

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

N° d'ordre : O5/DS/2018  
N° de série :01/Micro/2018



**Thèse de Doctorat**

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences  
**Option : Biochimie et Microbiologie appliquées**

Par : *M<sup>elle</sup>* DEKKICHE SAMIA

**Diversités taxonomique et moléculaire des  
rhizobiums nodulant le pois chiche (*Cicer  
arietinum*L.), dans l'Est Algérien**

**Jury**

Président :	<b>Pr. Benhizia Yacine</b>	Pr. UMC1, Constantine
Directeur :	<b>Pr. Ben Guedouar Ammar</b>	Pr. UMC1, Constantine
Co-directeur :	<b>Dr. Gilles Béna</b>	Directeur de recherche IRD, Montpellier. France
Examineurs :	<b>pr. Benniou Ramdane</b>	Pr. U. M'Sila
	<b>Dr. Yahyaoui Billel</b>	M.C.A. U. Sétif
	<b>Pr. Hamidechi M. Abdelhafid</b>	Pr. UMC1, Constantine

Année universitaire : 2017-2018

### Résumé :

Des bactéries nodulantes fixatrices d'azote du pois chiche ont été étudiées pour leur diversité et leur biogéographie en prenant en compte trois variétés d'hiver différentes comme plante hôte. L'étude a inclus neuf sites de l'Est Algérien sous différents climats et avec des sols présentant différentes caractéristiques physicochimiques. Afin d'exploiter ces sites dans un objectif agronomique, les bactéries nodulantes les plus efficaces dans ces régions sont recherchées. Des isollements bactériens ont ainsi été réalisés dans chacun des sites par piégeages. L'étude moléculaire qui a porté sur l'analyse des séquences de cinq fragments d'ADN : ADNr16S, *recA*, IGS 16S-23S, *nodC* et *nifH*, montre que les nodules sont occupés par une grande diversité de bactéries, que cela soient des rhizobiums ou des non rhizobiums.

Au sein des rhizobiums, quatre genres ont été identifiés: *Ensifer* (46%), *Rhizobium/Agrobacterium* (23%), *Mesorhizobium* (21%) et *Burkholderia* (10%), avec une diversité d'espèce dans chaque genre. Des grandes différences sont remarquées entre les sites et les variétés pour leur capacité à induire des nodules et d'engager un genre ou une espèce rhizobienne déterminé(e) comme symbiote. Une certaine spécificité est détectée entre les genres *Mesorhizobium* et *Burkholderia* avec le site de Jijel ainsi qu'entre le genre *Ensifer* et Biskra et entre le genre *Rhizobium* et Tébessa. Dans ce dernier couple, la variété II a donné le plus grand nombre de nodules alors que la capacité à former des nodules de la variété III est beaucoup plus élevée avec les trois autres genres. Malgré ces variations, aucune corrélation significative entre les caractérisations chimiques et physiques des échantillons de sol et celles du génotype de la plante n'a été trouvée.

Au sein du *Mesorhizobium*, au moins 5 géno-espèces différentes connues sont présentes (*M.ciceri*, *M. amorphae*, *M. gobiense*, *M. opportunistum* et *M. Tamayadense*). Certains isolats pourraient probablement représenter au moins une nouvelle espèce de *Mesorhizoium*, proche du complexe *M.ciceri/M.loti*. Contrairement aux séquences ADNr16S, IGS et *recA* qui présentent de la diversité moléculaire de séquence, la diversité symbiotique est faible. Ceci pourrait refléter une acquisition au sein de ces espèces des gènes symbiotiques par transfert latéral.

À notre connaissance, cette étude est la première évaluation systématique des rhizobiums de pois chiches en Algérie. Pour la première fois il est montré que les espèces *M. gobiens* et *M. tamadayense*, sont des symbiotes du pois chiche. Aussi, pour la première fois, il est révélé que le genre *Mesorhizobium* n'est pas dominant et la nodulation du pois chiche n'est pas limitée au genre *Mesorhizobium* et peut être réalisée par différents genres de rhizobiums, même si des études complémentaires sont nécessaires pour finaliser cet aspect. Cela ouvre des possibilités d'utilisation de souches bactériennes avec un large spectre d'espèces pour la sélection des partenaires symbiotiques fiables à la culture et au rendement du pois chiche en Algérie.

**Mots clés :** *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *ADNr16S*, *recA*, *IGS*, *nodC*, *nifH*, pois chiche, diversité.

**Summary:**

Nodulating chickpea bacteria were examined for their diversity and biogeography taking three winter varieties into account as host plants. The study included nine sites in eastern Algeria with different climates and physicochemical characteristics. In order to operate these sites, the most efficient nodulation partners from these regions are sought after. Bacterial isolations were performed using trapping protocols in greenhouse with each varieties and soil samples from each site. A molecular study was carried out on the analysis of the sequences of five DNA fragments (DNA r16S, *recA*, IGS 16S-23S, *nodC* and *nifH*), showed that the nodules were occupied by rhizobia and non rhizobia, with a high degree of diversity within each.

Four genera of rhizobia are present: *Ensifer* (46%), *Rhizobium* / *Agrobacterium* (23%), *Mesorhizobium* (21%) and *Burkholderia* (10%). Large differences are noted between sites and varieties for their ability to induce nodules and to involve a specific rhizobial genus or species as a symbiot. Specificity is detected between the genera of *Mesorhizobium* and *Burkholderia* associated with the site of Jijel as well as between the genus *Ensifer* and Biskra and between the genus *Rhizobium* and Tebessa. With this latter pair, variety II resulted in the greatest nodulation level while the nodulation efficiency of variety III is much more striking with the three other genera. Despite these variations, no correlation was found between the chemical and physical characterizations of the soil samples and those of the plant genotype.

Within the *Mesorhizobium* genus, at least 5 different known genospecies are present (*M.ciceri*, *M. amorphae*, *M. gobiense*, *M. opportunistum* and *M. Tamadayense*), whereas some isolates could probably represent at least one new species of *Mesorhizobium*, closely related to the *M.ciceri* / *M.loti* cluster. Conversely to the significant genetic diversity shown by 16S rDNA, IGS 16S-23S and *recA*, symbiotic diversity represented by *nodC* and *nifH* was low. This may reflect acquisition of the symbiotic genes by lateral transfer.

To our knowledge, this study is the first systematic evaluation of chickpea rhizobia in Algeria. For the first time it is shown that the species *M. gobiense* and *M. tamadayense* are symbiotic bacteria of chickpea. Also for the first time it is revealed that the genus *Mesorhizobium* is not dominant and the nodulation of chickpea is not limited to the genus *Mesorhizobium* and can be carried out by different species and genera of rhizobia, although it should be confirmed by more studies. This certainly opens up a broad spectrum for the selection of reliable symbiotic partners for the cultivation and yield of chickpea in Algeria.

**Key words:** *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *rDNA16S*, *recA*, *IGS*, *nodC*, *nifH*, *chickpea* and *diversity*.

### ملخص :

بكتيريا مكونة للعقد الجذرية , مثبتة للزوت للحمص تمت دراسة تنوعها و جغرفيتها البيولوجية اخذين في الحسبان ثلاث اصناف شتوية مختلفة كنبات عائل . الدارسة شملت تسعة مواقع من الشرق الجزائري ذات مناخ مختلف وذات اتربة لها صفات فيزيوكيميائية مختلفة . لاستغلال هذه المواقع لغرض زراعي , البكتريا المكونة للعقد الجذرية الاكثر نشاطا في هذه المناطق تم البحث عنها .

عزل اليكتيري قد تم في كل موقع بالتفخيخ . الدراسة الجزيئية القائمة على تحليل سلاسل خمسة قطع *ADNr16S, recA, IGS(16S-23S), nodC, nifH:ADN* اظهرت ان العقد الجذرية ممتلئة بتنوع بكتيري كبير , منها *rhizobium* ومنها غير *rhizobium*.

ضمن بكتيريا *rhizobium* اربعة اجناس تم التعرف عليها : *Mesorhizobium* 21% , *Burkholderia* 10% , *Rhizobium /Agrobacterium* 23% , *Ensifer* 46% مع تعدد الانواع ضمن كل منها. اختلافات كبيرة تمت ملاحظتها بين المواقع وتغيرات في القدرة على اختراق العقد وامتلاؤها بجنس او نوع ريزوبي محدد كمتعايش . بعض الخصوصية اكتشفت بين الاجناس *Mesorhizobium* و *Burkholderia* مع موقع جيجل , ايضا بين جنس *Ensifer* وبسكرة وبين جنس *Rhizobium* وتبسة . في هذا الزوج الاخير الصنف II اعطى اكبر عدد من العقد بينما القدرة على تكوين عقد الصنف III كانت اعلى مع الاجناس الثلاثة الاخرى من الريزوبيا . رغم هذه التنوعات لا توجد صلة ذات دلالة بين الدراسة الوصفية الكيميائية والفيزيائية لعينات التربة وتلك للتركيب الجيني للنبات .

مع العلم , هذه الدراسة تعتبر التقويم التصنيفي الاول لريزوبيا الحمص في الجزائر .لاول مرة تم اكتشاف ان النوعان *M. Gobiens* و *M. Tamadayens* هما متعايشان لنبات الحمص ايضا لاول مرة ظهر ان الجنس *Mesorhizobium* غير سيد وتكوين العقد غير مقتصر على جنس *Mesorhizobium* وقد يحدث باجناس ريزوبية اخرى ولو استلزم الامر دراسات تكميلية لهذه الظاهرة , هذا ما يفتح امكانية استعمال سلالات بكتيرية مع انواع عديدة لاختيار الشريك التعايشي الاحسن للزراعة ولمنتوج وفير من الحمص في الجزائر .

### الكلمات المفتاحية :

*,Mesorhizobium, Ensifer, Rhizobium, ADNr16S, recA, IGS, nodC, nifH*  
الحمص , التنوع .

سبحانك لا علم لنا إلا ما  
علمتنا إنك أنت العليم  
الحكيم

### Remerciements

*Ce travail n'aurait pas vu la lumière sans la bourse de 18 mois (Oct2011- Mars2013), qui m'a été accordée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de l'Algérie. Cette bourse a permis d'établir une convention entre trois pays via trois organismes de recherches: Université Mentouri I, (Constantine, Algérie). Université Mohammed V- Agdal, (Rabat, Maroc) et L'IRD (Montpellier, France).*

*Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au niveau du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (L.M.B.M.) et du Laboratoire International Mixte (L.M.I), Faculté des Sciences, Université Mohammed V- Agdal, Rabat, Maroc.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Ben Guedouar Ammar : Professeur à l'Université frères Mentouri (I), Constantine, d'avoir accepté la charge d'être rapporteur de ma thèse, pour la confiance qu'il m'a témoigné et pour ses encouragements pour accomplir ce travail. Merci pour les nombreuses connaissances microbiologiques qu'il m'a appris, qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de ma reconnaissance pour tout ce qu'il a fait pour moi.*

*Mes plus sincères remerciements s'adressent à mon co-directeur de thèse Gilles Béna, Directeur de recherche à l'IRD, Montpellier, France, qui m'a tendu la main à un moment difficile. Je le remercie pour avoir accepté mon encadrement, pour les nombreuses connaissances agronomiques et microbiologiques qu'il m'a appris. Pendant les 18 mois de stage, il a présenté une disponibilité sans faille. Les nombreuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir m'ont énormément aidé et formé. Je tiens à le remercier également pour tout le temps qu'il m'a accordé pour l'élaboration de l'article et de la thèse. Grâce à ses conseils et son encadrement, j'ai pu finaliser et valoriser ce travail. Je n'oublierai forcément pas sa bonne humeur, son optimisme, sa joie de vivre et sa tolérance qui m'ont permis de rester enthousiaste et qui ont rendu les 18 mois de mon stage les plus agréables.*

*J'adresse mes vifs et sincères remerciements au professeur Benhizia Yassine professeur à l'université de Constantine, qui n'a cessé d'être un vrai frère pour moi durant toute la durée de mon travail de recherche. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude, de ma reconnaissance pour ses conseils, son soutien, ses encouragements et son aide précieuse pour l'élaboration de ce travail. Enfin je le remercie du fond du cœur d'avoir accepté aimablement de critiquer, de juger et de présider ce travail.*

*Je voudrais remercier également les autres membres de jury pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce travail : Pr. Hamidechi Abdelhafid (Professeur à l'université de Constantine I), Dr. Yahyaoui Bilél (M.C.A. Université de Sétif) et Pr Benniou Ramdane, (professeur à l'université de M'Sila).*

*Mes remerciements les plus chaleureux et fraternels au Professeur Adbelkarim FILALI-MALTOUF, directeur de recherche et responsable du Laboratoire de Microbiologie et*

## Remerciements

---

*Biologie Moléculaire (L.M.B.M.). Je le remercie pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour son soutien et ses encouragements. Ses apports scientifiques et logistiques ainsi que ses rapports humains dans le suivi et la réalisation de mes travaux de recherche ont été d'une qualité supérieure et fructueuse.*

*Je remercie fortement les personnes du LMI de l'université Mohamed V (Rabat), le professeur Sbabou Laila, qui m'a ouvert les portes de sa maison, m'a beaucoup aidé et conseillé. Le Professeur Aurag Jamel fait partie des personnes que j'estime beaucoup et que je tiens à remercier. Son ouverture scientifique et son humour raffiné m'ont donné envie d'aller souvent discuter avec lui.*

*Je tiens vivement exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude au professeur El Bekkay BERRAHO pour ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche. Merci à Patricia pour son aide, au docteur Benhassou pour le soutien et les précieux conseils qu'il m'a prodigué. Je remercie Antoine lequère pour ses remarques et ses suggestions qui ont été très utiles et judicieuses pour cette thèse.*

*Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de plusieurs doctorants du LMI qui m'ont donné de bons coups de mains et dont l'aide a été précieuse. Merci à Kaouter, Ilham, Malika et Yassir pour tous ces instants où nos rigolades ont vraiment été de bons moments. Bon courage et bonne chance à vous tous pour l'avenir*

*Enfin, je n'oublie pas ceux que je pleurais a tout jamais. A La mémoire de mon père et celle de mon grand frère Tayeb, avec qui je n'aurais pas le plaisir de partager cet événement. Il m'est difficile de trouver les mots pour exprimer mon amour éternel et mon chagrin en exposant cette thèse en votre absence. J'aurais aimé que vous soyez à mes cotés ce jour. Vous me manquez énormément, que vos âmes reposent en paix,*

*Ma profonde reconnaissance et ma grande affection s'adressent à ma mère, symbole de courage pour moi, source inépuisable de tendresse. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secoure, que Allah te donne bonne santé et longue vie.*

*Ma famille a été pour moi le principal moteur, chacun à sa manière de près ou de loin a su m'insuffler l'esnergie nécessaire. Merci a vous tous Puisse Allah nous protéger et nous garder toujours réunis*

*Mes vif remerciements à Riah Nassira de l'université de Constantine pour ses encouragements, a Nassira de l'TGC pour la procuration des variétés du pois chiche et aux personnes de l'université de Batna pour leur aide dans l'échantillonnage du sol, Professeur Hambababa, Kaouter Boudiaf, KarimaLjimi, naouel Messaidia, zineb, wafia.*

*Merci à vous tous, même ceux que j'ai oublié de citer, vraiment merci !*

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Classification des légumineuses de la famille des <i>Papilionoideae</i> ((Zhu et al. 2005)	6
<b>Figure 2 :</b> Arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) basée sur les séquences de gènes ADNr 16S montrant les relations phylogénétiques entre différentes espèces de <i>Mesorhizobium</i> sous le modèle Tamura 3-paramètre. <i>Azorhizobium caulinodans</i> est utilisée hors du groupe (Laranjo et al., 2014 ).	10
<b>Figure3 :</b> Mise en place de la symbiose légumineuse – rhizobium et fixation d’azote (Laranjo et al., 2014).	12
<b>Figure 4 :</b> Structure générale d'un facteur Nod, (Chataigné, 2007)	20
<b>Figure5 :</b> plante et graine de pois chiche ( <i>Cicer arietinum L.</i> ) ( <a href="http://www.visoflora.com/photos-nature/photo-pois-chiche-cicer-arietinum.html">http://www.visoflora.com/photos-nature/photo-pois-chiche-cicer-arietinum.html</a> ).	27
<b>Figure 6 :</b> Situation agronomique du pois chiche en Algérie a travers le temps (FAOSTAT, 2014) ( <a href="http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx">http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx</a> )	30
<b>Figure7 :</b> Surface cultivée, rendement et production du pois chiche durant les deux dernières décennies (FAOSTAT, 2017)	30
<b>Figure 8 :</b> Localisation des sites d’études dans l’Est Algérien	36
<b>Figure 9 :</b> Variétés de pois chiche utilisées	39
<b>Figure 10:</b> Conservation des nodules sous CaCl <sub>2</sub> (Vincent, 1970)	42
<b>Figure 11 :</b> Représentation en ACP des échantillons des sols	53
<b>Figure 12 :</b> Culture du pois chiche pour piégeage	56
<b>Figure 13 :</b> Nodules racinaires du pois chiche obtenus par piégeage	57
<b>Figure 14 :</b> Variation du nombre moyen de nodule par plantes en fonction des variétés et des sites	58
<b>Figure 15:</b> Aspect des bactéries nodulaires du pois chiche conservées	59
<b>Figure16 :</b> Etat de pureté des ADNs des souches DS39 (A) et Sam 29 (B) détecté par le nanodrope	68
<b>Figure17 :</b> Profil de migration des ADNs des différents isolats (Sam1-	68



## Liste des figures

---

Sam45), sur un gel de 0,8% d'agarose	68
<b>Figure 18:</b> Profils électrophorétiques des amplifiats des gènes ADN <sub>r</sub> 16S (a), <i>recA</i> (b), <i>nodC</i> (d), <i>nifH</i> (e) et le fragment IGS (c), pour quelques isolats nodulaires du pois chiche sur un gel d'agarose à 1%	69
<b>Figure19 :</b> Proportion des rhizobias et des non rhizobias nodulaires du pois chiche	71
<b>Figure 20 :</b> Distribution des rhizobias et non rhizobias par site	71
<b>Figure 21:</b> Distribution des rhizobias et des non rhizobias par variété	72
<b>Figure 22 :</b> Contribution de différents genres dans le groupe des bactéries non rhizobiums nodulaires du pois chiche	74
<b>Figure 23 :</b> Genres de rhizobium intra nodulaires du pois chiche selon l'ADN <sub>r</sub> 16S	74
<b>Figure 24 :</b> Nodules obtenus par test de nodulation	75
<b>Figure 25 :</b> Distribution des genres de rhizobium sur les sites	76
<b>Figure 26:</b> Distribution des genres de rhizobium sur les variétés	77
<b>Figure27 :</b> Distribution des variétés hôtes du microsymbiote sur les sites	77
<b>Figure 28 :</b> Proportion des souches dans le genre <i>Mesorhizobium</i> selon différents locus	85
<b>Figure 29:</b> Nombre de génotypes par locus selon le nombre de bactéries analysées	86
<b>Figure 30 :</b> Répartition des mesorhizobiums et des rhizobiums totaux sur les sites	89
<b>Figure 31:</b> Distribution des espèces et génotypes <i>Mesorhizobium</i> par site	90
<b>Figure32 :</b> Distribution des espèces et génotypes <i>Mesorhizoium</i> sur les variétés	91
<b>Figure33 :</b> Proportion des souches <i>Ensifer</i> selon différents locus	97
<b>Figure 34:</b> phylogénie des séquences du gène <i>nifH</i> des différents <i>Ensifer meliloti biovars</i> et <i>E. medicae</i> par la méthode de vraisemblance.	99

## Liste des figures

---

<b>Figure 35</b> : Distribution des différents génotypes des bactéries <i>Ensifer</i> par sites	101
<b>Figure 36</b> : Distribution des différents génotypes des bactéries <i>Ensifer</i> sur les trois variétés	103
<b>Figure 37</b> : Proportion des souches <i>Rhizobium/Agrobacterium</i> selon différents locus	104
<b>Figure 38</b> : Distribution des différents génotypes des bactéries <i>Rhizobium/Agrobacterium</i> par sites	106
<b>Figure 39</b> : Distribution des différents génotypes des bactéries <i>Rhizobium/Agrobacterium</i> sur les trois variétés	107
<b>Figure 40</b> : Proportion des souches <i>Burkholderia</i> selon différents locus	108
<b>Figure 41</b> : Distribution des différents génotypes des bactéries <i>Burkholderia</i> sur sites	110
<b>Figure 42</b> : Distribution des différents génotypes des bactéries <i>Burkholderia</i> sur les trois variétés	111

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Quelques gènes impliqués dans la symbiose rhizobiums-légumineuses	14
<b>Tableau2 :</b> Légumineuses alimentaires cultivées en Algérie en 2012 (FAOSTAT, 2014)	26
<b>Tableau3 :</b> Production du pois chiche en Algérie durant les années 2012-2015 (FAOSTAT, 2017)	29
<b>Tableau 4 :</b> Espèces du genre <i>Mesorhizobium</i> (Laranjo et al., 2014 ; BISMIS-2014 ; LPSN 2017)	31
<b>Suite Tableau 4 :</b> Espèces du genre <i>Mesorhizobium</i> (Laranjo et al., 2014 ; BISMIS-2014 ; LPSN 2017)	33
<b>Tableau5 :</b> Caractères pédoclimatiques des sites prospectés	37
<b>Tableau 6 :</b> Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de différents fragments d'ADN.	45
<b>Tableau 7 :</b> Température d'hybridation des différents couples d'amorce et longueur estimée d'ADN à amplifier	46
<b>Tableau8 :</b> Caractères physicochimiques des sols	49
<b>Tableau 9 :</b> Classe texturale, acidité et décomposition de la matière organique des sols	51
<b>Tableau 10 :</b> Le nombre le plus probable en rhizobium (NPP)	52
<b>Tableau 11 :</b> Nombre de plante et de nodules obtenus	55
<b>Tableau 12 :</b> Nombre de nodules utilisés et d'isolats obtenus et retenus	60
<b>Tableau 13 :</b> Amplifias d'ADN obtenus selon les isolats	70
<b>Tableau 14 :</b> Les bactéries non rhizobium, présents dans les nodules du pois chiche	73
<b>Tableau 15 :</b> Résultats du test de nodulation des isolats	75
<b>Tableau 16 :</b> Espèces et génotypes des bactéries <i>Mesorhizobium</i>	87
<b>Tableau 17 :</b> Espèces, souches et génotypes du genre <i>Ensifer</i> selon les locus	100
<b>Tableau 18 :</b> Nombre d'isolats et nombre de génotypes par locus dans le genre <i>Rhizobium/Agrobacterium</i>	105

## Abréviations

ACC	1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
IGS	Séquence inter génique
ITGC	Institut technique des grandes cultures
<i>dnaK</i>	70 kDa molecular chaperone
LCO	Lipo-chitooligosaccharides
ACP	Analyse de la Composante Principale
<i>gltA</i>	Citrate synthase
PCR	Polymerase chain reaction
PGPB	Plant growth promoting bacteria
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
YEM	Yeast Extract-Mannitol
<i>atpD</i>	ATP synthase subunit $\beta$
<i>glnII</i>	Glutamine synthétase II
<i>nifH</i>	Nitrogenase Iron protein
<i>nod A</i>	N-acyltransferase nodulation protein A
<i>R.</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>S.</i>	<i>Sinorhizobium</i>
<i>E.</i>	<i>Ensifer</i>
<i>M.</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>A.</i>	<i>Agrobacterium</i>
<i>B.</i>	<i>Bradirhizobium</i>
MLSA	Multi-Locus Sequence Analysis
<i>recA</i>	DNA recombinase A
<i>nodC</i>	N-acetyl glucosaminyl transferase nodulation protein C
<i>dnaJ</i>	40kDa molecular chaperone (protéine de choc thermique)
ERIC	Enteric Repetitive Intergenic Consensus

<b>Introduction</b>	1
<b>Partie I: Revue bibliographique</b>	
<b>I-Symbiose légumineuses-rhizobium</b>	<b>5</b>
<b>1-Les partenaires de la symbiose</b>	<b>6</b>
1-1-Les légumineuses	6
1-1-1-Généralités	6
1-1-2-Intérêt des légumineuses	7
1-2-Les rhizobiums	7
1-2-1-Generalités	7
1-2-2-Génome des rhizobiums	8
1-2-3-Phylogénie des rhizobiums	9
1-2-4-Biogéographie des rhizobiums	11
<b>2-La mise en place de la symbiose: un dialogue moléculaire complexe</b>	<b>12</b>
<b>3- Génétique de la nodulation</b>	<b>13</b>
3-1-Génétique bactérienne de la nodulation	14
3-1- 1-Les gènes de nodulation	14
3-1-2-Les gènes de fixation d'azote	16
3-1-2-1-Les gènes <i>nif</i>	16
3-1-2-2- Gènes <i>fix</i> et gènes <i>dct</i>	17
3-2-Génétique de la nodulation chez la légumineuse	17
<b>4-Spécificité symbiotique</b>	<b>18</b>
<b>5- Facteurs biotiques et abiotiques conditionnant la nodulation</b>	<b>21</b>
5-1-Facteurs abiotiques de stress: pH, eau et sel	21
5-1-1-Le pH	21
5-1-2-L'eau	22
5-1-2- La salinité	22
5-2-Les éléments minéraux	23
5-2-1- L'azote	23
5-2-2- Le phosphore	23
5-2-3-Le potassium, soufre et molybdène	24
5-3-Facteurs biologique du sol	24
5-3-1-Effet de la taille de la population des rhizobiums	24
5-3-2-Effet des bactéries amélioratrices de la croissance des plantes	24
5-4-Effet des facteurs culturaux	25
<b>II-Notre modèle d'étude, le pois chiche en Algérie</b>	<b>25</b>
1-Aperçu sur l'agriculture et les légumineuses en Algérie	25
2-Généralités sur le pois chiche ( <i>Cicer-arietinum L.</i> )	26
3-Importance du pois chiche	28

4-Situation des pois chiches cultivés en Algérie	29
5-Genre du symbiote nodulant le pois chiche : <i>Mesorhizobium</i>	32
6- Diversité des rhizobiums nodulant le pois chiche ( <i>Cicer-arietinum L.</i> )	34

---

## **Partie II: Matériel et méthodes**

---

<b>I-Zones d'études</b>	<b>36</b>
1-Localisation et données pédoclimatiques des sites prospectés	36
2-Echantillonnage des sols	37
3- Analyses physicochimiques des sols	38
<b>II Culture du pois chiche et obtention de nodules et des bactéries nodulaires</b>	<b>38</b>
<b>1-Graines et conditions des cultures</b>	<b>38</b>
1-1- Variétés de pois chiche utilisées	38
1-2-Préparation des graines	39
1-3- Dispositifs et conditions de culture	39
<b>2- Piégeage des bactéries nodulaires du pois chiche</b>	<b>40</b>
<b>3- Estimation du nombre le plus probable (NPP) des rhizobiums</b>	<b>40</b>
3-1-Suspension de sol et inoculation des graines de pois chiche	40
3-2-Calcul du NPP	41
<b>4-Obtention d'une collection de nodules</b>	<b>41</b>
3-1- collecte des jeunes nodules	41
3-2-Conservation des nodules	42
<b>5-Isolement de bactéries intra nodulaires</b>	<b>42</b>
5-1- stérilisation des nodules	42
5-2- Isolement, purification et stockage des isolats	42
5-3-Caractérisation morphologique des bactéries retenues	43
<b>6-Test de nodulation</b>	<b>43</b>
<b>III-Charactérisation moléculaire des bactéries nodulaires du pois chiche</b>	<b>43</b>
<b>1-Obtention des échantillons d'ADN</b>	<b>43</b>
1-1-Extraction et conservation d'ADN	43
1-2-Qualité de l'ADN extrait	44
1-2-1- Caractérisation par Nanodrop	44
1-2-2 Caractérisation par électrophorèse	44
<b>2- Amplification de l'ADN</b>	<b>45</b>
2-1-Les fragments d'ADNs à analyser	45
2-2- Amorces utilisées	45
2-3- La solution mixte de l'amplification	46
2-4- Conditions de l'amplification	46
2-5- Vérification de la qualité des amplifias	47
<b>3- Séquençage des amplifias</b>	<b>47</b>

<b>IV Analyse des donnés</b>	48
1-Identification des isolats et correction des séquences	48
2-Etude phylogénique des isolats	48

---

## **Partie III : Résultats et discussions**

---

### **Chapitre 1 : Caractères des sites d'étude et des bactéries nodulaires du pois chiche isolées**

---

<b>I-Résultats</b>	49
<b>1-Caractérisation du sol</b>	49
1-1-Analyses physicochimiques	49
1-1-1-Analyse granulométrique	49
1-1-2- pH des sols	50
1-1-3-Carbone total, Azote total et rapport C/N	50
1-2- Analyse microbiologique : le nombre le plus probable en rhizobium	51
1-3-Analyse en composante principale (ACP) du sol et effet des paramètres abiotiques sur le NPP	53
<b>2- Piégeage et isolement des bactéries nodulaires</b>	56
2-1-Plantes et nodules du piégeage	56
2-1-1-plantes obtenues	56
2-1-2- Nodules obtenus	56
2-1-3-Interactions sites – variétés pour la formation des nodules	58
2-2-Isolement des bactéries intra nodulaires du pois chiche	58
2-2-1- Nodules utilisés pour l'isolement des bactéries	58
2-2-2-Isolats intra nodulaires obtenus	59
2-2-2-1-Caractère culturaux des bactéries retenues	59
2-2-2-2- Nombre d'isolats retenus	59
<b>II- Discussions</b>	61
<b>III-Conclusion</b>	67

---

### **Chapitre 2 : Caractérisation moléculaire des isolats obtenus**

---

<b>I-Résultats</b>	68
<b>1-Qualité d'ADN</b>	68
<b>2-Amplifias et séquences obtenus</b>	69
<b>3-Les bactéries nodulaires du pois chiche</b>	71
3-1-Identification via l'ADNr 16S	71
3-2-Repartition des deux types de bactéries nodulaires	71
3-2-1-Repartition par sites	71
3-2-2 Répartition par variété	72
3-3- Bactéries non rhizobiums obtenus	72
3-4- Bactéries rhizobiums obtenus	74
3-4-1-Identification au niveau du genre	74
3-4-2-Test de nodulation	76
3-4-3-Structuration des genres de rhizobium obtenus	76

3-4-3-1-Distribution des genres de rhizobium sur les sites	76
3-4-3-2- Distribution des genres de rhizobium sur les variétés	77
3-4-3-3-Distribution des variétés hôtes sur les sites	77
<b>II-Discussion</b>	78
<b>III-Conclusion</b>	83

---

### **Chapitre 3 : Etude de la diversité et de la biogéographie du *Mesorhizobium* nodulaire du pois chiche**

---

<b>I-Résultats</b>	84
<b>1-diversité du <i>Mesorhizobium</i></b>	84
1-1-Manuscrit 1 (publié)	84
1-2-Résultats supplémentaires	84
1-2-1- souches non citées dans l'article	84
1-2-2- Fiabilité des ADN analysés dans la mise en évidence de la diversité	85
1-2-2-1-Mise en évidence des espèces	85
1-2-2-2- Diversité intra espèces	86
1-3- Diversité globale et génotypes du <i>Mesorhizobium</i>	86
<b>2- Biogéographie du <i>Mesorhizobium</i> nodulant le pois chiche</b>	88
2-1- Distribution du <i>Mesorhizobium</i> par rapport aux sites	88
2-1-1- Structuration du <i>Mesorhizobium</i> par rapport aux autres genres du rhizobium	88
2-1-2- Distribution du <i>Mesorhizobium</i> par site	89
2-2-Distribution du <i>Mesorhizobium</i> par variété	91
<b>II-Discussions supplémentaires</b>	92
<b>III-Conclusion</b>	96

---

### **Chapitre 4 : Etude de la diversité et de la biogéographie des autres genres nodulaires du pois chiche**

---

<b>I-Résultats</b>	97
<b>1-Etude du genre <i>Ensifer</i></b>	97
1-1- Espèces détectées et fiabilité des ADNs analysés	97
1-2- Génotypes détectés	98
1-3-Analyse phylogénique du <i>nif H</i>	100
1-4- Distribution des génotypes des bactéries <i>Ensifer</i>	101
1-4-1- Distribution par sites	101
1-4-2- Distribution par variétés	102
<b>2- Etude du genre <i>Rhizobium/Agrobacterium</i></b>	103
2-1-Espèces détectées et fiabilité des ADNs analysés	103
2-2- Génotypes détectés	105
2-3- Distribution des génotypes des bactéries <i>Rhizobium/Agrobacterium</i>	105
2-3-1-Distribution par sites	105
2-3-2-Distribution par variétés	107
<b>3-Etude du genre <i>Burkholderia</i></b>	108



3-1- Espèces détectées et fiabilité des ADNs analysés	108
3-2- Génotypes détectés	109
3-3- Distribution des génotypes des bactéries <i>Burkholderia</i>	110
3-3-1- Distribution par sites	110
4-3-2- Distribution par variétés	111
<b>II-discussion</b>	112
<b>III-conclusion</b>	118
<b>Discussion générale, conclusion générale et perspectives</b>	119
<b>Références bibliographiques</b>	135
<b>Annexes</b>	

# *Introduction*

## **Introduction**

Dans les zones arides et semi arides du bassin méditerranéen, la productivité végétale et le rendement agricole sont limités par plusieurs facteurs abiotiques, parmi lesquels la pauvreté des sols en azote constitue l'un des facteurs majoritaires.

