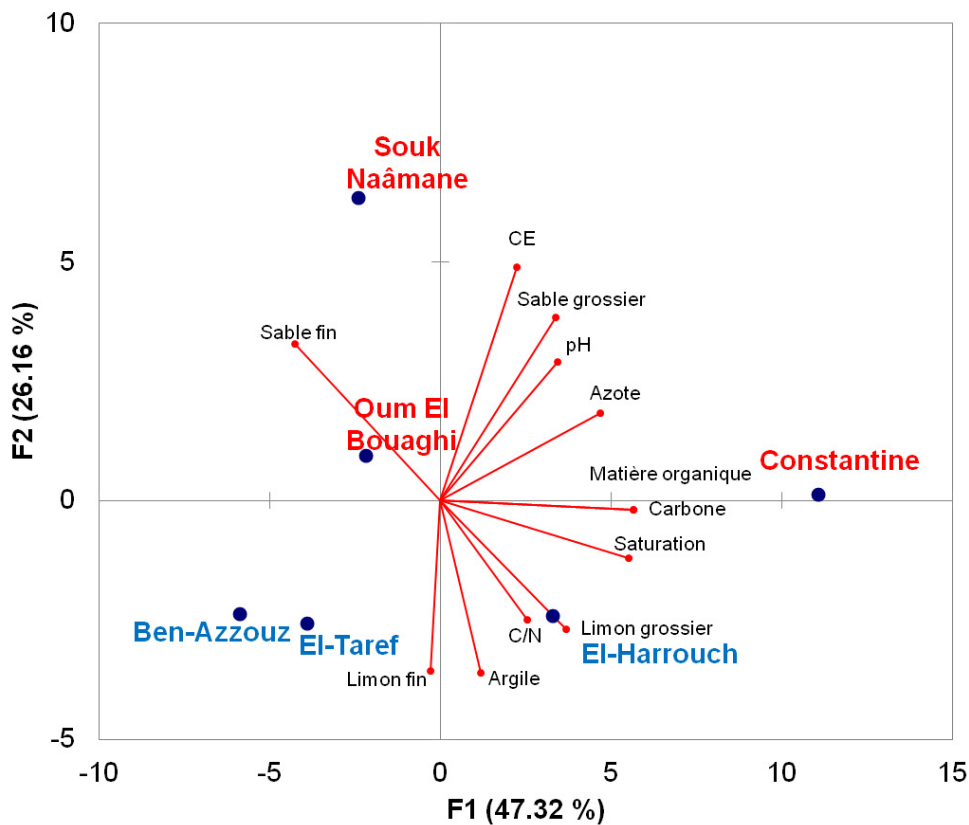


Figure 9 : Analyse en composantes principales des sols en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques

1.2. Densité des populations des rhizobiums dans les différents sols

La présence de nodules sur les racines de la vesce a été observée au bout de 2-4 semaines. Pour estimer le nombre le plus probable de rhizobiums présents dans le sol, nous avons utilisé la table 3.5_A de Fisher et Yates (Annexe 2). Cette table nécessite trois données fondamentales : n , soit le nombre de tubesensemencés avec la même dilution, s qui correspond au nombre de dilution effectuées et enfin le nombre de tubes de croissance positifs dans lesquels se sont développées les plantes nodulées (Vincent, 1970). Dans notre cas, $n = 4$, $s = 8$ et le nombre de tubes de croissance positifs varie selon le sol. Le MPN a été calculé selon la formule suivante : $\text{MPN (rhizobiums/g sol)} = M \times d/v$. M : nombre de rhizobiums/g de sol humide pour la dilution la plus faible, estimé par la table de Fisher et Yates ; d : inverse de la dilution la plus faible utilisée dans la série (10^{-1}) ; et v : volume d'inoculation = 1 ml.

Il faut tenir compte de l'humidité du sol pour le calcul de MPN par g de sol sec. L'intervalle de confiance qui encadre la valeur estimée a été déterminé selon la formule de Cochran (Cochran, 1950) qui tient compte de n et du taux de dilution, Pour notre expérience, ce taux est de 1/10. Ainsi, en reportant ces deux valeurs dans la table de Cochran (Annexe 2), on obtient le facteur de confiance ($f = 3,8$). Les résultats des estimations MPN pour les différents types de sols sont résumés dans le Tableau 4. On observe que la taille des populations des rhizobiums varie peu entre les sols (0.2 à 3.9×10^4 rhizobiums par g de sol). Des différences significatives sont uniquement observées entre le sol de Ben-Azzouz (zone subhumide) et celui d'Oum El Bouaghi (zone semi-aride) car les intervalles de confiances ne se recouvrent pas.

Tableau 4 : Densité des populations des rhizobiums dans les différents sols

| Sites | Zone ^a | Nombre totale de tubes de croissance positifs | MPN ^b x 10 ⁴ (g ⁻¹ sol frais) | Equivalent d'1 g de sol frais en sol sec | MPN x 10 ⁴ (g ⁻¹ sol sec) [intervalle de confiance] ^c |
|----------------|-------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| El-Taref | SH | 15 | 1 | 0,844 | 1.2 (0.3–4.5) |
| Ben-Azzouz | SH | 17 | 3,1 | 0,871 | 3.5 (0.9–13.3) |
| El-Harrouch | SH | 16 | 1,7 | 0,804 | 2.1 (0.5–7.9) |
| Constantine | SA | 17 | 3,1 | 0,790 | 3.9 (0.1–14.8) |
| Souk Naâmane | SA | 16 | 1,7 | 0,653 | 2.6 (0.7–10.0) |
| Oum El Bouaghi | SA | 12 | 0,17 | 0,883 | 0.2 (0.05–0.7) |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride.

^b Nombre le plus probable de rhizobiums.

^c Intervalle de confiance à 95% donné entre parenthèses.

2. Etude morphologique des isolats et test de nodulation

2.1. Etude morphologique

Parmi les caractéristiques morphologiques et culturales utilisées pour la caractérisation et l'identification des rhizobiums, une des plus remarquables est leur croissance sur milieu YMA (Vincent, 1970). Ainsi la croissance de nos isolats a été détectée après 24–48 heures à 28°C, abondante après 3 à 5 jours; Les colonies ont une forme circulaire à bord régulier, convexes, translucides, avec une taille variable selon les souches de 2-4 mm ; leur incubation à l'obscurité n'a pas résulté en l'absorption du rouge Congo, les colonies restent ainsi

blanches ou deviennent rarement rosées (annexe 5). D'après ces caractéristiques morphologiques, les souches se sont montrées en accord avec la description décrite par Jordan (1982, 1984) et Vincent (1970) pour *Rhizobium* à croissance rapide. Chaque colonie a été purifiée et conservée.

2.3. Test de nodulation

La capacité d'induire la formation des nodules sur les racines de la légumineuse hôte constitue un critère d'authentification essentiel dans la caractérisation des rhizobiums. Cette approche nous a permis d'évaluer l'infectivité de chaque isolat avec la plante hôte à partir de laquelle il a été isolé. Les premiers nodules apparaissent après 10 jours. Tous nos isolats ont répondu positivement au test de nodulation après 3-4 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.

Ces critères morphologiques et l'aptitude à former des nodules avec la plante hôte ont conduit à la sélection de 237 souches symbiotiques isolées à partir du pois protéagineux, du pois fourrager et de la lentille, soit environ 80 isolats pour chacune des plantes hôtes et 31-42 isolats par site (Tableau 5).

Tableau 5 : Nombre des isolats par plante et par site

| Sites | Zone ^a | plantes hôtes ^b | | | Total |
|----------------|-------------------|----------------------------|----|----|-------|
| | | PF | PP | L | |
| El-Taref | SH | 13 | 20 | 9 | 42 |
| Ben-Azzouz | SH | 12 | 13 | 16 | 41 |
| El-Harrouch | SH | 14 | 14 | 12 | 40 |
| Constantine | SA | 11 | 14 | 16 | 41 |
| Souk Naâmane | SA | 14 | 12 | 16 | 42 |
| Oum El Bouaghi | SA | 12 | 9 | 10 | 31 |
| Total | | 76 | 82 | 79 | 237 |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride.

^b PF : Pois fourrager ; PP : Pois protéagineux ; L : Lentille.

3. Caractérisation génétique des rhizobiums

3.1. Caractérisation des rhizobiums par PCR-RFLP

3.1.1. Amplification d'ADN et Profils de restriction de la région IGS 16S-23S de l'ADNr

Les 237 isolats ont été analysés par PCR-RFLP de la région IGS 16S-23S de l'ADNr. Un fragment unique a été amplifié pour chaque isolat (Figure 10). Les souches ont donné une amplification dans la gamme de taille attendue, entre 1030 à 1215 paires de base, ce qui est conforme à la variabilité connue de la taille de ces régions d'ADN chez *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* (Laguerre *et al.*, 1996). Les profils générés par l'enzyme de restriction *Hae* III ont mis en évidence 14 profils ou types chez les souches nodulant le pois et la lentille. Chaque profil regroupe de 1 à 70 isolats. Les différents profils sont représentés dans la figure 11.

3.1.2. Amplification d'ADN et profils de restriction de la région symbiotique *nodD-F*

L'amplification par PCR de la région de l'ADN *nodD-F* qui comprend une partie du gène *nodD* et la région intergénique entre le *nodD* et le gène *nodF* a été réalisée pour les 237 isolats. Chaque isolat a produit une seule bande variant de 1110 à 1440 paires de bases (Figure 12), correspondant à la variabilité connue de la taille de cette région d'ADN chez *Rhizobium leguminosarum* sv *viciae* (Laguerre *et al.*, 1996). Les produits d'amplification digérés par l'enzyme de restriction *Hae*III ont généré 10 profils ou types de restriction distincts, chaque profil regroupe de 1 à 208 isolats (Figure 13).

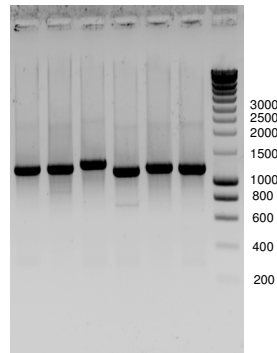


Figure 10 : Profils électrophorétiques des produits d'amplification de l'IGS 16S-23S de l'ADNr sur gel d'agarose de quelques isolats. La colonne de droite indique la position et la taille en paires de bases (pb) des bandes du marqueur de masse moléculaire Smart Leader (200-10000 pb).

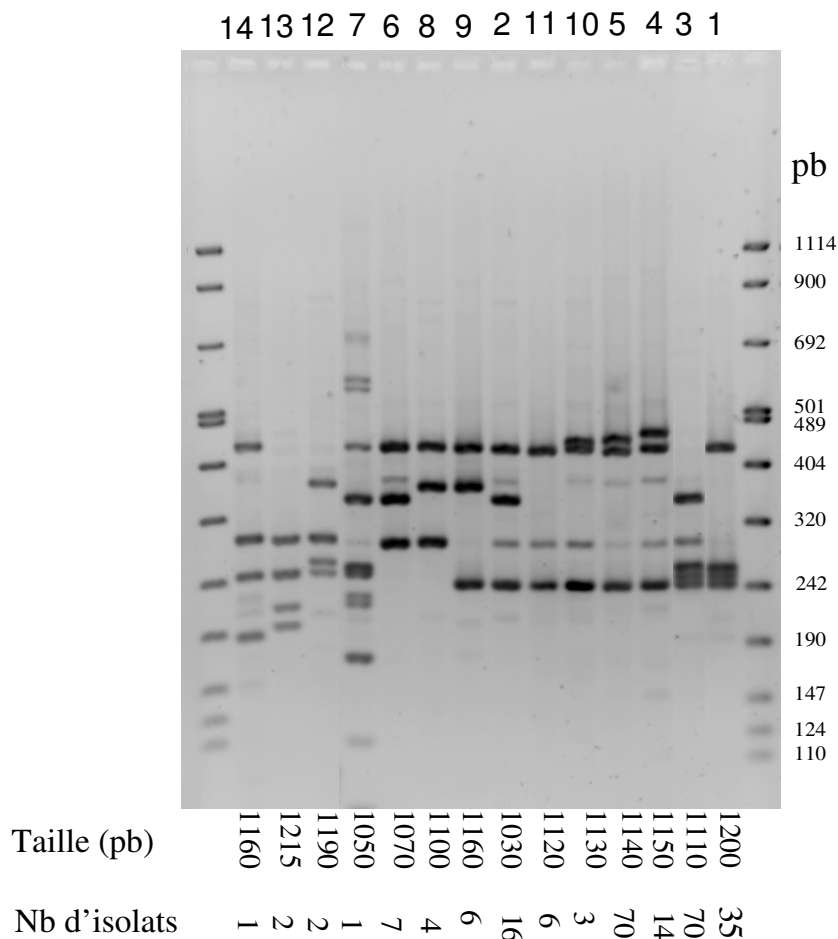


Figure 11 : Différents Profils électrophorétiques de restriction *HaeIII* par RFLP de la région IGS 16S-23S de l'ADNr. La première colonne indique la position et la taille en paires de bases (pb) des bandes du marqueur de masse moléculaire (VIII). La taille indiquée en bas des profils représente une estimation de la taille du produit d'amplification calculée à partir de la somme des fragments de restriction, ainsi que le nombre d'isolats pour chaque type IGS.

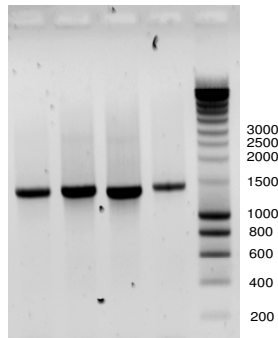


Figure 12 : Profils électrophorétiques des produits d’amplifications de la région symbiotique *nodD-F* sur gel d’agarose de quelques isolats. La colonne à droite indique la position et la taille en paires de bases (pb) des bandes du marqueur de masse moléculaire Smart Leader (200-10000 pb).

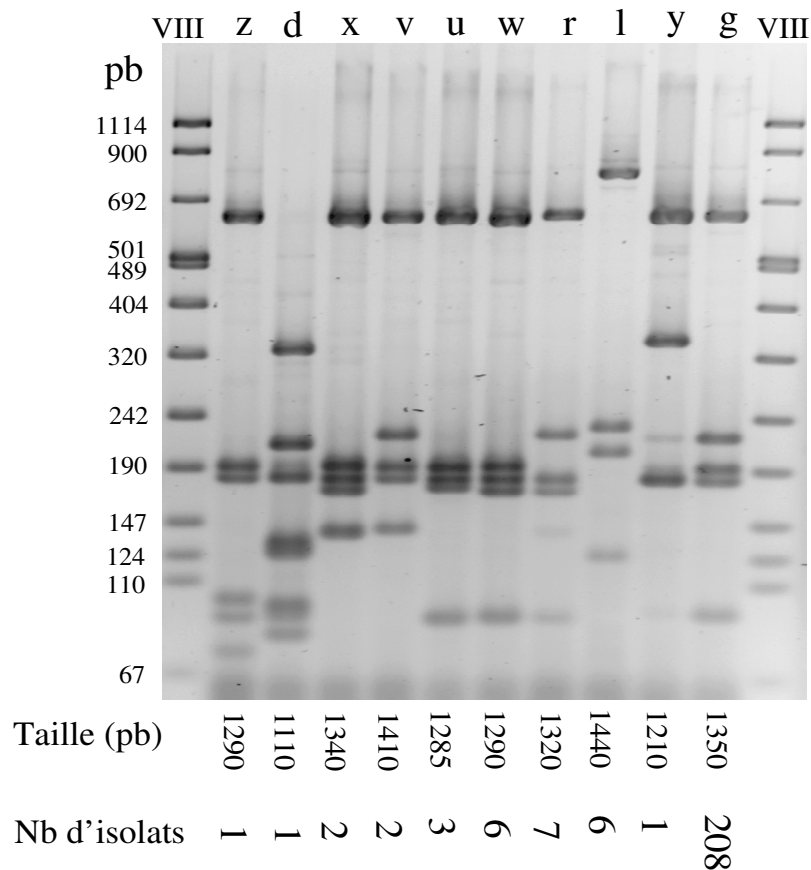


Figure 13 : Différents Profils électrophorétiques de restriction *HaeIII* par RFLP de la région symbiotique *nodD-F*. la première colonne indique la position et la taille en paires de bases (pb) des **bandes** du marqueur de masse moléculaire (VIII). La taille indiquée en bas des profils représente une estimation de la taille du produit d’amplification calculée à partir de la somme des fragments de restriction, ainsi que le nombre d’isolats pour chaque type *nod*.

3.1.3. Courbes de raréfaction

Gotelli et Colwell (2001) suggèrent de calculer les courbes de raréfaction pour l'estimation et la comparaison de la richesse spécifique en traçant simplement le nombre d'espèces découvert (nombre de génotypes) en fonction de l'effort d'échantillonnage (nombre d'isolats). Dans notre cas, un génotype est issu de la combinaison d'un type IGS et d'un type *nod*. Les courbes de raréfaction ont permis d'estimer l'effort d'échantillonnage pour chaque population, qui se définit par une plante hôte et un site. On observe que les courbes estimées et observées tendent vers un plateau de saturation, ce qui valide notre échantillonnage (Figures 14, 15, 16). Ainsi, il semble qu'une large fraction de la diversité des génotypes nodulant les plantes hôtes ait été mise en évidence pour chaque population. L'analyse de ces courbes a aussi confirmé que la taille de nos échantillons (le nombre d'isolats) était suffisamment élevée pour permettre une comparaison directe de la richesse (nombre de génotypes) entre les populations.

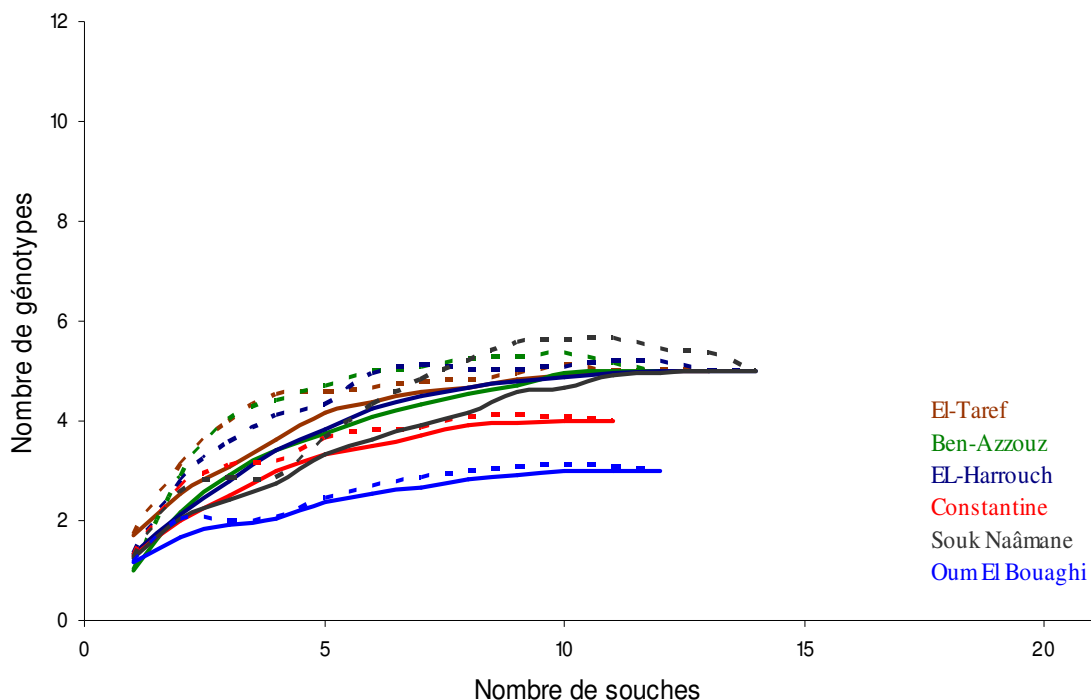


Figure 14 : Courbes de raréfaction obtenues pour le génotype IGS/*nod* de l'ensemble des populations du pois fourrager. Les courbes représentées en trait continu correspondent au nombre de génotypes observés. Les courbes représentées en traits pointillé correspondent au nombre total de génotypes estimés.

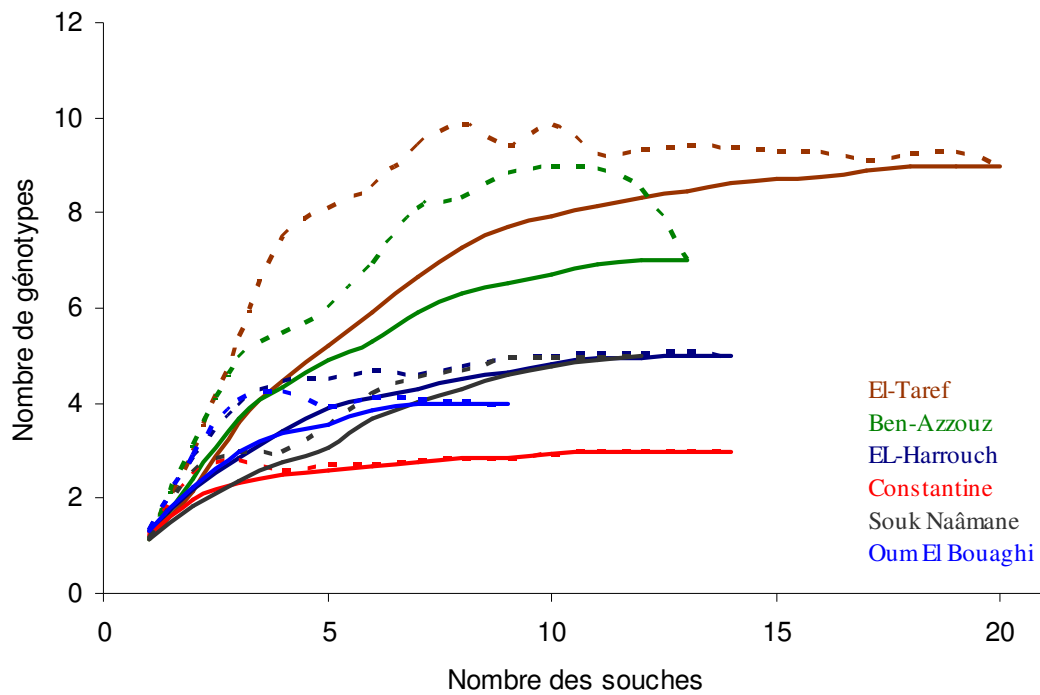


Figure 15 : Courbes de raréfaction obtenues pour le génotype IGS/*nod* de l'ensemble des populations du pois protéagineux. Les courbes représentées en trait continu correspondent au nombre de génotypes observés. Les courbes représentées en traits pointillé correspondent au nombre total de génotypes estimés.

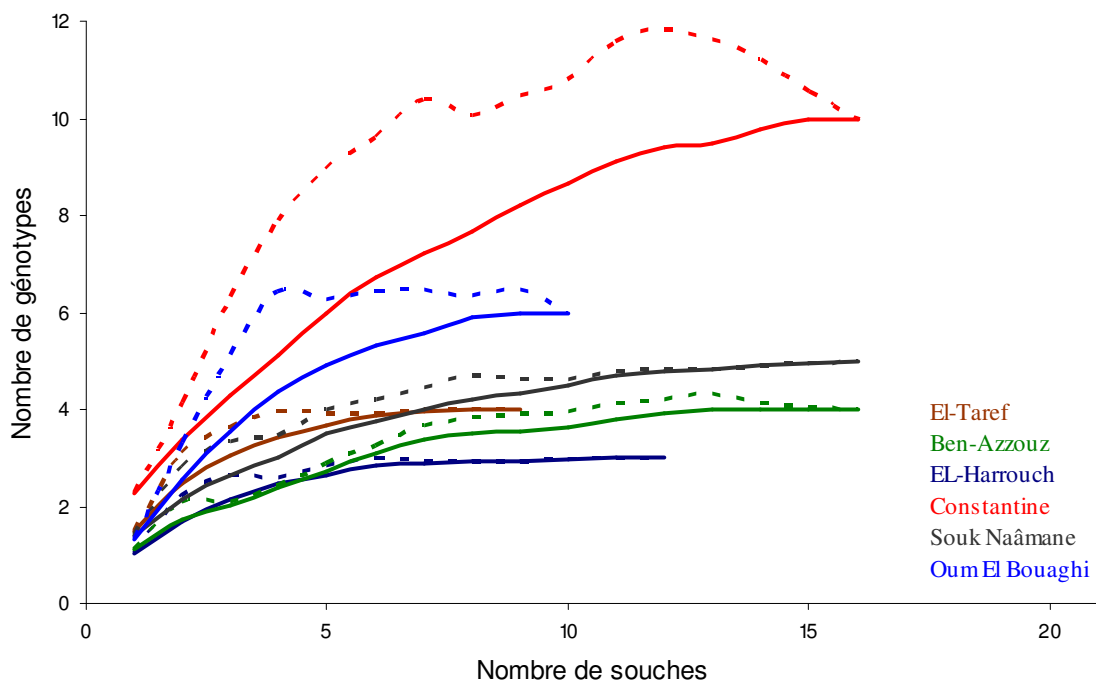


Figure 16 : Courbes de raréfaction obtenues pour le génotype IGS/*nod* de l'ensemble des populations de la lentille. Les courbes représentées en trait continu correspondent au nombre de génotypes observés. Les courbes représentées en traits pointillés correspondent au nombre total de génotypes estimés.

3.1.4. Répartition et diversité génétique des populations de rhizobiums

3.1.4.1. Répartition et diversité génétique des types IGS dans les différents sites et en fonction de la plante d'origine

Cinq types IGS prédominent, représentant chacun plus de 5% des 237 isolats. On observe des différences dans la répartition de ces types selon la zone éco-climatique. Les types 1 et 3, qui représentent respectivement 14.8% et 29.5% des isolats, n'ont été détectés que dans les trois sols en zone subhumide et le sol de Constantine en zone semi-aride. Le type 2 n'a été révélé que dans les sols en zone subhumide (6.8% des isolats). A l'inverse, les types IGS 4 et 5 (5.9% et 29.5% des isolats, respectivement) n'ont été observés que dans les sols en zone semi-aride, à l'exception de deux isolats de type 5 détecté dans le sol d'El-Taref, et prédominant dans les sols de Souk Naâmane et d'Oum El Bouaghi avec des proportions de 75% et 84% respectivement (Tableau 6). Cela est marqué par l'indice de diversité $1/D$ de 4.9, estimant ainsi le nombre de types dominant. Des différences significatives de diversité ont été détectées entre les zones semi-aride et subhumide pour les deux plantes hôtes séparément, le pois fourrager ($P=0.01$) et le pois protéagineux ($P=0.001$). Les différences observées entre les indices de diversité sont également significatives ($P < 0.001$) entre les populations originaires des trois plantes-hôtes. Aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été détectée entre les populations des zones subhumides et semi-arides (Tableau 7).

Tableau 6 : Diversité et distribution des isolats des rhizobiums selon les types IGS en fonction de la plante hôte et la zone éco-climatique.

| Zone ^a | Site | Plante-hôte ^b | % d'isolats dans les types IGS ^c | | | | | | | | | | | | | | Nb d'isolats | Indice de diversité ^d |
|-------------------|----------------|--------------------------|---------------------------------------------|-----|------|-----|------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|----------------------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | |
| SH | El-Taref | PF | 23 | 8 | 31 | | | | | | 8 | | 31 | | | 13 | 5.2 | |
| SH | El-Taref | PP | 35 | 15 | 20 | | 5 | 10 | | | 5 | 10 | | | | 20 | 5.9 | |
| SH | El-Taref | L | 22 | 33 | 33 | | | | | | | | 11 | | | 9 | 5.2 | |
| SH | Ben-Azzouz | PF | 8 | 0 | 75 | | | 8 | | | 8 | | | | | 12 | 1.8 | |
| SH | Ben-Azzouz | PP | 8 | 8 | 54 | | 8 | 8 | 8 | | 8 | | | | | 13 | 3.7 | |
| SH | Ben-Azzouz | L | 13 | 6 | 75 | | | | | | 6 | | | | | 16 | 1.8 | |
| SH | El-Harrouch | PF | 29 | 14 | 43 | | | | | 7 | | | 7 | | | 14 | 4.1 | |
| SH | El-Harrouch | PP | 29 | 29 | 36 | | | | | | 7 | | | | | 14 | 4.1 | |
| SH | El-Harrouch | L | 50 | 8 | 42 | | | | | | | | | | | 12 | 2.7 | |
| SA | Constantine | PF | 36 | | 36 | 18 | 9 | | | | | | | | | 11 | 4.2 | |
| SA | Constantine | PP | | | 57 | 7 | 36 | | | | | | | | | 14 | 2.4 | |
| SA | Constantine | L | 6 | | 19 | 25 | 25 | 6 | 6 | | 6 | | | | 6 | 16 | 8 | |
| SA | Souk Naâmane | PF | | | | 14 | 86 | | | | | | | | | 14 | 1.4 | |
| SA | Souk Naâmane | PP | | | | 8 | 58 | 17 | 8 | | | | 8 | | | 12 | 3 | |
| SA | Souk Naâmane | L | | | | 6 | 81 | | | | | | | 13 | | 16 | 1.5 | |
| SA | Oum El Bouaghi | PF | | | | 8 | 83 | | 8 | | | | | | | 12 | 1.5 | |
| SA | Oum El Bouaghi | PP | | | | 11 | 89 | | | | | | | | | 9 | 1.3 | |
| SA | Oum El Bouaghi | L | | | | 10 | 80 | | | | | | 10 | | | 10 | 1.6 | |
| SH+SA | Tous les sites | PF+PP+L | 14.8 | 6.8 | 29.5 | 5.9 | 29.5 | 3 | 0.4 | 1.7 | 2.5 | 1.3 | 2.5 | 0.8 | 0.8 | 0.4 | 237 | 4.9 |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride

^b PF : Pois fourrager ; PP : Pois protéagineux ; L : Lentille.

^c Les types IGS sont identifiés par des numéros.

^d Indice de diversité : indice inverse de Simpson 1/D.

3.1.4.2. Répartition et de diversité génétique des types *nod* dans les différents sites et en fonction de la plante d'origine

Dans notre étude, la diversité du type *nod* est plutôt faible, avec seulement 10 types, mais très déséquilibrée, avec un type dominant "*nod g*" (88% au total) dans les différentes zones géographiques, indépendamment de la plante hôte d'isolement. Cette différence dans la distribution de la diversité est reflétée par l'indice de diversité, variant de 4.9 (IGS) à 1.3 (*nod*) (Tableaux 7 et 9). Les autres types *nod* ne sont que marginalement représentés dans les différentes zones géographiques, avec 1% à 3% du total. Pour l'ensemble des populations isolées du pois fourrager, le type *nod g* est fortement dominant (100% des isolats dans chaque population), excepté à Souk Naâmane (zone semi-aride) où 3 types *nod* ont été différenciés, Le type *g* prédomine (86% des isolats), et les 2 autres types *nod v* et *z* représentent chacun 7% des isolats.

Tableau 7 : Diversité génétique des populations des rhizobiums selon les types IGS en fonction de la plante hôte et la zone éco-climatique.

| Populations originaires de: | | Nb total | Nb de | Indice de | Test de |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|----------|------------------------|----------------------------------------------|
| Zone ^a | Plante-hôte ^b | d'isolats | Type IGS | Diversité ^c | permutation Bootstrap ^d |
| SH | PF | 39 | 7 | 3.5 |] P=0.01 |
| SA | PF | 37 | 5 | 2.4 | |
| SH | PP | 47 | 8 | 4.9 |] P=0.0003 |
| SA | PP | 35 | 6 | 2.7 | |
| SH | L | 37 | 5 | 2.7 |] P=0.99 ^{NS} |
| SA | L | 42 | 10 | 2.7 | |
| SH | PF+PP+L | 123 | 10 | 3.6 |] P=0.0003 |
| SA | PF+PP+L | 114 | 10 | 2.6 | |
| SH+SA | PF | 76 | 9 | 4.8 |] P=0.48 ^{NS} |
| SH+SA | PP | 82 | 11 | 5.4 | |
| SH+SA | L | 79 | 13 | 4.8 |] P=0.57 ^{NS}] P=0.9 ^{NS} |
| SH+SA | PF+PP+L | 237 | 14 | 4.9 | |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride

^b PF : Pois fourrager ; PP : Pois protéagineux ; L : Lentille.

^c Indice de diversité : indice inverse de Simpson 1/D.

^d Test de diversité pour différence significative entre les échantillons. NS: non significatif.

Les isolats du pois protéagineux se répartissent en 7 types, la fréquence du type prédominant *nod g* varie de 67% à 100%, Constantine est le seul site présentant 100%. Les rhizobiums isolés des nodules de la lentille se répartissent en 6 types *nod*, aucune diversité n'a été observée dans les sites en zone subhumide (100% de type *g*), cependant dans les sites en zone semi-aride la fréquence du type *g* varie de 30 à 69% des isolats. Le type *nod l* est également fréquent (31% des isolats) dans le sol de Constantine. La diversité des types *nod* est plus élevée pour le pois protéagineux et la lentille dans le sol d'Oum El Bouaghi (2.3 et 6.4 respectivement), ce sont les types *nod g* et *w* qui co-dominent (30% des isolats) (Tableau 8). Ainsi, des différences significatives de diversité ont été observées entre les zones semi-aride et subhumide pour les populations de la lentille ($p = 0.001$) avec un indice de diversité élevé de 2.8 dans la zone semi-aride. Des différences significatives de diversité ont également été détectées entre les sous-populations originaires des trois plantes-hôtes ($p < 0.001$), et entre les sous-populations du pois fourrager et de la lentille entre la zone subhumide et semi-aride ($p < 0.001$) (Tableau 9).

Tableau 8 : Diversité et distribution des isolats des rhizobiums selon leur type *nod* en fonction de la plante hôte et de la zone éco-climatique.

| Zone ^a | Site | Plante-hôte ^b | % d'isolats dans les types <i>nod</i> ^c | | | | | | | | | | Nb total d'isolats | Indice de diversité ^d | |
|-------------------|----------------|--------------------------|----------------------------------------------------|---|----|----|----|----|----|----|---|---|--------------------|----------------------------------|-----|
| | | | g | y | l | r | w | u | v | x | d | z | | | |
| SH | El-Taref | PF | 100 | | | | | | | | | | | 13 | 1 |
| SH | El-Taref | PP | 95 | | 5 | | | | | | | | | 20 | 1.1 |
| SH | El-Taref | L | 100 | | | | | | | | | | | 9 | 1 |
| SH | Ben-Azzouz | PF | 100 | | | | | | | | | | | 12 | 1 |
| SH | Ben-Azzouz | PP | 77 | | | 8 | | | 8 | | 8 | | | 13 | 1.7 |
| SH | Ben-Azzouz | L | 100 | | | | | | | | | | | 16 | 1 |
| SH | El-Harrouch | PF | 100 | | | | | | | | | | | 14 | 1 |
| SH | El-Harrouch | PP | 93 | 7 | | | | | | | | | | 14 | 1.2 |
| SH | El-Harrouch | L | 100 | | | | | | | | | | | 12 | 1 |
| SA | Constantine | PF | 100 | | | | | | | | | | | 11 | 1 |
| SA | Constantine | PP | 100 | | | | | | | | | | | 14 | 1 |
| SA | Constantine | L | 63 | | 31 | 6 | | | | | | | | 16 | 2.2 |
| SA | Souk Naâmane | PF | 86 | | | | | | 7 | | 7 | | | 14 | 1.4 |
| SA | Souk Naâmane | PP | 92 | | | 8 | | | | | | | | 12 | 1.2 |
| SA | Souk Naâmane | L | 69 | | | | | 19 | 13 | | | | | 16 | 2 |
| SA | Oum El Bouaghi | PF | 100 | | | | | | | | | | | 12 | 1 |
| SA | Oum El Bouaghi | PP | 67 | | | 22 | | | | 11 | | | | 9 | 2.3 |
| SA | Oum El Bouaghi | L | 30 | | | 20 | 30 | 10 | 10 | | | | | 10 | 6.4 |
| SH+SA | Tous les sites | PF+PP+L | 88 | 0 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | | 237 | 1.3 |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride

^b PF : Pois fourrager ; PP : Pois protéagineux ; L : Lentille.

^c Les types *nod* sont identifiés par des lettres.

^d Indice de diversité : indice inverse de Simpson 1/D.

Tableau 9 : Diversité génétique des populations des rhizobiums selon leurs types *nod* en fonction de la plante hôte et de la zone éco-climatique.

| Populations originaires de: | | Nb total d'isolats | Nb de Type <i>nod</i> | Indice de Diversité ^c | Test de | |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Zone ^a | Plante-hôte ^b | | | | permutation | Bootstrap ^d |
| SH | PF | 39 | 1 | 1 |] P=0.23 ^{NS} |] P=0.0002 |
| SA | PF | 37 | 3 | 1.1 | | |
| SH | PP | 47 | 6 | 1.2 |] P=0.99 ^{NS} | |
| SA | PP | 35 | 3 | 1.1 | | |
| SH | L | 37 | 1 | 1 |] P=0.0001 | |
| SA | L | 42 | 6 | 2.8 | | |
| SH | PF+PP+L | 123 | 6 | 1.1 |] P=0.0002 | |
| SA | PF+PP+L | 114 | 8 | 1.6 | | |
| SH+SA | PF | 76 | 3 | 1 |] P=0.05 ^{NS} | |
| SH+SA | PP | 82 | 7 | 1.3 | | |
| SH+SA | L | 79 | 6 | 1.6 |] P=0.06 ^{NS} | |
| SH+SA | PF+PP+L | 237 | 10 | 1.3 | | |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride

^b PF : Pois fourrager ; PP : Pois protéagineux ; L : Lentille.

^c Indice de diversité : indice inverse de Simpson 1/D.

^d Test de diversité pour différence significative entre les échantillons. NS: non significatif.

3.1.4.3. Répartition et diversité génétique des génotypes IGS/*nod* dans les différents sites géographiques et en fonction de la plante d'origine

La combinaison des analyses de PCR-RFLP de la région *nodD-F* et de l'IGS 16S-23S a permis de regrouper les isolats en 26 génotypes distincts. Parmi eux, 5 génotypes dominants, représentant de 5.9 à 29.1% des 237 isolats (totalisant 77,7% de l'ensemble, Tableau 10), ce qui est reflété par l'indice de diversité 1/D de 6,3 estimant le nombre de génotypes dominants (Tableaux 10 et 11). On constate que la diversité des génotypes IGS/*nod* s'explique en grande partie par la diversité des types IGS (1/D = 4,9). Ainsi, les génotypes 1g et 3g prédominent en zone subhumide et à Constantine (14.8% et 29.1% des isolats, respectivement), tandis que les génotypes 4g et 5g (5.9% et 21.1% des isolats, respectivement) n'ont été observés que dans les sols en zone semi-aride, avec un seul isolat de génotype 5g du pois protéagineux dans le sol d'El-Taref.

Nous constatons que la distribution de la diversité est inégale parmi les types, le type IGS 5 (70 isolats) s'associe non seulement avec le type *nod* majoritaire (*nod g*) (50 isolats) mais aussi avec 7 autres types (20 isolats), tandis que le type IGS 3 caractérisant le même

nombre d'isolats (70 isolats) s'associe seulement avec le type *nod g* (69 isolats) et *nod y* (1 isolat).

On note également la présence de certains génotypes dominants uniquement dans les populations isolées de la lentille cultivée en zone semi-aride, tels que les génotypes 5l (19% des isolats de lentille à Constantine) et 5w (19 et 30% des isolats de lentille à Souk Naâmane et Oum El Bouaghi, respectivement). En parallèle, on observe que le génotype 2g est présent dans tous les sites de la zone subhumide où il représente 6.8% du total des isolats, mais il n'a pas été détecté dans la zone semi-aride. On observe, en particulier que les populations du site de Constantine (zone semi-aride) présentent des similitudes à la fois avec les populations des sites en zone subhumide (génotype 3g fréquent par exemple) et avec les populations des deux autres sites de la zone semi-aride (génotypes 4g et 5g fréquents) (Tableau 10).

Les différences observées entre les indices de diversité ne sont pas significatives ($P > 0.05$) entre les populations originaires des trois plantes-hôtes, ni entre les deux populations des zones subhumide et semi-aride. Par ailleurs, des différences significatives de diversité ont été détectées entre les zones semi-aride et subhumide pour chaque plante hôte séparément ($P < 0.05$) ; on note cependant la plus forte diversité des populations nodulant la lentille en zone semi-aride comparée à celle des populations nodulant la lentille en zone subhumide ($P=0.01$), avec des indices de diversité respectifs de 9,0 et de 2,7 (Tableau 11). Ce résultat s'explique par la diversité élevée des types *nod* dans les populations de la lentille en zone semi-aride ($1/D = 2.8$) (Tableau 11).

Tableau 10 : Diversité et distribution des isolats des rhizobiums selon les génotypes IGS/*nod* en fonction de la plante hôte et de la zone éco-climatique.

| Site | Plante-hôte ^b | % d'isolats dans les génotypes IGS/ <i>nod</i> ^c | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Nb total d'isolats | Indice de diversité ^d | | | | | | |
|----------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1g | 2g | 3g | 3y | 4g | 5g | 5l | 5r | 5u | 5v | 5w | 5x | 5z | 6g | 6r | 7d | 8g | 8l | 9g | 10g | | | 10l | 11g | 12r | 12x | 13g | 14l |
| El-Taref | PF | 23 | 8 | 31 | | | | | | | | | | | | | | | 8 | | | 31 | | | | | | 13 | 5.2 |
| El-Taref | PP | 35 | 15 | 20 | | | 5 | | | | | | | 10 | | | | | 5 | 5 | 5 | | | | | | | 20 | 6.1 |
| El-Taref | L | 22 | 33 | 33 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 11 | | | | | | 9 | 5.1 |
| Ben-Azzouz | PF | 8 | | 75 | | | | | | | | | | 8 | | | | | 8 | | | | | | | | | 12 | 1.8 |
| Ben-Azzouz | PP | 8 | 8 | 54 | | | | | | 8 | | | | | 8 | 8 | | | 8 | | | | | | | | | 13 | 3.7 |
| Ben-Azzouz | L | 13 | 6 | 75 | | | | | | | | | | | | | | | 6 | | | | | | | | | 16 | 1.8 |
| El-Harrouch | PF | 29 | 14 | 43 | | | | | | | | | | | | | 7 | | | | | 7 | | | | | | 14 | 4.1 |
| El-Harrouch | PP | 29 | 29 | 29 | 7 | | | | | | | | | | | | | | 7 | | | | | | | | | 14 | 5 |
| El-Harrouch | L | 50 | 8 | 42 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 12 | 2.6 |
| Constantine | PF | 36 | | 36 | | 18 | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 11 | 4.2 |
| Constantine | PP | | | 57 | | 7 | 36 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 14 | 2.4 |
| Constantine | L | 6 | | 19 | | 25 | 6 | 19 | | | | | | | 6 | | | 6 | | 6 | | | | | | 6 | 16 | 10 | |
| Souk Naâmane | PF | | | | | 14 | 71 | | | 7 | | | 7 | | | | | | | | | | | | | | | 14 | 2 |
| Souk Naâmane | PP | | | | | 8 | 58 | | | | | | | 17 | | | 8 | | | | | 8 | | | | | | 12 | 3 |
| Souk Naâmane | L | | | | | 6 | 50 | | | 13 | | 19 | | | | | | | | | | | | | | 13 | 16 | 3.6 | |
| Oum El Bouaghi | PF | | | | | 8 | 83 | | | | | | | | | | 8 | | | | | | | | | | | 12 | 1.5 |
| Oum El Bouaghi | PP | | | | | 11 | 56 | | 22 | | | | 11 | | | | | | | | | | | | | | | 9 | 3.3 |
| Oum El Bouaghi | L | | | | | 10 | 20 | | 20 | 10 | | 30 | | | | | | | | | | | | | 10 | | 10 | 9 | |
| Tous les sites | PF+PP+L | 14.8 | 6.8 | 29.1 | 0.4 | 5.9 | 21.1 | 1.3 | 1.7 | 1.3 | 0.8 | 2.5 | 0.4 | 0.4 | 2.1 | 0.8 | 0.4 | 1.3 | 0.4 | 2.5 | 0.8 | 0.4 | 2.5 | 0.4 | 0.4 | 0.8 | 0.4 | 237 | 6.3 |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride

^b PF : Pois fourrager ; PP : Pois protéagineux ; L : Lentille.

^c la combinaison des types IGS et des types *nod* regroupent les isolats en génotypes IGS/*nod*.

^d Indice de diversité : indice inverse de Simpson 1/D.

Tableau 11 : Diversité génétique des populations de rhizobiums selon leur génotype IGS/*nod* en fonction de la plante hôte et de la zone éco-climatique.

| Populations originaires de: | | Nb total d'isolats | Nb de génotypes | Indice de diversité ^c | Test de | |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Zone ^a | Plante-hôte ^b | | | | permutation | Bootstrap ^d |
| SH | PF | 39 | 7 | 3.5 |] P=0.001 | |
| SA | PF | 37 | 7 | 2.9 | | |
| SH | PP | 47 | 12 | 5.3 |] P=0.03 | |
| SA | PP | 35 | 8 | 3.5 | | |
| SH | L | 37 | 5 | 2.7 |] P=0.001 | |
| SA | L | 42 | 14 | 9 | | |
| SH | PF+PP+L | 123 | 14 | 3.7 |] P=0.08 ^{NS} | |
| SA | PF+PP+L | 114 | 20 | 4.6 | | |
| SH+SA | PF | 76 | 11 | 5.1 |] P=0.26 ^{NS} |] P=0.09 ^{NS} |
| SH+SA | PP | 82 | 17 | 6.5 | | |
| SH+SA | L | 79 | 17 | 7.5 | | |
| SH+SA | PF+PP+L | 237 | 26 | 6.3 | | |

^a SH, Subhumide ; SA, Semi-aride

^b PF : Pois fourrager ; PP : Pois protéagineux ; L : Lentille.

^c Indice de diversité : indice inverse de Simpson 1/D.

^d Test de diversité pour différence significative entre les échantillons. NS: non significatif.

3.1.5. Structuration des populations des rhizobiums

Afin d'étudier la structure génétique des populations des rhizobiums préalablement identifiées entre les deux zones éco-climatiques, entre les sites et entre les plantes hôtes d'origine, nous avons procédé à des Analyses Moléculaire de la Variance (AMOVA) sur la base des fréquences des types *nod*, des types IGS et des génotypes IGS/*nod* grâce au logiciel Arlequin (Excoffier et *al.*, 2005). Ces analyses permettent d'estimer le degré de différence génétique entre les populations et de détecter une éventuelle structure pour chaque population.

3.1.5.1. Structuration des populations des rhizobiums selon le type IGS

Les types IGS 1 et 3 sont prédominants dans les neuf populations de la zone subhumide et dans la population du pois fourrager à Constantine. A l'inverse, les types IGS 4 et 5 sont présents dans toutes les populations de la zone semi-aride avec généralement une forte prédominance du type 5 (Tableau 6). A partir de cette diversité, il en est résulté par AMOVA une différenciation très significative de la distribution des types IGS entre les deux zones éco-climatiques (26.68% de la variation totale qui correspond à $p < 0.001$). De plus, entre tous les sites (28.32%) et les sites d'une même zone, la différenciation est plus élevée

parmi les sites de la zone semi-aride (22.78%) que de la zone subhumide (8.44%) (Tableau 12). Cette différence s'explique probablement par l'incidence des résultats du site de Constantine, qui partage les types IGS dominants des 2 zones éco-climatiques. La plante-hôte d'origine n'influence pas la distribution des types IGS quelque soit le niveau géographique analysé. Une différenciation très significative ($P < 0.001$) parmi les plantes hôtes dans chaque site a été observée (30%) (Tableau 12). Des différences significatives ($p < 0.001$) entre les 2 zones éco-climatiques selon le type IGS pour les populations correspondant à chacune des plantes hôtes. De même, il existe des variations significatives entre sites d'une même zone pour les populations de chaque plante hôte (Tableau 13). Les niveaux de diversité et de variabilité génétique des populations sont présentés dans la figure 17.