De par sa position et par l'immensité de son territoire (environ 238 millions d'hectares), l'Algérie constitue un pays méditerranéen incontournable d'Afrique du Nord. Malheureusement seulement 3,3% de sa superficie totale est utilisée pour la production agricole (FAOSTAT, 2014). La concentration de l'activité agricole en Algérie dans la zone pluvieuse du nord, mais aussi une croissance démographique rapide qui impacte énormément ce pays, entraînent des pressions importantes sur les ressources de la terre, surtout celles à profil agricole. Tout cela a engendré une nouvelle situation caractérisée par la réduction et la dégradation du couvert végétal et donc des contraintes économiques et écologiques majeures entraînant des rendements faibles des différentes cultures. Toutefois, parmi les programmes et les politiques nationales initiées depuis quelques temps, ceux ayant comme objectifs une production agricole durable, une meilleure protection de l'environnement et un développement rationnel des ressources naturelles, figurent dans les priorités. Ces programmes souhaitent optimiser la mise en valeur des terres non cultivées en zones arides et semi-arides par les plantations à base d'espèces végétales endémiques ou adaptées aux conditions biotiques et abiotiques des sols algériens.

Actuellement les légumineuses se trouvent au centre des préoccupations des instances internationales. En plus à leurs intérêts agronomiques, alimentaires et écologiques, leur importance est due entre autres à leur contribution, chaque année, à la fixation d'environ 65 millions de tonnes d'azote atmosphérique intégrés dans la biosphère (Danso, 1995 ; Graham et Vance, 2003). Cette fixation d'azote est réalisée en association avec les bactéries du sol collectivement appelées rhizobiums. Suite à un dialogue moléculaire entre les deux partenaires, les rhizobiums colonisent le système racinaire via les poils absorbants, induisent la formation et colonisent des structures particulières appelées nodules sur les racines des plantes. A l'intérieur des nodules, les rhizobiums se différencient et fixent l'azote libre de l'air (sous forme de di azote  $N_2$ ) et le fournissent à la plante sous une forme assimilable, contre une nutrition carbonée et une niche écologique (Raven *et al.*, 2000). Ainsi l'inoculation des légumineuses par des rhizobias efficaces est devenue un moyen efficace et pratique pour un bon enrichissement de sols pauvres en azote. Actuellement l'inoculation est appliquée dans

plusieurs pays, notamment au Brésil où l'inoculation du soja (*Glycine max L.*) permet une grande économie d'engrais azotés (Santos *et al.*, 2006). Malheureusement en Algérie, l'inoculation est peu connue et n'est utilisée qu'à titre expérimental.

En Algérie, le pois chiche (*Cicer arietinum L.*), est la seconde légumineuse alimentaire produite après les fèves. Sa culture a connue depuis l'indépendance une évolution progressive sur le plan des superficies et de la consommation, mais une régression en termes de productivité. Les causes d'ordre agro- techniques de cette régression (Hamadache et Ait Abdallah, 1998), sont souvent discutées alors que les causes symbiotiques le sont beaucoup plus rarement.

Depuis l'année 2008, des efforts importants des cultivateurs et des responsables de l'agriculture ont permis une augmentation remarquable en rendement du pois chiche passant de 5506 en 2008 à 9055 hectogrammes par hectares (hg/ha), en 2012. Cette amélioration en rendement est remarquée aussi pour les années qui ont suivis, surtout pour les années 2013 (11930 hg/ha) et 2015 (10690 hg/ha). Cette amélioration a été obtenue au prix d'une augmentation de la surface de culture et d'une utilisation des semences d'hivers moins couteuses. Malgré tous ces efforts le rendement du pois chiche est toujours insuffisant par rapport aux besoins du pays, ce problème devrait être traité par d'autres solutions innovantes (FAOSTAT, 2014, 2016 et 2017).

L'introduction de cultivars étrangers de pois chiche à haut rendement mais non adaptés aux sols algériens est l'un des facteurs explicatif les plus importants des rendements insuffisants enregistrés jusqu'à présent. Sachant qu'il existe encore à l'échelle du pays un patrimoine local de légumineuses fourragères et alimentaires ayant une bonne adaptation aux conditions du climat méditerranéen et adapté aux contraintes biotiques et abiotiques des sols algériens (Sadiki et Halila, 1997), l'exploitation de ces ressources doit être entreprise afin de développer une stratégie de recherche pour l'amélioration de la fixation symbiotique d'azote en Algérie. D'un autre coté la présence d'une grande diversité de rhizobiums autochtones capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote efficaces représente une opportunité pour optimiser la production des légumineuses et un facteur de développement d'une agriculture biologique respectueuse de l'environnement. Sachant que les régions arides et semi-arides du continent africain constituent un réservoir important de souches adaptées aux stress environnementaux (Mpeperekki *et al.* 1997), ces souches peuvent être isolées, caractérisées et évaluées pour leurs performances symbiotiques afin de sélectionner un inoculum efficace et utilisable dans des différentes régions de l'Algérie.

Afin de sélectionner ces souches, la connaissance préalable des caractéristiques taxonomiques et écologiques des populations des rhizobiums Algériens nodulant dans notre cas le pois chiche est nécessaire. L'utilisation de variétés de plante adaptées aux climats méditerranéens et aux conditions abiotiques du pays faciliterait sans doute le piégeage de leurs symbiotes nodulaires.

Ainsi, dans cette étude, nos objectifs consistaient à examiner et à explorer pour la première fois la diversité et la biogéographie des rhizobiums du pois chiche en Algérie, considérant l'Est Algérien comme un cas d'étude.

Notre démarche a consisté à étudier neuf sites différents situés dans l'Est de l'Algérie. Les rhizobiums ont été isolés à partir des nodules obtenus par piégeage sur trois variétés d'hiver de type kabuli sur les 9 sols des régions examinés. Les 9 sites choisis sont des représentants de différentes zones climatiques allant du climat humide, semi-aride à aride. Ces sols n'avaient jamais été cultivés. La diversité des rhizobias constituant notre collection a été évaluée en fonction de données phylogénétiques par analyse moléculaire de quatre gènes : ADN ribosomique 16S, *recA*, *nodC*, *nifH* et la région inter génique 16S-23S (IGS). L'approche taxonomique phylogénétique dans cette étude a consisté à comparer ces souches avec les espèces et souches nodulant les légumineuses déjà décrits dans la littérature.

Parallèlement à l'analyse de la diversité, cette thèse traite la structuration des symbiotes du pois chiche sous l'influence de différents paramètres environnementaux, biotiques et abiotiques. En ce qui concerne les conditions biotiques, l'étude porte sur plusieurs points dont:

- l'influence du génotype végétal représenté par trois variétés du pois chiche ;
- l'influence de la compétitivité bactérienne entre les espèces et au sein de la même espèce dans un même site et pour un même génotype de l'hôte ;
- l'influence du taux d'abondance des rhizobiums autochtones par site.

Pour les paramètres abiotiques, nous avons limité nos recherches à l'influence de certains paramètres physico-chimiques du sol et à l'influence des caractères climatiques des sites.

Nous avons profité de l'analyse de ces différents points pour estimer des couples symbiotiques (variété-rhizobium) performants pour une bonne nodulation de pois chiche dans certains sites Algériens. Ceci est devenu alors un des objectifs soulignés dans cette étude.

Trois grandes parties sont illustrées dans cette présente thèse, la première correspond à une synthèse bibliographique permettant de situer le travail dans son contexte scientifique. Les deux autres parties, traitent le travail expérimental et décrivent successivement le matériel et les méthodes utilisées pour chaque étape de travail (partie II) ainsi que les résultats obtenus et les discussions correspondantes (partie III). Nous notons que la partie III est divisée en quatre chapitres dont les résultats sont complémentaires, la fin de cette partie est consacrée à une discussion générale, une conclusion générale et les perspectives soulignées.

*Partie I :*  
*Revue bibliographique*

## I-Symbiose légumineuses-rhizobiums

Dans leur environnement les organismes vivants sont en interaction permanente les uns avec les autres. Certaines de ces interactions sont stables dans le temps et ont un impact sur le déroulement de la vie de l'un ou des deux organismes impliqués. La symbiose entre la famille des légumineuses et les bactéries dites rhizobiums représente un modèle de mutualisme, c'est-à-dire une interaction à bénéfices réciproques entre les partenaires. Au cours de cette interaction, le végétal fournit des composés nutritifs à la bactérie, celle-ci fixe l'azote de l'air et le fournit à son hôte (Rave *et al.*, 2000). Cette symbiose, affecte donc l'agriculture en augmentant la productivité des cultures sans addition d'engrais et par conséquent réduit la pollution (Freiberg *et al.*, 1997).

Grâce à ce type de symbiose, une importante économie d'engrais azotés peut être réalisée. A titre d'exemple, au Brésil, l'inoculation du soja (*Glycine max L.*) aux champs fournit jusqu'à 300 kg N/ha, ce qui entraîne des économies d'engrais azotés estimées à 3 milliards de dollars (Santos *et al.*, 2006).

La symbiose légumineuses-rhizobiums se caractérise par la formation d'un nouvel organe protecteur, le nodule, au sein duquel se déroule la fixation d'azote se résumant par la réduction de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) sous forme ammoniacale (Dommergues *et al.*, 1999). Les nodules se trouvent sur les racines ou plus rarement disposés le long de la tige, mais quelques genres de légumineuses tropicales tels que *Aeschynomene* (Alazard et Duhoux, 1988) et *Sesbania* (Dreyfus et Dommergues, 1981), portent des nodules à la fois sur les racines et sur les tiges.

En dehors des légumineuses, seul un petit nombre d'espèces végétales possèdent des nodules fixateurs d'azote. C'est le cas de la symbiose réalisée entre une plante actinorhizienne et des actinomycètes du genre *Frankia* (Benson et Silvester, 1993).

La mise en place de la symbiose légumineuse –rhizobium est un processus assez complexe. La formation de nodosités survient quand les rhizobiums pénètrent leurs hôtes d'une manière strictement coordonnée et contrôlée. Chacun des deux partenaires possède certains gènes qui ne sont exprimés ou influencés qu'en présence de l'autre (Djordjevic *et al.*, 1987).



# 1-Les partenaires de la symbiose fixatrice d'azote

## 1-1-Les légumineuses

### 1-1-1-Généralités

La famille des légumineuses est très diverse avec 3 sous-familles: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae* (Doyle et Luckow, 2003) et compte environ 20.000 espèces (Gepts *et al.*,2005). La sous famille des *Papilionoideae* regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement: le soja (*Glycine max*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*), la luzerne (*Medicago sativa*), l'arachide (*Arachi shypogaea*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), ou encore la fève (*Vicia faba*). Ces légumineuses cultivées se placent dans deux groupes taxonomiques distincts appelés *Galegoïdes* et *Phaseoloïdes* (Figure 1), à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des *Aeschynomeneae* (Broughton *et al.*,2003).

Les légumineuses occupent la deuxième place, après les céréales, en termes de surfaces cultivées et de production. Selon les données de la FAOSTAT, en 2014, la production mondiale des légumineuses sèches est estimée à 71354787 tonnes pour une superficie de 79272315 hectares. Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) et animale (soja, luzerne,...).

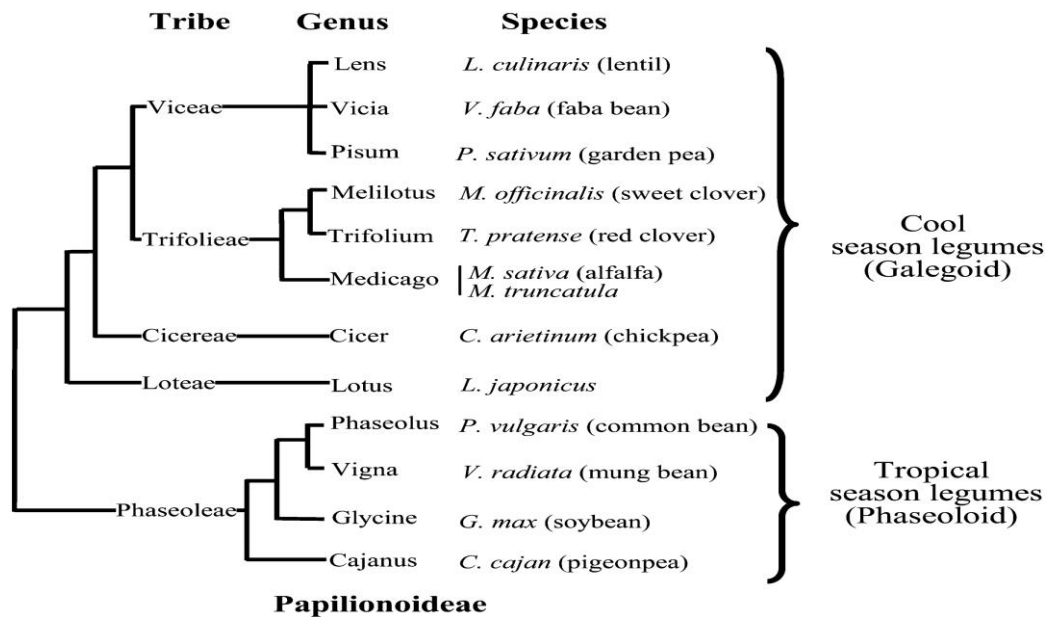


Figure 1: Classification des légumineuses de la famille des *Papilionoideae* (Zhu *et al.*,2005)

## **1-1-2-Intérêt des légumineuses**

Le grand intérêt des légumineuses provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. On estime que la réduction biologique de l'azote atmosphérique N<sub>2</sub> en ammonium fournit environ 65% de l'azote disponible dans la biosphère (Lodwig *et al.*, 2003). Selon Danso, (1995) la majorité de cet azote est apportée par la symbiose rhizobiums-légumineuses, leur fixation est estimée avec un taux allant de 10 à 300 kg de N<sub>2</sub> par hectare et par an (Lindström *et al.*, 2010). Cette fixation permet aux légumineuses de produire en abondance des protéines végétales (18 à 30 % de la graine sèche) constituant ainsi une source très importante et peu coûteuse dans l'alimentation humaine et animale (Baudoin, 2001).

Cette réserve d'azote stockée dans les graines, les feuilles ou les nodules, reste plus longtemps disponible dans les sols comparativement à l'azote minéral rapidement lessivé par les eaux de pluie. Cela représente le meilleur moyen de maintenir la fertilité des sols agricoles dans le cadre d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement sans faire appel à l'utilisation coûteuse d'engrais azotés. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent ainsi bénéficier directement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés (Baudoin, 2001).

Les légumineuses non cultivées, en plus de leur contribution à la fixation symbiotique de l'azote, constituent un potentiel de contrôle de l'érosion des sols (Ahmad *et al.*, 1984) et peuvent fournir un couvert végétal pour les terres dégradées ou en cours de dégradation (Jha *et al.*, 1995). Enfin elles servent également de cultures de fourrages, d'engrais verts et produisent un grand nombre de composés utiles comme des médicaments, des teintures et des parfums.

## **1-2-Les rhizobiums**

### **1-2-1-Generalités**

Par convention, on nomme « rhizobium » toute bactérie, quel que soit son genre, capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec une légumineuse. En général, les rhizobiums sont aérobies ou anaérobies facultatifs de Gram négatif, sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire et deux à six flagelles péritriches. Leur croissance est optimale à une température de 28-30°C et un pH situé entre 6 et 7 (Vincent, 1970).

Le rhizobium peut exister sous forme de saprophyte hétérotrophe ou sous forme de symbiote avec des légumineuses spécifiques. Dans le sol, le rhizobium libre peut être présent avec un

taux de l'ordre de  $10^6$  à  $10^{10}$  rhizobiums par gramme de sol, en fonction de la saison, de l'histoire la culture et des pratiques agricoles. Lorsqu'il est ensymbiose avec son hôte, les nodules peuvent le contenir à plus de  $10^{10}$  cellules par gramme de nodule (Mc. Dermott et al., 1987).

Les rhizobiums ont été décrits pour la première fois par Martinus Beijerinck à partir d'un nodule de racine d'une légumineuse (Beijerinck, 1888) et, depuis, leur étude s'est considérablement enrichie. En 2012, on comptait plus de 98 espèces décrites (Weir, 2012), ce nombre étant en augmentation constante en raison de la grande diversité des légumineuses et aux progrès technologiques dans chacun des trois critères utilisés en taxonomie, à savoir la morphologie, la physiologie et surtout l'analyse des séquences moléculaires.

La plupart des rhizobiums appartient à la classe des  $\alpha$ -proteobacteriacea et inclue une grande diversité de genres: *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Rhizobium* (Frank, 1889), *Ensifer* (Young, 2003) (anciennement *Sinorhizobium*), *Devosia* (Vernans, et al., 2010), *Methylobacterium* (Abdoulaye et al., 2001), *Ochrobactrum* (Zurdo-Pineiro et al., 2007), *Phyllobacterium* (Mantelin et al., 2006) et plus récemment *Aminobacter* (Maynaud, 2012), *Microvirga* (Ardley, 2012) et *Shinella* (Lin et al., 2008).

Récemment, les espèces de rhizobiums appartenant à la classe de  $\beta$ -proteobacteriacea ont été décrites. Cette classe comprend actuellement trois genres, à savoir : *Burkholderia* (Moulin et al., 2001), *Cupriavidus* (Chen et al., 2001) et *Herbaspirillum* (Valverde et al., 2003).

Des études avaient enfin suggéré l'existence de rhizobium appartenant à la branche des gamma-protéobactéries (Benhizia et al., 2004), mais aucune conclusion finale n'a pu être formellement établie à ce jour. Ce point reste donc aujourd'hui non validé.

### **1-2-2-Génomme des rhizobiums**

Les éléments de base du génome du rhizobium, correspondent aux gènes de ménage, qui sont nécessaires pour le bon fonctionnement de la cellule et pour la maintenance du métabolisme de base. Les éléments accessoires du génome du rhizobium sont responsables pour des fonctions spéciales qui ne sont pas essentielles pour le fonctionnement, telle que la symbiose ou autre types d'adaptation écologique (Young et al., 2006).

Bien que la plupart des gènes de ménage soient situés dans le chromosome, il a été démontré que, chez *Ensifer meliloti* (ou *Sinorhizobium meliloti*), le plasmide Sym porte également

certaines gènes essentiels (Galibert et *al.*, 2001), ce qui a amené des auteurs à l'appeler « chromid » (combinaison de plasmide et chromosome) (Harrison et *al.*, 2010).

La plupart des gènes impliqués dans la symbiose sont situés sur des plasmides de symbiose (Psym) (Sullivan et *al.*, 2002), comme les cas de *E.meliloti* (Finan et *al.*,2001), *Rhizobium.etli* (González et *al.*,2003), et *Mesorhizobium amorphae* (Wang et *al.*,1999). Ces gènes peuvent également être situés sur un îlot chromosomique comme dans le cas de *Mesorhizobium loti* (Sullivan et *al.*,1995) et *Bradyrhizobium japonicum*( Kaneko et *al.*,2002 (a, b)).

Des importantes différences concernant la taille de chromosome et le nombre de plasmides sont observées dans les génomes des espèces du rhizobium. Par exemple, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 possède un chromosome avec une taille de 9.11Mbp et aucun plasmide (Kaneko et *al.*, 2002(a, b)), tandis que *R.etli CFN42* possède un chromosome de 4.38Mbp et six plasmides allant de 0.184Mbp à 0.642Mbp (González et *al.*, 2003). Les variations du nombre de plasmides sont classiques, que cela soit entre espèces, mais aussi au sein d'une même espèce.

### 1-2-3-Phylogénie des rhizobiums

Bien qu'il est rapporté que l'utilisation des profils de restriction des sequence de l'ADNr 16S est une technique rapide pour identifier les rhizobias (Laguerre et *al.*, 1994), d'autres études ont rapporté que le gène de l'ARNr 16S a une utilité limitée dans la distinction des espèces de rhizobium très proches, comme dans le cas de certaines espèces de *Mesorhizobium* (Alexandre et *al.*,2008). Ceci est expliqué par la conservation très élevée de sa séquence. A cause de ces inconvénients, la recherche d'autres gènes capables de raconter une histoire évolutive des espèces bactériennes était nécessaire.

Selon plusieurs études, la phylogénie basée sur les gènes de ménage constitue une bonne base biologique pour la taxonomie des rhizobias (Martens et *al.*,2007; 2008; Vinuesa et *al.*, 2008). Dans la plupart des cas, ces phylogénies, montrent une résolution plus fiable mais concordante avec celle basée sur le gène ARNr 16S (Thompson et *al.*,2004). Les gènes de ménage les plus utilisés dans l'étude phylogénique des rhizobiums sont les gènes: *recA* codant pour la protéine recombinase A, *atpD* impliqué dans la production d'ATP (Gaunt et *al.*, 2001), *glnII* codant pour la glutamine synthétase II (Turner & Young, 2000) , *dnaK* (70 kDa molecular chaperone), (Stepkowski et *al.*, 2003) et *gltA* codant pour la citrate synthase (Hernandez-Lucas et *al.*, 2004).

Inversement, les gènes de symbiose peuvent avoir une histoire évolutive indépendante des autres gènes, leur comparaison phylogénétique avec des gènes de base révèle des transferts latéraux entre espèces et genres de rhizobium (Ueda et al., 1995 ; Sullivan et al., 1995 ; Martinez-Romero et Cabarello-Mellado, 1996 ; Haukkaet al., 1998; Wernegreen et Riley, 1999 ; Laguerre et al., 2001; Moulinet al., 2001; Vinuesa et al., 2005, Tan et al., 2012). Ce sont donc des caractères inappropriés pour définir les espèces, mais qui peuvent et doivent être utilisés pour les descriptions de biovars (Laguerre et al., 2001; Silva et al., 2003; Vinuesa et al., 2005).

Dans la majorité des études caractérisant les rhizobiums, une combinaison d'analyses de gènes de ménage et de symbiose est utilisée. Cette analyse est souvent accompagnée d'une étude des relations évolutives entre les rhizobiums par comparaisons des séquences du gène ARNr 16S malgré ses inconvénients (Olsen et Woese, 1993 ; Zhang et al., 2012 (b)), (Figure 2).

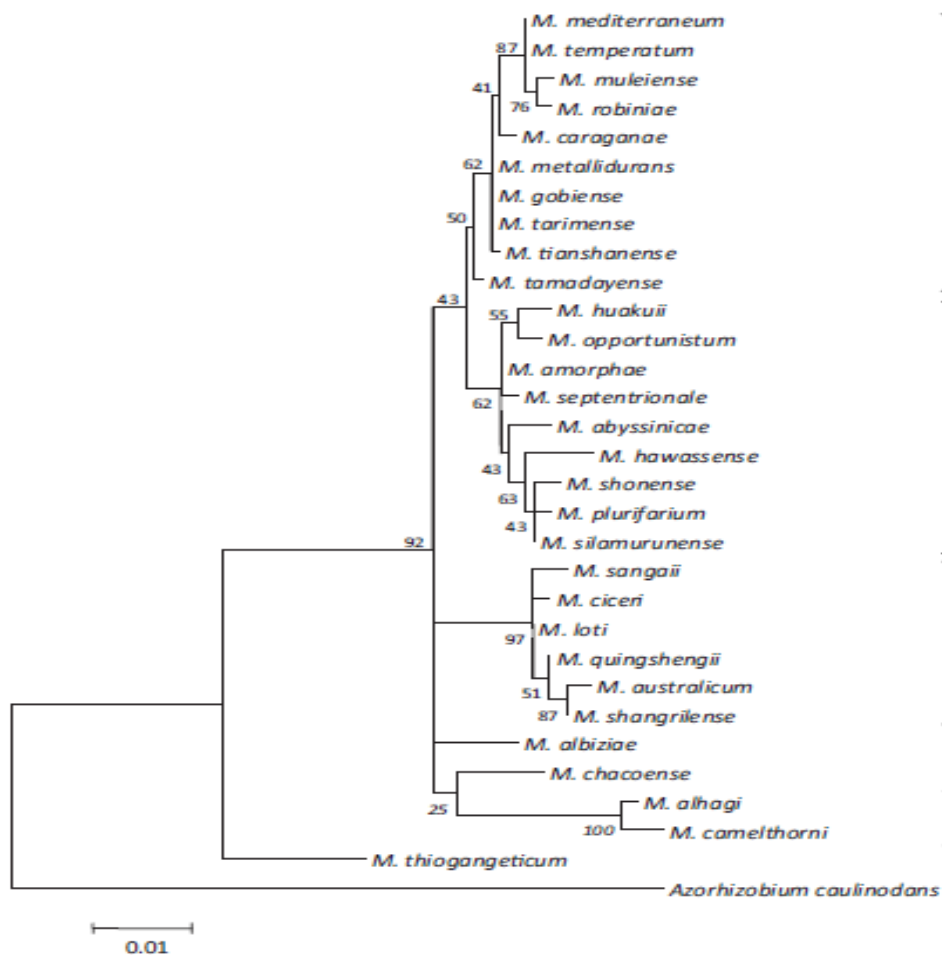


Figure 2 : Arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance), basé sur les séquences de gènes ADNr 16S, montrant les relations phylogénétiques entre différentes espèces de *Mesorhizobium* sous le modèle Tamura 3-parameter. *Azorhizobium caulinodans* est utilisée hors du groupe (Laranjo et al., 2014).

### 1-2-4-Biogéographie des rhizobiums

La biogéographie peut être définie comme "l'étude spatio-temporelle des diversités biologiques, de leur origine, de leur évolution et de leur régulation dans des espaces hétérogènes et changeants" (Blondel, 1995). Alors que ce domaine est central pour la compréhension de l'évolution de la biodiversité en fonction des paramètres du milieu, le déterminisme de la distribution spatiale des micro-organismes à petite, comme à grande échelle, est très peu documentée. L'essentiel des résultats obtenus jusqu'à présent repose sur l'influence de certaines caractéristiques du sol telles que l'acidité (Fierer et Jackson, 2006 ; Dequiedt et *al.*, 2009) ; la texture (Zhou *et al.*, 1996), l'âge (maturité du sol) (Tarlera *et al.*, 2008), la saison et la concentration en nutriments (Herfort *et al.*, 2007), la salinité (Lozupone et Knight, 2007) du sol ou la combinaison de facteurs environnementaux, temporels et géographiques sur la taille et la diversité microbienne (Yannarell et Triplett, 2005).

Les associations entre les plantes et les symbiotes du sol sont de bons modèles pour tester des hypothèses basées sur l'impact des espèces hôtes et des facteurs environnementaux sur la dynamique écologique et évolutive des communautés du sol (Thrall *et al.*, 2007), d'autant plus que ces associations sont connues pour leurs variabilité importante au niveau de leur spécificité et de leur efficacité (Burdon *et al.*, 1999; Thrall *et al.*, 2000). En dépit d'une croissance de la compréhension de l'importance de communautés du rhizobium du sol, peu de réflexion est donnée quant aux causes de leur distribution géographique.

Parmi les études réalisées dans ce contexte, celle de Parker et ses collègues a été menée sur long terme (Parker 1995, 1999; Wilkinson et Parker, 1996 ; Parker & Spoerke, 1998 ; Parker *et al.*, 2004), portait sur la légumineuse du genre *Amphicarpaea* et sur son symbiote *Bradyrhizobium sp.*. Cette étude a montré que la vaste variation de spécificité génotypique des associations symbiotiques existe au niveau des échelles spatiales régionales et géographiques. Dans le même cadre, d'autres études ont montré que les distributions de lignées de rhizobium dans des gammes géographiques d'hôte sont été davantage influencées par les variations génétiques de l'hôte (Parker & Spoerke, 1998 ; Wang *et al.*, 2009), des animaux (Humphries *et al.*, 2002) et par des facteurs de sol (Han *et al.*, 2009), de manière similaire aux bactéries libres (Fierer, *et al.*, 2006).

Dans ces types d'études, l'influence de la plante a pris une part assez importante. Au sein d'une même espèce végétale, la diversité génétique de la plante-hôte influence la structure de la diversité génétique des populations de rhizobia associées (Carelli *et al.*, 2000; Depret *et*

Laguerre, 2008; Tian *et al.*, 2007). Aussi, la promiscuité d'une espèce d'une plante peut avoir une incidence sur sa capacité à se développer sur différents sols par rapport à la dispersion géographique de ses partenaires symbiotiques. Les chercheurs Béna *et al.*, (2005) ont suggéré que la portée géographique de plusieurs espèces de *Medicago* étaient une contrainte par la distribution de leurs partenaires symbiotiques, ce qui n'était pas le cas pour d'autres espèces du même genre (*Medicago*) montrant une promiscuité plus large.

L'étude de Zhang *et al.*, (2011), contribue à clarifier la biodiversité et la biogéographie des rhizobiums du soja dans la plaine de Chine du Nord, en rapportant que le genre *Ensifer* est le plus dominant dans les sols alcalins-salins, cependant le genre *Bradyrhizobium* est plus abondant dans les sols neutres.

## 2-La mise en place de la symbiose: un dialogue moléculaire complexe

C'est Beyerinck qui a fourni la première preuve que les bactéries étaient à l'origine de la formation des nodosités, en infectant avec des cultures pures d'organismes provenant des nodosités de *Vicia faba* des plants de fève cultivées sur un sol stérile (Beyerinck, 1888, 1890). La formation de nodosités nécessite une reconnaissance génétique se traduisant par un dialogue moléculaire entre les deux partenaires (Djordjevic *et al.*, 1987; Limpens et Bisseling, 2003), (Figure3).

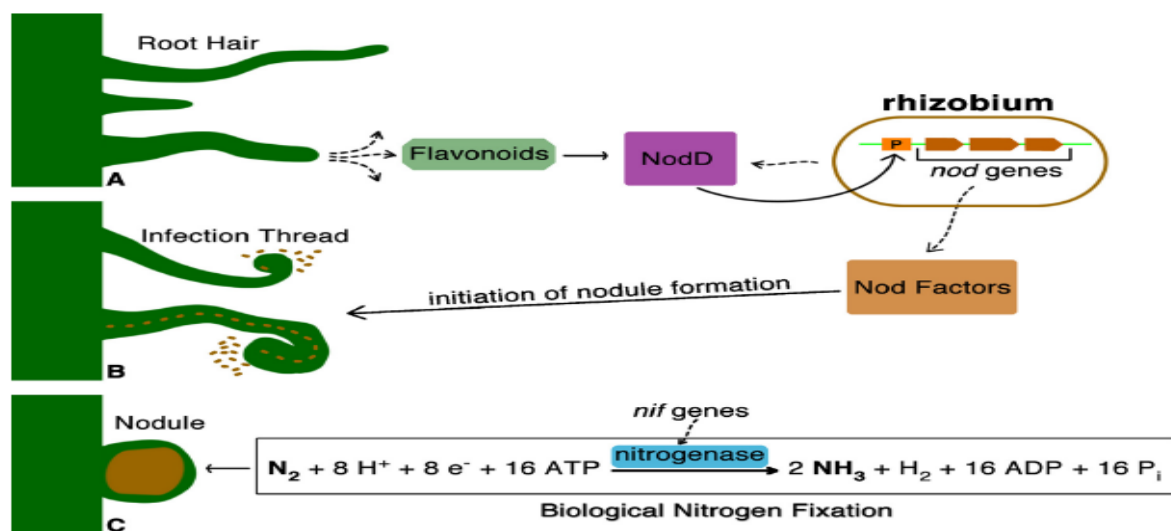


Figure3: Mise en place de la symbiose légumineuse – rhizobium et fixation d’azote (Laranjo *et al.*, 2014 )



Les bactéries reconnaissent spécifiquement des flavonoïdes qui sont sécrétées par la plante hôte, ces molécules induisent la production de facteurs Nod par les rhizobias (Oldroyd, 2001). Ces derniers sont des lipo-chitooligosaccharides (LCO) (Dénarié *et al.*, 1996), qui agissent essentiellement au niveau des cellules épidermiques et corticales de la plante.

Au niveau des cellules épidermiques, les facteurs Nod, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique, une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en «crosse de berger» pouvant enfermer les rhizobias (Esseling *et al.*, 2003). A ce niveau, les rhizobias pénètrent la cellule végétale par la formation d'un cordon d'infection qui traverse d'abord le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales, guidant ainsi les bactéries vers les couches cellulaires intérieures, (Gage, 2004).

Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se dédifférencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire. Quand les cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules arrêtent de se diviser et sont envahies par des rhizobias qui pénètrent par endocytose (Cermola *et al.*, 2000; Brewin, 2004).

Finalement, au sein des cellules végétales infectées, les bactéries sont enfermées dans des vésicules, se différencient en bacteroïdes capables de fixer et d'assimiler l'azote ce qui forme un ensemble appelé symbiosome. Ces différentes activités cellulaires conduisent rapidement au développement d'une structure complexe : le nodule.

Le processus infectieux se poursuit durant toute la vie du nodule qui établit des relations vasculaires avec le système vasculaire racinaire, ce qui permet l'apport en carbone et l'exportation de l'azote organique fixé vers les autres parties de la légumineuse infectée (Dommergues *et al.*, 1999).

### **3- Génétique de la nodulation**

Au cours de la symbiose légumineuse-rhizobium, les exigences génétiques de la reconnaissance spécifique ainsi que celles de la formation et la maturation fonctionnelle du nodule, sont partagées entre les deux partenaires.



### 3-1-Génétique bactérienne de la nodulation

De nombreux gènes symbiotiques bactériens interviennent dans la formation et le fonctionnement du nodule (Werner, 1992). Chez de nombreux rhizobias, ces gènes sont situés sur un grand plasmide symbiotique appelé PSym (Mercado-Blanco et Toro, 1996). Chez les genres *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et chez l'espèce *Mesorhizobium loti*, ces gènes se situent sur le chromosome (Sharma *et al.*, 1993 ; Sullivan *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 2002 (a, b) ; MacLean *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2007 ).

Les gènes de symbiose peuvent être divisés en deux catégories: des gènes responsables de l'infection et de la formation du nodule appelés gènes de nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol*) et les gènes responsables de la fixation d'azote tels que les gènes *nif*, *fix* et *dct*.

D'autres gènes (tableau 1), participent aussi à cette symbiose, la plupart d'entre eux codent pour l'expression et la synthèse de certaines molécules impliquées dans la structure de la surface bactérienne (Glazebrook & Walker, 1989 ; Broughton *et al.*, 2000).

Tableau1 : Quelques gènes impliqués dans la symbiose rhizobiums-légumineuses

Gène	Fonction	Espèce	Référence
<i>exo</i>	Production d'exo polysaccharides	<i>S. meliloti</i>	Glazebrook, & Walker, (1989)
<i>hup</i>	Consommation d'hydrogène	<i>B. japonicum</i>	Maier, (1986)
<i>gln</i>	Glutamine synthétase	<i>R. phaseoli</i>	Carlson <i>et al.</i> , (1987)
<i>dct</i>	Transport de dicarboxylate	<i>R. leguminosarum</i>	Jiang <i>et al.</i> , (1989)
<i>nfe</i>	Compétition et efficacité de la nodulation	<i>S. meliloti</i>	Sanjuan, & Olivares, (1989) Garcia-Rodriguez, & Toro, (2000)
<i>lps</i>	Production de lipopolysaccharides	<i>R. phaseoli</i>	Carlson <i>et al.</i> , (1987)
<i>ndv</i>	Synthèse de $\beta$ 1-2 glucans	<i>S. meliloti</i>	Breedveld <i>et al.</i> , (1994)

#### 3-1- 1-Les gènes de nodulation

Les plus importants gènes contribuant à la formation des nodules sont les gènes *nod* qui sont des déterminants essentiels de la spécificité (Geurts *et al.*, 2005). Ces gènes sont nombreux, incluent des gènes communs, des gènes spécifiques de l'hôte à infecter et des gènes de régulation (Broughton *et al.*, 2000 ; Spaink, 2000).

### **-Les gènes *nod* communs**

Les gènes *nod* ABCIJ sont des gènes communs retrouvés chez la plupart des espèces de rhizobium, ils codent pour le squelette chitino-oligosaccharidique des facteurs de nodulation (Hopkins, 2003). Leurs mutations (délétion, rupture du cadre de lecture...) provoquent une perte complète de la capacité à infecter et à noduler les plantes hôtes. Ils sont indispensables pour induire la déformation des poils absorbants et inciter les cellules végétales à se diviser (Brewin *et al.*, 1992 ; Pelmont, 1995).

Selon une étude portant sur la Luzerne, l'induction de l'organogenèse des nodules, qui peut être déclenchée à distance, semble être contrôlée par les gènes *nod ABC* (Debellé *et al.*, 1986 (b)) . Les gènes *nod ABC* font généralement partie d'un seul opéron (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995). La synthèse des lipo-chitooligosaccharides est sous le contrôle de *nodA* (acyl transférase), *nodB* (déacétylase) et *nodC* (N-acetylglucosaminyl transférase), (Downie,1998). Les *nodI* et *nodJ* sont situés en aval de *nodC* et semblent faire partie du même opéron (Van Rhijn&Vanderleyden, 1995). Ils codent pour des protéines intramembranaires impliquées dans le transport de petites molécules (Vazquez *et al.*, 1993).

### **-Les gènes contrôlant la spécificité de l'hôte**

Plusieurs gènes (*nodH*, *nodFE*, *nodG*, *nodMN*, *nodQ* etc.), sont généralement spécifiques de la plante à infecter (Pelmont, 1995 ; Davet, 1996), ils sont appelés les gènes *hsn* (*host specific nodulation*). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les rhizobias (Sharma *et al.*, 1993). Les gènes *hsn* assurent les diverses substitutions des facteurs Nod (Debellé *et al.*, 2001(a) ; Brencic et Winans, 2005). Leur mutation peut provoquer un retard, une réduction de la nodulation ou une modification de leur spécificité d'hôte (Debellé et Sharma, 1986 ; Horvath *et al.*, 1986 ; Faucher *et al.*, 1988 ; Cervantes *et al.*, 1989).

### **-Le gène régulateur *nodD***

Le gène *nodD* est le premier gène *nod* transcrit lors du processus de nodulation (Moulin, 2006). Sa transcription se fait de manière constitutive et l'activation de son produit, la protéine NodD, est réalisée par les flavonoïdes (Geurts et Bisseling, 2005). Une fois activé, le Nod D se lie aux sites régulateurs des opérons porteurs des autres gènes *nod* et active leur transcription (Rolfé et Gresshoff, 1988).

D'autres gènes de rhizobia codants pour l'expression et la synthèse des molécules de structure de la surface bactérienne interviennent au processus de nodulation. Les gènes *exo*, *lps* et *ndv*

qui codent successivement pour les exopolysaccharides (EPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les  $\beta$ -glucanes, sont nécessaires pour le développement continu du fil d'infection (Breedveld et Miller, 1998 ; Pellock et *al.*, 2000).

Les  $\beta$  glucanes sont majoritairement des molécules du périplasme qui permettent la croissance des bactéries sous des conditions hypo-osmotiques (Pfeffer, 1994). Les EPS (exopolysaccharides) interviennent dans l'initiation et l'élongation des cordons d'infection (Cheng Walker, 1998). Les LPS ( lipopolysaccharides) avec les  $\beta$ -glucanes jouent un rôle dans la suppression du déclenchement du mécanisme de défense chez l'hôte au cours de l'infection (Hirsch et *al.*, 2001 ; Tellstrom et *al.*, 2007). Des études ont montré que les mutants de rhizobia défectifs en la synthèse ou à faible production de lipopolysaccharides n'ont pas la capacité d'induire la formation de cordons d'infection. Ils perdent également leur capacité compétitive ou forment des nodosités incomplètement développées (Lagares et *al.*, 1992).

### **3-1-2-Les gènes de fixation d'azote**

Faisant suite à l'activité des gènes d'infection et de nodulation, d'autres groupes de gènes tels que les gènes *nif*, *fix* et *dct* interviennent dans les étapes tardives de la symbiose.

#### **3-1-2-1-Les gènes *nif***

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, codent pour la synthèse d'un complexe enzymatique catalysant la réduction de l'azote, connu sous le nom de nitrogénase ou dinitrogénase (Fischer, 1994). Ce complexe enzymatique est constitué de deux métalloprotéines de tailles différentes (Charpy et *al.*, 2001):

- La di nitrogénase vraie appelée protéine I, qui est une hétéro tétramère, contient le cofacteur à Fer et à Molybdène (MoFe-protéine, 245 KDa) et responsable directement de la réduction de  $N_2$  en  $NH_3$ .
- La di nitrogénase réductase ou protéine II, qui est un homodimère et qui contient le Fer (Fe-protéine, 64 KDa) assure le transfert des électrons nécessaires à la réduction de  $N_2$  d'un donneur à la di nitrogénase.

La Fe-protéine est codée par le gène *nifH*, alors que la Mo-Fe-protéine est codée principalement par les gènes *nifD* et *nifK*. La biosynthèse du cofacteur FeMo (fer-molibden)

requiert l'assemblage des produits des gènes *nifB*, *nifE* et *nifN* (Crossman, 2004). La majorité des autres gènes *nif* joue un rôle dans la synthèse et la maturation des groupements prosthétiques dans la synthèse de transporteurs d'électrons et de protéines de régulation.

Bien que très conservés chez les micro-organismes fixateurs d'azote, les gènes *nif* diffèrent au niveau de leur localisation (plasmidique ou chromosomique), organisation, régulation et expression (Fischer, 1994).

### **3-1-2-2- Gènes *fix* et gènes *dct***

Contrairement aux gènes *nif*, les gènes *fix* et *dct* sont propres aux fixateurs symbiotiques, sont impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules et/ou lors de la fixation symbiotique azotée (Earl et al., 1987 ; Brewin et al., 1992 ; Noel, 2009).

Les gènes *fix NOQP* codent pour le cytochrome oxydase, catalysant la régulation de l'oxygène lors de la fixation d'azote. Les gènes *fix ABCX*, codent pour la synthèse des flavoprotéines, nécessaires pour la fixation de l'azote (Crossman, 2004). Le système de régulation *fix LJ* joue un rôle très important dans l'expression des gènes *nif* et *fix* et particulièrement dans la régulation du gène *nifA* (David et al., 1988).

Les gènes *dct* (*Dicarboxylate transport genes*) sont nécessaires à l'assimilation par les bactéries des acides dicarboxyliques (succinate, malate) issus des composés carbonés (glucose, fructose) apportés par la plante au cours de la fixation azotée. La mutation de ces gènes chez les bactéries entraîne une faible prolifération des bactéroïdes et une déficience de ceux-ci lors de la fixation de l'azote (Noel, 2009).

## **3-2-Génétique de la nodulation chez la légumineuse**

Tout comme la bactérie, la plante émet des molécules essentielles à la réalisation de chaque étape du processus de nodulation et de fixation d'azote. les flavonoïdes produits par la plante hôte ont longtemps été soupçonnés de jouer un rôle direct dans la formation des nodules (Hirsch, 1992). En effet, les flavonoïdes avec leur importante diversité constituent les premiers signaux de l'hôte qui induisent le mécanisme du chimiotactisme des rhizobias et déclenchent chez eux l'expression du gène de régulation de la nodulation. (Peters and Verma, 1990 ; Dixon et al., 2002 ; Cooper, 2004).

En plus des flavonoïdes, la légumineuse synthétise un certain nombre de protéines essentielles au développement de nodules fonctionnels appelés nodulines (Govers et al., 1987). Certains gènes végétaux impliqués dans cette synthèse ont été identifiés et clonés (Delauney et Verma, 1988; Rolfe et Gresshoff, 1988). Certaines de ces nodulines sont des enzymes du métabolisme azoté (glutamine synthétase, etc.) ou carboné (saccharose synthase, etc.). La plus connue est une protéine (la globine) qui, associée à l'hème produit par les bactéroïdes, constitue la leghémoglobine, protéine fixatrice d'oxygène. Cette dernière protéine est indispensable à la fixation du N<sub>2</sub> et représente de 10 à 30% des protéines solubles dans un nodule mature. Par leurs propriétés de fixation de l'oxygène moléculaire, les leghémoglobines contrôlent la concentration en oxygène libre des cellules du nodule, tout en restant capables d'alimenter en oxygène la respiration intense des bactéroïdes (Ott et al., 2005).

## 4-Spécificité symbiotique

L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobium-légumineuse est leur spécificité. Une espèce de rhizobium donnée n'est capable, en général, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux (Pelmont, 1995). De même une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces de rhizobium (Tilak et al., 2005).

Une large gamme de niveau de spécificité a été observée chez les couples légumineuses-rhizobiums (Perret et al., 2000). Selon le degré de spécificité entre les deux partenaires, les associations rhizobiums-légumineuses peuvent être très spécifiques (aussi appelées spécialistes) dans le cas d'un seul symbiote possible, comme elles peuvent être généralistes lorsque le spectre d'hôte est large. Le partenaire bactérien *Azorhizobium caulinodans* ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988). Inversement la bactérie *Ensifer* sp. NGR 234 possède un spectre très large. Cette souche peut noduler 353 espèces de légumineuses appartenant à 112 genres différents et elle peut même noduler une non légumineuse: *Parasponia andersonii* (Pueppke et Broughton, 1999). La promiscuité des plantes, (sa capacité à interagir avec de nombreux partenaires différents), est elle aussi très variable. *Atropurpureum macroptilium* est connue pour avoir un large spectre de microsymbiotes et a été ainsi intensivement utilisé pour piéger les bactéries symbiotiques dans le sol. Récemment, *Sophora flavescens* s'est révélée être la plante hôte la plus prometteuse à noduler avec plus de

40 rhizobias différents (Jiao et al., 2015). De l'autre côté, plusieurs espèces de *Medicago* n'interagissent qu'avec les espèces uniques de *Ensifer Medicae* (Béna et al., 2005).

Le contrôle de spécificité est initié par la composition spécifique des exsudats racinaires de la légumineuse, ce qui rend la rhizosphère plus spécifique et favorable à ses partenaires symbiotiques (Sharma et al., 2004). Lors du dialogue moléculaire entre les deux partenaires, plusieurs niveaux de reconnaissance ont été mis en évidence et peuvent être considérés comme des étapes clefs de la spécificité symbiotique entre eux. (Djordjevic et al., 1987).

- **Les flavonoïdes et la protéine *NodD***

La reconnaissance des flavonoïdes par des protéines régulatrices bactériennes (*NodD*) est le premier niveau de spécificité. Ayant plus d'affinité pour le flavonoïde que pour l'ADN bactérien où elle se fixe, la protéine *NodD* se libère de cet ADN et permet ainsi la transcription des gènes de nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol*) dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse des facteurs Nod bactériens, responsables de l'initiation de la formation nodulaire (Dénarié et al., 1996). Il a été montré que de nombreuses souches de *Rhizobium* possèdent plusieurs copies du gène *nodD* dans leur génome. Ces différentes copies présentent des spécificités variables à l'égard des différents flavonoïdes présentes dans les exsudats racinaires de la plante hôte (Homna et Ausubel, 1987 ; Howarth et al., 1987).

Seules quelques classes particulières de flavonoïdes sont impliquées dans la spécificité d'hôte chez les légumineuses (Aoki et al., 2000). Les flavonoïdes inducteurs de la nodulation sont particulièrement des flavones et des isoflavones (Cleyet-Marel, 1996).

De nombreuses études montrent que la variabilité des structures moléculaires des flavonoïdes exsudés par la plante contribue à la création d'associations symbiotiques très étroites. Par exemple, chez le soja, les principaux inducteurs sont la 4',7 dihydroxyisoflavone (daidzeine), la 4',5,7 trihydroxyisoflavone (genisteine), (Kosslak et al., 1987) et la 2',4',4 trihydroxychalcone (isoliquiritigénine) (Kape et al., 1992). La lutéoline (3', 4', 5, 7 tetrahydroxyflavone) est montrée être un inducteur des gènes *nod* de *Ensifer meliloti* pour des concentrations très faibles de l'ordre de  $10^{-8}$  M (molaire), (Peters et al., 1986; Peck et al., 2006). La naringénine (5,7,4'-trihydroxyflavanone) induit les gènes de nodulation dans *Rhizobium bv. viciae* (Zaat et al., 1988).

Certains composés phénoliques peuvent être inducteurs de la nodulation chez les espèces de rhizobium et inhibiteurs chez d'autres, ce qui contribue dans la régulation de la spécificité

symbiotique. Les flavonoïdes inhibiteurs agissent comme des anti-inducteurs (antagonistes) de l'expression des gènes *nod* (Cooper, 2004, 2007 ; Peck *et al.*, 2006). La chrysrine, un dérivé de la chrysrine (7-hydroxy, 5-méthyl-flavone) et la naringénine se sont révélés des inhibiteurs spécifiques puissants de l'induction des gènes *nod* de plusieurs souches de *B.japonicum* (Kosslak *et al.*, 1990 ; Cunningham *et al.*, 1991 ).

• **Structure des facteurs Nod**

La variation structurale des facteurs Nod constitue un second niveau de spécificité, peut-être le plus important, la réponse des plantes à ces facteurs étant variable selon leur structure. Les facteurs de nodulation synthétisés ont la même structure de base pour toutes les espèces de rhizobium. Celle-ci consiste en un enchaînement de quatre ou cinq N-acétylglucosamine liés en  $\beta$  1- 4, portant un acide gras à une extrémité glucosamine non réduite (LeRouge *et al.*, 1990 ; Cullimor *et al.*, 1997).

La spécificité de chaque rhizobium repose sur la variabilité de cette partie commune: les deux glucosamines terminales portent des groupements spécifiques et la nature de l'acide gras diffère selon les espèces (Downie, 1998). Une fois que la structure de base des facteurs Nod est construite, les gènes *nod* propres à chaque espèce de rhizobium, vont l'orner de motifs caractéristiques de l'espèce (Perret *et al.*, 2000), (Figure 4) .

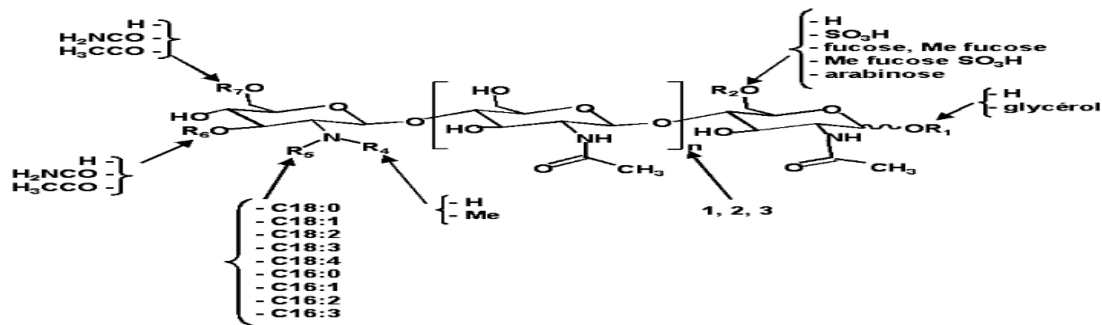


Figure 4 : Structure générale d'un facteur Nod, (Chataigné, 2007)

• **Les polysaccharides bactériens de surface et molécules végétales**

Les polysaccharides de surface, qui s'accumulent pour former un complexe macromoléculaire autour de la bactérie constitue un autre niveau de spécificité surtout au cours des étapes plus tardives de l'interaction entre les deux partenaires (Broughton et Perret, 1999; Spink, 2000; Stougaard, 2000).



La pénétration des rhizobium à l'intérieur des cellules végétales par endocytose est probablement selon certains chercheurs, la conséquence d'interactions physiques entre des composés de la surface des bactéries et des composés glycoprotéiques et glycolipidiques sur la surface de la membrane cellulaire de la plante (Brewin et *al.*, 1992). Selon Deakin et Broughton (2009), cette spécificité serait contrôlée par les lectines de l'hôte qui reconnaissent certains glucides des capsules bactériennes (Deakin et Broughton, 2009) et des lipopolysaccharides (LPS) de la membrane bactérienne externe (Hirsch et *al.*, 2001).

- **Sanction de la bactérie non efficiente**

La reconnaissance par la plante hôte des génotypes bactériens ne fixant pas l'azote (ou ne fournissant pas l'azote à la plante) est un autre niveau de spécificité entre les deux partenaires symbiotiques.

Même si le mode d'action est mal connu, plusieurs expériences portant sur des plantes formant des nodules déterminés (Kiers et *al.*, 2007; Kiers et *al.*, 2006; Kiers et *al.*, 2003; Simms and Taylor, 2002; Simms et *al.*, 2006) ont mis en évidence la sanction des rhizobiums par la plante hôte au sein du nodule. Lorsque les bactéroïdes ne peuvent pas fixer l'azote et donc ne participent pas à l'échange réciproque des composés, la plante a la capacité de sanctionner la bactérie dite « tricheuse », qui profite de la niche écologique protectrice et de la nutrition carbonée fournit par la plante sans donner de nutriments en contre partie.

## **5- Facteurs biotiques et abiotiques conditionnant la nodulation**

De nombreux facteurs environnementaux peuvent affecter la plante hôte ainsi que les rhizobias et doivent être ainsi optimaux pour l'établissement d'une symbiose effective (Somasegaran et Hoben, 1994).

### **5-1-Facteurs abiotiques de stress: pH, eau et sel**

#### **5-1-1-Le pH**

La majorité des légumineuses nécessitent un pH neutre ou légèrement acide pour établir une symbiose efficiente dans le sol (Bordeleau et Prevost, 1994). Pour les rhizobias, le pH optimal est variable entre 5.8 et 7.2 en fonction des espèces (Somasegaran et Hoben, 1994). Selon



Bordeleau et Prevost, (1994), les pH extrêmes affectent la nodulation en réduisant la colonisation du sol et de la rhizosphère de légumineuses par les rhizobiums.

Une acidité élevée du sol (pH <4,0) influence sur la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale (Bordeleau et Prevost, 1994) comme la réduction de l'absorption du molybdène (Mo), (Valérie Genot et *al.*, 2009). Il a été rapporté que dans le cas d'une acidité élevée, la nodulation est plus touchée que la croissance de la plante hôte et la fixation de l'azote (Bordeleau et Prevost, 1994 ; Munns, 1977). Les sols très alcalins (pH >8,0) ont tendance à être riches en chlorure de sodium, de bicarbonate et de borate qui sont souvent associés à une forte salinité et qui réduisent également la fixation d'azote (Bordeleau et Prevost, 1994).

### **5-1-2-L'eau**

L'irrigation stimule la fixation symbiotique et le stress hydrique inhibe la nodulation ainsi que la fixation azotée (Deschamps, 1985; Zahran, 2001), même chez les plantes inoculées (Zablotowicz *et al.*, 1981). Selon Vincent, (1982), il existe des taux d'humidité extrêmes tolérés au-delà desquels le développement de la plante et la survie du rhizobium sont affectés. Guckert et Laperrière (1985), ont montré qu'il existait une relation linéaire entre le potentiel hydrique de base et l'activité de fixation de l'acétylène chez le trèfle (*Trifolium repens L.*).

### **5-1-2-La salinité**

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia indirectement, en réduisant la germination, la croissance de la plante hôte et la survie des rhizobiums ou bien directement en inhibant le processus d'infection et le développement des nodules (Jebara *et al.*, 2000; Cesar *et al.*, 2011).

Chez les légumineuses, l'effet dépressif du sel se manifeste à partir d'un seuil critique de concentration qui est caractéristique de l'espèce ou de la variété (Farissi *et al.*, 2011 ; Faghire *et al.*, 2011). Ainsi chez certaines légumineuses telles que *Glycine max L.*, *Phaseolus vulgaris L.* et *Vigna unguiculata*, les pourcentages de germination des graines diminuent à partir d'une concentration de 50 mM de NaCl (Taffouo *et al.*, 2009), alors que la croissance végétative de *Phaseolus vulgaris L.* est fortement déprimée par une concentration de NaCl de l'ordre de 25 mM (Faghire *et al.*, 2011). Il est rapporté que chez la luzerne, le sel entraîne une réduction des productions de matière sèche aérienne et racinaire (Chaabena *et al.*, 2004), inhibe de manière

significative la croissance de différents organes (Mezni *et al.*, 2010). Toutefois, les racines sont souvent plus touchées que les parties aériennes (Amooaghaie, 2011).

La tolérance des rhizobias à la salinité est plus ou moins importante, certaines souches étant inhibées en culture pure à des concentrations en sel de 100 mM (Singleton *et al.*, 1982; Yelton *et al.*, 1983) alors que d'autres tolèrent des concentrations supérieures à 400 mM (Singleton *et al.*, 1982).

Chez des cultivars tolérants de pois chiche, la salinité inhibe le processus d'infection et affecte la taille et le nombre des nodules (Borucki et Sujkowska, 2008), tandis que chez la fève, une inhibition du cordon d'infection a été remarquée (Zahran et Sprent, 1986). En général, les premières étapes de la nodulation sont les plus sensibles au stress salin (Cesar *et al.*, 2011).

La salinité inhibe l'activité de la nitrogénase (Aydi *et al.*, 2008) généralement par une diminution de la production de protéines cytosoliques, surtout la légghémoglobine, (López *et al.*, 2008). D'autres résultats suggèrent que l'accumulation des ions toxiques ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) dans les nodosités peut affecter le métabolisme dans ces organes et inhiber leur activité fixatrice d'azote (Cordovilla *et al.*, 1995).

## **5-2-Les éléments minéraux**

### **5-2-1-L'azote**

La synthèse de la nitrogénase est inhibée par la présence d'ions ammoniums ou nitrates à un certain degré dans le sol (Denarié et Truchet, 1979; Pietschet *et al.*, 2007). La richesse du sol en azote devient alors un facteur inhibiteur de la symbiose, ce qui explique les effets dépressifs des engrais azotés sur la fixation de l'azote de l'air (Vance *et al.*, 1987).

Selon (Muller *et al.*, 1993), une faible dose d'azote dans le sol peut stimuler la croissance de la plante jusqu'au démarrage de la fixation symbiotique à condition que les quantités apportées soient celles exerçant un « effet starter »; autrement, un effet dépressif sur la nodulation et la fixation de  $\text{N}_2$  est constaté (Kucey, 1989). Les conditions requises avant la mise en place de la symbiose sont une faible teneur en azote du sol et une photosynthèse active pour assurer une source suffisante d'énergie (Kondorosi et Kondorosi, 2000).

### **5-2-2-Le phosphore**

Le manque du phosphore limite sévèrement la croissance de la plante, la formation des nodules et la fixation de l'azote (Somasegaran et Hoben, 1994). D'après Aftab *et al.*, (2010), l'apport de cet élément à la culture de soja améliore de 46 % l'efficacité symbiotique de

*Bradyrhizobium japonicum* TAL 377. Kouas et al., (2005), ont rapporté que chez le haricot, le nombre de nodules été significativement diminué avec un apport faible en phosphore (120 pmol), par rapport aux autres traitements.

### **5-2-3-Le potassium, soufre et molybdène**

Il est rapporté que la présence de chacun des éléments : potassium, soufre et molybdène favorise la symbiose. Bailey (1983), a signalé l'effet positif de la fertilisation potassique sur la fixation biologique de l'azote pour une culture de luzerne, alors que Varin et al., (2009) ont rapporté que la fertilisation sulfurée stimule la fixation azotée chez la luzerne et le pois. Selon (Somasegaran et Hoben, 1994), les sols pauvres en molybdène produisent de faibles quantités de nodules qui sont souvent inefficients.

## **5-3-Facteurs biologiques du sol**

### **5-3-1-Effet de la taille de la population des rhizobiums**

La nodulation d'une légumineuse nécessite par définition la présence du rhizobium spécifique dans sa rhizosphère avec une quantité suffisante. Certains rhizobiums sont totalement absents dans certains sols, c'est le cas des rhizobiums symbiotes de la luzerne (*Medicagosativa L.*) en sol acide (Obaton, 1971) ou ceux du soja (*Glycine max L. Merrill*) dans tous les sols français (Lagacherie & Obaton, 1973).

La taille de la population des rhizobiums joue un rôle important sur l'établissement de la symbiose et la formation des nodules. Quand la population de rhizobia autochtone spécifique à une légumineuse précise est faible (moins de 50 bactéries par gramme de sol), l'introduction de nouvelles souches doit être suggérée, par contre, dans les sols où les souches rhizobiennes sont déjà fortement présentes (plus de 10<sup>3</sup> bactéries/g de sol), l'inoculation est souvent sans succès par compétition avec les souches autochtones (Thies et al., 1991 ; Brochwell et al., 1995).

### **5-3-2-Effet des bactéries amélioratrices de la croissance des plantes**

Parmi les microorganismes du sol, les PGPB (plant growth promoting bacteria) ont la particularité d'améliorer la nodulation des légumineuses (Shaharoon et al., 2006 ; Shahzad et al., 2008). Ces bactéries stimulent la croissance des plantes directement ou indirectement

(Khan *et al.*,2009), ce qui induit par ricochet des plantes plus aptes à développer des nodules car mieux développées et plus en forme.

Les PGPB fournissent certains éléments bénéfiques pour la plante telles que certaines phytohormones (l'acide indole acétique, la zéatine, l'acide gibbérellique et acide abscissique), le fer séquestré par les sidérophores, le phosphore minéral (Zaidi *et al.*,2009). L'action indirecte des PGPB inclue plusieurs activités telles que la production d'antibiotiques et la prévention directe ou indirecte des phytopathogènes (Egamberdiyeva et Islam, 2008).

Shaharoon et *al.*,(2006), ont rapporté que la coinoculation du haricot mungo (*Vigna radiata L.*) avec une PGPB associée à *Bradyrhizobium* améliorait la nodulation de cette fabacée de 48 % comparativement à celle inoculée avec *Bradyrhizobium* uniquement. Selon ces auteurs, l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) désaminase, libérée par la PGPB supprime la biosynthèse de l'éthylène au niveau racinaire, ce dernier inhibant la formation des nodules. Shahzad *et al.*,(2008) ont aussi montré l'effet de l'activité de l'ACC désaminase de 3 souches rhizobactériennes sur l'amélioration de la nodulation d'une culture de pois chiche. Ces auteurs ont enregistré une amélioration de la nodulation de 87 % comparativement au témoin.

#### **5-4-Effet des facteurs cultureux**

Les pratiques culturales affectent largement la survie ainsi que le pouvoir infectif des rhizobiums par diminution du stock de carbone nécessaire à leur survie (Slattery *et al.*, 2001). D'autres part, il a été rapporté que l'application d'herbicides de type bentazone et MCPA (acide 4-chloro-2 methylphenoxy acetique) sur *Trifolium pratense L.* engendrait une altération de la morphologie des racines ainsi qu'une réduction du nombre de nodules et de l'activité de la nitrogénase des plantes (Lindström, 1985).

## **II-Notre modèle d'étude, le pois chiche en Algérie**

### **1-Aperçu sur l'agriculture et les légumineuses en Algérie**

Bien que sur les 238.174.000 hectares du pays, seulement 3,3% (41383.000 hectares), soient à vocation agricole (FAOSTAT, 2014), l'Algérie se distingue par une variation éco-géographique très remarquée. Le désert occupe les 4/5 du pays et le 1/5 restant est largement occupé par les étages bioclimatiques arides et semi-arides. Les étages subhumides et humides

couvrent des surfaces beaucoup plus restreintes. Cette variation des milieux s'accompagne d'une importante diversité en ressources naturelles. L'essentiel des ressources phytogénétiques se rencontre sur la frange nord où les conditions pédoclimatiques sont plus favorables.

En Algérie, les légumineuses alimentaires (légumes secs), font partie du paysage agricole depuis des générations. Ces cultures sont utilisées dans la rotation avec les céréales et constituent une importante source protéique susceptible de remplacer les protéines animales difficilement accessibles pour une large couche de la population algérienne. Selon les données du FAOSTAT (2014), en 2012, l'Algérie a produit une quantité de 82682 tonnes en légumineuses sur une surface cultivée totale de 82811 hectares et avec un rendement moyen de 9984 hg/ha (hectogramme /hectare). Le pois chiche figure parmi les espèces de légumineuses alimentaires les plus cultivées en Algérie (tableau 2).