Tableau 12 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des types IGS.

| Source de variation ^a | d.l. | % de variation ^b | Source de variation ^a | d.l. | % de variation ^b |
|------------------------------------|------|-----------------------------|-----------------------------------------|------|-----------------------------|
| Parmi les zones éco-climatiques | 1 | 26.68*** | Parmi les plantes hôtes | 2 | -5.6 ^{NS} |
| Parmi les sites | 5 | 28.32*** | Parmi les plantes hôtes dans les sites | 12 | 30*** |
| Parmi les sites dans de la zone SA | 2 | 22.78* | Parmi les plantes hôtes dans la zone SA | 6 | 1.81 ^{NS} |
| Parmi les sites dans de la zone SH | 2 | 8.44* | Parmi les plantes hôtes dans la zone SH | 6 | -1.66 ^{NS} |

^aSH, zone subhumid ; SA, zone semi-aride.

^b la différence entre les populations est donné en pourcentage de la variance totale. La probabilité d'avoir un composant plus extrême de la variance et les valeurs F statistiques observées par hasard sont données entre parenthèses (* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$; NS : Non Significatif).

Tableau 13 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des types IGS.

| Source de variation | d.l. | % de variation ^a | Source de variation | d.l. | % de variation ^a |
|-------------------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------------------|------|-----------------------------|
| Parmi les zones pour le pois fourrager | 1 | 25.0*** | parmi populations dans les zones | 4 | 14.7*** |
| Parmi les zones pour le pois protéagineux | 1 | 6.8*** | Parmi les populations dans les zones | 4 | 18.6*** |
| Parmi les zones pour la lentille | 1 | 30.7*** | Parmi les populations dans les zones | 4 | 9.7** |

^a la différence entre les populations est donné en pourcentage de la variance totale. La probabilité d'avoir un composant plus extrême de la variance et les valeurs F statistiques observées par hasard sont données entre parenthèses(* : P < 0.05; ** : P < 0.01 ; *** : P < 0.001 ; NS : Non Significatif).

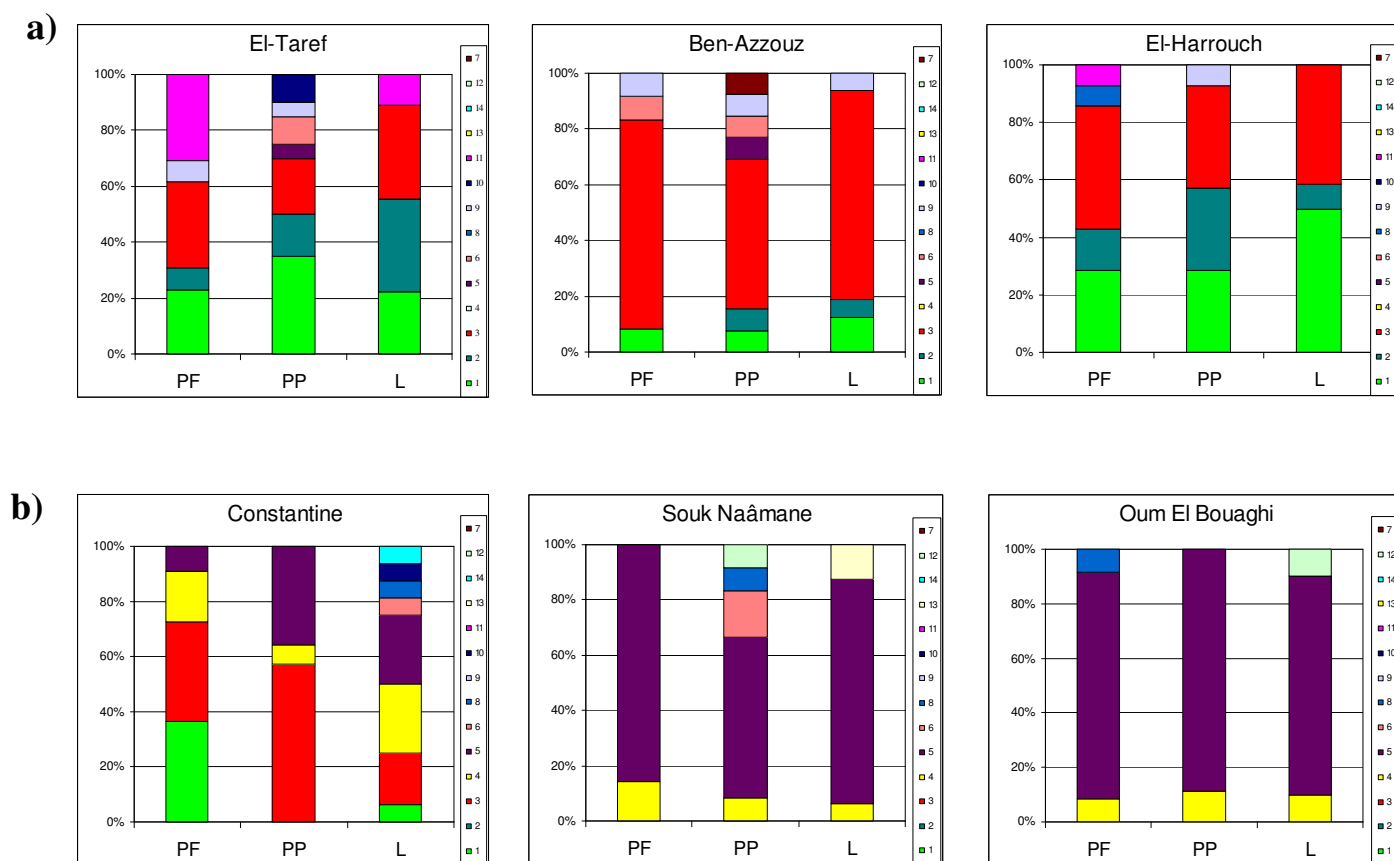


Figure 17 : Distribution des types IGS des populations des rhizobiums dans les zones subhumide (a) et semi-aride (b).

3.1.5.2. Structuration des populations de rhizobiums selon le type *nod*

L'AMOVA a démontré des différences peu significatives (5.4%) entre les deux zones éco-climatiques, Aucun effet significatif de site, ni de la plante hôte n'ont été détectés. Seul un effet significatif du site a été détecté pour les 3 sites subhumides ($p=0.038$) mais avec une différenciation de très faible valeur (3.3%). Une différenciation significative parmi les plantes hôtes dans chaque site a été observée (15.79%) (Tableau 14). Une différenciation selon la plante d'origine a également été mise en évidence, malgré la faible diversité des types *nod*. On observe peu de variation entre zones pour les types *nod*, sauf pour les populations de la lentille (21.1%). Il existe des faibles variations significatives entre sites d'une même zone pour les populations du pois protéagineux (6.4%) et de la lentille (7.6%) (Tableau 15). Les comparaisons deux à deux entre les populations est très nette (Figure 18).

Tableau 14 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des types *nod*.

| Source de variation ^a | d.l. | % de variation ^b | Source de variation ^a | d.l. | % de variation ^b |
|------------------------------------|------|-----------------------------|-----------------------------------------|------|-----------------------------|
| Parmi les zones éco-climatiques | 1 | 5.41* | Parmi les plantes hôtes | 2 | 2.68 ^{NS} |
| Parmi les sites | 5 | 0.96 ^{NS} | Parmi les plantes hôtes dans les sites | 12 | 15.79*** |
| Parmi les sites dans de la zone SA | 2 | -3.01 ^{NS} | Parmi les plantes hôtes dans la zone SA | 6 | 10.32 ^{NS} |
| Parmi les sites dans de la zone SH | 2 | -1.81 ^{NS} | Parmi les plantes hôtes dans la zone SH | 6 | 3.30* |

^aSH, zone subhumid ; SA, zone semi-aride.

^b la différence entre les populations est donné en pourcentage de la variance totale. La probabilité d'avoir un composant plus extrême de la variance et les valeurs F statistiques observées par hasard sont données entre parenthèses (* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$; NS : Non Significatif).

Tableau 15 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de l'origine géographique et de la plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des types *nod*.

| Source de variation | d.l. | % de variation ^a | Source de variation | d.l. | % de variation ^a |
|-------------------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------------------|------|-----------------------------|
| Parmi les zones pour le pois fourrager | 1 | 0.8*** | Parmi les populations dans les zones | 4 | 2.3 ^{NS} |
| Parmi les zones pour le pois protéagineux | 1 | -3 ^{NS} | Parmi les populations dans les zones | 4 | 6.4* |
| Parmi les zones pour la lentille | 1 | 21.1*** | Parmi les populations dans les zones | 4 | 7.6* |

^a la différence entre les populations est donné en pourcentage de la variance totale. La probabilité d'avoir un composant plus extrême de la variance et les valeurs F statistiques observées par hasard sont données entre parenthèses (* : P < 0.05; ** : P < 0.01 ; *** : P < 0.001 ; NS : Non Significatif).

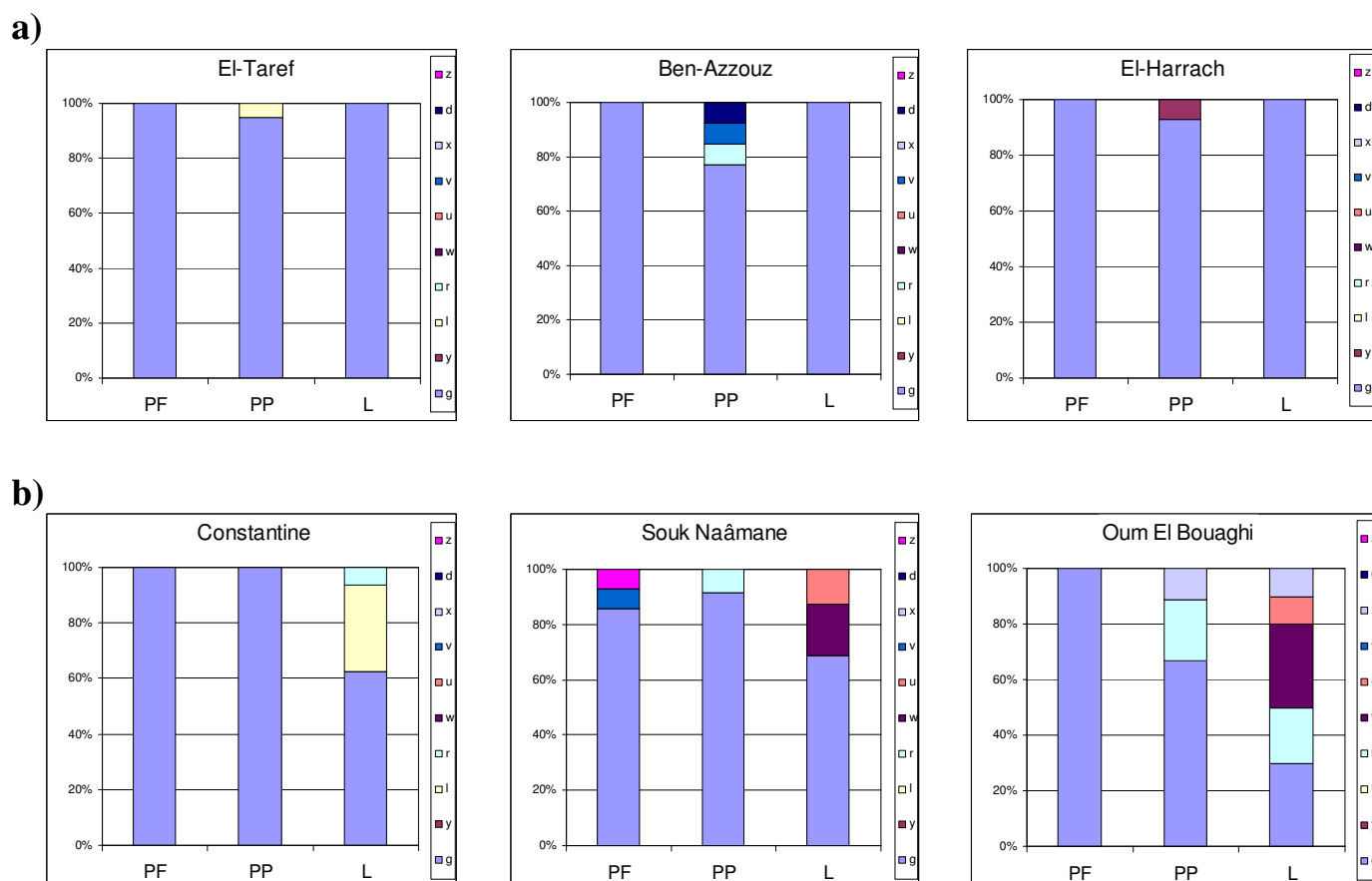


Figure 18 : Distribution des types *nod* des populations de rhizobiums dans les zones subhumide (a) et semi-aride (b).

3.1.5.3. Structuration des populations de rhizobiums selon les génotypes IGS/*nod*

Les résultats d'AMOVA ont montré une différenciation très significative entre les populations originaires des deux zones éco-climatique (17.6%, $p < 0.0001$) (Tableau 16). Ce fort niveau de différenciation s'explique par les génotypes 2g, 11g et 9g (16, 6 et 6 isolats respectivement), qui sont présents seulement dans les zones subhumides, tandis que les génotypes 4g et 5g (14 et 50 isolats respectivement, un seul échantillon 5g étant détecté dans la zone subhumide) sont spécifiques des zones semi-arides. Les proportions des génotypes 1g et 3g sont également extrêmement déséquilibrés entre les deux zones éco climatiques (Tableau 10). Une différenciation très significative ($P < 0.001$) a également été observée entre les sites, mais aussi parmi les sites dans chacune des zones éco-climatiques (Tableau 16) ; la différenciation est légèrement plus élevée parmi les sites dans la zone semi-aride (10.7%) contre les sites dans la zone subhumide (8.4%), probablement due aux caractéristiques

intermédiaires du site de Constantine (zone semi-aride), qui présente des similitudes à la fois avec les populations des sites en zone subhumide (génotype 3g fréquent par exemple) et avec les populations des deux autres sites de la zone semi-aride (génotypes 4g et 5g fréquents).

Il n'y a pas d'effet significatif de la plante hôte lorsqu'on considère l'ensemble des données (Tableau 16, Figure 20), mais une différenciation significative parmi les plantes hôtes dans chaque site a été détectée (Tableaux 16 et 17).

Nous avons finalement effectué des tests de différenciation par paires parmi toutes les combinaisons des sites de la plante hôte, les résultats sont présentés dans la figure 19. On observe un effet de la plante-hôte d'origine sur la structure des populations, mais cet effet est globalement moins important que l'effet géographique. Il est plus particulièrement marqué pour les populations de la zone semi-aride, deux sites sont fortement différenciés de tous les autres : Souk Naâmane et Oum El Bouaghi, quelques soient les espèces des plantes hôtes. On note la présence de génotypes uniquement prédominants dans les populations isolées de la lentille cultivée en zone semi-aride, tels que les génotypes 5l à Constantine et 5w à Souk Naâmane et Oum El Bouaghi. Des tests de différenciation deux à deux indiquent des différences significatives dans trois cas : sur le site de Constantine, entre les populations du pois protéagineux (forte prédominance de 3g et 5g et faible diversité (2.4)) et celles des deux autres plantes hôtes ; sur le site de Oum El Bouaghi entre les populations du pois fourrager (forte prédominance du génotype 5g et faible diversité (1.5)) et de la lentille (Figure 19).

Tableau 16 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'isolement par AMOVA basée sur les fréquences des génotypes IGS/*nod*.

| Source de variation ^a | d.l. | % de variation ^b | Source de variation ^a | d.l. | % de variation ^b |
|------------------------------------|------|-----------------------------|-----------------------------------------|------|-----------------------------|
| Parmi les zones éco-climatiques | 1 | 17.6*** | Parmi les plantes hôtes | 2 | -3.35 ^{NS} |
| Parmi les sites | 5 | 18.6*** | Parmi les plantes hôtes dans les sites | 12 | 2.72*** |
| Parmi les sites dans de la zone SA | 2 | 10.7* | Parmi les plantes hôtes dans la zone SA | 6 | -1.07 ^{NS} |
| Parmi les sites dans de la zone SH | 2 | 8.4** | Parmi les plantes hôtes dans la zone SH | 6 | -1.04 ^{NS} |

^aSH, zone subhumid ; SA, zone semi-aride.

^b la différence entre les populations est donné en pourcentage de la variance totale. La probabilité d'avoir un composant de la variance plus extrême et les valeurs F statistiques observées sont données entre parenthèses (* : P < 0.05; ** : P < 0.01 ; *** : P < 0.001 ; NS : Non Significatif).

Tableau 17 : Différenciation de la structure génétique des populations de rhizobiums en fonction de leur origine géographique et de leur plante hôte d'origine par AMOVA basée sur les fréquences des génotypes IGS/*nod*.

| Source de variation | d.l. | % de variation ^a | Source de variation | d.l. | % de variation ^a |
|-------------------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------------------|------|-----------------------------|
| Parmi les zones pour le pois fourrager | 1 | 22.1*** | parmi populations dans les zones | 4 | 12.88*** |
| Parmi les zones pour le pois protéagineux | 1 | 14.13*** | Parmi les populations dans les zones | 4 | 6.5** |
| Parmi les zones pour la lentille | 1 | 17.46*** | Parmi les populations dans les zones | 4 | 8.16*** |

^a la différence entre les populations est donnée en pourcentage de la variance totale. La probabilité d'avoir un composant plus extrême de la variance et les valeurs F statistiques observées par hasard sont données entre parenthèses (* : P < 0.05; ** : P < 0.01; *** : P < 0.001; NS : Non Significatif).

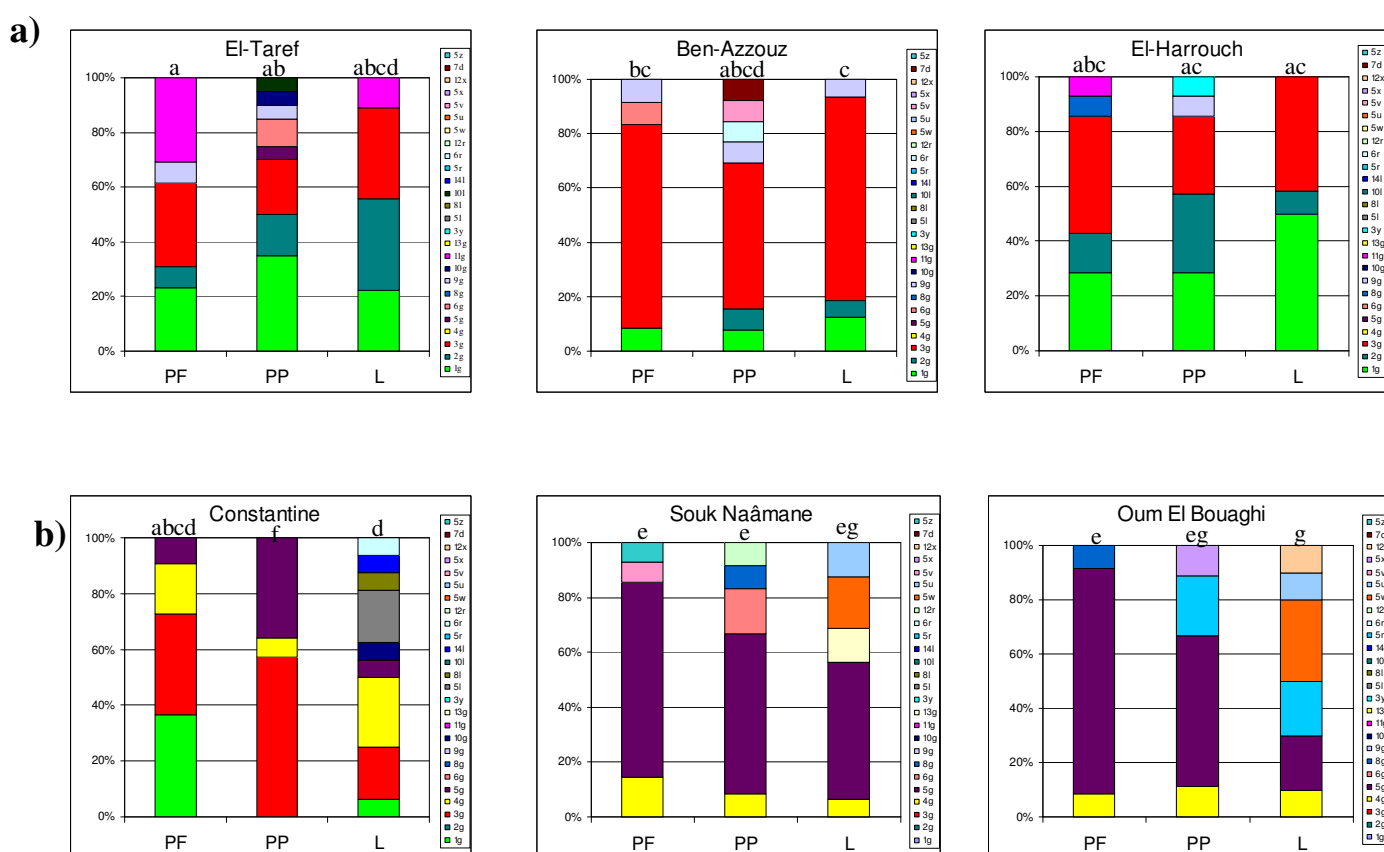


Figure 19 : Structure des populations des rhizobiums selon les génotypes IGS/*nod* dans les zones subhumide (a) et semi-aride (b).

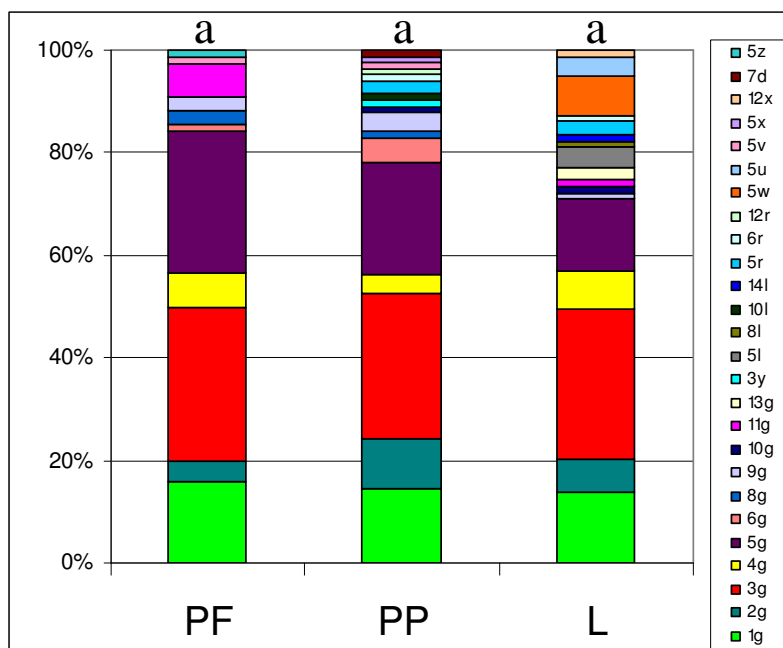


Figure 20 : Structure des populations des rhizobiums selon les génotypes IGS/*nod* chez le pois fourrager, le pois protéagineux et la lentille

3.2. Séquençage et analyse phylogénétique

Les séquences nucléotidiques des gènes 16S ARNr, 16S-23S IGS ADNr et *nodD* des souches utilisées dans les analyses phylogénétiques ont été déposées dans la base de données GenBank et leurs numéros d'accès sont indiqués dans le tableau 18. Les souches de référence utilisées pour la construction des arbres phylogénétiques sont indiquées dans l'annexe 6.

Tableau 18 : Numéros d'accessions des séquences utilisées dans les analyses phylogénétiques.

| Souche | plante hôte ^a | Site géographique | zone éco-climatique ^b | genotype IGS/nod | N° d'accession de la séquence ^c | | |
|--------|--------------------------|-------------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------------------|------------------|----------|
| | | | | | gène 16S ARNr | IGS 16S-23S ADNr | nodD |
| CS15 | <i>P. sativum</i> | Constantine | SA | 1g | KF228866 | KF264422 | KF264436 |
| TP4 | <i>P. sativum</i> | El-Taref | SH | 1g | | | KF264444 |
| HP25 | <i>P. sativum</i> | El-Harrouch | SH | 2g | KF228869 | KF264424 | |
| CL4 | <i>L. culinaris</i> | Constantine | SA | 3g | KF228854 | KF264430 | KF264445 |
| HP3 | <i>P. sativum</i> | El-Harrouch | SH | 3g | | | KF264437 |
| HP18 | <i>P. sativum</i> | El-Harrouch | SH | 3y | KF228867 | | KF264438 |
| OS20 | <i>P. sativum</i> | Oum El Bouaghi | SA | 4g | KF228870 | KF264425 | |
| OS25 | <i>P. sativum</i> | Oum El Bouaghi | SA | 5g | KF228871 | KF264426 | KF264439 |
| SP4 | <i>P. sativum</i> | Souk Naâmane | SA | 5g | | | KF264440 |
| CL25 | <i>L. culinaris</i> | Constantine | SA | 5l | KF228858 | | |
| OL2 | <i>L. culinaris</i> | Oum El Bouaghi | SA | 5r | KF228859 | | |
| OL15 | <i>L. culinaris</i> | Oum El Bouaghi | SA | 5u | KF228860 | | KF264448 |
| SL16 | <i>L. culinaris</i> | Souk Naâmane | SA | 5u | KF228863 | | KF264450 |
| SS37 | <i>P. sativum</i> | Souk Naâmane | SA | 5v | KF228874 | | KF264443 |
| OL13 | <i>L. culinaris</i> | Oum El Bouaghi | SA | 5w | | | KF264447 |
| SS21 | <i>P. sativum</i> | Souk Naâmane | SA | 5z | | | KF264442 |
| TP35 | <i>P. sativum</i> | El-Taref | SH | 6g | KF228877 | KF264429 | |
| CL22 | <i>L. culinaris</i> | Constantine | SA | 6r | KF228857 | | |
| BP25 | <i>P. sativum</i> | Ben-Azzouz | SH | 7d | KF228865 | | KF264435 |
| OS39 | <i>P. sativum</i> | Oum El Bouaghi | SA | 8g | KF228872 | | |
| CL8 | <i>L. culinaris</i> | Constantine | SA | 8l | KF228856 | KF264432 | KF264446 |
| HP21 | <i>P. sativum</i> | El-Harrouch | SH | 9g | KF228868 | KF264423 | |
| TP23 | <i>P. sativum</i> | El-Taref | SH | 10g | KF228875 | | |
| TP32 | <i>P. sativum</i> | El-Taref | SH | 10l | KF228876 | KF264428 | |
| TL8 | <i>L. culinaris</i> | El-Taref | SH | 11g | KF228864 | KF264434 | |
| SP15 | <i>P. sativum</i> | Souk Naâmane | SA | 12r | KF228873 | KF264427 | KF264441 |
| OL29 | <i>L. culinaris</i> | Oum El Bouaghi | SA | 12x | KF228861 | | KF264449 |
| SL15 | <i>L. culinaris</i> | Souk Naâmane | SA | 13g | KF228862 | KF264433 | |
| CL7 | <i>L. culinaris</i> | Constantine | SA | 14l | KF228855 | KF264431 | |

^a *P* : *Pisum* ; *L* : *Lens*

^b SH, zone subhumid ; SA, zone semi-aride.

^c toutes les séquences de l'Algérie utilisées dans cette étude.

3.2.1. Analyse phylogénétique basée sur la séquence de l'ARNr 16S

Les séquences partielles (907 pb) du gène codant pour l'ARNr 16S de 24 souches, représentant chacune un génotype IGS/*nod*, ont montré une très faible variation. Vingt deux séquences sont identiques et les deux autres différent seulement par une et deux mutations respectivement (souche SL15/génotype 13g ; souche CL4/génotype 3g). Toutes ces séquences sont pratiquement identiques aux séquences des souches de *Rhizobium leguminosarum* disponibles dans les bases de données. (Figure 21).

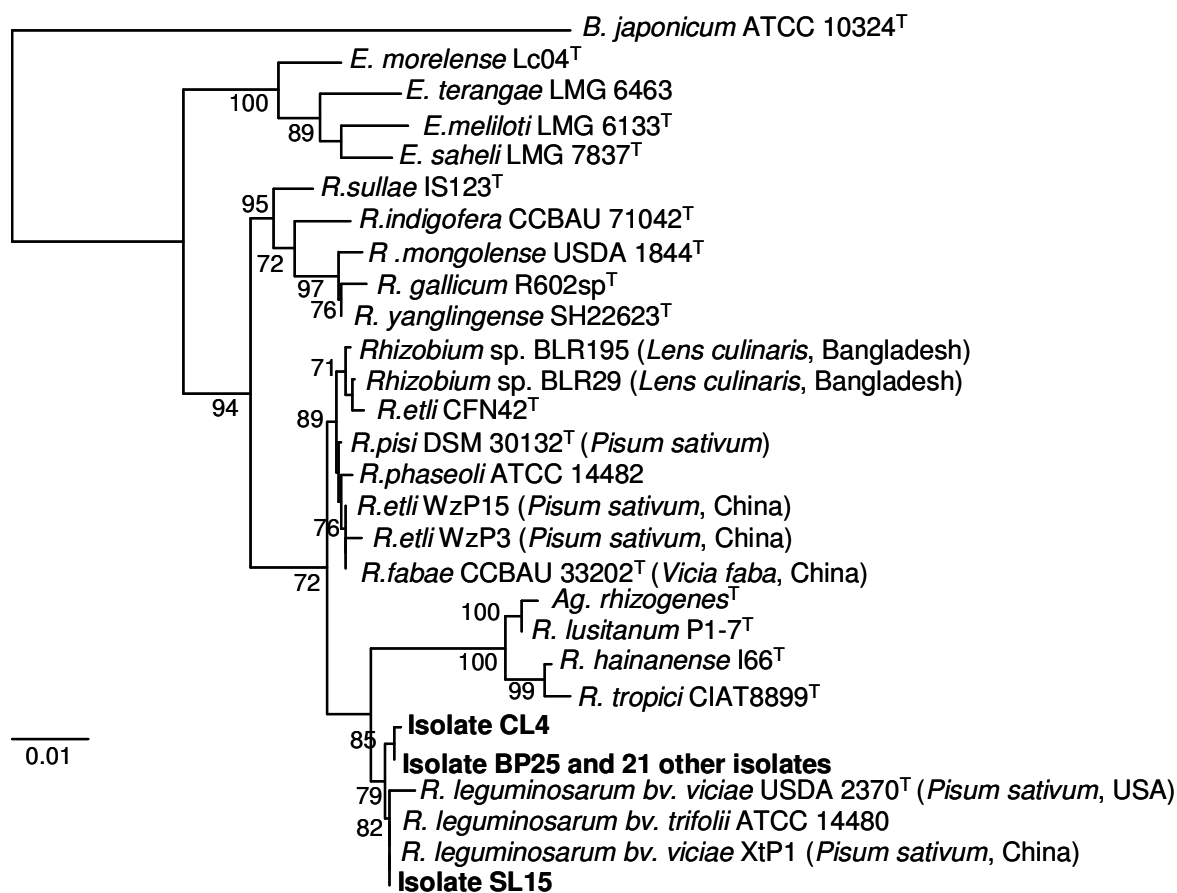


Figure 21 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) basé sur l’alignement de 907 pb des séquences nucléotidiques de l’ADNr 16S. Les valeurs de bootstrap (100 répétitions) sont indiquées aux points de branchements (seules les valeurs supérieures à 70% sont représentées). Les isolats d’Algérie sont indiqués en gras. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l’espèce. La séquence de l’isolat BP25 est identique aux séquences de 21 autres isolats algériens (voir tableau 18). La plante hôte d’origine et l’origine géographique des souches sont indiquées entre parenthèses. Les numéros d’accès des séquences sont listés dans le tableau 18 et Annexe 6. *B.*: *Bradyrhizobium*; *E.*: *Ensifer* ; *R.*: *Rhizobium*; *Ag.*: *Agrobacterium*. La barre d’échelle indique le nombre de substitutions par site.

3.2.2. Analyse phylogénétique basée sur la séquence de l'IGS 16S-23S ADNr

L'analyse des séquences de l'IGS 16S-23S ADNr a été réalisée pour 13 souches représentant les différents types IGS. Ces séquences sont polymorphes et distribuées dans différents clades de l'arbre phylogénique (Figure 22). L'arbre construit inclus des souches de *Rhizobium* nodulant *Vicia sativa*, *Pisum sativum* et *Vicia faba* de diverses origines géographiques (France, Angleterre, Pérou et Espagne) (Depret et Laguerre, 2008 ; Santillana et al., 2008 ; Álvarez-Martínez et al., 2009 ; Mutch et Young, 2004). Le groupement observé pour ces séquences dans la phylogénie ne montre aucune corrélation avec l'origine des souches correspondantes, ni la zone éco-climatique, ni le site, ni la plante hôte.

3.2.3. Analyse phylogénétique basée sur le gène *nodD*

Le séquençage des fragments *nodD* (535 pb) a été effectué pour 16 souches, 10 représentant les différents types *nod* et 6 représentant le type principal *nod g*. Ces séquences ont été comparées à celles disponibles pour les souches *R. leguminosarum* sv. *viciae* isolées du pois et pour les souches de *Rhizobium* sp. isolées de la lentille. L'arbre phylogénique (Figure. 23) a corroboré les résultats obtenus par l'analyse PCR-RFLP, avec les groupements des souches, indépendamment de leur origine, incluant l'Algérie (cette étude), la France (Depret et Laguerre, 2008), l'Angleterre (Mutch et Young, 2004), et le Bangladesh (Rashid et al., 2012). A l'exception des types *nod d* et *nod l* (3% des isolats), tous les autres types *nod* identifiés dans cette étude sont presque identiques, avec seulement des mutations ponctuelles, et ils sont étroitement regroupés. Ce groupe inclut des souches d'origines françaises et anglaises. et sont liées à des souches échantillonnées des sols Anglais et Français. Les six type *nod g* sont contenus dans un seul clade avec les deux types v et y, qui sont étroitement liés.

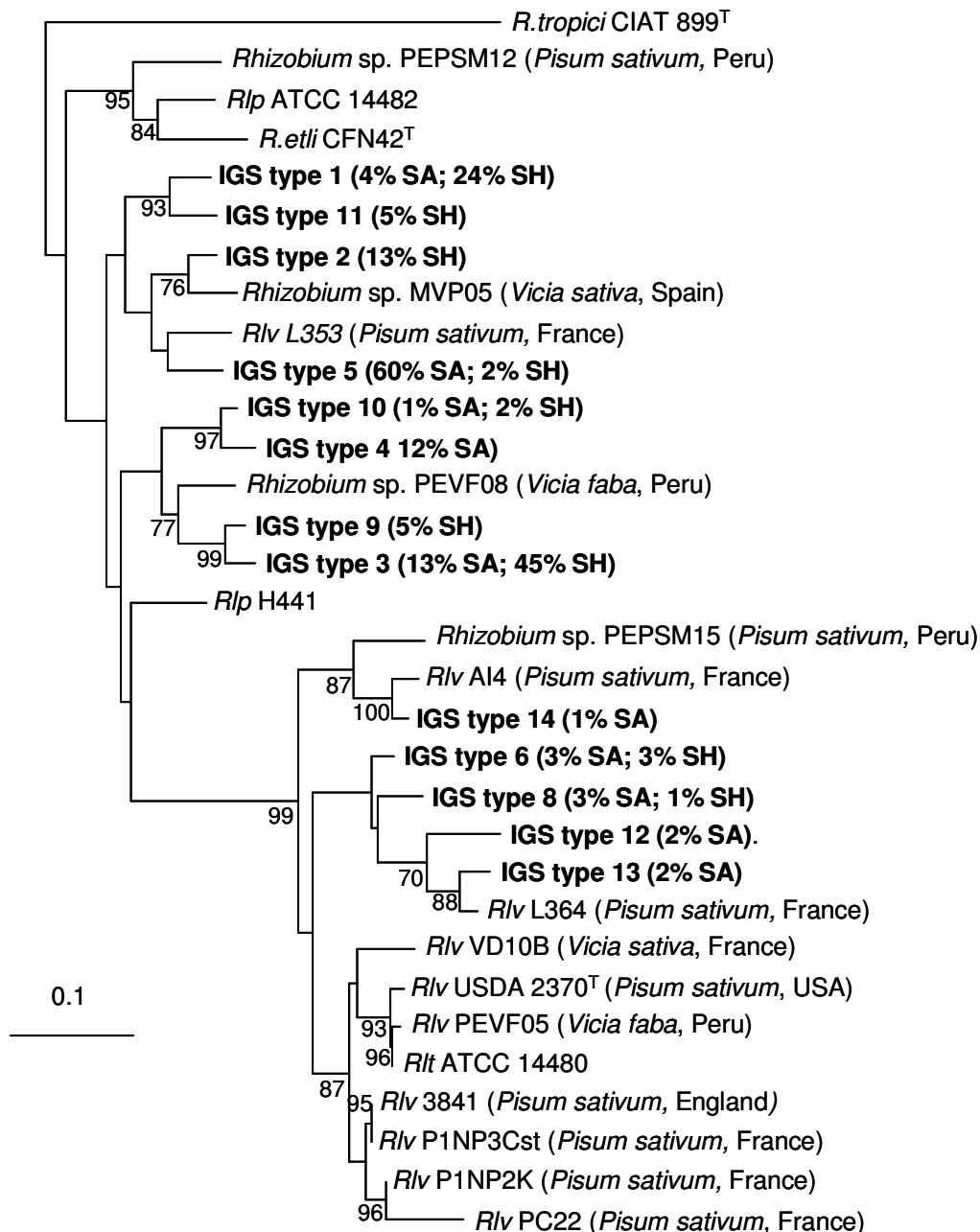


Figure 22 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) basé sur l'alignement de 470 pb des séquences nucléotidiques de l'IGS de l'ADNr 16S-23S. Les valeurs de bootstrap (100 répétitions) sont indiquées aux points de branchements (seules les valeurs supérieures à 70% sont représentées). Les types IGS des isolats algériens sont indiqués en gras, leur fréquence dans les zones climatiques où ils ont été détectés, sont indiquées entre parenthèses. SH. : zone subhumide ; SA. : zone semi-aride. La plante hôte d'origine et l'origine géographique des souches de référence symbiotes d'espèces végétales de la tribu Viceae sont indiqués entre parenthèses). La lettre "T" indique la souche type de l'espèce. Les numéros d'accèsion des séquences sont listés dans le tableau 18 et Annexe 6. *Rlp.*: *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *phaseoli* ; *Rlt*, *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *trifolii* ; *Rlv*, *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae*. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site.

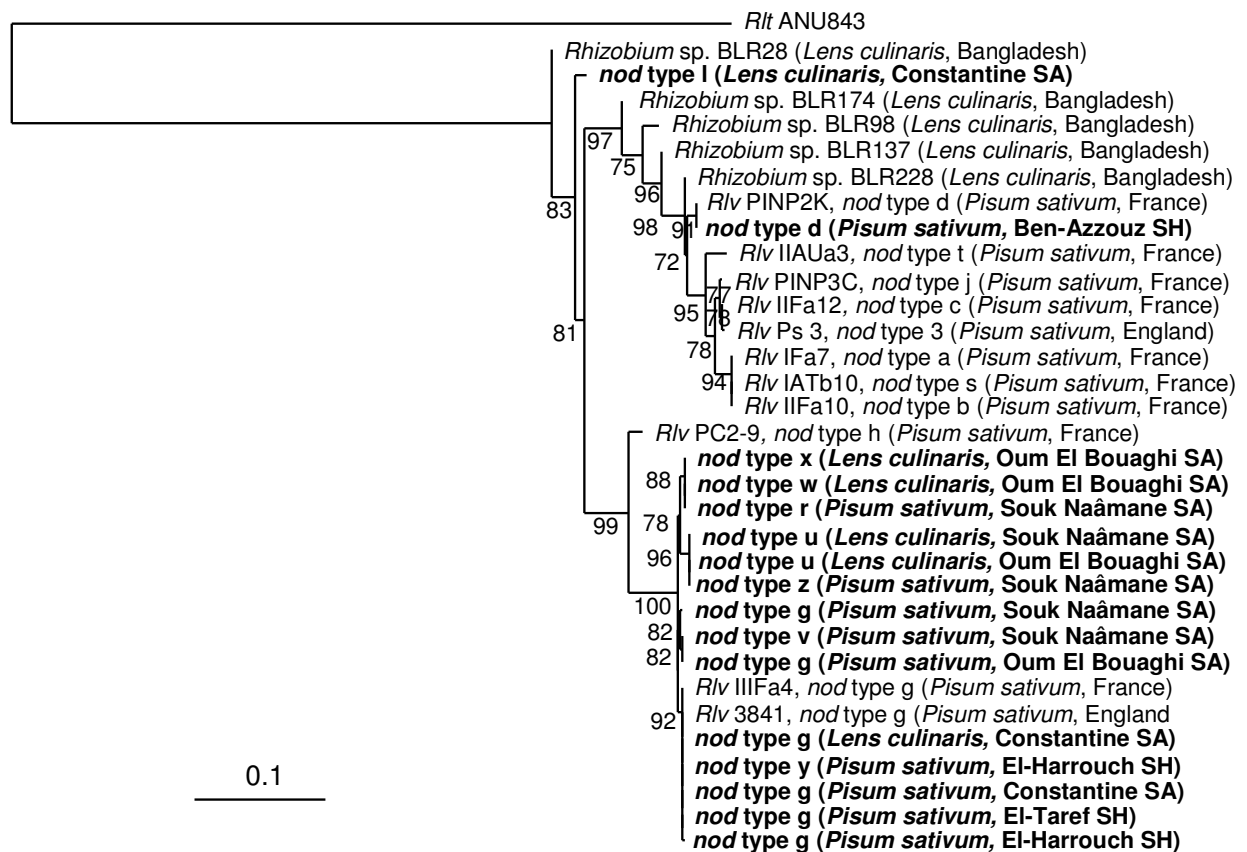


Figure 23 : Arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) basé sur l’alignement de 535 bp de séquences *nodD*. Les valeurs de bootstrap (100 répétitions) sont indiquées aux points de branchements (seules les valeurs supérieures à 70% sont représentées). Les isolats obtenus dans cette étude sont notés en gras. La plante hôte d’origine et l’origine géographique des souches sont indiquées entre parenthèses. SH. : zone subhumide ; SA. : zone semi-aride. ; *Rlt*, *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *trifolii* ; *Rlv*, *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae*. Les numéros d’accession des séquences sont listés dans le tableau 18 et Annexe 6. La barre d’échelle indique le nombre de substitutions par site.

4. Discussion des résultats

Dans ce travail de thèse, nous présentons le premier rapport sur la caractérisation de *Rhizobium* nodulant le pois et la lentille dans plusieurs sites en Algérie et à travers un gradient climatique. Nous avons étudié et caractérisé 237 souches de *Rhizobium* isolées à partir des nodules racinaires de trois plantes hôtes cultivées dans deux zones éco-climatiques, subhumide et semi-aride de l'Est algérien, et analysé la structure génétique de la diversité bactérienne parmi les sites et les plantes hôtes.

4.1. Les rhizobiums isolés du pois et de la lentille en Algérie sont affiliés à l'espèce *Rhizobium leguminosarum*

Dans cette étude, les 237 isolats des nodules du pois et de la lentille ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Rhizobium leguminosarum*, basés sur l'analyse phylogénétique de leur séquence d'ADNr 16S. Cette analyse a montré que nos souches sont étroitement liées à l'espèce type *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370^T avec une identité variant de 99,4 à 99,7% (Figure 20). Le séquençage du gène ADNr 16S a été largement utilisé pour l'évaluation de la variabilité génétique de *Rhizobium*. Cependant, ce gène présente des limitations pour différencier les espèces proches. Il est maintenant bien établi que deux organismes présentant moins de 97% d'homologie de séquences d'ADNr 16S appartiennent à deux espèces différentes (Young *et al.*, 2001 ; Kuykendall, 2005 ; Rivas *et al.*, 2009). A cet effet le séquençage de plusieurs gènes de ménage a été proposé pour l'identification de différentes espèces de *Rhizobium* (Rivas *et al.*, 2009).

Plusieurs études ont été consacrées à la diversité génétique de *Rhizobium* associée aux légumineuses dans la tribu des *Viciae*, à travers tous les continents (Laguerre *et al.*, 2003; Mutch et Young 2004; Moschetti *et al.*, 2005; Santillana *et al.*, 2008; Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010; Rahi *et al.*, 2012; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008 ; Rashid *et al.*, 2012 ; Zahran *et al.*, 2013 ; Rashid *et al.*, 2014 ; Saïdi *et al.*, 2014). La plupart d'entre elles ont seulement isolé des souches de *R. leguminosarum* comme dans notre étude, mais plusieurs ont pu récupérer d'autres espèces de *Rhizobium*, tels que *R. fabae* isolé de *Vicia faba* en Chine qui est capable de noduler le pois *Pisum sativum* (Tian *et al.*, 2008) ; *R. laguerreae* isolé de *Vicia faba* dans différentes régions géographiques (Espagne, Pérou et Tunisie) (Saïdi *et al.*, 2014) ; *R. pisi* de *Pisum sativum* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008 ; Zahran

et *al.*, 2013) ; *R. etli* de *Pisum sativum* au Pérou (Santillana *et al.* 2008), en Chine (Yang *et al.* 2008) et en Egypte (Zahran *et al.*, 2013).

Il est surprenant d'observer que de nouvelles espèces ou lignées sont associées à la lentille au Bangladesh (Rashid *et al.*, 2012 ; 2014), alors que dans plusieurs régions du monde (Egypte, Zahran *et al.*, 2013) (Allemagne, Turquie et Syrie, Rashid *et al.*, 2014) cette plante hôte est nodulée par *R. leguminosarum*, symbiote spécifique des légumineuses de la tribu des *Viciae*. Par conséquent, Rashid *et al.* (2014) ont supposé que *R. leguminosarum* est le symbiote originel de la lentille, mais il a été associé à de nouvelles lignées au Bangladesh où il a été introduit. La dispersion de cette espèce de *Rhizobium* avec des graines de cette légumineuse est une hypothèse bien acceptée (Álvarez-Martinez *et al.*, 2009).

Bien que l'isolement d'autres espèces de *Rhizobium* à partir des espèces *Vicia* ou *Pisum* est restée rare, on aurait pu imaginer, étant donné le grand nombre d'isolats obtenus dans notre étude, avoir isolé au moins une ou quelques autres espèces de *Rhizobium*. Mais nous avons récupéré uniquement les isolats appartenant à *R. leguminosarum*, quelque soit le site, la zone éco-climatique ou la plante d'origine. Ce résultat n'est pas surprenant, car des études antérieures et récentes ont révélé que les légumineuses de la tribu des *Viciae* partagent ce même symbiote *R. leguminosarum* dans différentes régions au monde (Laguerre *et al.*, 2003; Mutch et Young 2004 ; Depret *et al.*, 2004 ; Moschetti *et al.*, 2005 ; Álvarez-Martinez *et al.*, 2009 ; Rahi *et al.*, 2012 ; Zahran *et al.*, 2013 ; Rashid *et al.*, 2014). Ce manque de diversité dans les sols d'Algérie (l'Afrique du Nord) pourrait simplement résulter d'une absence d'autres espèces de *Rhizobium* dans le sol. Cependant cette hypothèse n'est pas valide, dans la mesure où plusieurs espèces de ce genre ont été préalablement isolées en Algérie, ou à une échelle plus large à travers l'Afrique du Nord (le Maroc, la Tunisie et l'Algérie): *R. gallicum* (en Algérie à partir de l'*Acacia saligna*, Amrani *et al.*, 2010), *R. gallicum* sv. *gallicum*, *R. etli* sv. *phaseoli*, *R. giardinii* sv. *giardinii* (en Tunisie à partir de *Phaseolus vulgaris*, Mhamdi *et al.*, 2002), *R. sullae* d'*Hedysarum coronarium* en Algérie (Squartini *et al.*, 2002), *R. tropici* du *P. vulgaris* au Maroc (Faghire *et al.*, 2012). Ces études ont ainsi montré que de nombreuses espèces de *Rhizobium* sont effectivement présentes dans les sols de l'Afrique du Nord, et que les spécificités des espèces que nous avons observées ont résulté d'une véritable spécificité symbiotique de la plante hôte. Bien que quelques exceptions ont été mises en évidence, le genre *Vicia* et *Pisum* doivent toujours être considérés comme des légumineuses hautement spécifiques.