Tableau 2 : Légumineuses alimentaires cultivées en Algérie en 2012 (FAOSTAT, 2014)

Légumineuse	Surface agricole (hectare)	Production (tonnes)	Rendement (hg/ha)
Pois chiche ( <i>Cicer arietinum L.</i> )	30562	27675	9055
Lentille ( <i>Lens culinarisL.</i> )	3600	4050	11250
Haricot ( <i>Phaseolus vulgarisL.</i> )	1573	1024	6510
Pois sec ( <i>Pisum sativum L.</i> )	9891	9178	9279
Fèveet féverole ( <i>Vicia faba L.</i> )	36835	40507	10997

Bien que les légumineuses alimentaires aient reçu beaucoup d'attention de la part des services agricoles pour augmenter les superficies et améliorer les niveaux de rendements, la production nationale en légumes secs n'a pas connu l'amélioration escomptée, tant sur le plan de superficie que sur la production de graines. Il existe donc aujourd'hui un vrai challenge à développer ces cultures au niveau national.

## 2-Généralités sur le pois chiche (*Cicer arietinum L.*)

Le pois chiche est arrivé sur les côtes du bassin méditerranéen après avoir traversé de nombreux pays. Duke (1981), rapporte que ce légume sec a conquis l'Europe durant le Moyen âge après que les croisés l'aient découvert au Proche orient (Sud-Est de la Turquie, Syrie), mais, sa culture et sa consommation ont en réalité été attestées par des sources écrites et archéologiques, bien avant. Selon Ladizinsky, (1987), l'espèce cultivée *Cicer arietinum L.* a

été trouvée à Ramad (région près de Damas, Syrie) et à Jéricho (Jordanie), respectivement depuis les années 8500 A.J.C, l'expansion de cette culture a été rapide dans les régions Méditerranéennes.

Davis, (1969) et Ladizinsky, (1975) ont découvert deux espèces sauvages (*Cicer echinospermum* et *Cicer reticulatum* Ladiz) au Sud-Est de la Turquie. Ces deux espèces ne diffèrent pas beaucoup morphologiquement de l'espèce cultivée *Cicer arietinum* L. L'indentification basée sur l'analyse de protéines et d'enzymes a montré que l'espèce *Cicer reticulatum* Ladiz pourrait être un ancêtre spontané du pois chiche (Ladizinsky, 1989).

Le pois chiche se rattache à la famille des *Papilionacées*, du genre *Cicer* et en particulier l'espèce *Cicer arietinum* L. (Saxena, 1987). Il est décrit comme une plante herbacée annuelle haute de 20 à 50 cm, dressée ou rampante couverte de poils glanduleux. Sa tige est anguleuse possédant une hauteur de 0.20 à 1 mètre de haut. Les feuilles de cette plante, se composent de 7 à 17 folioles ovales et dentées (figure 5). Les fleurs peuvent être blanches, bleues ou violettes, solitaires et pédonculées. Les gousses sont renflées à 1 - 2 graines.



Figure 5: plante et graine de pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

(<http://www.visoflora.com/photos-nature/photo-pois-chiche-cicer-arietinum.html>).

La culture du pois chiche nécessite une température optimale variante entre 18°C et 29°C le jour et 20°C la nuit (Girard, 1985). Malgré sa grande capacité d'absorption de l'eau dans le sol qui s'effectue grâce à son système racinaire très développé en profondeur (Duke, 1981), le pois chiche est sensible à la sécheresse notamment à la floraison (Girard, 1985; Summerfield et al., 1984). Un déficit hydrique à ce stade-là, se traduit par une diminution du nombre de gousses et par une augmentation de gousses vides (Wery, 1986).

Bien que le pois chiche semble préférer les sols meubles profonds, plus ou moins argileux avec une bonne capacité de rétention (Singh et Diwakar, 1995; Moolani et Chandra, 1970) ou des sols limoneux profonds (Moolani et Chandra, 1970), il peut être cultivé dans différents

types de sols (Babar et *al.*, 2009). Le pH du sol favorable à cette culture se situe entre 6 et 9 (Braune et *al.*, 1988).

### **3-Importance du pois chiche**

Le pois chiche est l'une des principales cultures de légumineuses dans le monde après les haricots secs et les pois secs. C'est une importante source alimentaire grâce à sa composition diversifiée. Selon Williams et Singh (1987), la graine du pois chiche contient 23% de protéines, 64% de glucides, 5% de matières grasses, 6% de cellulose brute, 6% de sucre soluble, et 3% de cendres. Cette légumineuse est une culture clé dans les systèmes de production en alternance avec des céréales; elle prend en charge la gestion des mauvaises herbes, enrichit le sol grâce à la fixation de l'azote (Yadav et *al.*, 2011).

Alors que plusieurs chercheurs montrent que le pois chiche peut fixer jusqu'à 141 kg d'azote ha<sup>-1</sup> par an, par association avec son micro symbiote spécifique (Herridge et *al.*, 1995 ; Sharma & Sharma, 2008) et obtenir plus de 70% de ses besoins en azote à partir de la fixation symbiotique (Rhitu et *al.*, 2012), il a été rapporté que cette légumineuse est capable de fixer l'azote dans un interval plus large, à savoir, 90-180 kg N ha<sup>-1</sup> (Werner , 2005). Par les résidus de sa récolte, cette légumineuse, laisse derrière une quantité importante d'azote pour les cultures suivantes et ajoute de la matière organique indispensable pour maintenir et améliorer la santé des sols, assurant ainsi une fertilité à long terme et une durabilité des écosystèmes (Bacha et Ounane, 2003).

De nos jours, le pois chiche est cultivé sur un large éventail de zones climatiques qui vont de l'Inde subtropical et Nord-Est de l'Australie, à des zones aride et semi-aride du bassin méditerranéen et le sud de l'Australie du Sud (Laranjo et *al.*, 2008 ; FAOSTAT, 2014). Son succès est dû à sa capacité à croître sur des sols pauvres et appauvris, avec de faibles pluies. Jusqu'à l'année 2014, le pois chiche occupait une superficie mondiale de plus de 13 Millions d'hectares (13981218 ha) et une production annuelle estimée à plus de 13 Millions de tonnes (13730998 tonnes), avec un rendement de 9821 hg/ha. L'Inde est le plus grand pays producteur du pois chiche (FAOSTAT, 2016).

Les grands pays exportateurs sont l'Australie, le Mexique, la Turquie, le Canada, les Etats Unis alors que les plus importants pays importateurs sont, l'Inde, le Pakistan, l'Espagne,



l'Algérie, le Bangladesh, l'Italie, l'Arabie saoudite, la Jordanie, la Tunisie et le Royaume-Uni (AAC, 2006 et FAOSTAT, 2014).

Deux types de pois chiche sont connus à l'échelle commerciale. Le pois Kabuli, gros, de couleur crème, recouvert d'un tégument mince et le pois Desi, plus petit, plus foncé et recouvert d'un tégument épais. La production mondiale est composée de 75% de du type Desi et de 25% de type Kabuli. Les pays du sous-continent Indien ainsi que l'Australie, produisent surtout le type Desi alors que le reste des pays produisent le type Kabuli. (AAC, 2006).

#### 4-Situation des pois chiches cultivés en Algérie

En Algérie, la culture de pois chiche est limitée au type kabuli et occupe la deuxième place après la fève (*Vicia faba L.*). Elle est surtout localisée surtout dans les régions du Nord du pays à 150Km de la cote mediterraniene (Maatougi et *al.*, 1996).

La production nationale pour cette légumineuse ne parvient pas à couvrir les besoins internes du pays et une telle situation a incité l'Etat recourir à des importations importantes. En effet, En 2013 l'Algérie a importé une quantité de 108956 tonnes contre une faible quantité de 22 tonnes qu'elle a pu exporter (FAOSTAT , 2016). Depuis l'indépendance jusqu'à l'année 2015, la plus grande quantité de pois chiche produite en Algérie est représentée par 35118 tonnes obtenue sur une surface de 33295 ha pendant l'année 2014. En 2015, meme si une legère augmentation en rendement (10690 hg/ha) est remarquée, en le cultivant sur une surface plus petite (29000ha) que celle de l'année 2014, la quantité de pois chiche obtenue a rechuté atteindant une valeur de 31000 tonnes (FAOSTAT , 2017),(tableau3).

Tableau3 : Production du pois chiche en Algerie durant les années 2012-2015 (FAOSTAT, 2017)

Année	Surface en hectare (ha)	Production (en tonne)	Rendement en hectogramme/hectare(hg/ha)
2012	30562	27675	9055
2013	29320	34980	11930
2014	33295	35118	10548
2015	29000	31000	10690

Ce rendement non satisfaisant est obtenu malgré les efforts fournis par le gouvernement et les agriculteurs, portants d'une part sur l'augmentation de la quantité de graines semées qui a atteint sa plus grande valeur (3481 tonnes) en 1986 et d'une autre part sur l'étalement de cette



culture sur des surfaces plus importantes (figure 6), dont la plus grande (69620 hectares) est utilisée en 1987, (FAOSTAT, 2014).

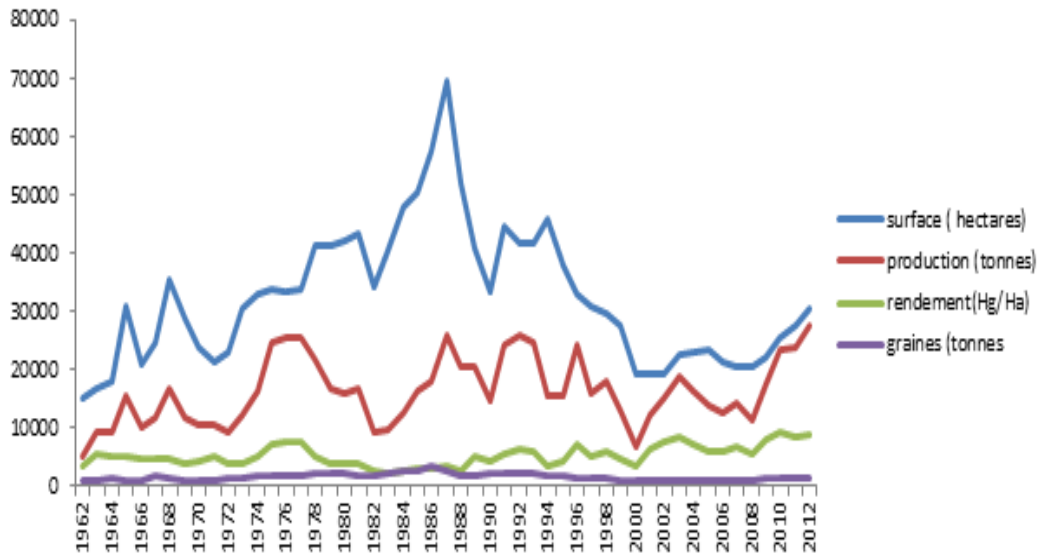


Figure 6: Situation agronomique du pois chiche en Algérie a travers le temps (FAOSTAT, 2014)

<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

En rassemblant toutes les données, on trouve que durant les deux dernières décennies (figure 7), le pois chiche en Algérie est produit sur un surface de moyenne de 28691,4 ha donnant une quantité de 18329 tonnes et présentant un rendement de 0,6tonnes/ha.

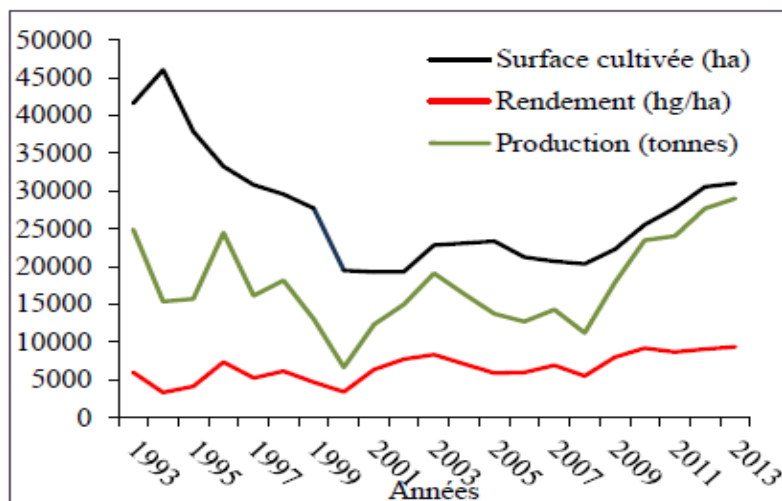


Figure 7 : Surface cultivée, rendement et production du pois chiche durant les deux dernières decennies (FAOSTAT, 2017)

Tableau 4 : Espèces du genre *Mesorhizobium* (Laranjo et al., 2014 ; BISMis-2014 ; LPSN 2017)

<b>Espèce</b>	<b>Souche type</b>	<b>Origine de la souche type</b>	<b>Hôte d'origine</b>	<b>Référence</b>
<i>M. abyssinicae</i>	AC98c <sup>T</sup>	Southern Ethiopia	<i>Acacia abyssinica/A. tortilis</i>	Degefu et al., (2013)
<i>M. albiziae</i>	CCBAU 61158 <sup>T</sup>	China	<i>Albizia kalkora</i>	Wang et al., (2007)
<i>M. alhagi</i>	CCNWXJ12-2 <sup>T</sup>	China	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al., (2010)
<i>M. amorphae</i>	ACCC 19665 <sup>T</sup>	China	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et al., (1999)
<i>M. australicum</i>	WSM2073 <sup>T</sup>	Australia	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al., (2009)
<i>M. camelthorni</i>	CCNWXJ 40-4 <sup>T</sup>	China	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al., (2011)
<i>M. caraganae</i>	CCBAU 11299 <sup>T</sup>	China	<i>Caragana spp.</i>	Guan et al.,(2008)
<i>M. chacoense</i>	LMG 19008 <sup>T</sup>	Argentina	<i>Prosopis alba</i>	Velázquez et al., (2001)
<i>M. ciceri</i>	UPM-Ca7 <sup>T</sup>	Spain	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al., (1994)
<i>M. gobiense</i>	CCBAU 83330 <sup>T</sup>	China	<i>Oxytropis glabra</i>	Han et al., (2008 (b))
<i>M. hawassense</i>	AC99b <sup>T</sup>	Southern Ethiopia	<i>Agroforestry legumetrees</i>	Degefu et al.,( 2013)
<i>M. huakuui</i>	CCBAU 260 <sup>T</sup>	China	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen et al., (1991)
<i>M. loti</i>	NZP 2213 <sup>T</sup>	New Zealand	<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis et al., (1982)
<i>M. mediterraneum</i>	UPM-Ca3 <sup>T</sup>	Spain	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al., (1995)
<i>M. metallidurans</i>	STM 2683 <sup>T</sup>	France	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal et al., (2009)
<i>M. muleiense</i>	CCBAU 8396 <sup>T</sup>	China	<i>Cicer arietinum</i>	Zhang et al., (2012 (b))
<i>M. opportunistum</i>	WSM2075 <sup>T</sup>	Australia	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al., (2009)
<i>M. plurifarum</i>	ORS 1032 <sup>T</sup>	Senegal	<i>Acacia senegal</i>	De Lajudie et al., (1998)
<i>M. qingshengii</i>	CCBAU 33460 <sup>T</sup>	China	<i>Astragalus sinicus</i>	Zheng et al., (2013)
<i>M. robiniae</i>	CCNWCY 115 <sup>T</sup>	China	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Zhou et al., (2010)
<i>M. sangaii</i>	SCAU7 <sup>T</sup>	China	<i>Astragalus luteolus</i>	Zhou et al., (2013)
<i>M. septentrionale</i>	SDW014 <sup>T</sup>	China	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al., (2004)
<i>M. shangrilense</i>	CCBAU 65327 <sup>T</sup>	China	<i>Caragana spp.</i>	Lu et al., (2009)
<i>M. shonense</i>	AC39a	Southern Ethiopia	<i>Agroforestry legumetrees</i>	Degefu et al., (2013)
<i>M. silamurunense</i>	CCBAU 01550 <sup>T</sup>	Yellow River in Mongolian	<i>Astragalus species</i>	Zhao et al., (2012)
<i>M. tamadayense</i>	Ala-3 <sup>T</sup>	Tamadaya ravine, (Canary Islands)	<i>Lotus berthelotii</i>	Ramírez-Bahena et al., (2012)
<i>M. tarimense</i>	CCBAU 83306 <sup>T</sup>	China	<i>Lotus frondosus</i>	Han et al., (2008(b))

Ce faible rendement est dû à plusieurs causes parmi lesquelles, il faut citer l'introduction de cultivars sélectionnés parfois à partir de germoplasmes étrangers jugés à haut rendement et conduisant de façon inattendue à une réduction de la production. L'incapacité des cultivars introduits à établir une bonne symbiose avec les populations rhizobiennes autochtones les a privés des conditions optimales de nutrition azotée. Ces légumineuses sont d'autant plus affectées par ces contraintes biotiques qu'elles se trouvent soumises à des contraintes osmotiques dues à une salinité du sol ou au manque d'eau dans quelques régions.

Cet acharnement de l'agriculteur à rechercher les rendements souhaités, a engendré une augmentation des coûts de production et une pollution de l'environnement par l'utilisation intensives d'engrais. Cette situation à l'échelle du pays est d'autant plus contradictoire qu'il existe encore un patrimoine local de légumineuses alimentaires (tel que le pois chiche) et fourragères adaptées aux contraintes biotiques et abiotiques pouvant être utilisées directement ou comme réserve génétique afin de développer une stratégie d'amélioration génétique des variétés cultivées.

Sans doute, la présence d'une grande diversité de bactéries rhizobiennes capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote efficaces représente une opportunité pour optimiser la production des légumineuses et un facteur de développement d'une agriculture sinon biologique, a minima respectueuse de l'environnement.

### **5-Genre du symbiote nodulant le pois chiche: *Mesorhizobium***

Selon la récente classification de BISMIS-2014, le genre *Mesorhizobium* a été décrit par Jarvis et al.,(1997) en y incluant la première espèce *Mesorhizobium loti*. Depuis, plusieurs espèces de rhizobium ont été transférées à ce genre, parmi lesquelles les deux espèces *M.ciceri* et *M. mediterraneum*, connues comme symbiotes spécifiques du pois chiche (Nour et al., 1994 ; 1995).

Actuellement, le genre *Mesorhizobium* est composé d'un total de 43 espèces Toutes les souches de ce genre ont été isolées à partir de nodules de racines de légumineuses, à l'exception des deux espèces : *M. thioganicum*, (Ghosh et Roy, 2006) et *M. soli*, (Nguyen et al. , 2015) qui ont été obtenues à partir de la rhizosphère de légumineuses et à l'exception de l'espèce et *M. sediminum* isolée d'un environnement marin (Yuan et al., 2016), (tableau 4, pages 31 et 33).

**Suite** Tableau 4 : Espèces du genre *Mesorhizobium* (Laranjo et al., 2014 ; BISMis-2014 ; LPSN 2017)

<i>Espèce</i>	<i>Souche type</i>	<i>Origine de la souche type</i>	<i>Hôte d'origine</i>	<i>Référence</i>
<i>M. temperatum</i>	SDW018 <sup>T</sup>	China	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al., (2004)
<i>M. tianshanense</i>	A-1BS <sup>T</sup>	China	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Chen et al., (1995)
<i>M. thioganicum</i>	SJT <sup>T</sup>	India	<i>Clitoria ternatea</i>	Ghosh et Roy, (2006)
<i>M. waitakense</i>	HAMBI 3605	Waitaki river (New Zealand)	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., (2016)
<i>M. waimense</i>	HAMBI 3608	Waima river (New Zealand)	<i>Sophora longicarinata</i>	De Meyer et al., (2015)
<i>M. sophorae</i>	HAMBI 3606	Waitaki river (New Zealand)	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., (2016)
<i>M. soli</i>	KEMB 9005-153	in South Korea	<i>rhizosphere of Robinia pseudoacacia L.</i>	Nguyen et al., (2015)
<i>M. sediminum</i>	KCTC 42205	Environmental – marine	<i>deep-sea sediment</i>	Yuan et al., (2016)
<i>M. newzealandense</i>	HAMBI 3607	Waitaki river (New Zealand)	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., (2016)
<i>M. kowhii</i>	HAMBI 3603	Waitaki river (New Zealand)	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., (2016)
<i>M. jarvis</i>	LMG 28313	New Zealand	<i>Lotus corniculatus</i>	Martínez-Hidalgo et al., (2015)
<i>M. japonicum</i>	CECT 9101	New Zealand	<i>Lotus</i>	Martínez-Hidalgo et al., 2016
<i>M. erdmanii</i>	LMG 17826t2	New Zealand	<i>Lotus corniculatus</i>	Martínez-Hidalgo et al., (2015)
<i>M. cantuariense</i>	HAMBI 3604	New Zealand	<i>Sophora microphylla</i>	De Meyer et al., 2015
<i>M. calcicola</i>	HAMBI 3609	Waitaki river (New Zealand)	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., (2016)
<i>M. acaciae</i>	JCM 30534	Guangdong (China)	<i>Acacia melanoxylon</i>	Zhu et al., 2015

Dans le genre *Mesorhizobium*, la séquence du gène de l'ARNr 16S utilisée pour les études phylogénétiques montre une grande similitude entre les espèces (Alexandre et al.,2008). Ainsi d'autres gènes ont été utilisés tels que *dnaK* (Stepkowski et al.,2003), *atpD* et *recA* (Vinuesa et al.,2005). Récemment, le gène *dnaJ* a été proposé comme marqueur phylogénétique au niveau de la classe des  $\alpha$ protéobactéries, dans le genre *Mesorhizobium*. Ce gène permet une identification avec plus de résolution que le gène de l'ARNr 16S (Alexandre et al.,2008).

## **6- Diversité des rhizobiums nodulant le pois chiche (*Cicer-arietinum* L.)**

La symbiose pois chiche- rhizobiums n'a pas été largement étudiée, ce n'est que dans les années 90 que la diversité des rhizobiums pouvant noduler cette légumineuse a commencé à être systématiquement étudiée. Jusqu'à présent, peu d'études sont consacrés à ce domaine, elles utilisent des critères phénotypiques et moléculaires variés du rhizobium. La caractérisation phénotypique est basée sur des tests biochimiques, enzymatiques (L'Taïef et al.,2007) et sur les profils de résistance aux antibiotiques (Alexandre et al.,2006). Les approches moléculaires les plus communes comprennent les empreintes digitales RAPD (random amplified polymorphic DNA), le séquençage de l'ARNr 16S, les profils palindromiques extragéniques répétitifs (REP -PCR) (Ben Romdhane et al.,2007) et l'analyse du profil des protéines totales (Alexandre et al.,2006).

Au début, tout en se basant sur le concept de groupes d'inoculation croisée, les chercheurs ont déduit que les rhizobiums nodulant le pois chiche formaient un groupe très spécifique (Gaur et Sen, 1979). Au sein de ce groupe, une importante hétérogénéité a été cependant détectée par des analyses physiologiques et moléculaires. Ces contradictions ont mené Nour et al., (1994) à réexaminer une collection de rhizobia de pois chiche provenant de différentes zones géographiques. Deux espèces du même genre *Rhizobium* ont d'abord été identifiées: *Rhizobium ciceri* et *Rhizobium mediterraneum* (Nour et al., 1994 ; 1995). Deux ans plus tard, les études suivies par Jarvis et al., (1997), ont permis d'inclure ces deux espèces dans le genre *Mesorhizobium*. Depuis au sein du genre *Mesorhizobium*, une grande diversité d'espèces nodulant le pois chiche a été mis en évidence. Des isolats liés à d'autres espèces (*M. amorphae*, *M. Loti*, *M. huakuii*, *M. opportunistum*, *M. muleiense* et *M. tianshanense*) ont été rapportés former des nodules fonctionnels lors de l'interaction avec les racines de pois chiche (Laranjo et al., 2002, 2004, 2008 , 2012; Rivas et al ., 2007; Alexandre et al., 2009; Zhang et

*al.*, 2012(a)). Cette non concordance entre cette grande diversité trouvée et la restrictivité pour la nodulation connue du pois chiche (Broughton & Perret, 1999) a mené des chercheurs à examiner des gènes symbiotiques.

L'analyse phylogénétique de deux gènes de symbiose (*nifH* et *nodC*), portant sur 21 isolats portugais, a révélé qu'ils étaient très conservés chez les isolats du pois chiche. Ces gènes groupent tous les isolats examinés dans deux clades correspondant à deux espèces (*M. mediterraneum* et *M. ciceri*), indépendamment de leurs précédentes affiliations (Laranjo et al., 2008 ). Ceci confirme que le pois chiche est un hôte restrictif pour la nodulation au moins en terme de facteurs Nod produits (Broughton&Perret, 1999).

Récemment, une autre légumineuse, *Bisserula. pelecinus*, a été montrée comme pouvant être nodulée par des bactéries de l'espèce *M. ciceri* isolées de nodules de pois chiche; cependant la souche type de *M.ciceri* est incapable de noduler cette plante (Nandasena et al., 2007 b). Le spectre d'hôte de ces souches isolées du pois chiche apparait donc comme très restreint même si ponctuellement des souches peuvent s'associer avec d'autres plantes.

Malgré ces précédents résultats, le problème de l'ambiguïté concernant la spécificité de la symbiose entre le pois chiche et le rhizobium reste toujours à résoudre. Sans doute les résultats d'un nombre plus grand d'études devraient expliquer cette importante diversité, surtout que cette dernière a même dépassé le niveau inter espèce du genre *Mesorhizobium*. En effet, d'autres espèces du genre *Ensifer* nodulant le pois chiche, ont été détectées dans plusieurs études (Aouani et al., 2001; Maatallah et al., 2002; Ben romdhane et al., 2007 ) au sein des nodules de pois chiche.

L'importance du pois chiche dans notre pays, son insuffisance en rendement, la nécessité de notre pays à exploiter la symbiose « pois chiche-rhizobium », le nombre d'études réduit portant sur la diversité des symbiotes de cette légumineuse ainsi que l'ambiguïté des résultats obtenus jusqu'à présent concernant la spécificité de cette symbiose, toutes ces causes nous ont encouragés à centrer notre étude sur les rhizobiums qui nodulent le pois chiche en Algérie.

***Partie II : Matériel et  
méthodes***

## I-Zones d'études

### 1-Localisation et données pédoclimatiques des sites prospectés

Neufs sites situés dans l'Est Algérien, ont servi pour un prélèvement des échantillons de sol: Constantine, Jijel, Batna, Merouana, N'Gaous, Biskra, Tébessa, Still et Hassi Messaoud, (figure 8).

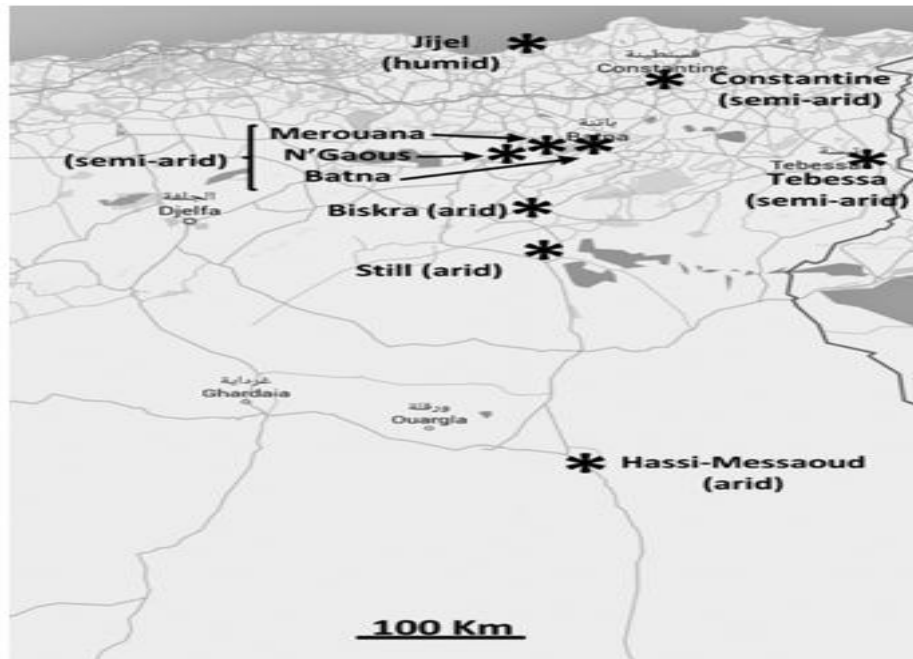


Figure8 : Localisation des sites d'études dans l'Est Algérien

Ces différents sites, présentent différents climats, varient en latitude de 31° 57'N (Hassi Messaoud ) à 36°48'N (Jijel) et en Longitude de 03° 40' E (Still ) à 08° 07' E (Tébessa).

Le climat de chaque site d'étude est définit à l'aide des données fournies par les différentes stations Météorologiques des villes concernées, (se basant sur l'échelle bioclimatique d'Emberger, 1995) et par le calcul de l'indice d'aridité (De Martonne, 1926). Ce dernier est calculé par la relation  $I=P/T+10$  (P et T sont successivement les moyennes annuelles de la précipitation et la température).

Nos sites couvrent différents étages climatiques :

- Un climat aride (Hassi Messaoud, Still et Biskra), caractérisé par une température annuelle moyenne variante entre (21,9 et 23,07°C) et une faible précipitation variante entre 3 et 128mm.



- Un climat semi – aride présenté par : Tébessa, Batna, Merouana , Constantine et N’Gaous. Excepté le site de Constantine qui est connu par une pluviosité plus forte que les autres, montrant une précipitation annuelle de moyenne 560mm, le reste de ces sites est caractérisé par une température annuelle moyenne allant 14 à 15,5°C et des précipitations dont la moyenne est située entre 253 à 390 mm.
- Un climat humide représenté par Jijel, ce site est caractérisé par une température moyenne de 19°C et par la plus grande précipitation annuelle atteignant une valeur moyenne de 1200mm.

Tableau 5 : Caractères pédoclimatiques des sites prospectés

Sites	Climat	latitude	Longitude	Indice d’aridité (I)
Tébessa	Semi -aride	35°24'50"N	8°5'01"E	13,938
Still	aride	34° 15' 43"N	5° 54' 49" E	0,126
Hassi Messaoud	aride	31°41'56"N	6°04'17"E	0,092
Batna	Semi -aride	35°33'07"N	6°11'16"E	15,6
N’Gaous	Semi- aride	35°32'59" N	5°36'01" E	11,058
Biskra	aride	34°51'01"N	5°45'09"E	4,064
Constantine	Semi–aride	36°21'42"N	6°39'59"E	22,4
Jijel	Humide	36°47'37"N	5°46'34"E	41,379
Merouana	Semi -aride	35°37'40"N	5°54'28"E	11,791

## 2-Echantillonnage des sols

Les échantillons de sols ont tous été prélevés au mois de Mars 2012 à une profondeur comprise entre 10 et 20cm à partir de différentes régions n’ayant jamais été cultivées. Chaque échantillon du sol a été prélevé et introduit dans un sachet en plastique, les pierres, les racines et les débris étant éliminés et l’échantillon est immédiatement transporté au laboratoire. Pour chaque site, l’échantillon de sol est constitué d’un mélange de 5 à 8 prélèvements pris à partir de différents points espacés de 1 à 2 mètres du point dont les coordonnées GPS sont prises. Chacun des échantillons du sol a été séparé en deux lots. Un lot dont les sols ont servi pour les analyses physico-chimiques (excepté pour le cas du pH), ces sols ont subi un séchage à l’air libre. Le deuxième lot contient les sols destinés à l’énumération et le piégeage des rhizobiums, ces derniers ont été utilisés à l’état frais avec un stockage de 7 jours au maximum à 4°C (Chaussod et *al.*, 1986).

### **3- Analyses physicochimiques des sols**

L'acidité des sols des neufs sites prospectés a été déterminée dans l'eau (Afnor, 1981). Une suspension contenant 10g de sol et 90ml d'eau distillé stérile subie une agitation pendant 1h, puis après un repos de 30min, 3 mesures du pH sont effectuées à l'aide d'un pH mètre.

La texture des sols a été déterminée par analyse granulométrique, réalisée par le laboratoire des travaux publics de l'Est, direction régionale de Constantine selon les normes NF P94-056 et NF P94-057.

Le niveau de fertilité a été déterminé par des analyses chimiques qui ont porté sur la teneur en azote totale et en carbone totale. Leurs déterminations sont obtenues par combustion sèche selon les normes ISO13878 (N) et ISO10694 (C), par le laboratoire des moyens analytiques de l'IRD à Dakar (Laboratoire certifié ISO 9001).