4.2. Les niveaux de diversité génétique sont contrastés entre les loci symbiotique et chromosomique

L'étude de la distribution géographique des rhizobiums capables de noduler les légumineuses s'appuie sur l'analyse de la variabilité génétique à la fois des gènes chromosomiques et symbiotiques de ces bactéries (Steenkamp *et al.*, 2008). Les techniques moléculaires permettent de détecter des variations naturelles dans les populations bactériennes, ainsi les niveaux de diversité peuvent être mesurés chez les bactéries présentant une variabilité intraspécifiques. La diversité génétique des différents isolats a été évaluée par séquençage et PCR-RFLP des régions d'ADN, IGS 16S-23S de l'ADNr, *nodD-F* et l'ADNr 16S. La technique PCR-RFLP adaptée à l'analyse de la diversité des populations de ces rhizobiums, permet de différencier des souches très proches, au sein d'une même espèce. Par conséquent Les études basées de cette technique chez *R. leguminosarum* indiquent une très forte diversité dans les populations naturelles nodulantes. (Laguerre *et al.*, 1996 ; Louvrier *et al.*, 1996 ; Laguerre *et al.*, 2003 ; Mutch et Young 2004 ; Depret *et al.*, 2004 ; Depret et Laguerre, 2008 ; Yang *et al.*, 2008 ; Aoki *et al.*, 2010 ; Rahi *et al.*, 2012).

4.2.1. Diversité génétique du locus chromosomique

La PCR-RFLP de l'IGS 16S-23S ADNr a été largement utilisée afin de distinguer et d'explorer la diversité au sein de *R. leguminosarum* sv. *Viciae*. Cette région est suffisamment variable pour différencier des souches d'une même espèce (Laguerre *et al.*, 1996 ; Louvrier *et al.*, 1996 ; Laguerre *et al.*, 2003 ; Depret *et al.*, 2004 ; Laguerre *et al.*, 2006 ; Vessey et Chemining'wa., 2006 ; Depret et Laguerre, 2008 ; Yang *et al.*, 2008 ; Aoki *et al.*, 2010). Parmi ces études, la diversité de l'IGS dans les populations de *R. leguminosarum* sv. *viciae* est extrêmement variable. Palmer *et al.* (2000) ont détecté 25 types IGS dans 285 isolats en utilisant *HaeIII*, et ont considéré cela comme une gamme normale de la variation de cette espèce. Depret et Laguerre (2008) ont détecté 28 types parmi 1100 isolats (à partir d'un seul site en France, en utilisant *HaeIII*). Inversement, Mutch et Young (2004) ont détecté seulement 9 types différents parmi 625 isolats (avec l'enzyme de restriction *TaqI*) obtenus à partir d'un seul endroit, et ont considéré que cette variation chromosomique est faible. A l'autre extrémité du monde, Aoki *et al.* (2010) avec seulement 15 isolats, ont détecté 8 types différents, mais à une échelle géographique très large. Notre étude a révélé un niveau intermédiaire de diversité chromosomique, avec 14 types différents parmi 237 isolats. Cette diversité des types IGS prédominants a principalement contribué à la différenciation des populations nodulantes des rhizobiums entre les sites et les zones éco-climatiques subhumide

et semi-aride. Trois types IGS (1, 3, 5) représentaient 73.8% des isolats. Tandis que, 93.2% des isolats sont contenues dans deux clades étroitement liés, indépendamment de leurs zones éco-climatiques ou leur plante d'origine (Figure 21).

4.2.2. Diversité génétique du locus symbiotique

La diversité des rhizobiums doit être basée non seulement sur des marqueurs génétiques situés sur le chromosome, mais aussi sur des gènes de nodulation plasmidiques (Laguerre et *al.*, 2001). Le gène symbiotique *nodD*, responsable de la synthèse des facteurs de nodulation (facteurs NOD) (Dénarié et *al.*, 1996) chez *R.leguminosarum* sv. *viciae*, a souvent été préférée, car il existe une seule copie de ce gène comme marqueur spécifique, il a aussi été utilisé comme un marqueur symbiotique typique pour estimer la diversité et analyser la spécificité entre les rhizobiums et les légumineuses de la tribu des *Viciae* (Zézé et *al.*, 2001 ; Laguerre et *al.*, 1996, Laguerre et *al.*, 2003 ; Mutch et *al.*, 2003 ; Mutch et Young, 2004 ; Depret et Laguerre, 2008 ; Tian et *al.*, 2007 ; Tian et *al.*, 2010, Rashid et *al.*, 2014).

Dans notre étude, l'analyse phylogénétique basée sur le gène de nodulation *nodD* confirme que nos isolats appartiennent au symbiovar *viciae*. L'analyse des séquences *nodD* a confirmé aussi la classification par PCR-RFLP indépendamment de l'origine géographique des souches, justifiant la faible diversité de ce gène symbiotique dans les sols d'Algérie. La quasi-totalité de nos souches (97% des isolats) possèdent des séquences *nodD* très proche phylogénétiquement, et sont étroitement regroupés avec le type g détecté en France (Dépret et Laguerre, 2008) et le type g de la souche *R.leguminosaru*.sv. *viciae* séquencée 3841 (Young et *al.*, 2006). Par ailleurs, la diversité de la région symbiotique *nodD-F* est plutôt basse, avec seulement 10 types, mais spécialement et extrêmement déséquilibrée, avec un type *nod* « type g » dominant (88% au total) dans les différentes zones géographiques, indépendamment de la plante hôte d'isolement (pois et lentilles). Au vu des résultats acquis dans cette étude, il était intéressant de les comparer à la diversité étudiée dans les zones tempérées sur des légumineuses de la tribu des *Viciae* en Europe et dans d'autres endroits du monde. Le type *nod g* a été isolé précédemment dans d'autres régions, et a été décrit comme étant un type très fréquent dans ces études. En France, Laguerre et *al.* (2003) ont noté que le type *nod g* a été isolé principalement de la féverole, mais sa fréquence était beaucoup plus basse dans les nodules de pois que dans les populations du sol. Ce type *nod g* était phylogénétiquement distant des autres types *nod*. Des résultats similaires ont été rapportés par Mutch et Young (2004) au Royaume Uni sur le *Pisum sativum*, le *Lathyrus* et le *Vicia faba*. En Europe, le

Vicia faba cultivé sélectionne fortement ce type g dominant, indépendamment des génotypes hôtes et des types des sols, tandis que le *Pisum sativum* cultivé et les légumineuses sauvages (*Vicia* and *Lathyrus*) sont plus proches pour leur symbiotes. En Jordanie, les symbiotes de *Vicia faba* ont différents type *nod* en comparaison avec ceux de l'Europe (Mutch et al., 2003), tandis qu'en Chine, Tian et al. (2007) ont révélé deux types *nod* dominants parmi les symbiotes de *Vicia faba* dans deux éco-zones, dont l'un correspond au type g. L'étude très récente de Rashid et al. (2014) a montré que ce type *nod* g isolé d'un petit nombre de souches de la lentille, est assez fréquent en Allemagne par comparaison à la Syrie, mais il est absent en Turquie.

Au cours de cette étude, d'autres types *nod* (l, w) ont été trouvés aussi fréquent que le type g, mais uniquement dans la zone semi-aride, et sur la lentille. La variabilité génétique faible de la région *nodD-F* ne peut pas être expliquée par l'histoire culturelle récente des sols car aucune légumineuse de la tribu des *Viciae* n'a été cultivée sur les deux sites Oum El Bouaghi et Souk Naâmane sur une période de 30 ans au moins. Cependant, suivant cette idée, il est à noter que ces deux sites présentent le plus haut niveau de diversité de type *nod* parmi tous les sites. Hirsch (1996) a montré que les souches de *R. leguminosarum* sv *viciae* survivent à des niveaux de 10^4 à 10^6 par g de sol en absence de la plante hôte. Nos données, ainsi que d'autres précédentes, suggèrent que le type *nod* g, lorsqu'il est présent dans le sol, est très compétitif par rapport à d'autres types *nod*, et persiste dans le sol, même en l'absence d'un couvert végétal des légumineuses *Viciae*. Toutefois, cette compétitivité semble, au moins dans notre étude, être renforcée lorsque préalablement elle est exposée à l'une de ces espèces de légumineuses. Notre étude a confirmé la forte compétitivité de ce type *nod* g pour la nodulation des plantes hôtes des espèces *Viciae*. Laguerre et al. (2003) avaient précédemment souligné la prédominance de ce type *nod*, quelque soit le type de sol ou l'histoire culturelle. Amarger (1980) a également montré que la plante hôte constitue un facteur essentiel à la diversité des populations de *R. leguminosarum* sv *viciae*. Sa culture induit généralement une augmentation temporaire d'une partie de la population spécifique de cet hôte, la densité de ces rhizobiums spécifiques pouvant alors atteindre 10^7 par g de sol, mais elle diminue rapidement après la récolte. Cela peut être dû à la capacité de certaines substances présentes dans les exsudats racinaires (Hynes et Ocnell, 1990 ; Laguerre et al., 1992).

4.2.3. Diversité génétique du génotype IGS/*nod*

Álvarez-Martinez et *al.* (2009) ont suggéré une origine commune des souches de *R. leguminosarum*, nodulant la tribu des *Viciae*, qui auraient été dispersées de l'Europe à plusieurs autres continents. Toutefois, certains travaux utilisant ces légumineuses ont montré des différences génétiques entre les génotypes de *R.leguminosarum* (Laguerre et *al.*, 2003 ; Mutch et Young 2004 ; Tian et *al.*, 2010 ; Rashid et *al.*, 2014). La diversité des souches et la structure des populations retrouvées dans les nodules ne sont pas toujours le reflet de la structure des populations naturelles du sol (Hynes et O'Connell, 1990 ; Laguerre et *al.*, 1992, Louvrier et *al.*, 1996). Cela suggère une sélection de certaines souches par les plantes. Il existe des différences entre la structure des populations directement isolées du sol et celle des nodosités mais la sélection par la plante hôte varie selon l'espèce hôte (Laguerre et *al.*, 2003).

Au cours de notre étude, la diversité des génotypes *R. leguminosarum* associée avec les espèces de légumineuses pois et lentille a apparemment suivi deux étapes : Une sélection du type *nod g*, en augmentant sa fréquence dans le sol, et réduisant considérablement sa diversité symbiotique globale. Par la suite, la recombinaison et le transfert de plasmide ont distribué ce type *nod g* dans des fonds chromosomiques variés. Le transfert horizontal des gènes est décrit comme un mécanisme naturel important chez les α -rhizobiums (Rogel et *al.*, 2011). Ce mécanisme peut être induit chez les bactéries face à un stress environnemental. Afin d'acquérir une réponse adaptative aux changements de l'environnement. L'adaptation à un ou plusieurs facteurs de stress augmente l'aptitude d'un organisme et peut contribuer à son succès dans la compétition pour la nodulation de la plante hôte (Zou et *al.*, 1995 ; Wielbo, 2012). Dans notre cas, une coadaptation entre le type *nod g* et les fonds chromosomiques pourrait également expliquer une répartition inégale du gène symbiotique fréquent, parmi les divers types chromosomiques. La sélection des génotypes est donc un équilibre entre la sélection, sur les gènes à la fois symbiotiques et chromosomiques, et une recombinaison, tel que décrit par Bailly et *al.* (2007) Les travaux de Tian et *al.* (2010) ont montré que l'incongruence des phylogénies entre les loci chromomiques et le gène *nodD* a permis de mettre en évidence le transfert horizontal du gène symbiotique au sein des sous-lignées de *R. leguminosarum* sv *viciae*. Cependant, tel que montré dans nos résultats, la combinaison ne s'est pas produite équitablement parmi toute la diversité chromosomique. D'une façon assez surprenante, le type IGS 5 (70 isolats) s'associe non seulement avec le type *nod g* le plus fréquent mais aussi avec d'autres types, alors que le types IGS 3 aussi fréquent (70 isolats) s'associe uniquement avec le type *g* et le type *nod y* (1 isolat). Ceci peut être dû à la sélection

de la plante hôte pour des caractères codés par des gènes chromosomiques bactériens. En effet les plantes hôtes sélectionnent spécifiquement les populations de *R. leguminosarum* pour former des nodosités racinaires (Hynes et Oconnell, 1990 ; Laguerre et al., 1992 ; Laguerre et al., 2003 ; Much et Young, 2004, Tian et al., 2010) par l'intermédiaire des exsudats racinaires de rhizodépôts constituant une source de carbone et d'énergie pour les micro-organismes de la rhizosphère, et par les flavonoïdes favorisant la nodulation par des types spécifiques de *R. leguminosarum* sv. *Viciae* (Hynes et Oconnell, 1990 ; Perret et al., 2000 ; Cooper, 2007 ; Badri et Vivanco, 2009 ; Maj et al., 2010). Les travaux de Hynes et O'Connell (1990) ont montré que le génotype formant la majorité des nodosités chez le pois était absent des nodosités de la féverole. Ces travaux ont suggéré que la compétitivité pour la nodulation du pois était corrélée avec l'aptitude à cataboliser l'homosérine, un acide aminé trouvé en grandes quantités dans les exsudats racinaires de pois. Vanderlinde et al. (2014) ont identifié un groupe de gènes sur le plasmide pRL8JI, nécessaire pour le catabolisme de cet acide aminé chez *R. leguminosarum* sv. *viciae*, et ont suggéré que l'homosérine, un acide aminé abondant dans les exsudats racinaires de pois, était utilisée en tant que source de carbone pour *R. leguminosarum* dans la rhizosphère de cette légumineuse. Les flavonoïdes exsudés par les racines des plantes influent sur la capacité des rhizobiums à coloniser les racines, survivre dans la rhizosphère, et affecter la compétitivité des rhizobiums et leurs interactions symbiotiques avec les légumineuses (cooper, 2004).

Les rhizobiums peuvent mener une vie saprophytique et symbiotique. La compétition entre les souches pour la nodulation est un facteur structurant des populations nodulantes de *R. leguminosarum* sv. *Viciae* (Wilson et al., 1998). En outre, la compétitivité des rhizobiums pour la nodulation d'une légumineuse peut aussi être affectée par certaines caractéristiques bactériennes (Wielbo, 2012). Certaines souches de *R. leguminosarum* sont capables de synthétiser des bactériocines, leur conférant un avantage compétitif pour l'occupation des nodules par rapport aux souches sensibles à ces composés (Oresnik et al., 1999).

Une variabilité dans la capacité métabolique et la possibilité d'utiliser des sources de carbone et d'énergie spécifiques, ont également été décrit dans la compétition nutritionnelle des souches de *Rhizobium* (Hynes et Oconnell, 1990 ; Kohler et al., 2010 ; Wielbo, 2012).

Toutefois, la structuration des populations nodulantes peut aussi s'expliquer par des mécanismes spécifiques de l'interaction symbiotique. La formation des nodules est un processus complexe impliquant, après la colonisation de la rhizosphère, la liaison avec la

surface de la racine, l'infection racinaire, le cordon d'infection et la formation de nodules, et une de ces étapes peut être influencée par le génotype de *Rhizobium*. Laguerre et al. (2003) ont montré que la structure génétique des populations *R. leguminosarum* sv. *viciae* sélectionnées dans la rhizosphère de *V. faba* ne reflète pas les populations nodulantes, ce qui suggère que les étapes qui viennent après la colonisation de la rhizosphère exercent également un effet sélectif. Quelques études ont aussi mis en évidence le rôle sélectif du cultivar végétal sur la structure des populations de rhizobiums chez le *Pisum* (Depret et Laguerre, 2008). En outre, Depret et Laguerre (2008) ont montré l'influence du stade de développement de la plante hôte sur la structure des populations de *Rhizobium* isolées à partir des nodules. En conséquence, elles ont suggéré que des variations développementales et physiologiques de la plante peuvent avoir des conséquences sur l'exsudation racinaire et ainsi influencer la compétition nutritionnelle entre les souches, ce qui induit une structuration des populations nodulantes de *R. leguminosarum* sv. *Viciae*.

4.3. Facteurs influençant la structure des populations des rhizobiums

Notre travail a permis d'analyser la structure de la diversité des populations nodulantes de *Rhizobium* isolées du pois et de la lentille cultivés dans deux zones éco-climatiques différentes, subhumide et semi-aride. Ainsi une variabilité de la structure de ces populations a été détecté entre les sites géographiques et entre les zones éco-climatique. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer cette variabilité structurelle des populations de *Rhizobium* fixatrices d'azote, tels que, les conditions environnementales (déficit hydrique, pH, salinité, sécheresse...), le type de sol (texture, composition en matière organique...), la sélection de certaines souches par la légumineuse hôte, la compétition entre les souches du sol pour la nodulation de la plante hôte, et l'impact de la distance géographique.

4.3.1. Distance géographique

Nous avons détecté une importante différenciation significative à la fois entre les deux zones éco-climatiques et entre les sites globalement ou à l'intérieur de chaque zone. En raison du faible nombre des sites (6), et leurs non-indépendance en terme de distance relative (les sites de chaque zone sont plus proches les uns des autres que les sites de l'autre zone), nous ne pouvons pas rejeter l'hypothèse d'une simple différenciation par distance entre les deux zones. Le site de Constantine, qui apparait intermédiaire entre les trois sites du nord et les deux du sud, refléterait une telle différenciation liée à la distance géographique. Une situation similaire a été décrite clairement dans les études de Rahi et al. (2012) qui ont fait état d'une

discontinuité génétique, et un flux génétique limité, dans les populations de pois nodulant *R. leguminosarum* sv. *viciae* cultivé dans le coté Himalaya Indien Occidental.

D'autre part, dans les conditions environnementales de notre étude, la structuration de la diversité des populations de *R. leguminosarum* sv. *viciae* dépendante de la distance géographique, explique aussi bien que deux sites proches partagent des génotypes similaires. Des études antérieures ont signalé que la structure génétique des populations de *R. leguminosarum* semble être influencée par la distance géographique à l'échelle mondiale (Souza et al., 1992). Chez une autre espèce *S.meliloti*, aucune relation n'a été observée entre la composition génétique des populations nodulant différentes espèces de *Medicago* et la distance géographique entre ces populations (Silva, 2007). Cependant, la structuration génétique des populations d'une même espèce bactérienne est plus influencée par la distance géographique que par l'effet plante-hôte (Pavoine et Bailly, 2007). Par ailleurs, de nombreuses différentes études sur des communautés bactériennes non symbiotiques, ont trouvé qu'elles sont principalement structurées par un ou plusieurs facteurs environnementaux indépendamment de la distance géographique (Martiny et al., 2006 ; Fierer et Jackson 2006 ; Yergeau et Kowalchuk, 2008).

4.3.2. Facteurs environnementaux

Dans notre étude, la caractérisation génétique des rhizobiums a permis de définir la distribution et la structure de la diversité des populations entre deux zones éco-climatique opposées, subhumide et semi-aride. Cette différenciation pourrait s'expliquer par les contraintes climatiques environnementales, principalement par de faibles précipitations dans le climat semi-aride résultant du stress de sécheresse. La résistance à la sécheresse est un facteur sélectif structurant la diversité de *Rhizobium*. Certaines souches résistantes à la sécheresse, peuvent dominer leur population dans le sol et colonisent plus facilement les nodules de la plante hôte (McIntyre et al., 2007). Egalement les variations environnementales peuvent avoir un impact sur les structurations des communautés bactériennes du sol, comme la latitude associée à la température atmosphérique (Staddon et al., 1998).

Généralement, il est bien connu que les conditions climatiques pourraient jouer un rôle majeur dans la structuration de la diversité. Plusieurs études ont été rapportées sur la capacité du *Rhizobium* à s'adapter à plusieurs contraintes environnementales, telles que le stress hydrique, les hautes températures, les pratiques agricoles, l'acidité du sol, la salinité, la contamination par les métaux lourds (Zahran, 1999 ; Serraj et al., 1999 ; Abdelmoumene et

al., 1999 ; Athar et Johnson, 1997 ; Rehman et Nautiyal, 2002 ; Moschetti et *al.*, 2005 ; BenRomdhane et *al.*, 2009 ; Fterich et *al.*, 2012 ; Ruiz-Díez et *al.*, 2012). En effet, chez les légumineuses la fixation symbiotique de l'azote est très sensible à la contrainte de déficit hydrique (Ben Romdhane et *al.*, 2009 ; L'Taief et *al.*, 2009 ; Cesar et *al.*, 2011). Elboutahiri et *al.* (2010) ont mis en évidence une large diversité génotypique et phénotypique des isolats de *Ensifer meliloti* tolérants aux solutions salines et aux stress hydrique, échantillonnés dans les zones arides et semi-arides du Maroc. Les effets combinés du sol et du climat ont été rapportés pour le pois dans différentes régions géographiques subtropicales en Chine où la distribution et la structure de la diversité des rhizobiums sont influencées par le pH, la température et la teneur en eau du sol (Yang, 2008). Tian et *al.* (2010), se basant sur les séquences concaténées de trois gènes (*atpD*, *recA* et *glnII*), ont identifié plusieurs populations de *R. leguminosarum* sv. *viciae* nodulant *Vicia faba* selon leurs origines géographiques en Chine.

le mécanisme d'adaptation des rhizobiums aux stress abiotiques résulte soit de l'absorption des osmoprotecteurs (glycine, bétaïne, proline, glutamate ...) à partir du milieu environnant, soit à la stimulation de la biosynthèse de ces composés (Vriezen et *al.*, 2007). Par exemple, l'accumulation du tréhalose chez *R. leguminosarum* joue un rôle important dans la protection de cette bactérie contre le stress rencontré lors de la nodulation (McIntyre et *al.*, 2004).

Enfin dans cette étude, nous remarquons qu'une combinaison à la fois de la condition environnementale (climatique) et la distance géographique ont probablement joué un rôle majeur dans la distribution de la diversité bactérienne observée. A travers des essais d'inoculation croisée dans les deux zones éco-climatiques suivi d'une estimation de l'évolution de la population bactérienne (soit la persistance ou la diminution) aiderait à résoudre la contribution relative de ces deux paramètres.

4.4. Le facteur sol n'a pas d'influence sur la diversité génétique bactérienne

La variabilité dans l'environnement du sol peut agir sur la diversité des populations de *Rhizobium*. En outre, la diversité des *R. leguminosarum* sv. *viciae* peut être influencée par les propriétés du sol, ainsi un niveau élevé de phosphate contribue à une diminution de la diversité de ces bactéries (Palmer et Young, 2000). Des concentrations en calcium semblent

également influencer la structure de *R. leguminosarum* sv. *viciae* (Smit, 1991). Une réduction de densité et de diversité est également observée dans les sols pollués par les métaux lourds (Laguerre et al., 2006).

Dans notre étude, la distribution des populations des rhizobiums est variable selon leur origine géographique. Tous les sols étudiés, présentent des caractéristiques physico-chimiques comparables (texture principalement limoneuse, non salés, alcalins) et l'abondance des populations de *Rhizobium* varie peu entre ces sols. Ainsi, le sol ne peut pas être un facteur majeur expliquant la différence des structures des populations de *R. leguminosarum* sv. *viciae* observée dans les deux zones environnementales différentes en Algérie (subhumide et semi-aride).

Il convient aussi de noter que nos résultats de la densité de *Rhizobium* (MPN/g de sol) trouvée dans chaque sol sont confirmés par les études d'Amarger (1981) et Hirsch (1996). Ils ont montré que les rhizobiums saprophytiques représentent une faible proportion de microorganismes avec 10^2 à 10^6 *Rhizobium* par g de sol pour *R. leguminosarum* sv. *viciae* contre 10^8 à 10^9 bactéries par g de sol pour la proportion totale des microorganismes. Les facteurs abiotiques dans l'environnement du sol, tels que, la salinité ou le pH, peuvent influencer la densité des rhizobiums (Martyniuk et al., 2005)

4.5. La plante hôte n'a pas d'influence significative sur la diversité génétique bactérienne récupérée.

Il existe une sélectivité différente selon les plantes hôtes vis-à-vis des génotypes des populations de *R. leguminosarum* sv. *viciae*. (Laguerre et al., 2003 ; Much et Young, 2004). A l'inverse, aucun de nos tests de différenciation n'a pu détecter un effet significatif de la plante hôte sur la diversité génétique bactérienne récupérée, ni lorsque l'on considère l'ensemble des sites, ni lors de la séparation des deux zones climatiques. Ce résultat était assez surprenant, étant donné que plusieurs auteurs ont suggéré précédemment que le pois, la lentille, et la fève ont réalisé une certaine sélection du génotype de *Rhizobium* (Hynes et Ocnell, 1990 ; Laguerre et al., 1992). Certaines études ont montré des différences entre la composition des populations d'un même sol isolées des nodosités de différentes plantes hôtes utilisées pour le piégeage et ont signalé que le *Pisum* et le *Vicia faba* sont plus sélectifs que des légumineuses hôtes sauvages (*Vicia* et *Lathyrus*) (Much et Young, 2004). Laguerre et al. (2003) ont également montré que pour un même sol, il ya une différence entre les populations

nodulant le pois et la féverole. Hynes et Ocnell (1990) arrivent à la même conclusion sur d'autres sols. Comme décrit précédemment, cette sélection en fonction de l'espèce de la plante hôte peut être liée à une exsudation différentielle de rhizodépôts et/ou de flavonoïdes, et d'autres caractéristiques bactériennes.

Selon notre étude et en s'appuyant sur l'analyse statistique, le seul effet significatif n'a été détecté, entre les plantes hôtes que dans les sites de la zone semi-aride. Ce manque d'effet peut avoir deux explications. La première, un peu triviale, pourrait être la précision de notre test statistique. Mais le pourcentage de variation estimé dans nos tests AMOVA est soit faible et même négatif, reflétant apparemment un vrai manque de différenciation. Même l'effet significatif entre plantes de sites semi arides est supporté par un faible pourcentage de la valeur de variation (7.4%). La seconde explication pourrait être un vrai manque d'effet de la plante hôte. En tenant compte des études précédentes qui ont suggéré de tels effets, ceci pourrait être dû à la faible diversité bactérienne locale, réduisant la possibilité pour les plantes de sélectionner son symbiote le plus adapté et indiquant donc, leur spécificité réelle. En s'appuyant sur cette idée, nous avons détecté une très faible différence nucléotidique parmi les types *nodD*, en opposition avec des études récentes sur des souches du pois, de la fève et de la lentille cultivés en Europe, en Chine et au Bangladesh, où une grande diversité phylogénétique du gène *nodD* a été soulignée (Laguerre et al., 2003 ; Mutch et al., 2004 ; Depret et Laguerre, 2008 ; Tian et al., 2010 ; Rashid et al., 2012). Le type *nod w* phylogénétiquement proche du type *g* s'associe qu'avec le type IGS5. Le type *nod l* est phylogénétiquement distant des autres types *nod* et possède la propriété d'être associé à des fonds chromosomiques variés. Ces deux types *nod* se sont montrés apparemment aussi compétitifs que le type *nod g* pour la nodulation de la lentille en zone semi-aride. La nature et/ou le niveau de dominance des souches peuvent différer selon la plante hôte cultivée, ce qui suggère la préférence d'une légumineuse vis-à-vis de certaines souches. Ceci a été observé entre les populations isolées des plante-hôtes appartenant à des genres différents, tels que le pois, la lentille et la féverole (Laguerre et al., 1992 ; Hynes et O'connel, 1990). Ce résultat peut aussi être expliquer par l'adaptation de certaines souches face aux facteurs environnementaux et leur dominance pour la noduation (McIntyre al., 2007 ; Wielbo, 2012).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans cette étude s'inscrivent dans le cadre de l'amélioration de la production des légumineuses alimentaires et fourragères en Algérie sous contraintes environnementales climatiques. La fixation biologique de l'azote moléculaire par la symbiose *Rhizobium*-légumineuse présente un intérêt économique et agronomique considérable.

Notre étude a permis d'évaluer la diversité génétique des rhizobiums nodulant trois plantes hôtes de la tribu des *Viciae* (pois protéagineux, pois fourrager et lentille) cultivés au champ dans six sites représentant deux zones éco-climatiques contrastées, subhumide et semi-aride de l'est algérien. L'objectif principal était de déterminer le niveau de variabilité de la structure génétique des populations nodulantes de *Rhizobium* parmi les sites et les plantes hôtes en conditions climatiques différentes. Cette variabilité a été évaluée par séquençage et PCR-RFLP des régions d'ADN, IGS 16S-23S de l'ADNr, *nodD-F* et l'ADNr 16S.

Cette étude a été limitée à l'analyse des bactéries présentes dans les nodules. Toutes les souches symbiotiques constituant notre collection locale ont été identifiées comme *Rhizobium leguminosarum* quelque soit le site, la plante d'isolement et la zone éco-climatique d'origine (subhumide et semi-aride). Au cours de ces dernières années, de nouvelles espèces de *Rhizobium* nodulant les légumineuses de la tribu des *Viciae* ont été décrites dans différentes régions géographiques du monde, en particulier en Tunisie, en Espagne, en Chine et au Bangladesh. Il est possible que le fait que nous n'avons pas décelé de nouvelles espèces dans les sols d'Algérie puisse résulter d'une absence d'autres espèces de *Rhizobium* dans le sol ou de la haute spécificité de ces légumineuses. Etant donné qu'en Algérie, sont représentés tous les bioclimats méditerranéens depuis le per humide au Nord jusqu'au per aride au Sud, il serait intéressant de vérifier la spécificité de l'interaction symbiotique au sein de la tribu des *Viciae* dans d'autres étages bioclimatiques.

Nous avons montré que les populations nodulantes du pois et de la lentille sont génétiquement polymorphes, et de diversité génétique variable entre les sites et entre les deux zones éco-climatiques. En effet, la diversité des types IGS prédominants a principalement contribué à la différenciation des populations nodulantes des rhizobiums entre les sites et les zones éco-climatiques subhumide et semi-aride. Nous avons constaté que la diversité des génotypes IGS/*nod* est principalement dépendante de la diversité élevée de l'IGS. Néanmoins, le locus symbiotique se caractérise par un faible niveau de diversité, mais extrêmement

déséquilibrée, avec un type *nod g* dominant dans les différentes zones géographiques, quelque soit la plante hôte d'origine. Pourtant, certains types *nod* (l, w) présents à des fréquences faibles, se sont montrés aussi compétitifs que ce type *nod g* pour la nodulation de la lentille en zone semi-aride. Ces travaux devront être complétés par des études de compétition entre souches pour la nodulation. Il serait par ailleurs utile de vérifier la capacité de ces types *nod* à noduler le pois. Dans le cas positif, il sera important de comparer leur efficacité symbiotique et leur capacité à fixer l'azote chez la lentille et le pois. L'intérêt d'examiner la compétitivité entre les souches de *Rhizobium* est également motivée par la mise au point d'un inoculum bactérien compétitif capable de dominer les souches indigènes du sol pour la nodulation de la plante hôte. Dans ce cadre, il serait important de vérifier la compétitivité des souches en milieu contrôlé et après introduction au champ. Une souche efficace et compétitive a pour effet d'augmenter la teneur en azote de la plante hôte et d'améliorer sa croissance.

Dans ce travail de thèse, la caractérisation génétique des rhizobiums a clairement défini la distribution et la structure de la diversité des populations en fonction de l'origine géographique ; la plante d'origine n'a montré aucun effet sur la structuration. Ce niveau de différenciation s'explique par la présence de certains génotypes dominants, par exemple le génotype 2g se trouve seulement dans la zone subhumide, tandis que d'autres génotypes (4g et 5g) sont généralement spécifiques aux zones semi-arides. Les proportions des génotypes 1g, 3g sont aussi très déséquilibrés entre les deux zones éco climatiques, car le site de Constantine (zone semi-aride) présente des similitudes à la fois avec les populations des sites en zone subhumide (génotype 3g fréquent) et avec les populations des deux autres sites de la zone semi-aride (génotypes 4g et 5g fréquents). Nous avons mis en évidence l'impact de la distance géographique sur la composition des populations entre les deux zones éco-climatiques. Ceci s'explique par le site de Constantine qui apparaît intermédiaire entre les trois sites du nord (zone subhumide) et les deux sites du sud (zone semi-aride). Ces résultats nous donnent une grande satisfaction et permettent d'affirmer une grande variabilité de la structure des populations nodulantes entre les sites géographiques et entre les zones éco-climatiques subhumide et semi-aride.

A l'issue de cette analyse globale, il ressort une combinaison entre la distance géographique et les contraintes environnementales climatiques pour la structuration des populations symbiotiques du pois et de la lentille en Algérie. Ces résultats ouvrent une nouvelle perspective de recherche afin de résoudre la contribution relative de ces deux

paramètres par des essais d'inoculation croisée dans les deux zones éco-climatiques suivi d'une estimation de l'évolution de la population bactérienne.

Dans la zone semi-aride où la faiblesse des précipitations et leur distribution aléatoire se traduisent souvent par un déficit hydrique, résultant en un stress dû à la sécheresse, qui est une contrainte abiotique majeure de la production agricole. Chez certains rhizobiums, la capacité de résistance à la sécheresse ou du moins au déficit hydrique, est déjà connue. Nos travaux de thèse ont permis d'apporter des informations complémentaires sur la structure de la diversité génétique des populations de *R. leguminosarum* sv. *viciae* existant en Algérie sous contraintes climatiques. Ce travail mérite d'être étendu, il serait particulièrement intéressant de vérifier l'effet de cette variabilité génétique structurale des populations de *Rhizobium* sur l'efficacité symbiotique. Dans cette perspective, il serait fortement souhaitable de mieux comprendre l'impact des facteurs climatiques, plus particulièrement la contrainte sécheresse sur la variabilité fonctionnelle en fonction du génotype de *Rhizobium*. L'évaluation des caractéristiques symbiotiques de notre collection de souches de *Rhizobium* (infectivité, efficacité, aptitude à la compétition etc.) permettra donc d'identifier des souches efficaces, compétitives et tolérantes à la contrainte sécheresse. Les souches ainsi sélectionnées pourraient être utilisées pour l'identification d'une symbiose *Rhizobium*-légumineuse bien adaptée à cette contrainte climatique. En effet, cette évaluation sera déterminante dans le processus d'exploitation de la fixation biologique de l'azote pour l'amélioration de la production des légumineuses fourragères et alimentaires, en particulier le pois fourrager et la lentille d'intérêt agronomique et économique en Algérie.

Nous avons isolé des souches présentant des caractéristiques génotypiques différentes entre les deux zones subhumide et semi-aride ; il serait donc intéressant de compléter leur caractérisation par une étude de leur diversité phénotypique. Cela, permettra de sélectionner des souches plus tolérantes aux contraintes abiotiques (ex température). L'évaluation de l'efficacité de ces souches serait particulièrement intéressante pour une inoculation efficace et bénéfique pour les plantes hôtes.

En Algérie, le développement de l'agriculture s'est toujours heurté aux effets des contraintes climatiques naturelles (sécheresse, salinité, désertification...) et humaines (urbanisation, industries...). Ce qui laisse le pays souffrir d'une production agricole insuffisante, plus particulièrement en ce qui concerne le processus naturel symbiose *Rhizobium* – légumineuse. Bien que les légumes secs revêtent une importance stratégique

pour l'alimentation d'une large couche de la population algérienne car ils remplacent les protéines animales difficilement accessibles, la production locale de la lentille, par exemple, reste très faible au regard des importations qui s'élèvent chaque année.

L'Algérie devrait promouvoir les recherches visant le développement de la production des légumineuses par la fixation symbiotique de l'azote de l'air, qui pourrait résoudre des problèmes fondamentaux de la production agricole par la sélection de souches symbiotiques locales capables de tolérer et de s'adapter aux contraintes de la sécheresse. En parallèle, il est impératif de faire appel à des plantes hôtes tolérantes aux contraintes correspondantes. L'utilisation des inoculums performants dans la zone semi-aride affectée par la contrainte sécheresse serait un apport important pour l'agriculture, en évitant l'utilisation des engrais chimiques toxiques pour les êtres vivants et pour l'environnement, et pourrait assurer un assolement et une rotation (graminées et légumineuses) pour optimiser l'exploitation agricole. Enfin, le développement de ces recherches agronomiques et agroalimentaires pourrait contribuer à l'augmentation des surfaces cultivées et réduire la facture de l'importation des légumineuses.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdelguerfie A. 2003.** Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Rapport de Synthèse sur « La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie » MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31 Tome IX.
- Abdelmoumen H, Filali-Maltouf A, Neyra M, Belabed A, Missbah El Idrissi M. 1999.** Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *Journal of Applied Microbiology* . 86: 889–898.
- Alvarez-Martínez ER, Valverde A, Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Tejedor C, Mateos PF, Santillana N, Zuniga D, Peix A, Velazquez E. 2009.** The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Archives of microbiology*. 191: 659–668.
- Amadou C, Pascal G, Mangenot S, Glew M, Bontemps C, Capela D, Carrère S, Cruveiller S, Dossat C, Lajus A, Marchetti M, Poinot V, Rouy Z, Servin B, Saad M, Schenowitz C, Barbe V, Batut J, Médigue C, Masson-Boivin C. 2008.** Genome sequence of the beta-*Rhizobium* Cupriavidus taiwanensis and comparative genomics of rhizobia. *Genome Research*. 18: 1472–1483.
- Amarger N, Macheret V, Laguerre G. 1997.** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International journal of systematic bacteriology*. 47: 996–1006.
- Amarger N. 1980.** Aspect microbiologique de la culture des légumineuses. Le sélectionneur français. 28 : 61–66.
- Amrani S, Noureddine NE, Bhatnagar T, Argandoña M, Nieto JJ, Vargas C. 2010.** Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*. 33: 44–51.
- Andersen OM, Markham KR. 2006.** Flavonoids: Chemistry. CRC Press, Boca Raton, Biochemistry and Applications.
- Aoki S, Kondo T, Prévost D, Nakata S, Kajita T, Ito M. 2010.** Genotypic and phenotypic diversity of rhizobia isolated from *Lathyrus japonicus* indigenous to Japan. *Systematic and Applied Microbiology*. 33: 383–397.
- Armstrong RD, McCosker KJ, Millar GR, Walsh K, Johnson S, Probert ME. 1997.** Improve nitrogen supply to cereals in central Queensland following short legume leys. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 37: 359–68.
- Arp DJ. 2000.** The nitrogen cycle. In: Triplett EW. eds. Prokaryotic nitrogen fixation, a model system for the analysis of a biological process. Horizon Scientific, Wymondham, Norfolk, England.

- 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. *Microbes and Environments*. 21: 23–35.
- Athar M, Johnson DA. 1996.** Competitive ability of *Rhizobium meliloti*. *Vereinigung für Angewandte Botanik*. 70: 128–133.
- Athar M, Johnson DA. 1997.** Effect of drought on the growth and survival of *Rhizobium meliloti* strains from Pakistan and Nepal. *Journal of Arid Environments*. 35: 335–340.
- Badri DV, Vivanco JM. 2009.** Regulation and function of root exudates. *Plant Cell and Environment*. 32: 666–681.
- 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. *Journal of Bacteriology*. 189: 5223–5236.
- Barnett MJ, Fisher RF. 2006.** Global gene expression in the rhizobial–legume symbiosis. *Symbiosis*. 42: 1–24
- Batista JSS, Hungria M, Barcellos FG, Ferreira MC, Mendes IC. 2007.** Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. *Microbial Ecology*. 53: 270–284.
- Becking J. 2006.** The family *Azotobacteraceae*. *Prokaryotes*. 6: 759–783.
- Ben Romdhane S, Trabelsi M, Aouani ME, de Lajudie P, Mhamdi R. 2009.** The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*. 41: 2568–2572.
- Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A, Squartini A 2004.** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*. 27: 462–468.
- Benoît M., Deffontaines J.-P., Lardon S. 2006.** Acteurs et territoires locaux. Vers une géoagronomie de l'aménagement. *Collection Savoir-Faire, Inra*.
- Benson DR, Dawson JO. 2007.** Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic *Frankia* and its host plants. *Plant Physiology*. 130: 318–330.
- Bergey DH, Harrison FC, Breed RS, Hammer BW, Huntoon FM. 1923.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins, Baltimore.
- Blondeau R. 1980.** Fixation biologique de l'azote. Thèmes Vuibert Université Biologie. Série animée par Guy Marchal. Université de Lille. p102.
- 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. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 24: 1359–1371.

Boukhatem ZF, Domergue O, Bekki A, Merabet C, Sekkour S, Bouazza F, Duponnois R, de Lajudie P, Galiana A. 2012. Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. *FEMS Microbiology Ecology*. **80**: 534–557.

Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benallaoua S, Laguerre G. 2009. Retama species growing in different ecological–climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Systematic and Applied Microbiology* **32**: 245–255.

Bourion V, Laguerre G, Depret G, Voisin A-S, Salon C, Duc G. 2007. Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Annals of Botany*. **100**: 589–598.

Bourion V, Laguerre G, Depret G, Voisin AS, Salon C, Duc G. 2007. Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Annals of Botany* **100**:589–598.

Brencic A, Winans SC. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **69**: 155-194.

Brewin NJ. 1991. Development of the legume root nodule. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **7**: 191–226.

Brewin NJ. 2004. Plant cell wall remodeling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **23**: 293–316.

Brink M, Belay G. 2006. Céréales et légumes secs, ressources végétales de l’Afrique tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. P:102

Brink M, Belay G. 2006. Céréales et légumes secs, ressources végétales de l’Afrique tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. P: 102.

Cardenas L, Dominguez J, Quinto C, Lopez-Lara IM, Lugtenberg BJJ, Spaink HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Molecular Biology*. **29**: 453–464.

Cardenas L, Feijo JA, Kunkel JG, Sanchez F, Holdaway-Clarke T, Hepler PK, Quinto C. 1999. *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant Journal*. **19**: 347-352.

Cesar AI, Esther MG, Daniel M, Ruben L, Estibaliz L, Erena GQ. 2011. Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*. **5**: 24–31.

Chahota RK, Kishore N, Dhiman KC, Sharma TR, Sharma SK. 2007. Predicting transgressive segregants in early generation using single seed descent method-derived micromacrosperma genepool of lentil (*Lens culinaris* Medikus). *Euphytica* **156**: 305–310.

- Chelius MK, Triplett EW. 2000.** Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 783–787.
- Chen HC, Feng J, Hou BH, Li FQ, Li Q, Hong GF. 2005b.** Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Research.* **33**: 2540–2548.
- Chen WM, de Faria SM, Chou JH, James EK, Elliott GN, Sprent JI, Bontemps C, Young JP, Vandamme P. 2008.** *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* **58**: 2174–2179.
- Chen WM, James EK, Chou JH, Sheu SY, Yang SZ, Sprent JI. 2005a.** Beta-rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytologist.* **168**:661–675.
- Chen WM, James EK, Prescott AR, Kierans M, Sprent JI. 2003b.** Nodulation of *Mimosa* spp. By the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **16**: 1051–1061.
- Chen WM, Laevens S, Lee TM, 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 *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* **51**: 1729–1735.
- Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson C. 2003a.** Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology.* **185**: 7266–7272.
- Chen WX, Tan ZY, Gao JL, Li Y, Wang ET. 1997.** *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *International journal of systematic bacteriology.* **47**: 870–873.
- Chen WX, Yan GH, Li JL. 1988.** Numerical taxonomy study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* **38**: 392–397.
- Cheng HP, Walker GC. 1998.** Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology.* **180**: 5183–5191.
- Cieslarová J, Smýkal P, Dočkalová Z, Hanáček P, Prochazka S, Hýbl M, Griga M. 2011.** Molecular evidence of genetic diversity changes in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Genetic Resources and Crop Evolution.* **58**: 439–451.
- Cleland EE, Harpole WS. 2010.** Nitrogen enrichment and plant communities. *New York Academy of Sciences.* **1195**: 46–61.
- Cochran WG. 1950.** Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". *International Biometric Society.* **6**: 105–116.

- Cocking EC. 2003.** Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*. **252**:169–175.
- Cooper JE. 2004.** Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research*. **41**: 1–62.
- Cooper JE. 2007.** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*. **103**: 1355–1365.
- Corre-Hellou G, Fustec J, Crozat Y. 2006.** Interspecific competition for soil N and its interactions with N₂ fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. *Plant and Soil*, **282**: 195–208.
- D’Haeze W, Holsters M. 2002.** Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*. **12**: 79R–105R.
- Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L. 2001.** Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **58**: 61–71.
- De Faria S, Lewis G, Sprent J, Sutherland J. 1989.** Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytologist*. **111**: 607–619.
- De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M. 1994.** Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov, *Sinorhizobium saheli* sp. nov, and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **44**: 715–733.
- Deakin WJ, Broughton WJ. 2009.** Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*. **7**: 312–20.
- Denarié J, Debelle F, Prome JC. 1996.** *Rhizobium* lipo-chitooligo-saccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*. **65**: 503–535.
- Dénarié J, Debelle F, Prome JC. 1996.** *Rhizobium* lipo-oligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*. **65**: 503–535.
- Depret G, Houot S, Allard MR, Breuil MC, Nouaïm R, Laguerre G. 2004.** Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS Microbiology Ecology*. **51**: 87–97.
- Depret G, Laguerre G. 2008.** Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations nodulating pea. *New Phytologist*. **179**: 224–235.

- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008.** Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. **36**: W465–W469.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Srinivasa-Reddy MS, Wang L. 2002.** The phenylpropanoid pathway and plant defence, a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. **3**: 371–390.
- Dommergues Y, Duhoux E, Diem HG. 1998.** Les arbres fixateurs d'azote. Eds Espace 34, Editions Scientifiques et Culturelles. p 499.
- Downie JA. 2005.** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology*. **15**: 6.
- Doyle JJ, Luckow MA. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**: 900–10.
- Doyle JJ. 2011.** Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **24**: 1289–1295.
- Dreyfus B, Dommergues Y. 1981.** Nodulation of Acacia species by fast-and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Applied and Environmental Microbiology*. **41**: 97–99.
- Dreyfus B, Dommergues Y. 1981.** Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiology Letters*. **10**: 313–317.
- Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M. 1988.** Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov, sp.nov, a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **38**: 89-98.
- Drouin P, Prevost D, Antoun H. 1996.** Classification of bacteria nodulating *lathyrus japonicus* and *lathyrus pratensis* in northern Quebec as strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **46**: 1016–1024.
- 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 of Statistics*. **7**: 1–26.
- Elboutahiri N, Thami-Alami I, Udupa SM. 2010.** Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*. **10**: 15.
- Elmerich C. 1993.** Fixation biologique de l'azote. *Annales de l'Institut Pasteur*. **4**: 133–153.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992.** Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. **131**: 479–491.

Faghire M, Bargaz A, Farissi M, Palma F, Mandri B, Lluch C, Tejera García NA, Herrera-Cervera JA, Oufdou K, Ghoulam C. 2011. Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55: 69–75.

FAO. 1988. Programme de coopération technique. Programme de développement des productions fourragères et de l'élevage. Rapport de synthèse. Rome : FAO.

FAO. 2006. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques, INRAA. FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

FAO. 2012. Cadre Programmation par Pays Algérie (2013 – 2016). République Algérienne Pour l'Alimentation et l'Agriculture Démocratique et Populaire, FAO (organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

FAOSTAT-Agriculture 2011. Food and agricultural commodities production. Food and agriculture organization. Rome.

Faure D, Vereecke D, Leveau JHJ. 2009. Molecular communication in rhizosphere. *Plant Soil*. 321: 279–303.

Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant Journal*. 13: 455–463.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783–791.

Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52: 61–76.

Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:626.

Fisher HM. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiology Reviews*. 58: 352–386.

Fisher RF, Egelhoff TT, Mulligan JT, Long SR. 1988. Specific binding of *Rhizobium meliloti* extracts containing *nodD* to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes and Development*. 2: 282–293.

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. *Ber Dtsch Bot Ges*. 7: 332–346.

Fred EB, Baldani JI, McCoy E. 1932. Root nodule bacteria and legume plants. University of Wisconsin, USA.

- Fterich A, Mahdhi M, Lafuente A, Pajuelo E, Caviedes MA, Rodriguez-Llorente ID, Mars M. 2012.** Taxonomic and symbiotic diversity of bacteria isolated from nodules of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in arid soils of Tunisia. *Canadian Journal of Microbiology*. **58**: 738–51.
- NA, Lum MR, de Hoff PL, Whitelegge JP, Faull KF, Hirsch AM. 2008.** *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. *Molecular Microbiology*. **67**: 504–515.
- Gage DJ. 2004.** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**: 280–300.
- Geniaux E, Laguerre G, Amarger N. 1993.** Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Ecology* **2**: 295–302.
- Germano MG, Menna P, Mostasso FL, Hungria M. 2006.** RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **56**: 17–29.
- Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Peret B, Laplaze L, Franche C, Parniske M, Bogusz D. 2008.** SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankia bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**: 4928–4932.
- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. 2008.** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*. **42**: 413–441.
- Gillis M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, Teixeira KRS, Döbereiner J, De Ley J. 1989.** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International journal of systematic bacteriology*. **39**: 361–364.
- Giraud E, Fleischman D. 2004.** Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis Research*. **82**: 115–130.
- Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck WL, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Vermiglio A, Medigue C, Sadowsky M. 2007.** Legume symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*. **316**: 1307–1312.
- Goodfellow M. 1971.** Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *Journal of General Microbiology* **69**: 33–80.
- Gotelli NJ, Colwell RK. 2001.** Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*. **4**: 379–391.