## **II Culture du pois chiche, obtention des nodules et des bactéries nodulaires**

### **1-Graines et conditions des cultures**

#### **1-1-Variétés de pois chiche utilisées**

Trois variétés de pois chiche ont été utilisées dans cette expérimentation : **ILC32-79** (variété I), **Flip 85-55** (II), **Flip 90-13** (III), (Figure 9). Ces variétés ont été sélectionnées dans une collection de matériel génétique maintenu à l'institut technique des grandes cultures (I.T.G.C), situé à Elkhroub (Constantine, Algérie). Selon cet institut, les trois variétés sont de type Kabuli qui s'adapte bien aux sols méditerranéens (Saxena, 1987). En plus de leur variabilité génotypique, la différence phénotypique de ces trois variétés réside en leurs tailles et en la structure de leurs graines (figure 9).



Figure 9: Variétés de pois chiche utilisées

### 1-2-Préparation des graines

Les graines de trois variétés (I, II et III) sont désinfectées en les mettant dans une solution d'hypochlorite de calcium à 10% pendant 3 min, puis rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines sont mises à imbiber dans de l'eau distillée stérile pendant 16 à 24 heures à 4°C. Les graines bien imbibées sont transférées dans des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée stérile à 0,8% (w/v) puis placées à l'obscurité à 25°C pendant 3 à 5 jours pour germination (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

### 1-3- Dispositifs et conditions de culture

La culture du pois chiche est réalisée dans des pots en plastique de 1000 ml de volume, remplis à leur 3/4 par de la perlite puis stérilisés par autoclavage à 120°C pendant ½ heure. Les pots sont mis en chambre de culture sous conditions contrôlées, assurant une photopériode de 16 heures et une température de 25 °C le jour et 18°C la nuit (Vincent, 1970). Un arrosage de 30 ml/pot d'une solution nutritive stérile sans azote est effectué tous les deux jours. L'utilisation de l'eau distillée stérile et celle d'une solution azotée est réalisée selon les nécessités et le teste à réaliser.

## 2- Piégeage des bactéries nodulaires du pois chiche

Les trois variétés de pois chiche ont été mises en culture sur les 9 différents sols pour piéger les rhizobiums pouvant former des nodules sur leurs systèmes racinaires. Le piégeage des rhizobiums est réalisée selon la méthode modifiée par plusieurs chercheurs (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

Une quantité 50g de chacun des échantillons des neufs sols prospectés est distribuée sur la perlite de chaque pot. Sur ce mélange sont déposées cinq graines stériles de l'une des trois variétés de pois chiche, le tout est recouvert par une légère couche de perlite stérile. Pour chaque site prospecté et pour chacune des trois variétés, cette opération est répétée 3fois, soit un total de neuf répétitions pour chaque type de sol.

Six pots ne contenant pas de sol (uniquement de la perlite stérile) ont servi comme témoins pour chaque variété. Trois pots arrosés par la solution nutritive sans azote représentent le témoin négatif et trois arrosés par la solution azotée (7g/l de  $\text{KNO}_3$ ) représentent le témoin positif.

## 3- Estimation du nombre le plus probable (NPP) des rhizobiums

La taille de la population de rhizobium naturelle dans les différents sols est estimée selon la méthode reposant sur l'infection des plantes par leurs symbiotes dans des conditions contrôlées (Brockwell et *al.*, 1963 ; Vincent, 1970 ; Toomsan et *al.*, 1984; Somasegran et Hoben, 1994).

### 3-1-Suspension de sol et inoculation des graines de pois chiche

Dans cette expérience seulement la variété III est utilisée. Pour chaque site, une suspension est formée de 10g de sol et 90 ml d'une solution saline de 0.9%NaCl (w/v) stérile, puis agitée pendant 15mn. On procède à une dilution au dixième de la suspension du sol obtenue pour chaque cas, par utilisation de l'eau physiologique. Ainsi 8 dilutions successifs ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) de chaque suspension de sol sont obtenues (nous avons considéré que la dilution  $10^{-1}$  représente la solution mère).

Un volume de 2 ml de chaque dilution a servi pour inoculer deux graines de pois chiche semées dans un même pot de perlite stérile.

Quatre répétitions sont réalisées pour chaque dilution et les cultures de contrôles non inoculées sont également incluses.

### **3-2-Calcul du NPP**

Les plantes sont récoltées 7 semaines après leur 'inoculation et sont prospectées pour la présence ou l'absence de nodules. Le nombre total de pots positifs montrant des nodules est ensuite utilisé pour calculer le NPP (nombre le plus probable) du rhizobium pour chaque site (Fisher et Yates, 1963). Tout en se basant sur 10 g de chaque type de sol séché dans une étuve réglée à 80°C, le nombre le plus probable de rhizobium par gramme de sol sec, est calculé par la formule suivante :

$$\text{NPP} = mxv/d$$

d : représente la dilution la plus faible utilisée ( $d=10^{-1}$  dans notre cas)

v : volume utilisé pour l'inoculation d'une plante dans chaque pot ( $v=1$  ml dans notre cas)

m : le nombre le plus probable trouvé (ou lue) dans la table statistique de Yates et Fisher (annexe 3). Il est déterminé à partir de n et s et par le nombre de pots qui montrent des plantes avec nodules (résultats positifs)

n : nombre de répétitions ( $n=4$  dans notre cas)

s : nombre des étapes de dilution ( $s=8$  dans notre cas )

## **4-Obtention d'une collection de nodules**

### **3-1- Collecte des jeunes nodules**

Au début de la phase de floraison (6-8 semaines après germination), les jeunes plantes qui ont servis pour le piégeage des rhizobiums, sont déterrées et les nodules sont collectés selon la méthode décrite par (Vincent, 1970). Chaque plante est arrachée délicatement à partir de son pot et après lavage, les racines sont coupées 1 à 2 mm à proximité du site d'attachement des nodules. Les nodosités prélevées ont, soit servi immédiatement à l'isolement directe des bactéries nodulaires ou bien ils sont conservés par dessiccation.

Parallèlement à la collecte des nodules, l'enregistrement de certains paramètres est réalisé. Pour chaque variété et pour chaque sol, sont notés, la taille, la couleur et le nombre des nodules obtenus par plante.

### 3-2-Conservation des nodules

La majorité des nodules obtenus a servi pour un usage immédiat en maintenant les nodules frais dans le réfrigérateur à 4C° jusqu'à 48 heures. Pour une longue conservation, la dessiccation des nodules est réalisée par déshydratation en présence du Chlorure de Calcium (CaCl<sub>2</sub>) anhydre mis au fond d'un flacon en verre et recouvert par une couche de coton sur laquelle reposent les nodules (Fig. 9).

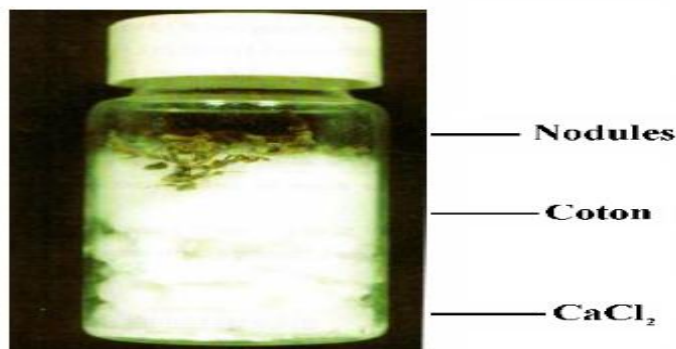


Figure10: Conservation des nodules sous CaCl<sub>2</sub> (Vincent, 1970)

L'ensemble des nodosités récoltées par piégeage a servi pour former une collection de nodules à partir de laquelle, une collection de bactéries nodulaires du pois chiche est obtenue.

## 5-Isolement de bactéries intra nodulaires

### 5-1- Stérilisation des nodules

Les nodosités collectées sont rincées à l'eau courante afin d'éliminer le sol, désinfectées par une solution de chlorure mercurique acidifié (0,1% HgCl<sub>2</sub> dans 0,06 N HCl) pendant 3 min, puis rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile (Vincent, 1970).

### 5-2- Isolement, purification et stockage des isolats

L'isolement est réalisé selon la technique classique de Vincent (1970). Les nodosités de taille inférieure à 0,5 cm sont écrasées dans des ependorfs contenant 200µl de l'eau stérile. Le broyat obtenu est striée sur le milieu YEM (Yeast Extract-Mannitol) solide (Vincent, 1970) additionné de rouge Congo à 2,5% (Annexe 1). Les nodosités de taille supérieure à 0,5 cm sont coupés aseptiquement sur des boîtes de Pétri stériles et la partie rougeâtre à l'intérieur de chaque nodosité est prélevée à l'aide d'un cure dent stérile, puis étalée par striation directement sur des boîtes contenant du YEM solide additionné de rouge Congo à 2,5%. Les différentes boîtes sont incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours. La purification est réalisée par

une série de repiquage des colonies sur le même milieu (Vincent, 1970) et les bactéries purifiées sont mises à -80°C dans 20% de glycérol pour conservation après leur caractérisation morphologique.

### **5-3-Caractérisation morphologique des bactéries retenues**

La caractérisation morphologique des bactéries retenues dans notre collection repose sur une analyse visuelle de l'aspect des colonies selon les caractéristiques phénotypiques des rhizobiums, cités par Vincent, (1970) et Jordan (1982).

### **6-Test de nodulation**

Le test de nodulation consiste en l'inoculation des graines stériles et germées du pois chiche avec les différentes bactéries à tester dans des conditions microbiologiquement contrôlées (Vincent, 1970 ; Beck *et al.*, 1993).

Pour cette expérimentation quatre graines de la variété III (Flip90-13), sont semées dans un même pot en plastique stérile (1000 ml de volume). L'inoculation des racines est effectuée 2 à 3 jours après le semis avec un inoculum de  $10^8$ - $10^9$  cellules de rhizobium par millilitre (1ml d'inoculum /plante). Un témoin positif (solution nutritive azotée avec 7g/l de  $KNO_3$ ) et un contrôle sans azote et non inoculé, représentant d'un témoin négatif sont également inclus dans ce test. Une répétition de trois pots pour chaque isolat et pour chacun des témoins, est réalisée. Les plantes sont arrosées avec une solution nutritive stérile sans azote ou avec azote selon le besoin et selon le cas. Après six semaines, les racines sont vérifiées pour la présence (+) ou absence (-) de nodules.

## **III-Caractérisation moléculaire des bactéries nodulaires du pois chiche**

### **1-Obtention des échantillons d'ADN**

#### **1-1-Extraction et conservation d'ADN**

L'ADN génomique des isolats est obtenu par extraction au chloroforme et traitement RNase, à partir des cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance dans le milieu YEM

(annexe 1). La méthode adoptée est classique et a été utilisée par plusieurs chercheurs (Vincent, 1970 ; Ausubel et *al.*, 1987 ; Sritharan et *al.*, 1991) avec quelques modifications.

Une quantité 3 ml de la culture de chaque souche est transférée dans un ependorf puis soumise à une centrifugation pendant 10 min à 13000 rpm. Au culot obtenu sont additionnés 300 µl de tampon de lyse (40 mM Tris-HCl (pH 7,8) – 1 mM EDTA - 1% SDS- 20 mM d'acétate de sodium et l'ARNase à 20 mg ml<sup>-1</sup>) et 100 µl d'une solution de NaCl 5M. Le mélange est incubé à une température de -20°C pendant 20mn puis centrifugé à 13000 rpm pendant 10mn à 4°C. Au 500 µl du surnageant obtenu est ajouté un volume égal de chloroforme, le mélange est centrifugé pendant 3 min à 13000 rpm. La précipitation des acides nucléiques est effectuée par l'ajout 2 volumes d'éthanol absolu froid au volume du surnageant obtenu. Après une autre centrifugation de 10 min à 13000 rpm, le culot obtenu est lavé par de l'éthanol froid à 70% en centrifugeant à 13000 rpm pendant 10 min, puis séché à l'air libre.

Le culot séché est suspendu dans 55 µl de TE (10mM Tris (pH=7,8), 1mM EDTA) et 1µL d'ARNase (20µg/ml). Les différents ependorfs contenant l'ADN sont placés à 4°C pendant 24h avant la détermination de la qualité d'ADN obtenu et son utilisation.

## **1-2-Qualité de l'ADN extrait**

### **1-2-1- Caractérisation par Nanodrop**

La quantité et la pureté de l'ADN sont estimées par un dosage sur un Nanodrop (Thermo Scientific Nano Drop<sup>TM</sup>8000). La quantité est estimée par absorbance à 260nm et la pureté de l'ADN est évaluée par le rapport de deux densité optiques (DO), mesurées (DO 260/DO 280). L'ADN de chaque souche est ensuite dilué dans du TE à une concentration finale de 10 ng/µl puis conservé à -20°C.

### **1-2-2 Caractérisation par électrophorèse**

La qualité des ADNs obtenus est révélée par électrophorèse horizontale. Pour chaque échantillon d'ADN, une quantité de 8 µl est déposée sur un gel d'agarose à 0,8% puis soumise à une migration sous une impulsion électrique de 80V pendant 2heurs de temps.

Le gel d'agarose est préparé dans le tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM). La révélation se fait sous UV (312 nm) par photographie au Biodoc (Biodoc 2NT/Biometra), après confrontation du gel avec une solution de bromure d'éthidium (BET) à 1 mg/ml pendant 20 à 25 min et rinçage dans de l'eau distillée pendant 3 min.



## 2- Amplification de l'ADN

### 2-1- Les fragments d'ADN à analyser

Les isolats nodulaires du *Cicer arietinum*, sont analysés par séquençage de plusieurs fragments d'ADN, comportant un gène ribosomique (ADNr 16S), un gène de ménage (*recA*), une région inter génique 16S-23S (IGS) et deux gènes symbiotiques (*nodC* et *nifH*). Nous notons que l'analyse moléculaire de l'ensemble des isolats de notre collection a été initiée par l'utilisation du gène ADNr 16S en premier lieu.

### 2-2- Amorces utilisées

Selon l'ADN ciblé pour l'amplification, un ou plusieurs couples d'amorces (tableaux 5), sont utilisées.

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de différents fragments d'ADN.

ADN à amplifier	Nom de l'amorce	Séquences (5'-3')	Références
ADNr 16S	1488R	CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC	Herrera-Cervera <i>et al.</i> , (1999)
	41F	GCTCAGATTGAACGCTGGCG	Herrera-Cervera <i>et al.</i> , (1999)
	FGPS6	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG	Normand <i>et al.</i> , (1992)
	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> , (1991)
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	Overmann et Tuschak, (1997)
	FGPS1509	AAGGAGGGGATCCAGCCGCA	Normand <i>et al.</i> , (1992)
recA	RAS_recAF35	CGGTGGAYAAAAGCAAGGC	Sbabou <i>et al.</i> , 2016
	RASM_recARev1006	GGCRATSAGVCCGGCATTCTG	Sbabouet <i>et al.</i> , 2016
	recA6-F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	Gaunt <i>et al.</i> , (2001).
	recA555-RD	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT	Gaunt <i>et al.</i> , (2001).
	M-recAF35	CRGTGGACAAATCAAAGGC	Sbabou <i>et al.</i> , 2016
	RecA Burk1F	GATCGARAAGCAGTTCGGCAA	Cette étude
	RecA Burk1R	TTGTCCTTGCCCTGRCCGAT	Cette étude
IGS	FGPS1490-72	TGCGGCTGGATCCCCTCCTT	Normand <i>et al.</i> , (1996)
	R23_3R	GGTACTTAGATGTTTCAGTTC	Kwon <i>et al.</i> , (2005)
	23S_38	CCGGGTTTCCCATTTCGG	Normand <i>et al.</i> , (1992)
	BR5*	CTTGTAGCTCAGTTGGTTAG	Willems, (2001)
nodC	nodCI	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	Laguerre <i>et al.</i> , (2001)
	nodCF	AGGTGGTYGAYGACGGTTC	Laguerre <i>et al.</i> , (2001)
nifH	<i>nifH</i> -1	AGCATGTCTCSAGYTCNTCCA	Rivas <i>et al.</i> , (2002)
	<i>nifH</i> -2	TACGGNNAARGGSGGNATCGGCAA	Rivas <i>et al.</i> , (2002)

Quatre couples d'amorces sont utilisés pour l'amplification de chacun des gènes ADNr 16S et *recA*, deux pour l'amplification du fragment IGS et un pour chacun des gènes *nodC* et *nifH*, (tableaux 6 et 7).

### 2-3-La solution mixte de l'amplification

Pour chacun des différents isolats, une quantité de 1 µl de l'ADN est ajoutée à un mélange réactionnel de 24 µl par micro tube. Ce mélange contient le tampon de réaction à une concentration finale 10X (200mM de Tris-Hcl à pH=8,4 et 500 mM de Kcl), du dNTP (0.2 mM) de MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), 0.5 µM de chacune des deux amorces et 0,15 U de *Taq* Polymérase (Invitrogen). Chaque microtube contenant 25 µl de la solution réactionnelle correspond à un isolat et un microtube ne contenant aucun ADN (H<sub>2</sub>O), a servi de témoin négatif.

### 2-4- Conditions de l'amplification

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur de type Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Excepté la température d'hybridation variant de 55°C à 65°C selon le couple d'amorce utilisé (tableau 7), les étapes d'amplifications sont semblables pour les fragments à amplifier.

Tableau7 : Température d'hybridation des différents couples d'amorce et longueur estimé d'ADN à amplifier

ADN et longueur estimée en pb	Couple d'amorces	Température d'hybridation
16S (1350-1500bp)	1488R/41F	58°C
	1488R/FGPS	62°C
	1492R/27F	57°C
	1488R/FGPS1509	64°C
<i>recA</i> (970bp-1000pb)	RAS_ <i>recAF35</i> / RASM_ <i>recARev1006</i>	62°C
	<i>recA6-F</i> / <i>recA555-RD</i>	58°C
	M- <i>recAF35</i> / RASM_ <i>recARev1006</i>	62°C
	<i>RecA Burk1F</i> / <i>RecA Burk1R</i>	56°C
IGS (700-1000pb)	23S_38/FGPS1490-72	58°C
	R23_3R /BR5*	58°C
<i>nodC</i> (930pb-960bp)	<i>nodCI</i> / <i>nodCF</i>	55°C
<i>nifH</i> (600pb-700bp)	<i>nifH-1</i> / <i>nifH-2</i>	65°C

Chaque mélange réactionnel subi un préchauffage de 45s à 94°C, puis une succession 35 cycles dont chacun contient une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 40 secondes, une étape d'hybridation pendant 30 secondes et finalement une étape d'extension à 72°C pendant 60 à 90 secondes. Ces cycles sont suivis d'une étape d'élongation finale des amorces à 72°C pendant 7 min. Les micro tubes contenant les amplifias obtenus sont placés à 4°C jusqu'à utilisation.

### **2-5- Vérification de la qualité des amplifias**

La vérification de l'amplification des fragments d'ADN est réalisée par électrophorèse horizontale dans le tampon TAE 1X. La taille du marqueur de taille moléculaire utilisée (Stepladder, Promega), est variante entre 100bp (IGS, nodC et nifH) et 1Kb (ADNr16S, recA).

Pour chacun des différents amplifias, un échantillon de 5 µl, est préalablement mélangé avec 1µl du tampon de charge (annexe 3) puis déposé dans un puits. La migration est réalisée dans un gel d'agarose de 1% (Sigma medium EEO type II) à 80V pendant 45 min. Le gel est coloré dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à 1 mg/ml pendant 20 à 25 min, rincé dans de l'eau distillée pendant 3 min puis placé sous UV (312 nm) au Biodoc (Biodoc 2NT/Biometra), pour être photographié.

### **3- Séquençage des amplifias**

Les amplifias d'ADN de bonne qualité (une seule bande d'amplification visible sur gel) et quantité sont envoyés à séquencer dans une société privée (Genoscreen, Lille, France). Les réactions de séquençage de l'ADN ont été réalisées en se basant sur la méthode de Sanger et les produits des réactions de séquence ont été ensuite purifiés sur des colonnes Sephadex Auto Seq G-50 (Amersham Pharmacia Biotech). Les électrophorégrammes sont ensuite récupérés par internet auprès de la société.

## IV Analyse des données

### 1- Identification des isolats et correction des séquences

Les séquences nucléotidiques obtenues sont comparées avec celles des souches de référence de rhizobium disponibles dans la base de données Gen-Bank (NCBI : National Center for Biotechnology Information), à l'aide du logiciel Blast (Basic Local Alignment Search Tool, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), (Altschul et *al.*, 1997). Les séquences nucléotidiques ont été vérifiées et au besoin corrigées manuellement à l'aide de Chromas Lite v2.01 (Technelysium Pty. Ltd., Tewantin, Australie). Tous les alignements ont été effectués avec ClustalX (Larkin et *al.*, 2007) et corrigées manuellement avec GENEDOC v2.7.000 (Nicholas et *al.*, 1997).

### 2- Etude phylogénique des isolats

Les phylogénies moléculaires sont construites avec le logiciel MEGA 6 (Tamura et *al.*, 2013). Les modèles d'évolution moléculaire pour chaque ensemble de données ont été sélectionnés sur la base des scores BIC (Bayesian Information Criterion); Les plus bas scores BIC sont considérés pour décrire le meilleur modèle de substitution (test mis en œuvre dans MEGA 6); la méthode de vraisemblance maximale a été appliquée à chaque ensemble de données et la robustesse des arbres a été testée par la méthode de bootstrap. Les valeurs de bootstrap ont été exprimées comme un pourcentage de 100 réplifications.

Pour les isolats *Mesorhizobium*, nous avons effectué des analyses spécifiques. Nous avons inclus dans l'analyse des séquences ADNr 16S et recA l'ensemble de données de séquences de toutes les souches du genre *Mesorhizobium* disponibles dans la banque de données NCBI. Nous avons également concaténé les séquences ADNr 16S et recA dans le même ensemble de données et effectué une seule analyse phylogénétique, en présence des séquences de tous les différents génotypes isolés par (Armas-Capote et *al.*, 2014) sur *C. canariense*. Nous avons inclus plusieurs séquences *nodC* et *nifH* du *Mesorhizobium* (extraites de la banque de données) dans nos ensembles de données pour analyser les gènes *nodC* et *nifH* de nos isolats *Mesorhizobium*.

*Partie III : Résultats  
et discussions*

# **Chapitre I : Caractères des sols et des isolats nodulaires obtenus par piégeage**

## I-Résultats

### 1-Analyse du sol

#### 1-1-Analyses physicochimiques

##### 1-1-1-Analyse granulométrique

La quantité d'argile contenue dans les sols analysés est variable entre deux valeurs extrêmes: 11% pour Hassi Messaoud et 71% pour Constantine. Les sols de Tébessa et Batna sont similaires dans leur contenance en argile (31%), de même que pour Jijel et N'Gaous (24%). Les autres sites contiennent des quantités variables ne dépassant pas 36% (Merouana).

Concernant les particules limoneuses l'intervalle de valeurs obtenues est situé entre 10% pour Still (limon fin 6%, limon gros 4%) et 36 % pour Batna (29% fin et 7% gros). Même si la quantité en limon (fin ou gros) est variable entre eux, les sols de Biskra, Constantine (15%) et Jijel(16%), présentent presque la même contenance en limon total, idem pour le cas de Merouana (26%), N'Gaous (24%) et Hassi Messaoud (22%), ( Tableau 8).

Tableau 8 : Caractères physicochimiques des sols

Sites	Climat	pH	Argile (%)	Limon fin (%)	Limon gros (%)	Sable fin (%)	Sable gros (%)	A : Azote total (%)	C : Carbone total (%)	C/N
Tébessa	Semi-aride	8,2	31	18	14	30	7	0,06	5,64	94
Still	Aride	7,2	14	6	4	11	65	0,09	2,1	23,33
Hassi Messaoud	Aride	7,4	11	5	17	48	19	0,04	1,3	32,5
Batna	Semi-aride	7,6	31	29	7	21	11	0,25	9,68	38,72
N'Gaous	Semi-aride	8,2	24	19	5	26	25	0,29	10,32	35,58
Biskra	Aride	7,7	18	9	6	42	25	0,08	4,76	59,37
Jijel	Humide	8,1	24	13	3	23	36	0,23	2,65	11,52
Merouana	Semi-aride	7,8	36	20	6	25	13	0,17	5,99	35,23
Constantine	Semi-aride	7,9	71	15	0	10	3	0,2	2,32	10,08

Pour le cas de sable, plusieurs sites montrent un pourcentage dépassant 50%, la plus grande valeur est montrée par les sites à climat aride tels que : Hassi Messaoud, Biskra (67%) et Still (65%). Par rapport aux autres sites, Constantine représente le site le plus pauvre en sable

(13%) et le plus riche en argile (71%). Les autres sites présentent des quantités proches en particules sableuses : Jijel (49%), N'Gaous (51%), Batna (33%) et Tébessa (37%), cette variabilité touche les particules fines et grandes du sable (tableau 8).

Les quantités trouvées de l'ensemble des particules dosées (argile, limon et sable), dans cette analyse, nous a permis de déduire cinq différentes classes texturales dans les échantillons de sols examinés (tableau 9, page suivante) : Limon argilo –sableux (Tébessa, Batna, N'Gaous), sable (Still, Hassi Messaoud), Sable argileux (Biskra, Jijel), Argile limoneuse (Merouana) et Argile lourde (Constantine).

### **1-1-2- pH des sols**

Aucun pH acide n'est obtenu dans cette étude et selon les valeurs du pH obtenues, trois classes d'acidité sont détectées dans les sols examinés (tableau 9). La première classe représente un profile neutre montré par le site de Still et Hassi Messaoud. La deuxième classe d'acidité légèrement basique est présentée par les sites : Batna, Biskra et Merouana. La troisième classe dont l'acidité est nettement basique est représentée par les sites Jijel, N'Gaous, Tébessa et Constantine (tableau 9, page suivante).

### **1-1-3-Carbone total, Azote total et rapport C/N**

Un large écart dans la teneur en carbone total, situé entre 1,3 % (Hassi Messaoud) et 10,32% (N'Gaous) est obtenu pour les sites examinés. Still (2,1%), Constantine (2,32) et Jijel (2,65) sont les sites qui présentent les teneurs les plus basses en carbone après Hassi Messaoud (1,3 %). Les sites de Biskra (4,75%), Tébessa (5,64%) et Merouana (5,99 %), présentent une teneur moyenne tandis qu'une importante teneur en cet élément est montrée par Batna (9,68 %). Cette quantité lui permet de se situer ainsi après N'Gaous (10,32 %) qui présente la plus grande quantité en carbone par rapport aux autres sites examinés, (tableau 8).

Concernant l'azote, l'écart en teneur est important aussi en se situant entre 0,04% (Hassi Messaoud) et 0,29% (N'Gaous). Les teneurs les plus faibles sont montrées par Tébessa (0,06%), Biskra (0,08%) et Still (0,09), tandis que les teneurs les plus importantes sont celles montrées par Batna (0,25%), Constantine (0,23%), Jijel (0,23%), Merouana (0,17%) et N'Gaous (0,29%), (tableau 8).



D'après les teneurs de carbone et d'azote trouvés, il en sort que la différence en rapports C/N s'étend de la valeur 10,8 (Constantine) jusqu'à 94 (Tébessa). En fonction de valeurs C/N trouvées, on peut distinguer trois niveaux de décomposition de la matière organique allant d'une décomposition nulle ou négligeable (Tébessa) à une bonne décomposition (Constantine et Jijel). La classe représentante d'une mal décomposition de la matière organique rassemble tous les sites restants (tableau 9).

Tableau 9 : Classe texturale, acidité et décomposition de la matière organique des sols

Sites	Climat	Acidité du sol	Classe texturale du sol	Décomposition de la matière organique
Tébessa	Semi-aride	Franchement basique	Limon argilo -sableux	Non décomposition
Still	Aride	Légèrement neutre	Sable	Mal décomposition
Hassi Messaoud	Aride	Légèrement neutre	Sable	Mal décomposition
Batna	Semi-aride	Légèrement basique	Limon argilo -sableux	Mal décomposition
N'Gaous	Semi-aride	Franchement basique	Limon argilo -sableux	Mal décomposition
Biskra	Aride	Légèrement basique	Sable argileux	Mal décomposition
Constantine	Semi-aride	Franchement basique	Argile lourde	Bonne
Jijel	Humide	Franchement basique	Sable argileux	Bonne
Merouana	Semi-aride	Légèrement basique	Argile limoneuse	Mal décomposition
Nombre de classe	3	3	5	3

## 2- Analyse microbiologique : le nombre le plus probable en rhizobium (NPP)

C'est sur la base de plusieurs paramètres tels que : le nombre des pots positifs (contenant les nodules), le nombre de répétition ( $n=4$ ), le nombre ( $s=8$ ) et le volume ( $v=1\text{ml}$ ) des dilutions utilisées, l'équivalent du poids de 1g de sol frais et la table 3.5A de Fisher et Yates (Annexe 2), - qu'on a pu estimer le NPP (le nombre le plus probable) de rhizobium présent dans les sols examinés et en déduire l'intervalle de confiance ( $f$ ) correspondant, selon la formule de Cochran (Cochran, 1950).

Tableau 10 : Le nombre le plus probable en rhizobium (NPP)

Site	Nombre de pot (+) par dilution								Total des pots (+)	M (n=4et s=8) Cellules/g de sol frais	Equivalent d'1 g de sol frais en sol sec	NPP (cellule/g sol sec) x 10 <sup>3</sup>	Intervalle de confiance du NPP x10 <sup>3</sup> pour f=3,80
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>					
Constantine	2	2	1	2	2	3	0	0	12	1,7. 10 <sup>3</sup>	0,906	1,88	[0,49-7,14]
Batna	2	3	3	2	0	0	0	0	10	5,8. 10 <sup>2</sup>	0,98	0,592	[0,15-2,25]
Merouana	0	2	2	4	0	0	0	0	8	1,7. 10 <sup>2</sup>	0,922	0,184	[0,05-0,70]
Hassi Messaoud	0	2	3	0	0	0	0	0	5	3,1.10	0,984	0,0315	[0,008-0,12]
N'Gaous	0	2	0	2	2	0	0	0	6	5,8.10	0,97	0,0598	[0,016-0,23]
Still	1	3	2	2	0	0	0	0	8	1,7. 10 <sup>2</sup>	0,964	0,176	[0,046-0,67]
Jijel	0	4	3	1	3	3	0	0	14	5,8.10 <sup>3</sup>	0,989	5,86	[1,54-22,27]
Biskra	4	3	2	3	3	0	0	0	15	1,07.10 <sup>4</sup>	0,936	10,7	[2,81-40,66]
Tebessa	0	1	4	3	2	0	0	0	10	5,8.10 <sup>2</sup>	0,942	0,589	[0,15-2,24]

M : nombre de rhizobium par gramme de sol frais ; n : nombre de répétitions (n=4 dans notre cas) ; s : nombre des étapes de dilution (s=8 dans notre cas) ; f : facteur de confiance ; NPP : le nombre le plus probable en rhizobium exprimé en nombre de rhizobium/gramme sol sec ; Pot (+) : pot montrant au moins un nodule

Le NPP est exprimé en nombre du rhizobium par gramme de sol sec. Ce dernier est variable entre  $0,0315 \cdot 10^3$  (Hassi Messaoud) et  $10,7 \cdot 10^3$  (Biskra). N'Gaous avec le nombre  $0,0598 \cdot 10^3$  représente le deuxième site montrant un faible nombre de rhizobium suivi de Still ( $0,176 \cdot 10^3$ ) puis Merouana ( $0,184 \cdot 10^3$ ) après le site de Hassi Messaoud. Le site de Jijel ( $5,86 \cdot 10^3$ ) représente le deuxième site donnant un nombre important en rhizobium après Biskra. Les autres sites montrent un nombre de rhizobium intermédiaire : Tébessa ( $0,589 \cdot 10^3$ ), Batna ( $0,592 \cdot 10^3$ ) et Constantine ( $1,88 \cdot 10^3$ ), (tableau 10).

### 3-Analyse en composante principale (ACP) du sol et effet des paramètres abiotiques sur le NPP

Une analyse en composante principale a permis la comparaison entre tous les sols utilisés par rapport à tous les paramètres physicochimiques étudiés dans cette étude. Ceci a permis un regroupement des sites similaires pour plusieurs caractéristiques examinées (figure 11).