Graham PH, Sadowsky MJ, Kersters HH, Barnet YM, Bradley RS, Cooper JE, De Ley DJ, Jarvis BDW, Roslycky EB, Strijdom BW, Young JPW. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *International journal of systematic bacteriology*. **41**: 582–587.

Graham PH, Vance CP. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*. **65**: 93–106.

Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*. **131**: 872–877.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. **52**: 696–704.

Hammer Ø, Harper DT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. **4**: 9.

Harrisson SP, Young JPW, Jones DG. 1987. *Rhizobium* population genetics: effect of clover variety and inoculum dilution on the genetic diversity sampled from natural populations. *Plant Soil*. **103**: 147–150.

Haukka K, Lindström K, Young PW. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 419–426.

Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*. **311**: 1–18.

Hill MO. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*. **54**: 427–432.

Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. **43**: 1–11.

Hirsch AM. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*. **122**: 211–237.

Hirsch AM. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*. **2**: 320–326.

Hirsch PR. 1996. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New phytologist*. **133**: 159–171

Hong GF, Burn JE, Johnston AWB. 1987. Evidence that DNA involved in the expression of nodulation (*nod*) genes in *Rhizobium* binds to the product of the regulatory gene *nodD*. *Nucleic Acids Research*. **15**: 9677–9690.

Huang B, Chengqun LV, Yili Zhao, Rong Huang. 2012. A Novel Strain D5 Isolated from *Acacia confuse*. *PLoS ONE*, Edited by Luis Herrera-Estrella, vol. 7, issue 11, p. 49236.

Hynes MF, O'Connell MP. 1990. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. Canadian Journal of Microbiology. **36**: 864–869.

Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International journal of systematic bacteriology . **47**: 895–898.

Jensen MA, Straus N. 1993. PCR methods and applications. **3**:186–194.

Jiang G, Krishnan HB. 2000. *Sinorhizobium fredii* USDA257, a Cultivar Specific Soybean Symbiont, Carries Two Copies of y4yA and y4yB, Two Open Reading Frame That Are Located in a Region That Encodes the Type III Protein Secretion System. Molecular Plant-Microbe Interactions. **13**: 1010–1014.

Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Setchell SM, Hirsch PR, Beringer JE. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. Nature. **276**: 634–636.

Jordan DC. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. International journal of systematic bacteriology. **32**: 136–139.

Jordan DC. 1984. Family III. Rhizobiaceae. In: Krieg NR, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore. P: 234–242.

Jourand P, Giraud E, Be'na G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004. *Methylobacterium* nodulans sp. nov., for a group of aerobic, facultative methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria International journal of systematic and evolutionary microbiology. **54**: 2269–2273

Kaminski PA, Boistard P. 1998. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. In the *Rhizobiaceae*, pp. 431–460. In Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic.

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.

Kohler PRA, Zheng JY, Schoffers E, Rossbach S. 2010. Inositol Catabolism, a Key Pathway in *Sinorhizobium meliloti* for Competitive Host Nodulation. Applied and Environmental Microbiology. **76**: 7972–7980.

Kondorosi E, Gyuris J, Schmidt J, John E, Hofmann DB, Schell J, Kondorosi A. 1989. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. EMBO Journal. **8**: 13311–340.

Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M. 2010. How Many Peas in a Pod? Legume Genes Responsible for Mutualistic Symbioses Underground. Plant Cell Physiol. **51**:1 381–1397.

Kuykendall LD, Young JM, Martínez-Romero E, Kerr A, Sawada H. 2005. Order Rhizobiales (new) family *Rhizobiaceae* genus *Rhizobium*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds) The alpha-, beta-, delta-, and Epsilonproteobacteria, the Proteobacteria, Part C, Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2, 2nd edn. Springer, New York, p 324–361.

L'Taief B, Sifi B, Zaman-Allah M, Hajji M, Lachaâl M. 2009. Effets de la fertilisation azotée, de l'inoculation par *Rhizobium* sp. et du régime des pluies sur la production de la biomasse et la teneur en azote du pois chiche. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **13**: 537–544.

Lafay B, Bullier E, Burdon JJ. 2006. Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Parasponia* (*Ulmaceae*) do not constitute a separate coherent lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **56**: 1013–1018.

Laguerre G, Allard MR, Revoy F, Amarger N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length poly- morphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 56–63.

Laguerre G, Courde L, Nouaïm R, Lamy I, Revellin C, Breuil MC, Chaussod R. 2006. Response of Rhizobial Populations to Moderate Copper Stress Applied to an Agricultural. *Soil Microbial Ecology*. **52**: 426–435.

Laguerre G, Geniaux E, Mazurier SI, Rodriguez Casartelli R, Amarger N. 1993. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Canadian Journal of Microbiology*. **39**: 412–419.

Laguerre G, Louvrier P, Amarger N. 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 2276–2283.

Laguerre G, Mavingui P, Allard MR, Charnay MP, Louvrier P, Mazurier SI, Rigottier-Gois L, Amarger N. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-RFLP analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 2029–2036.

Laguerre G, Mazurier SI, Amarger N. 1992. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Molecular Ecology*. **101**: 17–26.

Laguerre G, Nour SM, 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.

Laguerre G, Van Berkum P, Amarger N, Prévost D. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 4748–4758.

- Lakzian A, Murphy P, Turner A, Beynon JL, Giller KE. 2002.** *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biology and Biochemistry*. **34**: 519–529.
- Land AH, Doig AG. 1960.** An automatic method of solving discrete programming problems. *Econometrica*. **28**: 497–520.
- Laus MC, Logman TJ, Lamers GE, Van Brussel AA, Carlson RW, Kijne JW. 2006.** A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular Microbiology*. **59**: 1704–1713.
- Lee KB, De Backer P, Aono T, Liu CT, Suzuki S, Suzuki T, Kaneko T, Yamada M, Tabata S, Kupfer DM. 2008.** The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS 571. *BMC genomics* 9: 271.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J. 1990.** Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. **344**: 781–784.
- Lewis G, Schrire B, MacKinder B, Lock M. 2005.** Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
- Li SX, Wang ZH, Malhi SS, Li SQ, Gao YJ, Tian XH. 2009.** Nutrient and Water Management Effects on Crop Production, and Nutrient and Water Use Efficiency in Dryland Areas of China. dans Sparks, D.L. (dir.) *Advances in Agronomy*. Vol. 102, Elsevier, Chapitre 7, p. 223–265.
- Lin DX, Wang ET, Tang H, Han TX, He YR, Guan SH, Chen WX. 2008.** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **58**: 1409–1413.
- Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010.** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*. **161**: 453–463.
- Lindström K. 1989.** *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International journal of systematic bacteriology*. **39**: 365–367.
- Lodwig E, Poole P. 2003.** Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *CRC Crit Rev Plant Sci*. **22**: 37–78.
- Louvrier P, Laguerre G, Amarger N. 1995.** Semiselective medium for isolation of *Rhizobium leguminosarum* from soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **27**: 919–924.
- Louvrier P, Laguerre G, Amarger N. 1996.** Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations isolated directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 4202–4205.
- Ludwig W. 2007.** Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International Journal of Food Microbiology*. **120**: 225–236.

Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS et al. 2010. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications*. 1: 10.

Mahdhi M, Fterich A, Rejili M, Rodriguez-Llorente ID, Mars M. 2011. Legume-nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. *Annals of Microbiology*. **62**: 61–68.

Maiden MC. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*. **60**: 561–588.

Maj D, Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Skorupska A. 2010. Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology Research*. **165**: 50–60.

Martínez-Romero J, Ormeño-Orrillo E, Rogel M, López-López A and Martínez-Romero E. 2010. Trends in Rhizobial Evolution and Some Taxonomic Remarks. *Evolutionary Biology-Concepts. Molecular and Morphological Evolution*. 301–315.

Martiny JB, Bohannan BJ, Brown JH et al. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*. **4**: 102–112.

Martyniuk S, Oron J, Martyniuk M. 2005. Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. **74**: 83–86.

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, Kluwer Academic Publisher.

Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol* **17**: 458–466.

Maynaud G, Willems A, Soussou S, Vidal C, Mauré L, Moulin L, Cleyet-Marel JC, Brunel B. 2012. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* . **35**: 65–72.

McIntyre H J, Davies H, Hore T A, Miller S H, Dufour J P, Ronson C W. 2007. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance, *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 3984–3992.

McIntyre JH, Davies H, A Hore T, H Miller S, Dufour JP, W Ronson C. 2007. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. *Applied and environmental microbiology* **73**: 3984–3992.

Mebarkia A, Abdelguerfi A. 2007. Etude du potentiel agronomique de trois espèces de vesces (*Vicia* spp.) et variabilité dans la région semi-aride de Sétif (Algérie). *Fourrages*. **192**: 495–506.

Meeks JC, Elhai J. 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free living and plant associated symbiotic growth states. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66: 94 – 121.

Merabet C, Bekki A, Benrabah N, Bey MBH, Bouchentouf L, Ameziane H, Rezki MA, Domergue O, Cleyet Marel JC, Avarre JC, Béna G, Bailly X, Lajudie de Ph. 2006. Distribution of *Medicago* species and their microsymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Research and Management.* 20: 219–231.

Merabet C, Martens M, Mosbah M, Zakhia F, Sy A, Le Roux C, Domergue O, Coopman R, Bekki A, Mars M, Willems A, de Lajudie P. 2010. Multi Locus Sequence Analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology .* 60: 664 – 674

Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A, Kondorosi E. 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103: 5230–5235.

Mergaert P, Van Montagu M, Holsters M. 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology.* 25: 811–817.

Mhamdi R, Laguerre G, Aouani M E, Mars M, Amarger N. 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology.* 41: 77–84

Miklashevichs E, Rohrig H, Schell J, Schmidt J. 2001. Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Crit. Rev. Plant Science.* 20: 373–394.

Ministère du Commerce. 2011. Rapport de conjoncture du secteur du commerce au titre du premier (1er) semestre de l'année 2011.

Moawad H, Beck DP. 1991. Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from un-inoculated field-grown lentil. *Soil Biology and Biochemistry.* 23: 933–937.

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 biovar viciae*. *Systematic and Applied Microbiology.* 28: 619–631.

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.

MP3-Grain Legumes. 2010. Enhanced food and feed security, nutritional balance, economic growth and soil health for smallholder farmers. Mega-Program 3 “Grain Legumes”.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 51: 263–273.
- Muresu R, Polone E, Sulas L, Baldan B, Tondello A, Delogu G, Cappuccinelli P, Alberghini S, Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Mori B, Calamassi R, Dazzo FB, Squartini A. 2008.** Coexistence de rhizobiums principalement non cultivables avec divers taxons bactériens , endophytes dans les nodules des légumineuses sauvages . FEMS Microbiology Ecology. **63**: 383–400.
- Mutch LA, Tamimi SM, Young JPW. 2003.** Genotypic characterisation of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: a comparison with UK isolates. Soil Biology and Biochemistry. **35**: 709–714.
- Mutch LA, Young JPW. 2004.** Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* on wild and cultivated legumes. Molecular Ecology. **13**: 2335–2344.
- Nedjraoui D, Bédrani S. 2008.** La désertification dans les steppes algériennes : causes, impacts et actions de lutte. VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement. 8.
- Nedjraoui D. 2003.** Les mécanismes de suivi de la désertification en Algérie proposition d'un dispositif national de surveillance écologique à long terme. Doc. OSS. P 37.
- Newton WE. 1998.** Nitrogénases : fonction et évolution. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 13: 238–241.
- Newton WE. 2007.** Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In: Ferguson BH, SJ NWE (eds) Biology of nitrogen cycle. Elsevier, Amsterdam, p 109–130.
- Oke V, Long SR. 1999.** Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Current Opinion in Microbiology. **2**: 641-646.
- Ollivier J, We ST, Bannert A, Hai B, Kastl EM, Meyer A, Su MX, Kleineidam K Schloter M. 2011.** Nitrogen turnover in soil and global change. FEMS Microbiology Ecology . **78**: 3–16.
- Oresnik IJ, Twelker S, Hynes MF. 1999.** Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. Applied and Environmental Microbiology. **65**: 2833–2840.
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK. 2005.** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Current Biology. **15**: 531–535.
- Palmer KM, Young JPW. 2000.** Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* populations in arable soils than in grass soils. Applied and Environmental Microbiology. **66**: 2445–2450.

- Pavoine S, Bailly X. 2007.** New analysis for consistency among markers in the study of genetic diversity: development and application to the description of bacterial diversity. *BMC Evolutionary Biology*. **7**: 156.
- Pawlowski K, Bisseling T. 1996.** Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features? *Plant Cell*. **8**: 1899–1913.
- Peck MC, Fisher RF, Long SR. 2006.** Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. **188**: 5417–5427.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000.** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**: 180–201.
- Pietsch G, Friedel JK, Freyer B. 2007.** Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Research*. **102**: 104–118.
- Piha MI, Vallack HW, Michael N, Reeler B.M. 1995.** A low input approach to vegetation establishment on mine and coal ash wastes in semi-arid regions. II. Lagooned pulverized fuel ash in Zimbabwe. *Journal of Applied Ecology* **32**: 382–390.
- Ponsonnet C, Nesme X. 1994.** Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Archives of microbiology*. **161**: 300–309.
- Potts M. 1994.** Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiology Review*. **58**: 755–805.
- Prévost, D. and Antoun, H. 2008.** Root Nodule Bacteria and Symbiotic Nitrogen Fixation in Carter, M.R. and Gregorich, E.G. (eds.)-Soil Sampling and Methods of Analysis. 2nd Edition, CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA, Chapter 31.
- Pueppke SG, Broughton WJ. 1999.** *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R.fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **12**: 293–318.
- Radnedge L, Agron PG, Worsham PL, Andersen GL. 2002.** Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology*. **148**: 1687–1698.
- Rahi P, Kapoor R, Young JPW, Gulati A. 2012.** A genetic discontinuity in root-nodulating bacteria of cultivated pea in the Indian trans-Himalayas. *Molecular Ecology*. **21**: 145–159.
- Rai AN, Söderbäck E, Bergman B. 2000.** Cyanobacterium-plant symbioses. *New Phytologist*. **147**: 449–481.
- Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2008.** Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **58**: 2484–2490.

Rashid MH, Gonzalez J, Young JPW, Wink M. 2014. *Rhizobium leguminosarum* is the symbiont of lentils in the Middle East and Europe but not in Bangladesh. *FEMS Microbiology Ecology*. **87**: 64–77.

Rashid MH, Sattar MA, Uddin MI, Young JPW. 2009. Molecular characterization of symbiotic root nodulating rhizobia isolated from lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. **8**: 602–612.

Rashid MH, Schäfer H, Gonzalez J, Wink M. 2012. Genetic diversity of rhizobia nodulating lentil (*Lens culinaris*) in Bangladesh. *Systematic and Applied Microbiology*. **35**: 98–109.

Recourt K, Schripsema J, Kijne JW, Vanbrussel AAN. 1991. Lugtenberg BJJ. Inoculation of *Vicia sativa* subsp *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones. *Plant Molecular Biology*. **16**: 841–852.

Redmond J, Batley M, Djordjevic M, Innes R, Kuempel P, Rolfe B. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature*. **323**: 632–635.

Rehman A, Nautiyal CS. 2002. Effect of drought on the growth and survival of the stress-tolerant bacterium *Rhizobium* sp. NBRI2505 *sesbania* and its drought-sensitive transposon Tn 5 mutant. *Current Microbiology*. **45**: 368–77.

Rivas R, García-Fraile P, Velázquez E. 2009. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights*. **2**: 51–69.

Rivas R, Velazquez E, Willems A, Vizcaino N, Subba-Rao NS, Mateos PF, Gillis M, Dazzo FB, 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. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 5217–5222.

Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez Romero E. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*. **34**: 96–104.

Rolfe B, Gresshoff P, Shine J. 1980. Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. *Plant Science Letters*. **19**: 227–284.

Ruiz-Díez B, Fajardo S, del Rosario de Felipe M, Fernández-Pascual M. 2012. Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. *Journal of Basic Microbiology*. **52**: 66–78.

Sadowsky MJ. 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: Werner D, Newton WE (eds) *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*. Springer. The Netherlands, p 89–112.

Saitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. **4**: 406–425.

- Sánchez-Díaz M. 2001.** Adaptation of legumes to multiple stresses in Mediterranean-type environments. *Options Méditerranéennes* **45**: 145–151.
- Santillana N, Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Velazquez E, Zuniga D. 2008.** Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S–23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Archives of microbiology*. **189**: 239–247.
- Saskatchewan Pulse Growers. 2000.** Pulse production manual. Saskatchewan Pulse Growers, Saskatoon SK.
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM. 2003.** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology*. **49**: 155–179.
- Saïdi S, Ramirez-Bahena MH, Santillana N, Zuniga D, Alvarez-Martinez E, Peix A, Mhamdi R, Vela'zquez E. 2014.** *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **64**: 242–247.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000.** Arlequin ver. 2.000: a Software for Population Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schofield PR, Watson JM. 1986.** DNA sequence of *Rhizobium trifolii* nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence preceding *nodABC* and *nodFE*. *Nucleic Acids Research*. **14**: 2891–2903.
- Segovia L, Young JPW, Martínez-Romero E. 1993.** Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*. **43**: 374–377.
- Serraj R, Sinclair TR, Purcell LC. 1999.** Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany*. **50**: 143–155.
- Silva C, Kan F L, Martínez-Romero E. 2007.** Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* And *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico. *FEMS Microbiology*. **60**: 477–489.
- Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Kro'lj. 2006.** Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories*. **5**: 7.
- Skorupska A, Wielbo J, Kidaj D, Marek-Kozaczuk M. 2010.** Enhancing *Rhizobium*–Legume Symbiosis Using Signaling Factors. In Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) *Microbes for Legume Improvement* . Springer-Verlag/Wien Printed in Germany. P 27.
- Smadhi D et al. 2001.** SIG: base de données pour la gestion de l'environnement agroclimatique: cas des hauts plateaux semi arides. Sémin. Nation. Sur la problématique de l'agriculture des zones arides et de la reconversion. 50–58.

- Smit G, Kijne JW, Lugtenberg BJ. 1987.** Involvement of both cellulose fibrils and a Ca_2^+ dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *Journal of Bacteriology*. **169**: 4294–4301.
- Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, Ford R, Coyne CJ, Maxted N, Ambrose MJ, Ellis NTH. 2011.** Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*. **9**: 4–18.
- Souza V, Nguyen TT, Hudson RR, Pinero D, Lenski RE. 1992.** Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**: 8389–8393.
- Spaink HP. 2000.** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*. **54**: 257–288.
- Sprent J. 2007 .** Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*. **174**: 11–25.
- Squartini A, Struffi P, Döring H, Selenska-Pobell S, Tola E, Giacomini A, Vendramin E, Velázquez E, Ma-teos PF, Martínez-Molina E, Dazzo FB, Casella S, Nuti MP. 2002.** *Rhizobium sullae* sp. nov (formerly *Rhizobium 'hedysari'*): the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **52**: 1267–1276.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont AD, Ka P, Maiden MCJ, Nesme X, Swings J, Tru HG, Ward AC et al. 2002.** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*. **52**: 1043–1047.
- Stackebrandt E, Goebel BM. 1994.** Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **44**: 846–849.
- Staddon WJ, Trevors JT, Duchesne LC, Colombo C. 1998.** Soil microbial diversity and community Structure across a climatic gradient in western Canada. *Biodiversity and Conservation*. **7**: 1081–1092.
- Stanley J, Cervantes E. 1991.** A review: biology and genetics of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234. *Journal of applied bacteriology*. **70**:9–19.
- Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000.** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**: 487–506.
- Steenkamp ET, Stepkowski T, Przymusiak A, Botha WJ, Law IJ. 2008.** Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **48**: 1131–1144.

Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint JP, Vierheilig H. 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules*. **12**: 1290–306.

Sullivan J, Trzebiatowski J, Cruickshank R, Gouzy J, Brown S, Elliot R, Fleetwood D, Mccallum N, Rossbach U, Stuart G. 2002. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Journal of bacteriology*. **184**: 3086.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, Dreyfus B. 2001. *Methylotrophic Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*. **183**: 214–220.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. **28**: 2731–2739.

Tan ZY, Kan FL, Peng GX, Wang ET, Reinhold-Hurek B, Chen WX. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* . **51**:909–14.

Taylor LP, Grotewold E. 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology*. **8**: 317–323.

Tellstrom V, Usadel B, Thimm O. et al. 2007. The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant physiology*. **143**: 825–837.

Tian CF, Wang ET, Wu LJ, Han TX, Chen WF, Gu CT, Gu JG, Chen WX. 2008. *Rhizobium fabae* sp. nov., a *bacterium* that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Food Microbiology*. **58**: 2871–2875.

Tian CF, Young JPW, Wang ET, Tamimi SM, Chen WX. 2010. Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: the role of recombination and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol*. **73**: 563–576.

Tindall BJ. 2008. The genus name *Sinorhizobium* Chen et al. 1988 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name '*Sinorhizobium adhaerens*' is not validly published. Opinion 84 - Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **58**: 1973–1973.

Trevaskis B, Colebatch G, Desbrosses G, Wandrey M, Wienkoop S, Saalbach G, Udvardi M. 2002. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. *Comparative and Functional Genomics*. **3**: 151–157.

Trinick MJ, Hadobas PA. 1988. Biology of the *Parasponia-Bradyrhizobium* symbiosis. *Plant Soil*, **110**: 177–185.

Trujillo ME, Willems A, Abril A, Planchuelo AM, Rivas R, Luden~a D, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velazquez E. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 1318–1327.

Udvardi MK, Day DA. 1997. Metabolite Transport across Symbiotic Membranes of Legume Nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **48**: 493–523.

Valverde A, Igual JM, Peix A, Cervantes E, Velazquez E. 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Food Microbiology*. **56**: 2631–2637.

Valverde A, Velazquez E, Fernandez-Santos F, Vizcaino N, Rivas R, Mateos PF, Martinez-Molina E, Igual JM, Willems A. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Food Microbiology*. **55**:1985–1989.

Van Berkum P, Beyene D, Bao G, Campbell TA, Eardly BD. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *International journal of systematic bacteriology*. **48**: 13–22.

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 systematics. *Microbiology Research*. **60**:407–438.

Vandenberg A, Slinkard AE. 1990. Genetics of seed coats color and pattern in lentil. *Journal of Heredity*. **81**: 484–488.

Vanderlinde E M, Hynes M F, Yost C K. 2014. Homoserine catabolism by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 requires a plasmid-borne gene cluster that also affects competitiveness for nodulation. *Environmental Microbiology*. **16**: 205–217

Vessey JK, Chemining'wa GN. 2006. The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biol. Biochem.* **38**: 153–163.

Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.

Vriezen JAC, de Bruijn FJ, Nüsslein K. 2007. Responses of Rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology* . **73(11)**: 3451–3459.

Wang ET, Tan ZY, Willems A, Fernández-López M, Reinhold-Hurek B, Martínez-Romero E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **52**: 1687–1693.

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG. 1987. Report of the ad hoc committee of reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International journal of systematic bacteriology*. **37**: 463–464.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. **173**: 697–703.

White J, Prell J, James EK, Poole P. 2007. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiology*. **144**: 604–614.

Wielbo J. 2012. Rhizobial communities in symbiosis with legumes: genetic diversity, competition and interactions with host plants. *Central European Journal of Biology*. **7**: 363–372.

Willems A, Collins MD. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International journal of systematic bacteriology*. **43**: 305–313.

Willems A, Coopman R, Gillis M. 2001. Comparison of sequences analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis, and DNA-DNA hybridization in *Bradyrhizobium*. *International journal of systematic bacteriology*. **51**: 623–623.

Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M, Russo DM, Zorreguieta A, Downie JA. 2008. Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *Journal of Bacteriology*. **190**: 4706–4715.

Wilson RA, Handley BA, Beringer JE. 1998. Bacteriocin production and resistance in a field population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* *Soil Biology and Biochemistry*. **30**: 413-417.

Woese CR, Stackebrandt E, Weisburg WG et al. 1984. The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*. **5**: 315–326.

Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. **51**: 221–271.

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 National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**: 7564 – 7569.