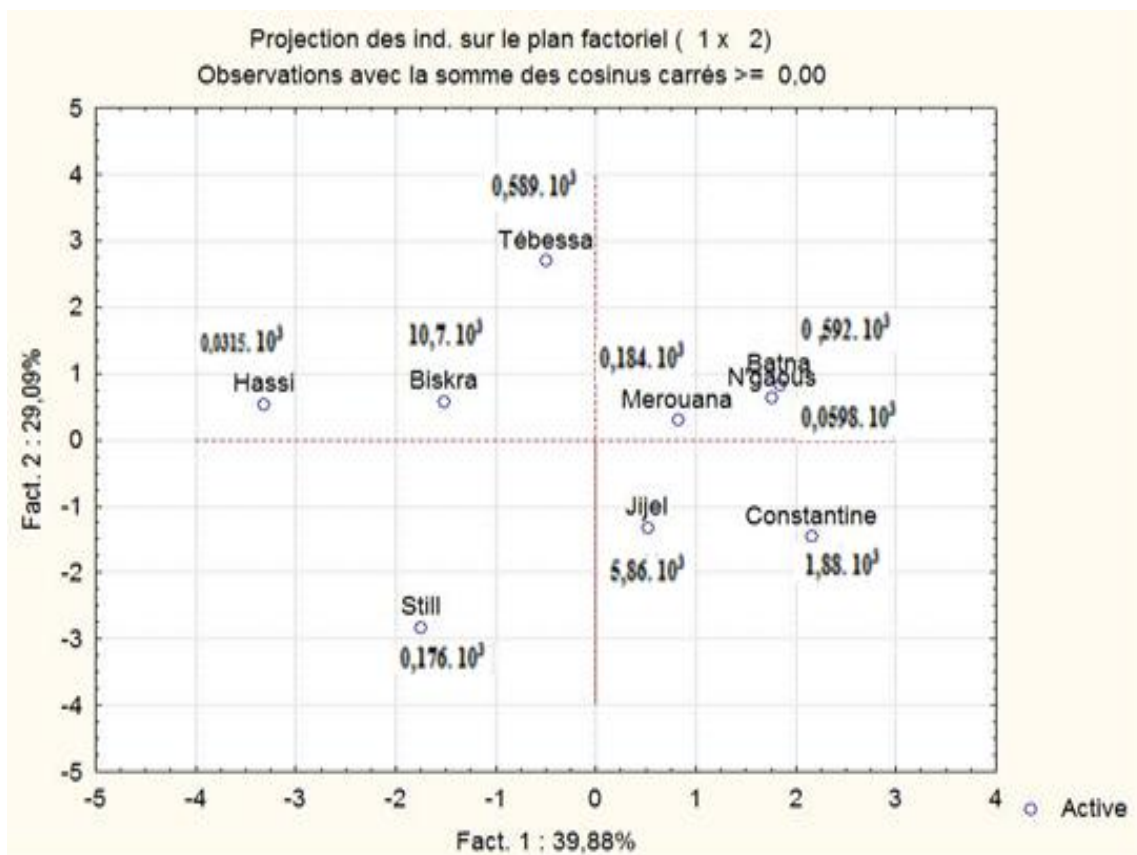


Figure 11: Représentation en ACP des échantillons des sols (les chiffres représentent le NPP par site)

Le premier axe, F1 (39,88% de la variation totale) a séparé les sites en deux groupes presque équivalents en nombre. Un des deux groupes rassemble quatre sites : Tébessa, Hassi, Still et Biskra dont la majorité est connue par son climat aride. La majorité des sites formant le deuxième groupe représente un climat semi-aride.

L'axe F2 (29,09% de la variation totale) quant à lui a permis de séparer les sites qui sont similaires par leur faible teneur en carbone (Constantine, Jijel et Still) des autres sites. L'intersection des deux axes a permis de grouper les sept sites en quatre groupes différents. A l'intérieur de chaque groupe, les sites sont loin ou proches selon le nombre de différences en certains de leurs caractères physicochimiques et climatiques, (figure 11).

Par exemple Batna, N'Gaous et Merouana se trouvent dans le même groupe. Le site de Merouana est un peu éloigné des deux autres probablement par sa contenance en limon et sa déficience en sable. Dans le deuxième groupe contenant Hassi, Biskra et Tébessa, ce dernier site se trouve un peu éloigné des autres puisqu'il ne représente pas le même climat et la même texture que Hassi et Biskra. Ces deux derniers sont différents seulement par leur classe en acidité et par la présence de l'argile à Biskra. Le troisième groupe contient deux sites (Constantine et Jijel) qui diffèrent par le climat et par la teneur en sable. Le site de Still se trouve seule dans le quatrième groupe, il est retiré des deux autres sites ayant le même climat (Hassi et Biskra) probablement à cause de sa pauvreté en limon gros et en sable fin et sa richesse en sable gros.

Pour essayer de mettre en évidence l'influence des facteurs physicochimiques et le climat sur le nombre de rhizobium (NPP) trouvé dans les sites examinés, nous avons attribué pour chaque groupe des sites séparés par l'ACP, les NPPs trouvés. Nous remarquons que certains sites appartenant à des groupes différents (Tébessa et Batna) montrent des valeurs très proches en NPP ( $0,589 \cdot 10^3$  et  $0,592 \cdot 10^3$ ). Aussi certains sites du même groupe (Biskra et Hassi Messaoud) ayant le même climat, présentent respectivement des valeurs extrêmes en NPP ( $10,7 \cdot 10^3$  et  $0,0315 \cdot 10^3$ ).

Avec cette distribution nous pensons que probablement les facteurs physicochimiques ainsi que le climat n'ont pas influé sur la répartition du NPP sur les différents sites (figure 11).

Tableau 11 : Nombre de plantes et de nodules obtenus par piégeage

Site	Variété I			Variété II			Variété III			Variétés (I, II, III)		
	Plante	Nodule	nodule/plante	Plante	Nodule	nodule/plante	Plante	Nodule	nodule/plante	Plante	nodule	nodule/plante
Biskra	8	7	0,9	7	8	1,14	13	31	2,38	28	46	1,64
Batna	10	20	2	8	12	1,5	11	22	2	29	54	1,86
N'Gaous	9	10	1,1	5	12	2,4	10	28	2,8	24	50	2,08
Merouana	11	16	1,5	8	8	1	8	18	2,25	27	42	1,56
Tébessa	5	6	1,2	13	24	1,85	6	14	3,5	24	44	1,83
Constantine	12	10	0,8	10	11	1,1	15	14	0,93	37	35	0,95
Jijel	11	14	1,3	12	8	0,67	12	36	3	35	58	1,66
Hassi Messaoud	4	0	0	2	0	0	6	2	0,33	12	2	0,16
Still	6	0	0	4	2	0,5	5	3	0,6	15	5	0,33
Total (sans témoins)	76	83	1,092	69	85	1,231	86	168	1,953	231	336	1,454
Témoin négatif	10	0	0	9	0	0	12	0	0	31	0	0
Témoin positif	15	0	0	12	0	0	15	0	0	42	0	0

## II- Piégeage et isolement des bactéries nodulaires

### 1-Plantes et nodules du piégeage

#### 1-1-plantes obtenues

Suite à une culture qui a duré 6 à 8 semaines, 304 plantes sont obtenues, parmi lesquelles 31 sont des témoins négatifs (sans sol et sans azote), 42 sont des témoins positifs (sans sol et avec azote). Au cours de cette culture, certaines germinations sont mortes ainsi le nombre de plante par pot pour certains cas était inférieur à cinq (figure 12).



Figure 12 : Culture du pois chiche pour piégeage

Les 304 plantes obtenues sont distribuées différemment selon les sols d'origine sur lesquels on a piégé et selon les variétés semées (Tableau 11, page 54).

Le plus grand nombre de plantes obtenu revient au sol de Constantine (37), suivi par celui du sol de Jijel (35), alors que le nombre le plus petit est détecté sur le sol de Hassi Messaoud (12) suivi par celui du sol de Still (15). Les autres sols ont donné un nombre de plante variant entre 24 et 29.

Nous avons obtenu le plus grand nombre de plantes pour la variété III (113) suivi par celui de la variété II (101) et enfin celui de la variété I (90), (Tableau 11, page 54).

#### 1-2- Nodules obtenus

Excepté les témoins positifs et négatifs (en azote), qui n'ont donné aucun nodule, la majorité des plantes obtenues a donné des nodules qui varient dans leurs caractères phénotypiques (figure 13). Cette variabilité est observée dans un même pot, quelle que soit la variété et quelle que soit le site (Tableau 11, page 54).

Les nodules obtenus diffèrent en taille (0,1 - 1,5cm), représentent différentes couleurs allant entre le blanc, rose foncé, rose claire, rose pâle et marron. Les nodules trouvés au niveau des sols de Sill et Hassi Messaoud sont parmi ceux ayant la plus petite de taille (0,2-0,3 cm) et montrent une couleur blanche à rose très pâle suggérant une faible efficacité en termes de fixation d'azote.



Figure 13 : Nodules racinaires du pois chiche obtenus par piégeage

(I : variété ILC32-79, Variété II : Flip 85-55 et Variété III : Flip 90-13)

Les nodules trouvés diffèrent aussi en leur nombre selon les sites (tableau 11). Le plus grand nombre de nodules (58) est obtenu par le site de Jijel avec une moyenne de 1,66 nodules/plante, ce nombre est suivi par celui de Batna (54) montrant une valeur de 1,86 nodules / plante. Quelle que soit l'importance du nombre de nodules obtenu par chacun de ces deux sites, le nombre moyen de nodule /plante le plus important est montré par le site de N'Gaous (2,08). Le nombre le plus faible en nodules est obtenu au niveau de Hassi Messaoud (2) suivi par Still (5) avec respectivement des valeurs moyennes de 0,16 et 0,33 nodules / plante.

En plus de sa variabilité en fonction du site, le nombre de nodule trouvé diffère selon les variétés de pois chiche (tableau 11). Ainsi la variété I a donné sur l'ensemble des sites une moyenne de 1,1 nodules par plante, contre 1,2 pour la variété II et 1,95 pour la III. Il ressort donc que la variété III produit presque 70% de nodules en plus par rapport à la variété I.

### 1-3-Interactions sites – variétés pour la formation des nodules

Selon le nombre de nodules obtenus par site et par variété nous pouvons dire qu'il existe enfin des effets d'interactions entre les sites et les variétés (figure 14). Ainsi par exemple, des nodules se forment avec le sol de Hassi Messaoud sur la variété III alors qu'il n'y en a aucun sur la I et la II. Sur le site de N'Gaous, le nombre moyen de nodule augmente pour la variété II alors qu'il diminue pour la variété I. Le site de Merouana donne un résultat inverse. Le site de Constantine apparait le plus « uniforme » pour les trois variétés.

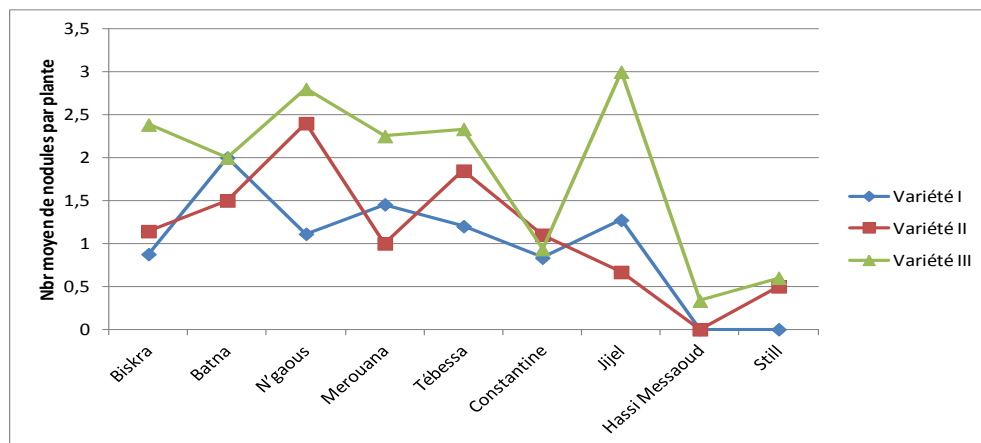


Figure 14 : Variation du nombre moyen de nodule par plantes en fonction des variétés et des sites

A partir d'un total de 231 plantes, nous avons formé une collection de 336 nodules afin d'essayer de les utiliser pour l'isolement des bactéries intra nodulaires.

## 2-Isolement des bactéries intra nodulaires du pois chiche

### 2-1- Nodules utilisés pour l'isolement des bactéries

Le nombre de nodules (336) obtenus suite au piégeage est distribué différemment sur les sites et sur les trois variétés utilisées. Dans le but d'essayer d'avoir le même nombre ou un nombre proche d'isolats par rapport à chaque variété et par rapport à chaque site, nous avons pensé à équilibrer entre les sites et les variétés en nombre de nodules qui devraient être écrasés. Cette opération nous a forcés à écarter dans chaque cas, certains nodules dont la majorité est celle montrant la plus petite taille et une couleur virant vers le clair. Ainsi suite à cette opération, seulement 296 ont servi pour l'isolement des bactéries intra nodulaires.



## 2-2-Isolats intra nodulaires obtenus

### 2-2-1-Caractère culturaux des bactéries retenues

Les bactéries isolées retenues dans ce travail, apparaissent sur le milieu YMA après 1 à 5 jours sous forme de colonies de forme homogène, circulaire à surface bombée et à contour régulier avec un aspect lisse brillant, une texture translucide et une consistance visqueuse. La taille des colonies varie entre 0,3-0,5cm, ces colonies sont soit transparentes soit apparaissent avec une couleur blanche, crème ou légèrement rose. Sur milieu YMA+Rouge de Congo les isolats absorbent peu ou pas le rouge de Congo (figure 15).

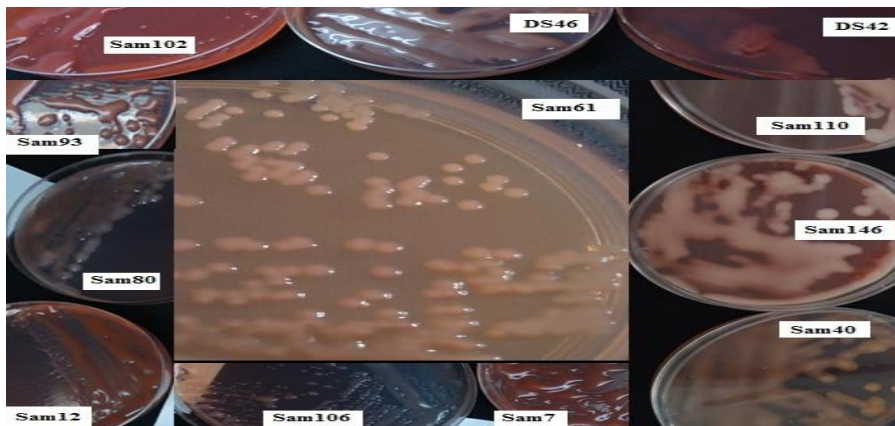


Figure 15: Aspect des bactéries nodulaires du pois chiche conservées.

### 2-2-2- Nombre d'isolats retenus

L'écrasement de 296 nodules retenus pour l'isolement des bactéries intra nodulaires du pois chiche a permis de donner 271 isolats. Tout en se basant sur les caractères phénotypiques des colonies citées dans le paragraphe précédent, seulement un nombre de 232 isolats est retenu pour une caractérisation génotypique et donc conservé. Ce nombre est distribué différemment sur les trois variétés et sur les différents sols utilisés. Le nombre d'isolats (ayant l'aspect du rhizobium), obtenu pour chacune des variétés I (43) et II (57) est inférieur à la moitié de celui obtenu par la variété III (132) ce qui reflète a priori la différence de niveau d'efficacité de nodulation entre les variétés. Excepté le site de Tébessa qui donne 22 isolats originaires de la variété II, tous les autres sites n'ont pu donner qu'un nombre d'isolats inférieurs à 10 avec cette même variété.

Tableau 12: Nombre de nodules utilisés et d'isolats obtenus et retenus

Site	Variété I				Variété II				Variété III				Variétés (I, II, III)			
	Nombre de nodules obtenu	Nombre de Nodules écrasés	Nombre d'isolats obtenu	Nombre d'isolats conservés	Nombre de nodules obtenu	Nombre de Nodules écrasés	Nombre d'isolats obtenu	Nombre d'isolats conservés	Nombre de nodules obtenu	Nombre de Nodules écrasés	Nombre d'isolats obtenu	Nombre d'isolats conservés	Nombre de nodules total	Nombre de nodules écrasés	Nombre d'isolats total obtenu	Nombre d'isolats conservés
<b>Biskra</b>	7	7	7	5	8	8	8	6	31	30	30	30	46	45	45	41
<b>Batna</b>	20	13	10	8	12	12	9	6	22	20	20	20	54	45	39	34
<b>N'Gaous</b>	10	10	9	9	12	12	10	8	28	18	15	12	50	40	34	29
<b>Marouana</b>	16	10	8	8	8	8	7	4	18	18	17	14	42	36	32	26
<b>Tebessa</b>	6	6	6	4	24	24	24	22	14	14	12	12	44	44	42	38
<b>Constantine</b>	10	10	8	3	11	11	6	3	14	14	14	14	35	35	28	20
<b>Jijel</b>	14	8	8	6	8	8	8	8	36	30	30	30	58	46	46	44
<b>Hassi Messaoud</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	2	2	2	0
<b>Still</b>	0	0	0	0	2	2	0	0	3	3	3	0	5	5	3	0
<b>total</b>	83	64	56	43	85	83	72	57	168	149	143	132	336	296	271	232

La variété III semble être la plus efficace en terme de nodulation avec la majorité des neuf sites examinés, notamment avec les sols de Biskra et Jijel (30 isolats chacun). Avec les sept autres sites, la variété III a donné un nombre d'isolats dont le minimum est 12, sauf pour les sites de Hassi Messaoud et Still (tableau 12).

Les 2 nodules obtenus dans le couple (variété II - sol de Still) n'ont rien donné puisque l'ensemencement du broyat nodulaire n'a donné aucune colonie pendant 10 jours de suivi. Nous ne pouvons conclure si les bactéries ayant induit ce nodule n'ont pu coloniser l'intérieur ou si elles n'étaient pas cultivables dans nos conditions de culture. Le broyat des 3 nodules originaires de ce même site ainsi que les 2 nodules originaires de Hassi Messaoud (tous obtenus à partir de la variété III), ont donné des bactéries dont l'aspect phénotypique était différent de celui recherché dans cette étude. Ces bactéries apparaissaient après moins de 24h, absorbant fortement le rouge de Congo, avec un aspect irrégulier et totalement non visqueux. Ces critères phénotypiques (reflétant la présence des bactéries non rhizobiums), sont aussi trouvés dans le cas de plusieurs autres nodules. Les bactéries ayant de telles caractéristiques ont été éliminées dans cette étude. Ainsi aucun isolat présentant les caractères phénotypiques recherchés n'a été obtenu pour les deux sites Hassi Messaoud et Still.

Au total, 271 bactéries sont isolées à partir de 296 nodules obtenus par piégeage sur neuf sites de l'Est algérien, piégés par trois variétés de pois chiche. La sélection de ces bactéries selon les caractéristiques phénotypiques du rhizobium, nous a permis de retenir seulement 232 isolats. Ces derniers sont conservés dans un congélateur à -80°C dans des ependorfs stériles, dans un milieu YM (Yeast Mannitol) à 20% de glycérol (Vincent, 1970).

## II-Discussion

- **Caractères du sol**

Les valeurs (en % ) des particules d'argile, de limon et de sable trouvés dans cette analyse, ont permis de déduire la classe texturale du sol pour chaque échantillon analysé. Ce classement est déterminé en fonction de la position des valeurs de ces particules (%) sur le triangle textural de Henin donné d'après les dimensions des particules USDA (annexe 2) et tout en se basant sur le guide de fertilisation du CRAAQ, (2003). Ainsi au sein des échantillons de sols analysés, sont trouvées cinq différentes textures parmi lesquelles, nous

pensons que les deux classes : Argile lourde (Constantine) et argile limoneuse (Merouana) ne semblent pas assez convenables pour la culture du pois chiche par rapport au reste des sites, ce dernier étant connu par ses préférences en sols contenant du sable (Vincent, 1970) ; même si cette légumineuse tolère différents types de sols (Babar et *al.*, 2009), tels que ceux qui sont plus ou moins argileux avec une bonne capacité de rétention (Singh et Diwakar, 1995; Moolani et Chandra, 1970) ou des sols limoneux profonds (Moolani et Chandra, 1970).

Les classes d'acidité des différents sols prospectés sont obtenues en se basant sur l'échelle d'interprétation du pH eau, signalé par (Gagnard et *al.*, 1988) et sur le guide de référence en fertilisation (CRAAQ, 2003). Malgré les différents niveaux d'acidité observés qui ont classé les neufs sites en 3 groupes (légèrement neutre, légèrement basique, moyennement ou fortement basique), le pH pour la totalité des échantillons est soit neutre soit basique. Cette gamme de pH trouvé est favorable pour les deux partenaires symbiotiques : pois chiche (Braune et *al.*, 1988) et rhizobium (Vincent, 1970). Ce résultat pourrait montrer la prédisposition de ces différents sols à être cultivés par les légumineuses telles que le pois chiche et accueillir les rhizobiums dans le cas d'une future inoculation.

Au regard des teneurs de carbone, 3 classes de sols sont distinguées. La première classe contient des sols qui représentent le désert à climat aride au niveau desquels, la teneur en carbone est faible et ne dépasse pas les valeurs 1,3% (Hassi Messaoud) et 2,1% (still). Ces sols ont une texture sableuse donc ne peuvent emmagasiner le carbone. La deuxième classe est représentée par les sols de Batna (9,68 %) et N'Gaous (10,32%) qui sont bien pourvus de carbone. Ces sols contiennent des particules d'argiles qui pourraient stocker le carbone. Enfin la troisième classe est représentée par les sols ayant une teneur en carbone intermédiaire entre les valeurs extrêmes citées précédemment et montrant un climat semi-aride (sauf Biskra qui est à climat aride). Ce résultat concorde avec celui de Chaussod et *al.*, (1986) qui ont montré que les sols légers, sont ceux où la proportion de carbone est la plus faible et que dans les sols lourds, le carbone microbien représente la proportion la plus importante du carbone total. Selon Calvet et vellemin, (1986), la teneur d'azote obtenue dans cette étude, permet de diviser les sites en deux classes : la première classe montrant une teneur minimale comprise entre les valeurs 0,04 et 0,09 %, cette classe (excepté le site de Tébessa qui est semi-aride) est représentée majoritairement par des sols à climat aride (Hassi Messaoud, Biskra et Still). La deuxième classe montrant une teneur importante en azote allant de 0,17 jusqu'à 0,29% est représentée par les sites restants ayant des climats semi-aride (Batna, Constantine, Merouana)

et humide (Jijel). Dans ces régions il existe une certaine proportion en argile qui pourrait jouer un grand rôle de rétention pour les particules minérales et la matière organiques du sol et fera ainsi un bon hébergement pour les microorganismes du sol. Ces derniers dégradent la matière organique et /ou fixent l'azote atmosphérique participant ainsi en grande part en la richesse de ces sols en azote (Chaussod et *al.*, 1986).

Les chercheurs Jean Jacques et *al.*, (2009), en caractérisant trois sols acides tropicaux du Rwanda sous jachères naturelles, ont considéré les teneurs en azote supérieures à 0,13 % comme satisfaisantes. En se basant sur cette hypothèse, on pourrait considérer que les teneurs en azote total obtenues dans cette étude sont acceptables pour la majorité des sites à climat semi-aride (sauf Tébessa) ou humide (Jijel). Au niveau des autres sites à climat aride (Hassi Messaoud et Still) et à climat semi-aride (Tébessa), les stocks en carbone et en azote restent faibles et pourraient constituer des contraintes sévères à la production agricole même si la teneur en carbone au niveau du site de Tébessa est plus importante que celles des deux autres sites.

L'un des principaux indicateurs de fertilité et de qualité physico-chimique des sols est le niveau de décomposition de la matière organique représenté par le rapport du taux total de carbone sur le taux d'azote total. Les chercheurs Gagnard et *al.*, (1988), voient qu'un rapport C/N inférieur à 8 est un indicateur d'une faible présence des composés organiques. Un rapport se trouvant entre 8 et 10 montre une présence moyenne de la matière organique, alors qu'un rapport supérieur à 12 indique sa forte présence. Selon les hypothèses de ces chercheurs, le niveau de fertilité trouvé dans cette étude n'est satisfaisant qu'au niveau des sols de Constantine (C/N= 10,08) et Jijel (C/N= 11,52). La matière organique n'est bien décomposée qu'au niveau de ces deux sites, la cause serait probablement liée à leur pH franchement basique et à la présence d'une quantité d'argile suffisante pour l'hébergement et les divers besoins de la microflore capable de cette décomposition organique. En dehors de ces zones, la matière organique est soit mal décomposée comme le cas de Still, Hassi Messaoud, Batna, N'Gaous et Merouana (C/N entre 32,5 et 38,72), soit pratiquement à l'état brut comme le cas de Tébessa et Biskra (C/N est entre 59,37 et 94). Cette insuffisance (ou absence) de décomposition serait liée probablement à l'absence des conditions recherchées par la flore microbienne spécialisée. En effet dans ces sites, soit que l'argile est carrément absente (Still, Hassi Messaoud), soit qu'elle est associée à du limon (Tébessa, Batna, N'Gaous, Merouana, Biskra). Il est probable aussi que pour les régions à climat aride,

le PH proche du neutre jouerait un rôle négatif dans cette décomposition (Still, Hassi Messaoud). Cette grande insuffisance (Tébessa) ou absence (Biskra) de décomposition pourrait aussi être expliquée par la pauvreté de ces sols en azote total (0,06 %, 0,08%) dont les conséquences sont : soit une diminution de microorganismes du sol soit une diminution de leurs activités même si ils ont une grande présence dans ces sols.

- **NPP**

Les paramètres liés à la taille, à la structure et à l'activité de la population microbienne (Schloter et *al.*, 2003) font partie des indicateurs biologiques de la fertilité des sols actuellement utilisés. Wilson(1926) a développé une méthode pour estimer la population de rhizobium dans des échantillons de sol. Cette méthode est basée sur la nodulation de plantes cultivées dans des conditions stériles et inoculées par des dilutions en série obtenues à partir des échantillons. Cette méthode a été largement utilisée et modifiée (Brockwell 1980, Toomson 1984) et le NPP calculé par cette méthode et dans cette étude nous a permis d'estimer la taille de la population de rhizobium susceptible de noduler le pois chiche dans les sites choisis.

Le nombre de rhizobium par g de sol sec obtenu est très différent entre les sols examinés. Ce nombre est compris entre une valeur très faible de  $0,0315 \cdot 10^3$  (Hassi Messaoud) et une importante valeur ( $10,7 \cdot 10^3$ ) obtenue à Biskra. Plusieurs chercheurs ont lié la variabilité de la taille de la population des rhizobias à l'environnement, à la variabilité des caractéristiques physico-chimiques entre les différents sols, (Zahran,1999 ; Zribi et *al.*, 2004 ; Chaussod *et al.*, (1986) et Vekemans *et al.* 1989) ainsi qu'au type et la domestication des cultures (Kim et *al.*, 2014). Dans cette étude, la distribution du NPP sur les différents groupes obtenus par l'ACP montre que certains sites différents en caractères physicochimiques présentent des NPP très proches (Tébessa et Batna), aussi les deux valeurs extrêmes du NPP se trouvent au niveau du même groupe (Biskra et Hassi). En confrontant les résultats du test de NPP obtenus aux différents types de climats nous trouvons que les deux nombres extrêmes (faible et grand) de rhizobium se trouvent dans les régions ayant le même climat aride. Aussi les sites dont le climat est semi-aride présentent des NPPs variables allant  $0,0598 \cdot 10^3$  (N'Gaous) jusqu'à  $1,88 \cdot 10^3$  (Constantine). Ce résultat permet de dire que contrairement aux résultats d'autres études (Zahran .,1999 ;Zribi et *al.*, 2004), le nombre de rhizobium obtenu dans les différents sols prospectés n'est pas dépendant du climat ni des conditions physicochimiques du sol examinés dans cette étude.

- **Piégeage et isolats nodulaires obtenus**

Suite au piégeage réalisé dans des conditions contrôlées, le nombre de plantes totale attendu, n'est pas obtenu dans cette étude, même pour le cas de témoin positif et négatif. Ce problème serait probablement causé soit par l'insuffisance de l'espace au niveau des pots (sachant que cinq graines sont semées dans chaque pot de 1 litre de volume) soit par la différence des trois variétés pour leur capacité à s'adapter à différentes qualités des neufs sols utilisés.

Une certaine variabilité de la réponse variétale du pois chiche par rapport aux types de sol présents est remarquée. La variété III a donné le plus grand nombre de plante et le plus grand nombre de nodules avec la totalité des sites prospectés en comparaison avec les autres variétés. Ceci pourrait témoigner la grande capacité de cette variété pour s'adapter à différents types de sols. Une mauvaise réponse du site de Tébessa en plantes et nodules est observée suite à son semi par les graines des variétés I et III. La qualité de ce sol pourrait satisfaire seulement à la variété II avec laquelle ce sol a donné son maximum en plante et en nodules.

Les sols de Hassi Messaoud et Still, donnent leur faible nombre en plantes et en nodules pour les trois variétés utilisées. Ceci est probablement la conséquence de certaines conditions bioclimatiques sévères qui ont affecté la survie de la plante et celle des populations du rhizobium (Zahran, 2001). Il se pourrait qu'il existe une déficience de certains éléments recherchés en commun par les trois variétés, nécessaires à leur développement ou bien il se pourrait qu'il a une présence excessive d'autres éléments inhibiteurs à leur développement telle que la salinité. Ces deux sites pourraient contenir des taux en sel intolérants pour la plante et pour les microsymbiotes. Ceci est concordant d'ailleurs par la faible taille de la population de rhizobium détectée par le test NPP. La salinité dans ces sols serait probablement la première cause de l'échouement de la symbiose (Zahran, 2001). La réussite du piégeage était aussi conditionné par le type de sol dans d'autres travaux tel que celui de Ben Romdhane *et al.*, (2007). Il a été montré dans le travail de ces derniers qu'à partir de 6 types de sols à différents climats, les nodules n'ont été observés que dans seulement les deux échantillons de sol de Gafsa (0,8 nodules par plante) et de Tataouine (2 nodules par plante). Ces deux sols ne sont pas salins et sont situés à des altitudes plus élevées, ce qui peut contribuer à une meilleure humidification (Ben Romdhane *et al.*, 2007).

À partir de 231 plantes obtenues, une collection de 336 nodules d'origines différentes en site et en variété est construite. Pour équilibrer d'avance le nombre des isolats par site et par

variété, 296 nodules seulement sont sélectionnés pour l'isolement des rhizobiums. Ces nodules sont choisis selon leur état structural et selon le nombre total de nodules disponibles pour chaque variété et pour chacun des sites prospectés. A partir de ce nombre de nodules, un total de 232 isolats (parmi 271 isolats obtenus) est sélectionné selon les caractéristiques phénotypiques décrites par Vincent (1970), qui permettent la mise en évidence de rhizobias. Les bactéries montrant ces caractéristiques sont caractérisés par le biais moléculaire.

Il semble que la détection et la récupération des bactéries nodulaire dans le cas de pois chiche, serait dépendant du choix de la variété. Sans variété III, le nombre de nodules et le nombre final d'isolats auraient considérablement diminué. En effet, Le nombre d'isolats pour la variété III (132) représente plus que le double de celui obtenu par la variété II (57) et celui de la variété I (43). Ce résultat est concordant avec ceux du piégeage qui montrent la capacité de la variété III à s'adapter avec les différents sols et l'adaptation de la variété II avec le sol de Tébessa.

Le sol aussi semble être un facteur limitant dans la récupération des bactéries nodulaires du pois chiche. En effet, le sol de Constantine induits les nodules sur les trois variétés, mais nous n'avons pu isoler les bactéries nodulaires qu'à partir de la variété III. Ceci nous laisse suggérer que :-soit que les bactéries sont présentes dans le cas des variétés I et II, dans les nodules mais ne sont pas cultivables -soit que les nodules étaient vides.

L'étape d'isolement a ainsi considérablement réduit le nombre de souches obtenues. Dans plusieurs cas, à partir de l'extrait nodulaire, aucune bactérie n'est obtenue sur la boîte.

La capacité des plantes à développer des structures non fixatrices d'azote sur leur système racinaire sans rhizobiums a été décrit depuis longtemps (Truchet et *al.*, 1989). Ces nodules sont évidemment non fonctionnels et reflètent le manque, ou le niveau extrêmement bas, de rhizobiums dans plusieurs sols que nous avons recueillis.

Plusieurs sols, tels que Batna et Constantine bien qu'ils ont donné des nodules, on n'a pas pu isoler des bactéries à partir de ces derniers, ce qui semble suggérer que face à des sols pauvres, les plantes induisent des structures vides non fonctionnelles sur les racines (Truchet et *al.*, 1989).



### III-Conclusion

Au totale, la caractérisation du sol nous a permis d'enregistrer une variabilité très claire entre les neufs sites prospectés. Nous avons pu en déduire 3 classes climatiques (aride semi-aride et humide, 3 classes d'acidité (Franchement basique, Légèrement basique, Légèrement neutre), 5 classes texturale (Limon argilo –sableux, Sable, Limon argilo – sableux, Sable argileux, Argile lourde, Argile limoneuse) et 3 classes concernant la décomposition en matière organique (Mal décomposition, Bonne décomposition, Non décomposition). Cette variabilité en caractères physicochimiques, climatiques et microbiologique entre les sols constitue un bon outil pour rechercher la nodulation et la diversité nodulaire du rhizobium.

La variété III semble être la meilleure variété pour coopérer avec la majorité des sols pour la nodulation du pois chiche puisque ses nodules ont donné le plus grand nombre d'isolats notamment sur les sites de Jijel et Biskra. La variété II semble être plus fiable en nodulation qu'avec le sol de Tébessa. La variété I se classe en dernier par sa faible réponse en nodulation et en nombre d'isolats obtenu. Quelles que soit les variétés, les sites de Hassi et Still ont faiblement réagi que ce soit dans le calcul du NPP ou bien dans le piégeage des bactéries nodulaires

À partir de 231 plantes obtenues, nous avons collecté 336 nodules, parmi lesquels seulement 296 nodules sont sélectionnés pour l'isolement des rhizobiums. Ces derniers ont servi pour isoler 271 isolats cependant seulement 232 isolats montrant des caractéristiques phénotypiques des rhizobias, sont sélectionnés pour la caractérisation moléculaire.

Aucune corrélation n'a pu être signalée entre les facteurs abiotiques des sols examinés dans ce travail et sur le NPP, le nombre de plante, le nombre de nodule et le nombre d'isolats nodulaires obtenus.

# **Chapitre II : Caractérisation moléculaire des bactéries nodulaires du pois chiche**

## I-Résultats

### 1-Qualité d'ADN

L'extraction au chloroforme et au traitement RNase nous a permis d'obtenir l'ADN de la totalité des isolats dont les rapports de DO 260/DO 280 sont situées entre 1,8 et 2 (figure 17).

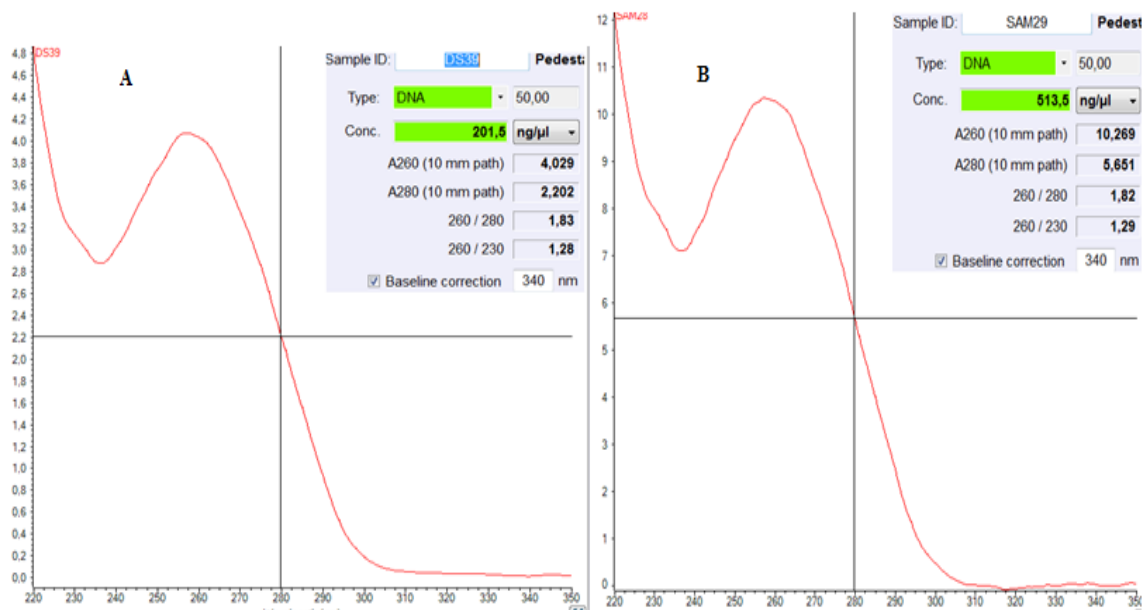


Figure 16 : Etat de pureté des ADNs des souches DS39 (A) et Sam 29 (B) détecté par le Nanodrop

Le dosage par Nanodrop a révélé de grandes variations quantitatives des ADNs obtenus, également visualisées par l'intensité de la bande obtenue pour chacun des différents isolats (figure 17), par conséquent une dilution à 10 ng pour chaque ADN a été effectuée pour les réactions d'amplification par PCR.

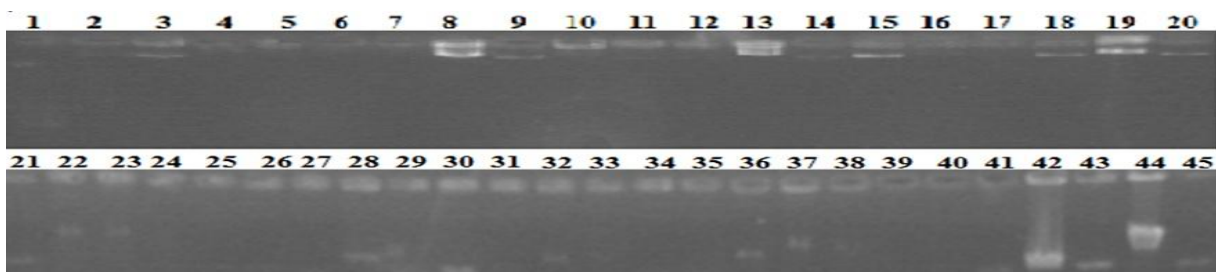


Figure 17 : Profil de migration des ADNs des différents isolats (Sam1-Sam45), sur un gel de 0,8% d'agarose

## 2-Amplifias et séquences obtenus

Pour chaque fragment d'ADN et pour chacune des bactéries, chaque amplifia a montré une bande unique révélée par électrophorèse. La taille de la bande de l'amplifia attendu a été évaluée visuellement par comparaison au marqueur de taille utilisé dans chaque cas. Dans le cas de chacun des gènes : ADNr 16S (1440 pb), *recA* (970), *nodC* (930pb) et *nifH* (601pb), les bandes obtenues sont proches dans leur taille attendue. Pour le cas de l'IGS, les bandes obtenues présentent des variations de tailles moléculaires (700 et 1000pb), (figure 18).

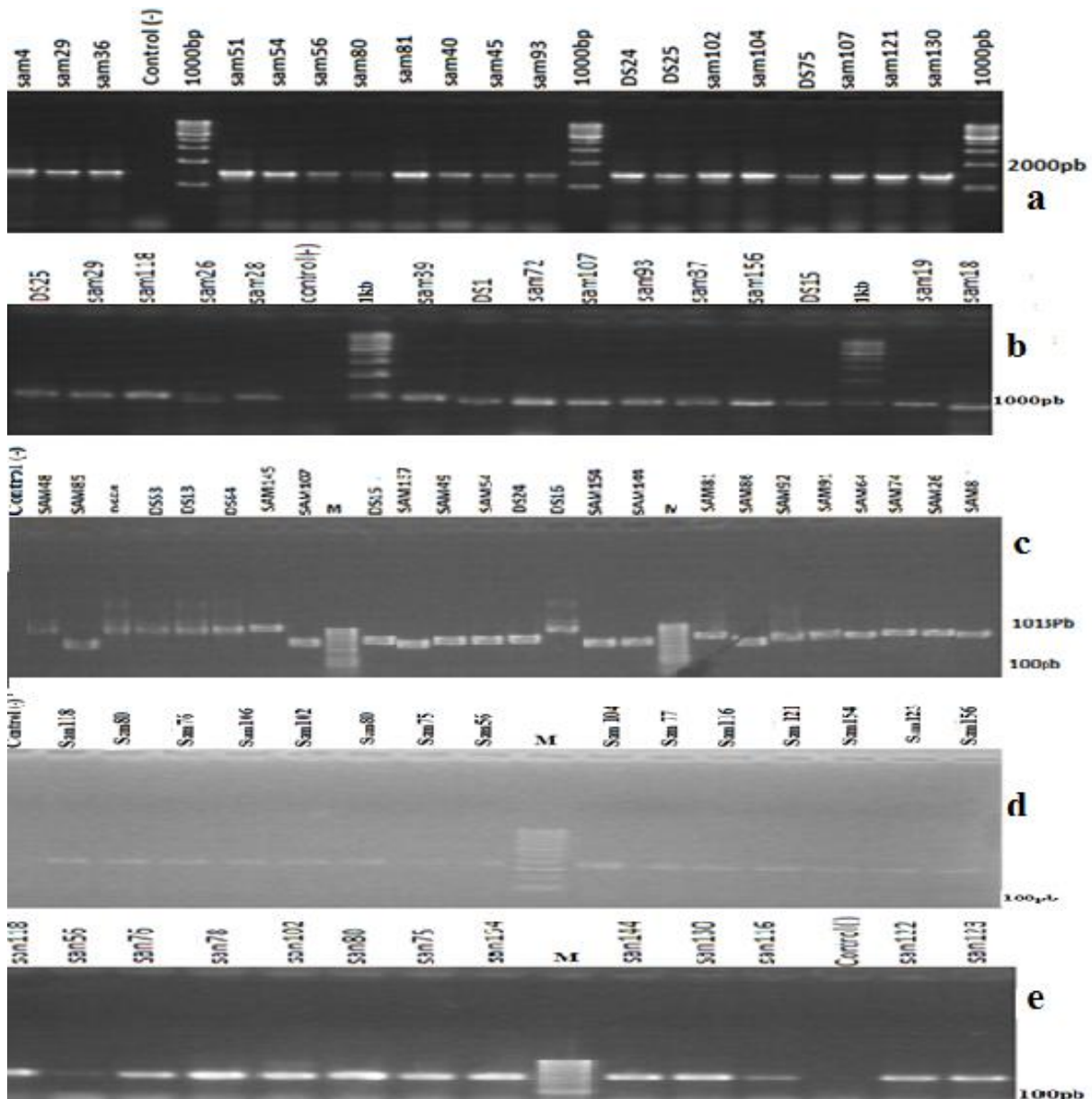


Figure 18: Profils électrophorétiques des amplifias des gènes ADNr 16S (a), *recA* (b), *nodC* (d), *nifH* (e) et le fragment IGS (c), pour quelques isolats nodulaires du pois chiche sur un gel d'agarose à 1% (M : Marqueur de taille 1kb (a, b) et de 100pb (c, d, e).

Le nombre de séquences obtenues diffère selon la nature des différents ADN amplifiés. Ainsi, nous avons obtenu au total 194 séquences ADN<sub>r16S</sub>, 101 séquences *recA*, 107 séquences IGS, 22 séquences *nodC* et 33 séquences *nifH* (tableau 13, page suivante).

Tableau 13 : Amplifias d'ADN obtenus selon les isolats

Bactérie	ADNr16S	<i>recA</i>	IGS	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>	Bactérie	ADNr16S	<i>recA</i>	IGS	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>	Bactérie	ADNr16S	<i>recA</i>	IGS	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
Sam2	+	+	+			Sam61	+	+	+		+	Sam110	+	+	+		
Sam4	+	+	+			Sam62	+	+	+		+	Sam111	+	+	+		
Sam5	+	+	+			Sam64	+	+	+			Sam116	+	+	+	+	+
Sam7	+	+	+			Sam68	+	+	+			Sam117	+	+	+		
Sam8	+	+	+		+	Sam70	+	+	+		+	Sam121	+	+	+	+	+
Sam10	+	+	+		+	Sam71	+	+	+			Sam122	+	+	+	+	+
Sam11	+	+	+			Sam72	+	+	+			Sam123	+	+	+	+	+
Sam12	+		+			Sam74	+	+	+			Sam125	+	+	+	+	+
Sam18	+	+	+			Sam75	+	+	+	+	+	Sam126	+	+	+	+	+
Sam19	+	+	+			Sam76	+	+	+	+	+	Sam129	+		+		
Sam24	+	+	+			Sam77	+	+	+	+	+	Sam130	+	+	+	+	+
Sam26	+	+	+		+	Sam78	+	+	+	+	+	Sam131	+	+	+	+	+
Sam28	+	+	+			Sam80	+	+	+	+	+	Sam137	+	+	+		
Sam29	+	+	+			Sam81	+	+	+			Sam144	+	+	+	+	+
Sam30	+		+			Sam82	+	+	+			Sam145	+		+		
Sam32	+	+	+			Sam83	+	+	+			Sam146	+	+	+		
Sam33	+	+	+			Sam84	+	+	+			Sam154	+	+	+	+	+
Sam36	+	+	+			Sam85	+	+	+			Sam156	+	+	+	+	+
Sam37	+	+	+			Sam86	+	+	+			DS 1	+	+	+		
Sam39	+	+	+			Sam87	+		+			DS13	+	+	+		
Sam40	+	+	+			Sam88	+	+	+			DS15	+	+	+		
Sam48	+		+			Sam89	+	+	+			DS16	+	+	+		
Sam49	+	+	+			Sam90	+	+	+			DS24	+	+	+		+
Sam51	+	+	+			Sam91	+	+	+			DS3 (S3)	+		+		
Sam105(S15)	+	+	+	+	+	Sam92	+	+	+			DS25	+	+	+		
Sam54	+	+			+	Sam 94 (S24)	+					DS26	+				
Sam55	+	+	+			Sam93	+	+	+		+	DS30	+	+	+		
Sam56	+	+	+	+	+	Sam96	+	+	+	+	+	DS32	+	+	+		
Sam57	+	+	+			Sam97	+	+	+			DS33	+	+	+		
Sam60	+	+	+			Sam102	+	+	+	+	+	DS37	+	+	+		
DS53	+	+			+	Sam104	+	+	+	+	+	DS38	+	+	+		
DS63	+	+	+		+	Sam106	+	+	+	+	+	DS39	+	+	+		
DS64	+	+	+			DS42	+	+	+			DS51	+	+	+		
DS66	+	+	+			DS43	+	+	+			DS77	+	+	+		
DS75	+		+			DS44	+	+	+			DS52	+	+	+		
DS76	+	+	+			DS47	+	+	+			DS49	+	+	+		
SAM50	+					DS50	+	+	+								
Sam107	+	+	+			DS48	+	+	+								
SAM1	+					Sam38	+					Sam100	+				
SAM3	+					SAM 41	+					SAM101	+				
SAM6	+					SAM 43	+					Sam112	+				
SAM9	+					SAM 44	+					Sam113	+				
SAM13	+					SAM 45	+					Sam134	+				
SAM15	+					Sam46	+					SAM 136	+				
SAM16	+					Sam47	+					Sam140	+				
SAM17	+					SAM 58	+					Sam142	+				
SAM 20	+					SAM 59	+					Sam148	+				
Sam21	+					SAM63	+					SAM150	+				
Sam22	+					SAM65	+					SAM151	+				
SAM23	+					SAM66	+					SAM152	+				
SAM25	+					SAM67	+					SAM153	+				
Sam27	+					SAM69	+					Sam157	+				
SAM31	+					SAM73	+					Sam158	+				
Sam34	+					Sam79	+					DS56	+				
Sam35	+					SAM 99	+					DS57	+				
DS18	+					DS43	+					DS58	+				
DS22	+					DS45	+					DS60	+				
DS80	+					DS79	+					DS61	+				
DS27	+					DS48	+					DS65	+				
DS29	+					DS53	+					DS69	+				
DS34	+					DS54	+					DS71	+				
DS35	+					DS55	+					DS72	+				
DS39	+					DS 2	+					DS78	+				
DS40	+					DS4	+					DS59	+				
DS81	+					DS84	+					DS28(S28)	+				
DS5	+																

### 3- Les bactéries nodulaires du pois chiche

#### 3-1-Identification via l'ADNr 16S

Puisque le nombre des séquences de l'ADNr 16S couvre la majorité des isolats, l'identification des bactéries est basée en premier lieu sur ce gène puis confirmée par les séquences du recA et celles de l'IGS.

Le Blast de 194 séquences d'ADNr 16S obtenues et leurs comparaison avec celles des souches de références contenues dans la banque des données a montré que ces séquences ne représentaient pas toutes des rhizobiums (figure 19). Parmi 194 séquences obtenues, 57,7 % sont révélés être des ADNs du rhizobium et 42,3 % séquences représentent des non rhizobiums.

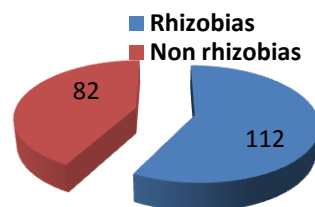


Figure 19 : Proportion des rhizobias et des non rhizobias nodulaires du pois chiche

#### 3-2-Répartition des deux types de bactéries nodulaires

Les bactéries rhizobiums et non rhizobiums obtenues sont distribuées différemment sur les sites prospectés et sur les trois variétés utilisées dans ce travail.

##### 3-2-1-Répartition par sites

Le nombre de bactéries rhizobium ou non rhizobium est pratiquement nul dans les deux sites Hassi Messaoud et Still. Excepté ces deux sites, le nombre de rhizobiums par site obtenu varie entre 5 (N'Gaous) et 30 (Jijel), (figure 20).

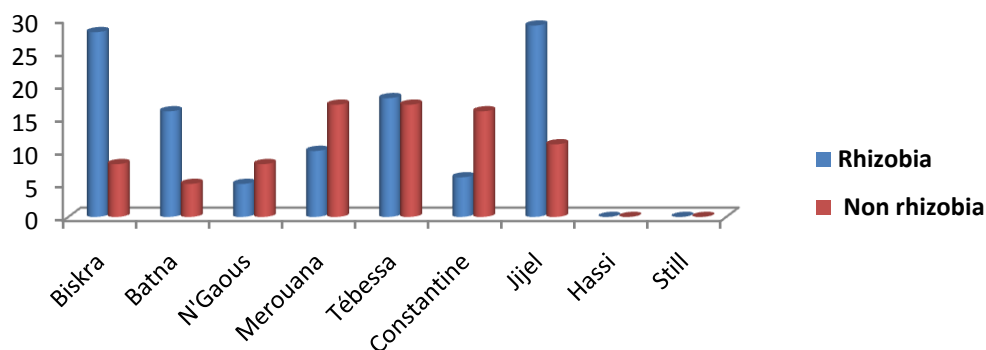


Figure 20 : Distribution des rhizobiums et non rhizobiums par site

Le site de Biskra représente le deuxième nombre le plus important en rhizobiums (28), après celui de Jijel, cependant c'est le site de Constantine qui montre le nombre de rhizobium le plus faible (7) après celui de N'Gaous. Le reste des sites présentent des valeurs intermédiaires entre les valeurs extrêmes variantes entre 10 (Merouana), 16 (Batna) et 19 (Tébessa).

Pour les non rhizobiums, leur nombre par site varie entre 6 (Batna) et 15 (Tébessa). Les autres sites ont représenté un nombre variant entre 8 (N'Gaous) et 12 (Constantine). Pour la majorité des sites le nombre de rhizobium est supérieur à celui des non rhizobiums. Les seules exceptions sont le cas des sites de N'Gaous, Merouana et Constantine dont le nombre des non rhizobiums est supérieure à celui des rhizobiums et le cas de Tébessa dont le nombre de rhizobium et celui des non rhizobiums sont presque égaux.

### 3-2-2- Répartition par variété

Pour la totalité des sols utilisés, seulement avec la variété III, le nombre de rhizobium est clairement plus grand (85) que celui des non rhizobiums (48), (figure 21).

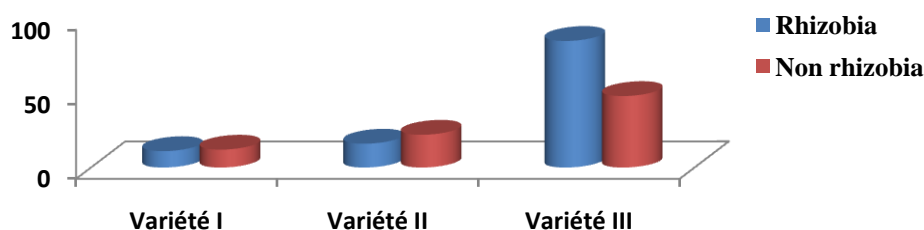


Figure 21: Distribution des rhizobiums et des non rhizobiums par variété

Pour les deux autres variétés I et II, même si le nombre des non rhizobiums dépasse légèrement celui des rhizobiums dans le cas de la variété II, nous pouvons dire que les valeurs du nombre de ces deux types de bactéries ne sont pas très éloignées. La variété III donne 2/3 de rhizobiums et 1/3 des non rhizobiums pour l'ensemble de sites.

### 3-3- Bactéries non rhizobiums obtenues

Plusieurs genres distincts des bactéries non rhizobiums, sont détectés par l'analyse des séquences du gène ADN<sub>r</sub>16S. La dominance revient au genre *Rahnella* qui représente 39% des bactéries non rhizobiums (tableau 14).

Tableau 14: Les bactéries non rhizobium, présentes dans les nodules du pois chiche

Bactérie	Identification (similitude)	Origine	variété	Bactérie	Identification (similitude)	Origine	variété
Sam1	<i>Microbacterium sp.</i> (98%)	Contantine	III	Sam140	<i>Rahnella aquatilis</i> (91%)	Batna	III
Sam3	<i>Inquilinus sp.</i> (98%)	Jijel	II	Sam142	<i>Rahnella aquatilis</i> (100%)	Batna	III
Sam6	<i>Pseudomonas koreensis</i> (95%)	Merouana	III	Sam148	<i>Rahnella sp.</i> (96%)	Contantine	I
Sam9	<i>Enterobacter ludwigii</i> (89%)	Tebessa	II	Sam150	<i>Rahnella sp.</i> (97%)	Contantine	I
Sam13	<i>Microbacterium sp.</i> 87%	Contantine	III	Sam151	<i>Rahnella sp.</i> (95%)	Contantine	III
Sam15	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (95%)	Merouana	II	Sam152	<i>Rahnella sp.</i> (93%)	Tebessa	III
Sam16	<i>Rahnella sp.</i> 94%	Merouana	II	Sam153	<i>Rahnella aquatilis</i> (93%)	Tebessa	III
Sam17	<i>Rahnella sp.</i> (97%)	Merouana	III	Sam157	<i>Rahnella aquatilis</i> (95%)	Tebessa	III
Sam 20	<i>Pseudomonas koreensis</i> (98%)	Merouana	III	Sam158	<i>Rahnella aquatilis</i> (95%)	Contantine	I
Sam21	<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)	Biskra	III	DS5	<i>Pantoeaagglomerans</i> (87%)	Tebessa	I
Sam22	<i>Rahnella sp.</i> (96%)	Contantine	II	DS29	<i>Enterobacter cloacae</i> (96%)	Tebessa	II
Sam23	<i>Pantoea sp.</i> (92%)	Biskra	III	DS34	<i>Microbacterium sp.</i> (97%)	Contantine	III
Sam25	<i>Pantoea sp.</i> 95%	Biskra	III	DS54	<i>Microbacterium sp</i> (93%)	Contantine	II
Sam27	<i>Pantoea agglomerans</i> (98%)	Biskra	III	DS59	<i>Enterobacter cloacae</i> (98%)	Merouana	III
Sam31	<i>Enterobacter cloacae</i> 98%	Tebessa	II	DS79	<i>Pseudomonas sp.</i> (98%)	Merouana	II
Sam34	<i>Pantoea agglomerans</i> (98%)	Contantine	III	DS80	<i>Rahnella aquatilis</i> (97%)	Jijel	II
Sam35	<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)	Contantine	III	DS81	<i>Rahnella aquatilis</i> (98%)	Contantine	II
Sam38	<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)	Biskra	III	DS84	<i>Rahnella aquatilis</i> (94%)	Jijel	III
Sam 41	<i>Enterobacter ludwigii</i> 93%	Tebessa	II	DS28 (S28)	<i>Rahnella aquatilis</i> (98%)	Jijel	III
Sam 43	<i>Enterobacter cloacae</i> (98%)	Tebessa	I	DS 2	<i>Enterobacter Leclercia</i> (98%)	Jijel	I
Ssam 44	<i>Pseudomonas sp.</i> 94 %	Merouana	III	DS4	<i>Bacillus mojavensis</i> (98%)	Merouana	I
Sam45	<i>Pantoea sp</i> (92%)	Merouana	I	DS40	<i>Rahnella aquatilis</i> (98%)	Merouana	II
Sam46	<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)	Merouana	III	DS48	<i>Paenibacillus speoriae</i> (94%)	Merouana	III
Sam47	<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)	Biskra	III	DS53	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)	Tebessa	III
Sam58	<i>Rahnella sp.</i> (93%)	N'Gaous	III	DS57	<i>Rahnella aquatilis</i> (98%)	Jijel	II
Sam59	<i>Rahnella sp.</i> (93%)	N'Gaous	III	DS58	<i>Microbacterium sp.</i> (98%)	Merouana	III
Sam63	<i>Rahnella sp.</i> 98%	Batna	III	DS60	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> (98%)	Merouana	II
Sam65	<i>Rahnella sp.</i> (95%)	N'Gaous	III	DS65	<i>Leclerciasp.</i> (95%)	Tebessa	II
Sam66	<i>Rahnella aquatilis</i> 95%	Biskra	III	DS72	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (98%)	Merouana	II
Sam67	<i>Enterobacter cloacae</i> (97%)	N'Gaous	III	DS78	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (98%)	Contantine	III
Sam69	<i>Rahnella sp.</i> (93%)	N'Gaous	III	DS55	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain (93%)	Tebessa	II
Sam73	<i>Rahnella sp.</i> (92%)	N'Gaous	III	DS69	<i>Uncultured bacterium</i> (98%)	Biskra	III
Sam79	<i>Bacillus pumilus</i> strain (78%)	Jijel	III	DS18	<i>Enterobacter cloacae</i> (97%)	Tebessa	II
Sam99	<i>Rahnella aquatilis</i> 93%	Batna	III	DS22	<i>Rahnella aquatilis</i> (99%)	Jijel	II
Sam100	<i>Rahnella sp.</i> (90%)	Batna	II	DS27	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (89%)	Jijel	I
SAM101	<i>Enterobacter cloacae</i> (91%)	Tebessa	I	DS39	<i>Rahnella aquatilis</i> (98%)	Tebessa	II
Sam112	<i>Rahnella sp.</i> 93%	Jijel	III	DS61	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> (98%)	Tebessa	III
Sam113	<i>Pantoea agglomerans</i> (94%)	N'Gaous	I	DS35	<i>Microbacterium sp.</i> (98%)	Contantine	III
Sam 134	<i>Gamma proteobacterium</i> 94 %	Jijel	III	DS43	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (98%)	Merouana	III
Sam136	<i>Rahnella sp.</i> (97%)	N'Gaous	III	DS45	<i>Microbacterium sp.</i> (85%)	Contantine	III
DS56	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain (93%)	Tebessa	I	DS71	<i>Rahnella sp.</i> (98%)	Contantine	III



Ce genre est suivi en dominance par les genres *Pantoea* et *Enterobacter* représentant chacun 15% des bactéries non rhizobiums (tableau 14). Avec le nombre de 7 bactéries parmi 82, chacun des genres *Pseudomonas* et *Microbacterium*, contribue avec une part de 8,5% dans le groupe des non rhizobiums.

De sa part le genre *Paenibacillus* se présente avec un pourcentage de 5% alors que chacun des autres genres non rhizobiums se présente avec un nombre moindre qui ne dépasse pas le nombre de 6 bactéries (figure 22).

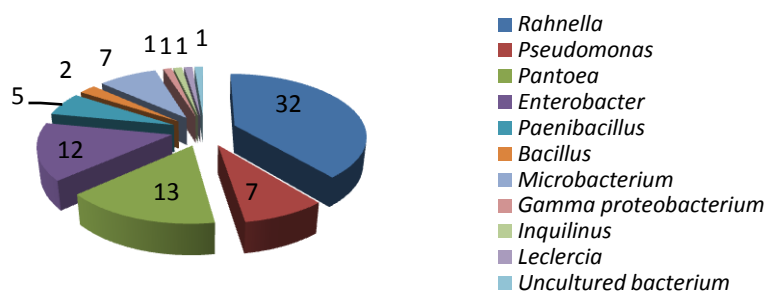


Figure 22: Différents genres des bactéries non rhizobiums nodulaires du pois chiche

### 3-4- Bactéries rhizobiums obtenues

#### 3-4-1-Identification au niveau du genre

Contrairement au gène ADNr 16S, le séquençage du gène *recA* et le fragment IGS n'a été réalisé que pour les bactéries qui se sont révélées être des rhizobiums selon l'analyse de l'ADNr16S. Quel que soit le fragment d'ADN analysé, la comparaison des séquences obtenues avec celles des souches de références disponibles dans la banque des données, montre que ces isolats sont divisés en 4 grands genres différents de rhizobium (*Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium/Agrobacterium* et *Burkholderia*) avec des effectifs différents (figure 23).

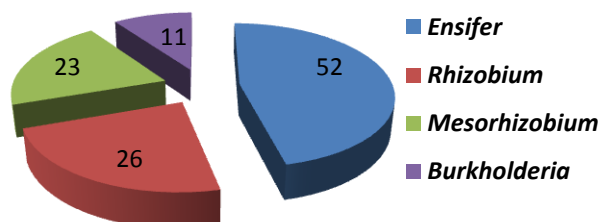


Figure 23: Genres de rhizobium intra nodulaires du pois chiche selon l'ADNr 16S

**3-4-2-Test de nodulation**

Après 6 semaines de culture, les bactéries infectives ont montré des nodules de différentes taille (0,3-0,9cm) et forme (circulaire ou allongée), leur couleur vire entre rose foncé, rose pâle et marron (figure 24).



Figure 24: Nodules obtenus par test de nodulation

A partir des 51 isolats testés, 46 bactéries sont montrées positifs en nodulation (tableau 15). Ces souches sont d'origines différentes en genre, sites et variétés.

Tableau 15 : Résultats du test de nodulation des isolats

Genre et nombre	Isolat	Nodulation	site	variété	Genre et nombre	Isolat	Nodulation	site	variété
<b>Mesorhizobium (19)</b>	Sam96	+	Jijel	III	<b>Ensifer (13)</b>	Sam10	+	Biskra	III
	Sam154	+	Batna	III		Sam2	+	Biskra	III
	Sam77	+	Jijel	III		Sam61	+	Biskra	III
	Sam121	+	Jijel	III		DS38	+	Biskra	III
	Sam126	+	Constantine	III		DS51	+	Merouana	III
	Sam125	+	Jijel	III		DS32	+	Batna	III
	Sam144	+	Merouana	I		DS43	+	Biskra	I
	Sam93	+	Jijel	III		DS49	+	Biskra	I
	Sam116	+	Jijel	III		DS50	+	Jijel	III
	Sam130	+	Jijel	III		DS48	+	Tébessa	III
	Sam78	+	Jijel	I		DS53	+	Biskra	II
	Sam75	+	Jijel	I		DS76	-	Merouana	II
	Sam105 (S15)	+	Jijel	III		DS30	-	Constantine	III
	Sam80	+	Jijel	III	<b>Rhizobium (15)</b>	Sam33	+	Tébessa	II
	Sam131	+	Jije	III		DS26	+	Tébessa	III
	Sam123	+	Jijel	III		Sam5	+	Jijel	II
	Sam102	+	Constantine	III		Sam91	+	Biskra	III
	Sam106	+	Jijel	III		Sam12	+	Merouana	III
	Sam122	+	Jijel	III		Sam7	+	Tébessa	II
<b>Burkholdria(4)</b>	Sam117	+	Jijel	III		DS16	+	Tébessa	I
	Sam110	+	Jijel	III		DS64	+	Constantine	III
	Sam18	+	Constantine	III		DS25	+	Tébessa	II
	DS44	-	Merouana	III		DS75	+	Merouana	II
						DS15	-	Tébessa	II
						DS13	-	Tébessa	III
						DS3 (S3)	+	Constantine	III
						Sam29	+	Tébessa	II
						Sam40	+	Tébessa	II

I : variété ILC32-79, Variété II : Flip 85-55 et Variété III : Flip 90-13,

+ : présence de nodules, - : absence de nodules

Dans le genre *Mesorhizobium*, 100% des souches (19/19) testées ont induit des nodules. Deux souches parmi 13 bactéries du genre *Ensifer* et deux parmi 15 du genre *Rhizobium* n'ont pas nodulé. Dans le cas du genre *Burkholderia* les  $\frac{3}{4}$  des isolats ont montré des nodules.