Yang CY, Yang JK, LI YG, Zhou JC. 2008. Genetic diversity of root-nodulating bacteria isolated from pea (*Pisum sativum*) in subtropical regions of China. *Sci. China Ser. C-Life Sci*. **51**: 854–862.

Yang Z. 1996. Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. *Journal of Molecular Evolution*. **42**: 587–596.

Yergeau E, Kowalchuk GA. 2008. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. *Environmental Microbiology*. **10**: 2223–2235.

Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. International journal of systematic and evolutionary microbiology. **51**: 89–103.

Young JM. 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

Young J. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. Biological nitrogen fixation. p 43–86.

Young JPW, Crossman LC, Johnston AWB, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH, Wexler M, Curson ARJ, Todd JD, Poole PS, Mauchline TH, East AK, Quail MA, Churcher C, Arrowsmith C, Cherevach I, Chillingworth T, Clarke K, Cronin A, Davis P, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, Whitehead S, Parkhill J. 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biology. **7**: R34.

Young JPW, Demetriou L, Apte RG. 1987. *Rhizobium* Population Genetics: Enzyme Polymorphism in *Rhizobium leguminosarum* from Plants and Soil in a Pea Crop. Applied and Environmental Microbiology. **53**: 397–402.

Young JPW. 2000. Taxonomy and evolution of diazotrophs in : Nitrogen fixation : from molecules to crop productivity. Brazil, Kluwer Academic Publishers.

Young ND, Mudge J, Ellis TH. 2003. Legume genomes: more than peas in a pod. Current Opinion in Plant Biology. **6**: 199–204.

Zahran HH, Chahboune R, Moreno S, Bedmar EJ, Abdel-Fattah M, Yasser MM, Mahmoud AM. 2013. Identification of rhizobial strains nodulating Egyptian grain legumes. International Microbiology. **16**: 157–163.

Zahran HH, Sprent JI. 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta **167**: 303–309.

Zahran HH. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **63**: 968–989.

Zahran HH. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. Journal of Biotechnology. **91**: 143–153.

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

- Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004.** Characterisation of Legume-Nodulating Bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*. **27**: 380–395.
- Zakhia F, Jeder H, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2006.** Diverse Bacteria Associated with Root Nodules of Spontaneous Legumes in Tunisia and First Report for *nifH* - like Gene within the Genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology*. **5**: 375–393.
- Zézé A, Mutch LA, Young JPW. 2001.** Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environmental Microbiology*. **3**: 363–370.
- Zhang H, Feng R, Li J, Guan D, Cao F. 2010.** Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. **50**: 1466–73.
- Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O. 2009.** Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Journal*. **57**: 171–183
- Zhang XX, Kosier B, Priefer UB. 2001.** Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Mol. Ecol*. **10**: 2297–2305.
- Zhang YF, Wang ET, Tian CF, Wang FQ, Han LL, Chen WF, Chen WX. 2008.** *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS Microbiology Letters* . **285**: 146–154.
- Zhu H, Choi HK, Cook DR, Shoemaker RC. 2005.** Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology*. **137**: 1189–1196.
- Zohary D. 1972.** The wild progenitor and the place of origin of the cultivated lentil *Lens culinaris*. *Economic Botany*. **26**: 326–332.
- Zou N, DART P, Jo MARCAR NE. 1995.** Interaction of salinity and rhizobial strain on growth and N₂-fixation by *Acacia ampliceps*. *Biology and Biochemistry*. **27**: 409–413.
- Zurdo-Pineiro JL, Rivas R, Trujillo ME, Vizcaino N, Carrasco JA, Chamber M, Palomares A, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velazquez E. 2007.** *Ochrobactrum cytisi* sp. nov. isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **57**: 784–788.

Annexes

Annexe 1

Milieux utilisés

- **milieux de culture bactérienne :**

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

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| Mannitol | 10.0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 g |
| NaCl | 0.1 g |
| Extrait de levure | 0.5 g |
| H ₂ O distillée | 1.0 litre |

Le pH est ajusté à 6.8. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

Milieu gélosé YMA (Yeast Mannitol Agar):

| | |
|------|-----------|
| YMB | 1.0 litre |
| Agar | 15 g |

Le pH est ajusté à 6.8. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

Milieu YMA au rouge Congo

Il est composé de YMA (1 litre de YMB + 15 g d'agar) + 10ml de la solution stock de rouge Congo (250 mg dans 100 ml d'eau distillée).

Le pH est ajusté à 6.8. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

- **Solution de culture des plantes** (Solution nutritive de Fahraeus, Vincent, 1970) :

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

Solution stock des oligoéléments en g/l

| | |
|------------------------------------------------------|--------|
| H ₃ BO ₄ | 2.86 g |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 2.03 g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 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 pendant 20 minutes à 120°C.

Annexe 2

Tables statistiques

- Table de Yates et Fisher

TABLE 3.5A*. Number (M) of rhizobia estimated by the plant infection count:
C. Ten-fold dilutions.
(A=10)

| Positive tubes | | Dilution steps (s) | | | |
|---------------------------------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| n=4 | n=2 | s=10 | | | |
| 40 | 20 | >7 × 10 ⁸ | | | |
| 39 | | | | | |
| 38 | 19 | 6.9 | | | |
| 37 | | 3.4 | | | |
| 36 | 18 | 1.8 | | | |
| 35 | | 1.0 | | | |
| 34 | 17 | 5.9 × 10 ⁷ | | | |
| 33 | | 3.1 | s=8 | | |
| 32 | 16 | 1.7 | >7 × 10 ⁴ | | |
| 31 | | 1.0 | | | |
| 30 | 15 | 5.8 × 10 ⁴ | 6.9 | | |
| 29 | | 3.1 | 3.4 | | |
| 28 | 14 | 1.7 | 1.8 | | |
| 27 | | 1.0 | 1.0 | | |
| 26 | 13 | 5.8 × 10 ⁶ | 5.9 × 10 ⁶ | | |
| 25 | | 3.1 | 3.1 | s=6 | |
| 24 | 12 | 1.7 | 1.7 | >7 × 10 ⁴ | |
| 23 | | 1.0 | 1.0 | | |
| 22 | 11 | 5.8 × 10 ⁴ | 5.8 × 10 ⁴ | 6.9 | |
| 21 | | 3.1 | 3.1 | 3.4 | |
| 20 | 10 | 1.7 | 1.7 | 1.8 | |
| 19 | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| 18 | 9 | 5.8 × 10 ³ | 5.8 × 10 ³ | 5.9 × 10 ³ | |
| 17 | | 3.1 | 3.1 | 3.1 | |
| 16 | 8 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | s=4 |
| 15 | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | >7 × 10 ³ |
| 14 | 7 | 5.8 × 10 ² | 5.8 × 10 ² | 5.8 × 10 ² | 6.9 |
| 13 | | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.4 |
| 12 | 6 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.8 |
| 11 | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 10 | 5 | 5.8 × 10 ¹ | 5.8 × 10 ¹ | 5.8 × 10 ¹ | 5.9 × 10 ¹ |
| 9 | | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 |
| 8 | 4 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 |
| 7 | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 6 | 3 | 5.8 × 1 | 5.8 × 1 | 5.8 × 1 | 5.8 × 1 |
| 5 | | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 |
| 4 | 2 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 |
| 3 | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 2 | 1 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| 1 | | <0.6 | <0.6 | <0.6 | <0.6 |
| 0 | 0 | | | | |
| Approx. range | | 10 ⁹ | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ³ |
| Factor, 95% fiducial limits† | | n=2 6.6 | | | |
| (×, ÷): | | n=4 3.8 | | | |

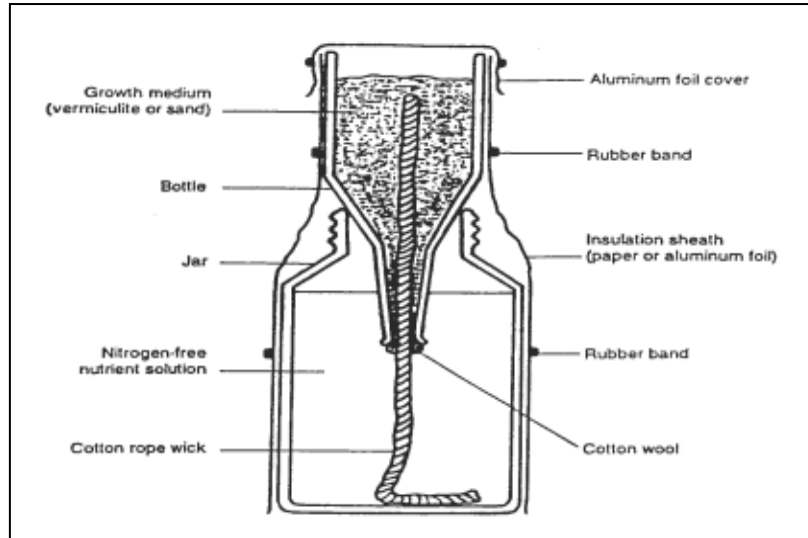
* Calculated from Table VIII₁ of Fisher and Yates (1963).
† Cochran; Biometrics, 1950, 6, 105.

- Table de Cochra

| No. of samples per dil. | Factor for 95% confidence limits | | | |
|-------------------------|----------------------------------|------|------|-------|
| | Dilution ratio (a) | | | |
| <i>n</i> | 2 | 4 | 5 | 10 |
| 1 | 4.00 | 7.14 | 8.32 | 14.45 |
| 2 | 2.67 | 4.00 | 4.47 | 6.61 |
| 3 | 2.23 | 3.10 | 3.39 | 4.68 |
| 4 | 2.00 | 2.68 | 2.88 | 3.80 |
| 5 | 1.86 | 2.41 | 2.58 | 3.30 |
| 6 | 1.76 | 2.23 | 2.38 | 2.98 |
| 7 | 1.69 | 2.10 | 2.23 | 2.74 |
| 8 | 1.64 | 2.00 | 2.12 | 2.57 |
| 9 | 1.58 | 1.92 | 2.02 | 2.43 |
| 10 | 1.55 | 1.86 | 1.95 | 2.32 |

Annexe 3

Jarre de Léonard (Vincent, 1970)

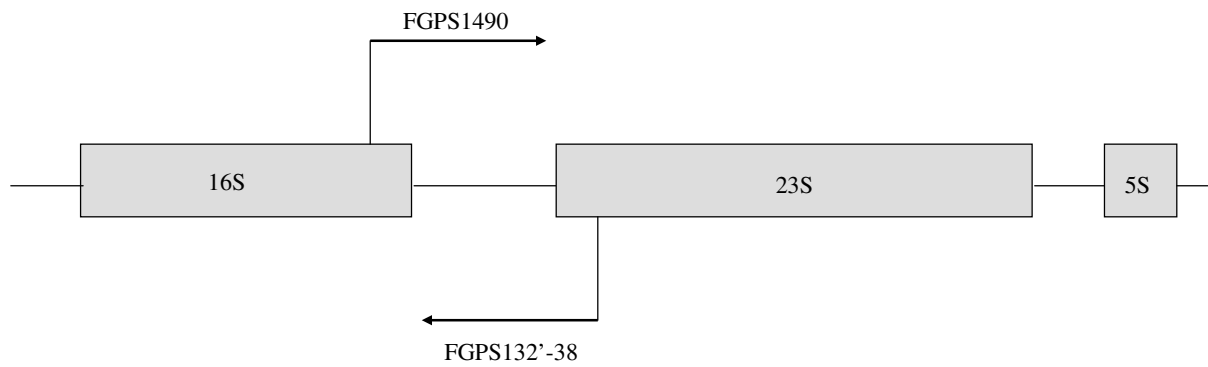


Conservation des nodules sous CaC

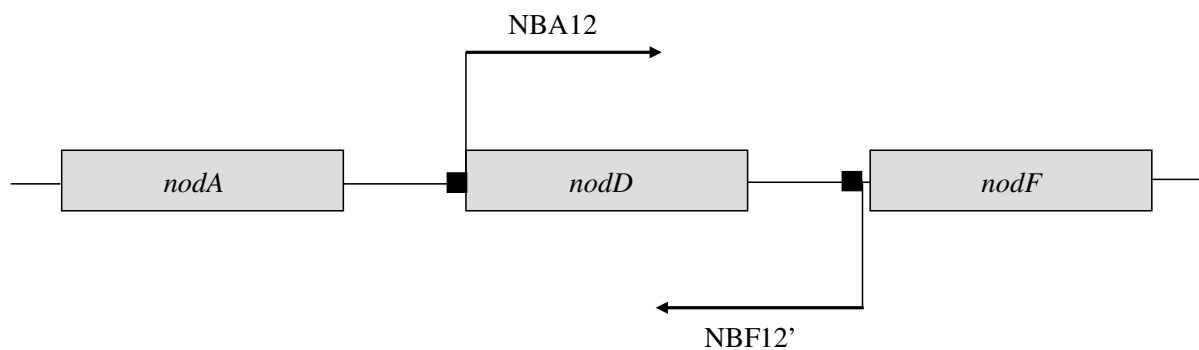
Annexe 4

Schémas de position des amorces

- Schéma de position des amorces FGPS1490 et FGPS132'-38 sur l'ADNr



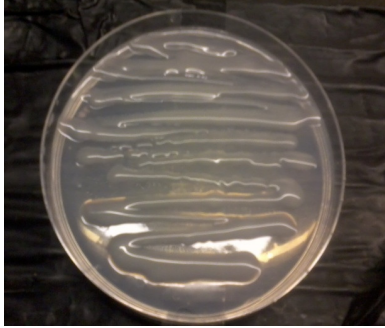
- Schéma de position des amorces NBA12 et NBF12' du gène *nodD*



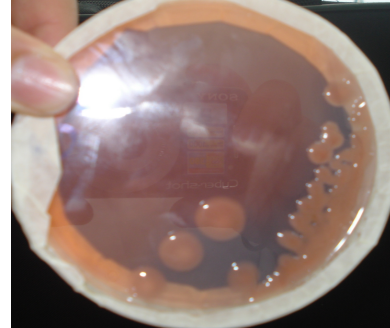
■ Séquence promotrice (*nod* box)

Annexe 5

Aspect des colonies isolées à partir des nodules racinaires du pois et de la lentille



Croissance sur YMA



Croissance sur YMA + rouge Congo

Annexe 6

Séquences de références des arbres phylogénétiques du gène 16S ARNr, de l'IGS 16S-23S ADNr et du gène *nodD*

| Souches | Plante d'origine | Origine géographique | Sequence accession N° | | | Référence |
|------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|-------------|---------------------------------------|
| | | | gène 16S ARNr | IGS 16S-23S ADNr | <i>nodD</i> | |
| <i>Rlv.</i> P1NP2K | <i>Pisum sativum</i> | France | | EU310477 | EU232110 | Laguerre <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Rlv.</i> IIAUa3 | <i>Pisum sativum</i> | France | | | EU232114 | Depret and Laguerre (2008) |
| <i>Rlv.</i> IIFa10 | <i>Pisum sativum</i> | France | | | EU232108 | Depret and Laguerre (2008) |
| <i>Rlv.</i> IFa7 | <i>Pisum sativum</i> | France | | | EU232107 | Depret and Laguerre (2008) |
| <i>Rlv.</i> IATb10 | <i>Pisum sativum</i> | France | | | EU232112 | Depret and Laguerre (2008) |
| <i>Rlv.</i> P1NP3C | <i>Pisum sativum</i> | France | | | EU232116 | Laguerre <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Rlv.</i> IIFa12 | <i>Pisum sativum</i> | France | | | EU232111 | Bourion <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Rlv.</i> PC2-9 | <i>Pisum sativum</i> | France | | | EU232113 | Depret <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Rlv.</i> IIIFa4 | <i>Pisum sativum</i> | France | | | EU232109 | Depret and Laguerre (2008) |
| <i>Rlv.</i> AI4 | <i>Pisum sativum</i> | France | | AY491948 | | Depret <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Rlv.</i> L364 | <i>Pisum sativum</i> | France | | AY491953 | | Depret <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Rlv.</i> PC22 | <i>Pisum sativum</i> | France | | AY491950 | | Depret <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Rlv.</i> P1NP3Cst | <i>Pisum sativum</i> | France | | EU310478 | | Laguerre <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Rlv.</i> VD10B | <i>Pisum sativum</i> | France | | AY491949 | | Depret <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Rlv.</i> L353 | <i>Pisum sativum</i> | France | | AY491956 | | Depret <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Rlv.</i> Ps 3 | <i>Pisum sativum</i> | England | | | AY226884 | Mutch and Young (2004) |
| <i>Rlv.</i> 3841 | <i>Pisum sativum</i> | England | | NC_008380 | AM236084 | Young <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Rlv.</i> PEVF05 | <i>Vicia faba</i> | Peru | | DQ196421 | | Santillana <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Rlv.</i> XtP1 | <i>Pisum sativum</i> | China | EU637927 | | | Yang <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Rhizobium</i> sp. PEPSM12 | <i>Pisum sativum</i> | Peru | | DQ196424 | | Santillana <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Rhizobium</i> sp. PEVF08 | <i>Vicia faba</i> | Peru | | DQ196422 | | Santillana <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Rhizobium</i> sp. PEPSM15 | <i>Pisum sativum</i> | Peru | | DQ196426 | | Santillana <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Rhizobium</i> sp. MVP05 | <i>Vicia sativa</i> | Spain | | FJ596016 | | Álvarez-Martínez <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Rhizobium</i> sp. BLR29 | <i>Lens culinaris</i> | Bangladesh | JN648907 | | | Rashid <i>et al.</i> (2012) |
| <i>Rhizobium</i> sp. BLR195 | <i>Lens culinaris</i> | Bangladesh | JN648932 | | | Rashid <i>et al.</i> (2012) |
| <i>Rhizobium</i> sp. BLR28 | <i>Lens culinaris</i> | Bangladesh | | | JN649015 | Rashid <i>et al.</i> (2012) |

| | | | | | |
|-----------------------------------------------|------------------------------|------------|----------|----------|--------------------------------------|
| <i>Rhizobium</i> sp. BLR174 | <i>Lens culinaris</i> | Bangladesh | | JN649024 | Rashid <i>et al.</i> (2012) |
| <i>Rhizobium</i> sp. BLR98 | <i>Lens culinaris</i> | Bangladesh | | JN649020 | Rashid <i>et al.</i> (2012) |
| <i>Rhizobium</i> sp. BLR137 | <i>Lens culinaris</i> | Bangladesh | | JN649023 | Rashid <i>et al.</i> (2012) |
| <i>Rhizobium</i> sp. BLR228 | <i>Lens culinaris</i> | Bangladesh | | JN649026 | Rashid <i>et al.</i> (2012) |
| Rlv. USDA 2370 ^T | <i>Pisum sativum</i> | USA | U29386 | AY491944 | Jordan (1984) |
| Rlt. ANU843 | <i>Trifolium</i> sp. | unknown | | X03721 | Rolfe <i>et al.</i> (1980) |
| Rlt. ATCC 14480 | <i>Trifolium pratense</i> | USA | AY509900 | AF345272 | Jordan (1984) |
| R. etli WzP15 | <i>Pisum sativum</i> | China | EU637928 | | Yang <i>et al.</i> (2008) |
| R. etli WzP3 | <i>Pisum sativum</i> | China | EU637929 | | Yang <i>et al.</i> (2008) |
| R. etli CFN 42 ^T | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Mexico | U28916 | AF541974 | Segovia <i>et al.</i> (1993) |
| Rlp. H441 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | France | | AY491958 | Laguerre <i>et al.</i> (1994) |
| Rlp. ATCC 14482 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | USA | EF141340 | EF141341 | Jordan (1984) |
| <i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Columbia | U89832 | AF345278 | Martínez-Romero <i>et al.</i> (1991) |
| <i>Ag. rhizogenes</i> IFO 13257 ^T | | | D14501 | | Sawada <i>et al.</i> (1993) |
| <i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Portugal | AY738130 | | Valverde <i>et al.</i> (2006) |
| <i>R. hainanense</i> I66 ^T | <i>Desmodium sinuatum</i> | China | U71078 | | Chen <i>et al.</i> (1997) |
| <i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ^T | <i>Vicia faba</i> | China | DQ835306 | | Tian <i>et al.</i> (2008) |
| <i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T | <i>Pisum sativum</i> | unknown | AY509899 | | Ramirez-Bahena <i>et al.</i> (2008) |
| <i>R. gallicum</i> R602sp ^T | <i>Phaseolus vulgaris</i> | France | U86343 | | Amarger <i>et al.</i> (1997) |
| <i>R. yanglingense</i> SH22623 ^T | <i>Amphicarpaea</i> sp. | China | AF003375 | | Tan <i>et al.</i> 2001 |
| <i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T | <i>Medicago ruthenica</i> | China | U89817 | | van Berkum <i>et al.</i> (1998) |
| <i>R. indigofera</i> CCBAU 71042 ^T | <i>Indigofera amblyantha</i> | China | AF364068 | | Wei <i>et al.</i> (2002) |
| <i>R. sullae</i> IS123 ^T | <i>Hedysarum coronarium</i> | Spain | Y10170 | | Squartini <i>et al.</i> 2002 |
| <i>E. teranga</i> LMG 6463 | <i>Sesbania rostrata</i> | Senegal | X68387 | | de Lajudie <i>et al.</i> (1994) |
| <i>E. saheli</i> LMG 7837 ^T | <i>Sesbania cannabine</i> | Senegal | X68390 | | de Lajudie <i>et al.</i> (1994) |
| <i>E. meliloti</i> LMG 6133 ^T | <i>Medicago sativa</i> | USA | X67222 | | Jordan (1984) |
| <i>E. morelense</i> Lc04 ^T | <i>Leucaena leucocephala</i> | Mexico | Ay024335 | | Wang <i>et al.</i> 2002 |
| <i>B. japonicum</i> ATCC 10324 ^T | <i>Glycine max</i> | Japan | U69638 | | Jordan (1984) |

La lettre "T" indique la souche type de l'espèce.

B.: Bradyrhizobium; E.: Ensifer; R.: Rhizobium; Ag.: Agrobacterium; Rlv.: Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae; Rlt.: Rhizobium leguminosarum symbiovar trifolii; Rlp.: Rhizobium leguminosarum symbiovar phaseoli.

SH : zone subhumide ; SA : zone semi-aride

Nom et prénom : RIAH Nassira

Doctorat en Sciences : Option Biochimie et Microbiologie Appliquée

Titre : Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien

RESUME

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse conduit à la formation des nodules racinaires fixateurs d'azote atmosphérique. Ce processus naturel présente un intérêt économique et agronomique considérable. En Algérie, la production des légumineuses alimentaires et fourragères est affecté par les contraintes environnementales climatiques (températures élevées, déficit hydrique, etc.). Dans cette étude, un total de 237 isolats ont été isolés à partir des nodules racinaires collectés sur la lentille (*Lens culinaris*), le pois fourrager (*Pisum sativum*) et le pois protéagineux (*Pisum sativum*) cultivés au champ dans six sites représentant deux zones éco-climatiques contrastées, subhumide et semi-aride de l'est algérien. L'objectif principal était de déterminer le niveau de variabilité de la structure génétique des populations nodulantes de *Rhizobium* parmi les sites et les plantes d'isolement en conditions climatiques différentes. Nos isolats ont été caractérisés par PCR-RFLP de la région intergénique 16S-23S ANRr (IGS), et de la région symbiotique *nodD-F*. Ils se sont répartis dans 14 types IGS et 10 types *nod*. La combinaison de ces haplotypes a permis de regrouper les isolats en 26 différents génotypes IGS/*nod*. L'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr 16S a permis de classer tous les isolats comme *Rhizobium leguminosarum*. La variation du marqueur symbiotique (*nodD-F*) est faible avec la prédominance d'un type *nod g*, qui a été récupéré précédemment avec une fréquence élevée en Europe. En outre, l'analyse des séquences de l'IGS des souches étudiées a confirmé sa grande variabilité. Une analyse par AMOVA a montré une différenciation très significative dans la distribution des haplotypes IGS entre les populations des deux zones éco-climatiques. Cette différenciation se traduit par des différences dans les fréquences des génotypes dominants. A l'inverse, aucun effet de la plante hôte n'a été détecté. L'analyse phylogénétique basée sur les séquences du gène *nodD* suggère que la diversité symbiotique de ce gène dans les populations de rhizobiums nodulant le pois et la lentille en Algérie est relativement basse comparée à celle observée dans d'autres zones géographiques au monde.

Mots clés : Pois, lentille, nodosités, *Rhizobium*, diversité, symbiose, structure génétique des populations, Algérie, zones éco-climatiques.