### 3-4-3- Distribution des genres du rhizobium obtenus

#### 3-4-3-1-Distribution sur les sites

Les quatre genres obtenus (sur la base des séquences de l'ADNr 16S), sont distribués différemment par rapport aux neuf sites utilisés. Aucun des quatre genres n'a été détecté au niveau des sites de Hassi et Still. Le site de Jijel regroupe la majorité des souches des genres *Burkholderia* et *Mesorhizobium*. Les bactéries du genre *Rhizobium/Agrobacterium* sont isolées essentiellement au niveau du site de Tébessa alors que la dominance du genre *Ensifer* est plus importante au niveau de Biskra (figure 25).

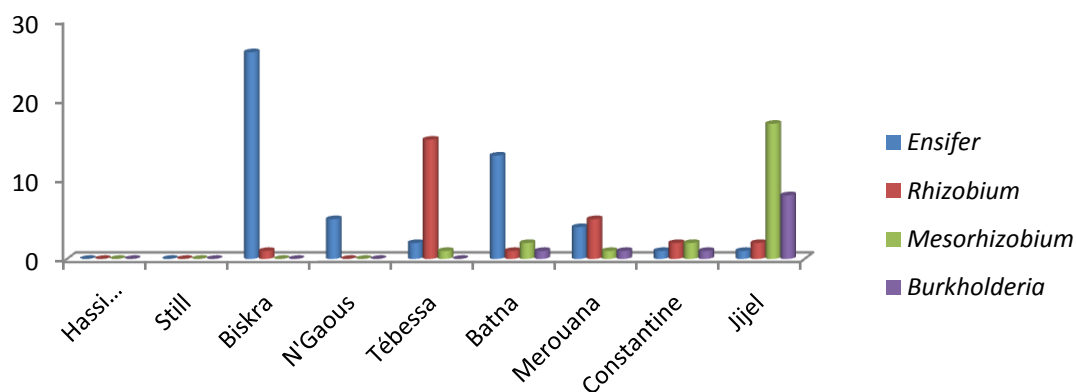


Figure 25: Distribution des genres de rhizobium sur les sites

Il semble aussi que l'importance de la présence de chacun des quatre genres est variable en fonction du climat. Pour les genres *Burkholderia* et *Mesorhizobium* la présence est progressivement diminuée du climat humide vers le climat semi-aride allant vers une absence totale dans le climat aride. L'inverse est remarqué pour le genre *Ensifer* dont le maximum de présence est détecté dans un climat aride (Biskra) et dont le minimum est détecté au niveau du climat semi-aride (Constantine) et le climat humide (Jijel). Le genre *Rhizobium* aussi montre son maximum de présence à Tébessa (climat semi-aride), sa présence la plus faible est située au niveau du climat humide (Jijel).

### 3-4-3-2- Distribution sur les variétés

Même si la variété III est la plus présente avec la majorité des genres obtenus, une variabilité de distribution des genres des rhizobias du pois chiche par rapport aux trois variétés utilisées est bien claire. Le genre *Rhizobium* fait l'exception par rapport aux autres genres en étant préférentiellement retrouvé sur la variété II alors qu'on n'y retrouve aucune bactérie des genres *Mesorhizobium* et *Burkholderia*, et qu'une seule bactérie du genre *Ensifer*, est trouvée avec cette variété. La variété I est faiblement nodulée par la totalité des quatre genres (figure 26).

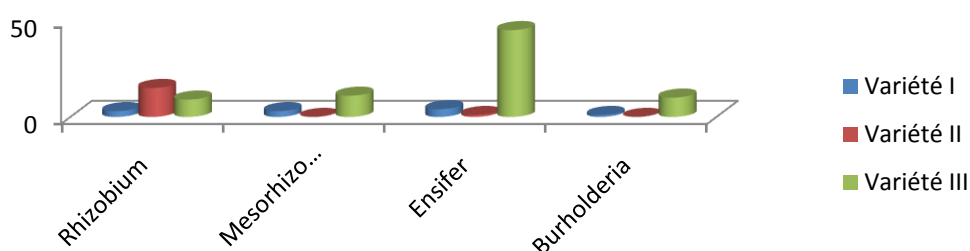


Figure 26: Distribution des genres de rhizobium sur les variétés

### 3-4-3-3-Distribution des variétés hôtes sur les sites

Quel que soit le genre du microsymbiote du pois chiche, la variété III est la plus nodulée dans la majorité des sites examinés. Le site de Tébessa est le seul qui a fait l'exception en favorisant la nodulation pour la variété II par rapport aux deux autres variétés. Les sites de N'Gaous et Constantine n'ont permis la nodulation que pour la variété III (figure 27).

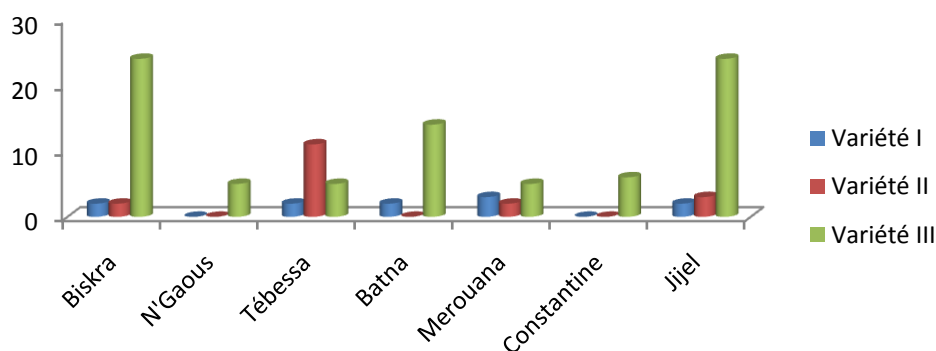


Figure 27: Distribution des variétés hôtes sur les sites

## II-Discussion

Pour examiner la diversité de nos isolats, plusieurs marqueurs génétiques sont utilisés (Armas-Capote et *al.*, 2014). Ces derniers comportent un gène ribosomique (ADNr 16S), un gène de ménage (*recA*), la région inter génique 16S-23S (IGS) et des gènes symbiotiques (*nodC* et *nifH*).

Nous avons commencé d'abord par le séquençage du gène ribosomique ADNr16S pour situer les isolats au niveau du genre, cette position est confirmée par l'analyse des séquences du gène de ménage *recA*. L'identification et l'affiliation de ces isolats aux niveaux de l'espèce et intra-espèce sont appuyées par l'analyse des séquences de la région inter génique 16S-23S (IGS). En outre, les gènes de symbiose, *nifH* et *nodC*, sont examinés pour vérifier l'origine des gènes symbiotiques de nos isolats. Il faut noter que le nombre d'amplifias obtenu était dépendant du type de l'ADN à amplifier et que le plus grand nombre était obtenu pour les amplifias des fragments d'ADN ribosomiques du gène ADNr 16S (194 amplifias).

L'analyse des séquences de ces amplifias, montre que, seulement 112 isolats sont des rhizobiums le reste correspond à des bactéries non rhizobium. La dominance des rhizobiums par rapport aux non rhizobiums est bien remarquable pour la majorité des sols examinés. Ceci montre la grande priorité des rhizobiums par rapport aux autres bactéries du sol à coopérer avec la légumineuse, surtout quand les nodules sont issus du système racinaire de la variété III du pois chiche. Pour cette variété le nombre de rhizobium (85) fait presque le double par rapport à celui des non rhizobium (48). Selon cette distribution on pourrait dire que la variété III, favorise les bonnes conditions de vie pour les rhizobiums que pour les non rhizobiums, contrairement aux cas des deux autres variétés.

Cette bonne de la variété III concernant sa bonne coopération avec les rhizobiums, suit celles remarquées dans la première partie de ce travail concernant le piégeage où on a pu remarquer que le plus grand nombre de plantes par pot et le plus grand nombre de nodules par plante, sont donnés par cette variété.

- **Bactéries non rhizobium**

L'obtention des bactéries non rhizobium parmi les isolats nodulaires du pois chiche nous laisse penser à deux types d'hypothèses. Ces bactéries seraient soit des contaminants de la surface extérieure des nodules (ou de l'environnement), soit des endo nodulaires. Cette deuxième hypothèse est renforcée par l'absence (après incubation) des colonies sur les boîtes de control négatif réalisé par des ensemencements de l'eau du dernier rinçage des nodules

stériles. Dans tous les cas, la présence des bactéries non rhizobium dans les nodules de certaines légumineuses a été souvent citée (Elvera- Recuenco *et al.*, (2000) ; Tokala *et al.*, (2002) ; Benhizia *et al.* (2004) et Muresu *et al.*,(2008). Cependant la question qu'on peut poser c'est : est ce que ces non rhizobiums vivent seuls dans les nodules ou bien associées avec les rhizobiums? D'une autre manière est ce que ces non rhizobiums sont capables de former les nodules du pois chiche ou ils ont profité du nodule après sa formation par les rhizobiums? Peu d'études basées sur ces types de questions sont connues. L'étude de Benhizia *et al.*, (2004), portant sur *Hedysarum* a suggéré l'existence de certaines bactéries appartenant à la branche des gamma- protéobactéries qui pourraient noduler cette légumineuse. Pour le cas de pois chiche aucune étude n'a ciblé ces points jusqu'à présents, donc pour valider l'hypothèse portant sur la probabilité de nodulation par des gamma-protéobactéries et pour qu'une conclusion finale pourrait être formellement établie à ce sujet, d'importants efforts se basant beaucoup plus sur les techniques de biologie moléculaires seraient nécessaires.

Parmi les différents genres des bactéries non rhizobiums trouvés dans cette étude (*Inquilinus Rahnella*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, et *Pseudomonas*), la dominance revient clairement au genre *Rahnella*. Ce dernier n'a jamais été cité comme endophyte des légumineuses jusqu'à l'obtention de ce résultat (Elvera- Recuenco *et al.*, (2000) ; Tokala *et al.*, (2002) ; Benhizia *et al.*,(2004) et Muresu *et al.*, (2008).

Les bactéries non rhizobiums trouvées dans cette étude, pourraient être parmi les rhizobactéries qui sont impliquées dans divers processus améliorant directement le développement des plantes ou bien pourraient avoir un effet positif sur l'infectivité et l'efficacité des rhizobiums nodulaires de la plante. Ces hypothèses devraient être vérifiées par des techniques moléculaires fiables. Ceci qui pourrait expliquer l'existence de ces bactéries au sein des nodules, notamment le rôle des bactéries du genre *Rahnella*., il serait préférable de vérifier leur possession en gènes de symbiose.

- **Bactéries rhizobium**

Notre insistance pour réaliser l'objectif de ce présent travail nous a incité à écarter temporairement les bactéries non rhizobiums et concentrer notre travail sur la caractérisation moléculaire des bactéries rhizobiums obtenus. En plus du gène ADNr 16S, l'analyse a impliquée dans ce cas le gène *recA* et le fragment IGS. Le résultat montrant la présence de quatre genres différents de rhizobium dans le nodule du pois chiche est vraiment surprenant.

Cette plante légumineuse est souvent connue par sa restrictivité pour la nodulation (Broughton et Perret, 1999) et jusqu'à présent le seul genre qui est connu être le conteneur des bactéries nodulant le pois chiche c'est bien le genre *Mesorhizobium* (Nour et al., 1994, 1995, Jarvis et al., 1997).

La présence des bactéries du genre *Ensifer* est déjà citée dans différentes études portant sur les rhizobiums du pois chiche. Au Maroc (Maatalah et al., 2002) et en Tunisie (Aouani et al., 2001 ; Ben romdhane et al., 2007), ce genre est trouvé, mais pour une grande dominance telle qu'on a obtenue dans cette étude, nous pouvons dire que ces précédents résultats ne peuvent être semblables à les nôtres.

Excepté les genres : *Ensifer* et *Mesorhizobium*, aucune étude n'a signalé la présence des deux autres genres (*Rhizobium* et *Burkholderia*) dans la nodulation des pois chiches. La présente étude est la première à avoir signalé la présence de ces deux genres dans les nodules de cette légumineuse.

La majorité des isolats *Mesorhizobium* et certains isolats choisies au hasard dans chacun des trois autres genres ont été testés pour leur capacité à noduler leur hôte (le pois chiche). Ceci est réalisé avec le même mode opératoire que le piégeage initial, avec l'ajout de 1 ml de chaque culture de la souche bactérienne sur les jeunes plantes. En se basant sur l'apparition des nodules sur les racines après 4-5 semaines, les tests ont été 100% positifs pour les souches *Mesorhizobium* et supérieurs à 80% pour les souches des autres genres. Même si le résultat positif n'est pas confirmé pour la totalité des bactéries testées, la nodulation trouvée laisse penser qu'on est en présence de micro symbiotes de cette légumineuse, notamment en s'appuyant sur le fait que en plus du *Mesorhizobium*, ces trois autres genres ont été décrits précédemment comme contenant des espèces symbiotiques (Lindström et al., 2015).

En plus de leur différence en genres, les bactéries confirmées être nodulantes sont variables dans leur origine que ce soit pour le site ou bien pour la variété de l'hôte. Ceci permettrait d'augmenter les chances de sélection pour une future inoculation dans ces sites ainsi que dans d'autres dont les caractéristiques du sol sont semblables à celles des sites examinés dans cette étude.

- **Distribution des quatre genres de rhizobium par rapport aux sites et aux variétés**

Pour tester l'effet conditions environnementales, type de sol et variétés, sur la distribution des genres obtenus, une confrontation entre les caractéristiques des sites examinés dans cette étude et la distribution des souches et des variétés obtenue est réalisée.

Cette étude a permis de détecter une différence de distribution des différents genres de rhizobium par rapport aux sites et aux variétés utilisés. Par conséquent l'estimation de la fiabilité de chacune des trois variétés du pois chiche pour être la plante hôte pourrait être discutée selon sa grande présence par rapport à deux facteurs : site et souche de rhizobium.

L'effet variété est bien détectable sur la densité, la présence ou l'absence d'un genre donné de rhizobium dans un site donné. En effet, même si la variété III est présente avec tous les genres, une certaine spécificité est remarquée notamment entre le site de Tébessa, le genre *Rhizobium/Agrbacterium* et la variété II. 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).

La distribution des genres de rhizobiums selon les sites et les variétés, pourrait être influencée même faiblement par certains facteurs du sol tels que le pH, la dégradation de la matière organique et la texture du sol. Ces facteurs auraient permis de situer la grande présence des genres *Mesorhizobium* avec *Burkholderia* au niveau de Jijel, celle du genre *Ensifer* à Biskra et celle du genre *Rhizobium* au niveau de Tébessa. Le type de climat, aussi pourrait avoir un grand rôle situant le *Mesorhizobium* dans le climat humide et le genre *Ensifer* beaucoup plus dans le climat aride.

L'effet combiné des propriétés du sol et du climat pourrait jouer un rôle important sur cette structuration. En effet ce type d'effet a été rapporté 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 et al., 2008). Dans notre cas, il semblerait que les genres *Mesorhizobium* et *Ensifer* préfèrent le même type de sol sableux. Le genre *Mesorhizobium* préfère un climat humide et un bon niveau de fertilisation alors que le genre *Ensifer* préfère un climat aride et il n'est pas exigeant pour une décomposition de la matière organique. Le genre *Rhizobium* quant à lui préfère un sol équilibré et un climat semi-aride. Le genre *Burkholderia*, semble suivre les mêmes préférences que ceux du genre *Mesorhizobium*. La grande présence du genre *Mesorhizobium* par rapport à celui du genre *Burkholderia* sur le même site pourrait revenir probablement au grand degré de spécificité du genre *Mesorhizobium* que celui du *Burkholderia* pour le pois chiche.

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



nutritionnelle, pourrait ainsi jouer un rôle important dans l'avantage compétitif pour l'occupation des nodules d'une espèce de rhizobium par rapport à d'autres et d'un genre de rhizobium par rapport à d'autres.

Si nous prenons par exemple les cas de l'influence des cultures sur la nodulation et la diversité au niveau du genre, on peut citer l'étude de l'impact de *Eucalyptus camaldulensis* sur la diversité des genres du rhizobia associées à *Acacia senegal* et *A. seyal* (d'*Acacia sahélienne*) en Sénégal. En présence d'une culture de *Eucalyptus camaldulensis* et à partir de deux types de sols (Sous Couvert (SC) et Hors Couvert (HC)), Soumare et al., 2013, ont rapporté que les plantations d'*E. Camaldulensis* réduisent la diversité des rhizobias associées aux espèces d'*Acacia sahélienne*. Les résultats ont montré que *A. seyal* était associée à trois genres de rhizobium: *Bradyrhizobium* (46.25%), *Mesorhizobium* (42.25%) et *Rhizobium* (11.25%) mais la répartition de ces genres varie selon le type de sol (HC/SC). En effet, dans les prélèvements SC, *A. seyal* est uniquement associé aux bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* (85%) et au genre *Mesorhizobium* (15%). Par contre, dans les sols de prélèvement HC, il est associé aux bactéries appartenant aux genres *Mesorhizobium* (67.5%), *Rhizobium* (22.5%) et *Bradyrhizobium* (10%). Aucune bactérie appartenant au genre *Rhizobium* n'a été trouvée parmi les isolats obtenus à partir des sols SC. Dans cette présente étude, nous avons utilisé des échantillons de sol qui n'ont jamais été cultivés avant, ce qui exclue l'effet de type de culture sur la structuration des genres de rhizobium obtenue.

Les données concernant la distribution des symbiotes par rapport aux sites et aux variétés trouvées dans cette présente étude, permettent d'accéder au deuxième volet de cette partie de thèse portant sur la détection des meilleurs couples et des meilleur combinaisons pour la nodulation du pois chiche. Le site de Jijel et Biskra semés par la variété III donne le plus grand nombre de symbiotes du genre *Mesorhizobium* et le genre *Ensifer*. Le site de Tébessa fait l'exception en donnant plus d'importance au genre *Rhizobium* et en favorisant la symbiose de ce genre avec la variété II comme plante hôte.

Certains d'autres sites ainsi que la variété I participent d'une façon moindre par rapport aux combinaisons citées et ainsi peuvent être utilisés pour des inoculations du pois chiche selon la disponibilité des souches et des variétés.

### III- Conclusion

La méthode d'extraction d'ADN utilisée dans cette étude est fiable puisque dans la majorité des cas on a pu extraire un ADN pure avec des concentrations suffisantes pour réaliser les différentes amplifications.

Les séquences de l'ADNr 16S, ont permis d'identifier les genres bactériens nodulaires du pois chiche. Les nodules de cette légumineuse contiennent des bactéries rhizobiums dominantes et des bactéries non rhizobium. Alors que les non rhizobiums se présentent avec plusieurs genres dont *Rahnella* est le genre dominant, les bactéries rhizobiums se trouvent partagées entre quatre genres différents avec une dominance claire du genre *Ensifer*.

Il semble que la variété III, favorise les bonnes conditions de vie pour les rhizobiums que pour les non rhizobiums. A l'inverse, la variété II semble favoriser les non rhizobias que les rhizobias rhizobias rhizobias alors que la variété I semble donner une chance de vie plus au moins égale pour les deux types de bactéries (rhizobium et non rhizobium).

Il semble que les genres *Mesorhizobium* et *Ensifer* préfèrent le même type de sol sableux, le genre *Mesorhizobium* préfère un climat humide, un bon niveau de fertilisation alors que le genre *Ensifer* peut tolérer plusieurs types de sol et un climat aride. Le genre *Rhizobium* semble n'être infectif qu'avec le sol de Tébessa.

**Chapitre III : Etude de la  
diversité et de la  
biogéographie du genre  
*Mesorhizobium* nodulant le  
pois chiche**

La grande hétérogénéité, obtenue dans cette étude nécessite une grande attention, une grande précision et une grande prudence dans l'analyse des données, c'est pourquoi on a préféré traiter et discuter la diversité des bactéries nodulant le pois chiche dans chaque genre appart. L'étude est plus profonde pour le genre *Mesorhizobium* non seulement parce que ce genre est le symbiote le plus commun de *Cicer*, mais aussi parce que nous avons réussi à séquencer pour ces isolats à la fois les locis *nodC* et *nifH*.

Ayant utilisé plusieurs sites et plusieurs variétés, nous avons profité d'analyser la distribution des génotypes des ADN examinés par rapport à ces paramètres afin de mettre la lumière sur les couples symbiotiques fiables pour la bonne croissance et la nodulation du pois chiche. En effet, la sélection des couples: variété-site, souche- site et souche- variété ainsi que les bonnes combinaisons variété-site-souche serait d'un grand intérêt pour une amélioration du rendement du pois chiche en Algérie tout en profitant de nouveaux sites qui n'ont jamais été cultivés. A un site donné serait attribuée une variété donnée qui sera nodulée par une souche portante d'un génotype donné.

## I-Résultats

### 1-Diversité du *Mesorhizobium*

#### 1-1-Manuscrit (article)

L'essentiel des résultats portant sur l'étude de la diversité du genre *Mesorhizobium* est détaillé sur l'article publié : **Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is nodulated by unexpected wide diversity of *Mesorhizobium* species in Eastern Algeria.**

#### 1-2-Résultats supplémentaires à l'article

##### 1-2-1- Isolats non citées dans l'article

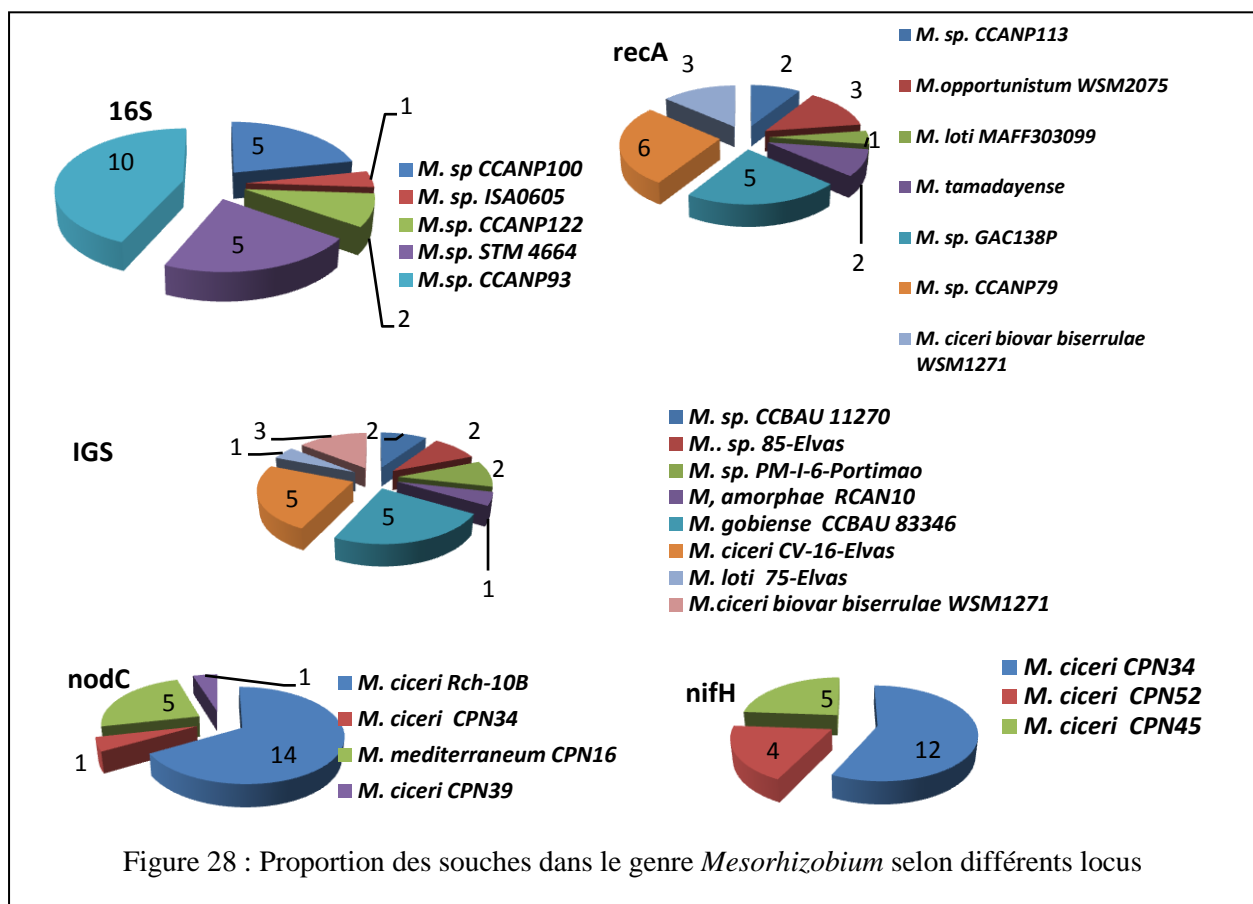
Les résultats contenus dans l'article ne traitent que les bactéries *Mesorhizobium* isolées à partir des nodules de la variété III (Flip 90-13), cependant quatre autres bactéries ayant pour hôte, soit la variété II (Flip 85-55), soit la variété I (ILC32-79), ont subi les mêmes analyses que celles des 19 bactéries citées dans l'article. Il s'agit des bactéries Sam75, Sam 78 (isolées du sol Jijel à partir de la variété I), de la bactérie Sam 144 (isolée du sol de Merouana à partir de la variété I) et de la bactérie Sam 105 (isolée du sol de Jijel à partir de la variété II). Les

résultats portant sur l’affiliation par Blast selon les ADNs analysés sont cités sur le tableau 9 de l’annexe 4 et les résultats portant sur les espèces et génotypes de ces bactéries sont cités sur le tableau 16 (page 86).

### 1-2-2- Fiabilité des ADN analysés dans la mise en évidence de la diversité

#### 1-2-2-1-Mise en évidence des espèces

La mise en évidence des espèces et des souches aux quelles sont affiliés les isolats est dépendante des ADNs analysés. L’analyse du gène de ménage *recA* a pu mettre en évidence le plus grand nombre en espèces *Mesorhizobium* (*M.opportunatum*, *M.ciceri*, *tamadayense*, et *M. loti*), (figure 28 et tableau 9 de l’annexe 4).



L’analyse de l’IGS, a montré qu’en plus de l’espèce *M.ciceri*, deux autres espèces dans le genre *Mesorhizobium* (*M.gobiense* et *M. amorphae*) sont représentées par 15 isolats parmi 21, alors que l’analyse par l’ADNr 16S n’a pu formellement distinguer ces espèces pour la totalité des 23 isolats examinés.

L'analyse des gènes symbiotiques par Blast montre que la totalité des isolats examinés pour ces gènes est affiliée soit à l'espèce *M. ciceri* soit à l'espèce *M. Mediterraneum* pour le *nodC* alors que la séquence de *M. ciceri* est la seule espèce retrouvée dans ces isolats dans le cas du *nifH*.

### 1-2-2-2-Diversité intra espèces

La comparaison et l'alignement des séquences obtenues pour chacun des fragments d'ADN analysé a permis de mettre en évidence une importante diversité en génotypes au sein de nos bactéries *Mesorhizobium*. Le locus le plus diversifié est le gène *recA* montrant 10 génotypes différents sur 22 isolats. Ayant montré 8 génotypes sur 21 bactéries, le fragment IGS prend la deuxième position dans la diversité en génotypes. Le locus ADNr16S se classe en dernier par rapport au gène *recA* et à l'IGS en donnant que 5 génotypes différents (figure 29 et tableau 9 de annexe 4).

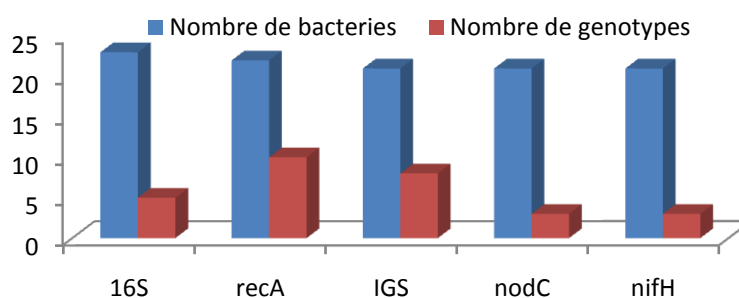


Figure 29: Nombre de génotypes par locus selon le nombre de bactéries analysées

Les gènes symbiotiques sont les plus pauvres en génotypes par rapport à la diversité détectée dans les trois premiers fragments d'ADN analysés (Figure 29 et tableau 9 de l'annexe 4).

### 1-3-Diversité globale du *Mesorhizobium*

Au total, au moins 5 espèces sont des microsymbiotes du *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche (tableau 16), alors qu'un groupe de 4 isolats se situe entre deux espèces différentes du *Mesorhizoium* (*M. ciceri*/*M. loti*) et pourrait représenter une nouvelle espèce. Les bactéries du *Mesorhizobium* trouvées dans cette étude, ont montré ensemble un total de 10 génotypes en *recA* ; 8 en IGS ; 5 en ADNr16S ; 3 en *nodC* et 3 en *nifH*. Les isolats de chacune de ces

espèces sont homogènes pour le même génotype ADN16S alors que pour le cas de l'IGS et le *recA* certaines des espèces sont bien plus diversifiées dans l'un ou l'autre ou bien dans les deux (Tableau 16).

Tableau 16: Espèces et génotypes des bactéries *Mesorhizobium*.

Site	Variety	Isolate	Phylogenetic affiliation (16S/recA)	16S	IGS	<i>recA</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
Jijel	III	SAM93	<i>M. amorphae</i>	g3	i3	r3	x	h2
Jijel	III	SAM104	<i>M. opportunistum</i>	g4 (S)	MD	r5	n2	h3
Jijel	III	SAM122	<i>M. opportunistum</i>	g4	i5	r4	n2	h3
Jijel	III	SAM130	<i>M. opportunistum</i>	g4	i4	r6	n2	h3
Jijel	III	SAM80	<i>M. opportunistum</i>	g4	i4	r7	n2	h3
Jijel	III	SAM96	<i>M. opportunistum</i>	g4	i5	r4	n2	h3
Jijel	III	SAM106	<i>M. tamayadense</i>	g2	i2	r2	n3	h3
Jijel	III	SAM125	<i>M. tamayadense</i>	g2	i2	r2	n3	h3
Batna	III	SAM56	<i>M. tarimense/M. gobiense</i>	g1	i1	r1	n1	h1
Jijel	I	SAM75	<i>M. tarimense/M. gobiense</i>	g1	i1	r1	n1	h1
Jijel	III	SAM76	<i>M. tarimense/M. gobiense</i>	g1	i1	r1	n1	h1
Jijel	III	SAM77	<i>M. tarimense/M. gobiense</i>	g1	i1	r1	n1	h1
Jijel	I	SAM78	<i>M. tarimense/M. gobiense</i>	g1	i1	r1	n1	h1
Batna	III	SAM154	<i>M. ciceri</i>	g5	i8	r10	n2	h3
Constantine	III	SAM102	<i>M. ciceri</i>	g5	i8	r9	n2	h3
Constantine	III	SAM126	<i>M. ciceri</i>	g5	i8	r9	n2	h3
Jijel	II	SAM105	<i>M. ciceri</i>	g5	i8	r10	n2 (S)	MD
Merouana	I	SAM144	<i>M. ciceri</i>	g5	i8	r9	n2	h3
Tebessa	III	SAM156	<i>M. ciceri</i>	g5	MD	r10	n2	h3
Jijel	III	SAM116	<i>M. ciceri/M. loti</i>	g5	i6	r8	n2	h2
Jijel	III	SAM121	<i>M. ciceri/M. loti</i>	g5	i6	r8	n2	h2
Jijel	III	SAM123	<i>M. ciceri/M. loti</i>	g5	i6	r8	n2	h2
Jijel	III	SAM131	<i>M. ciceri/M. loti</i>	g5	i7	MD	MD	MD

S : Shorter sequence ; MD : Missing Data ; Phylogenetic affiliation is given according to the 16S-*recA* phylogeny. Coding (g ,i, r, n, h + number) corresponds to the different haplotypes obtained for each locus (respectively: ADNr16S, IGS, *recA*, *nodC* and *nifH*).

Par exemple *M. ciceri/M. loti* ne semble être diversifiée que dans l'IGS pour lequel elle présente 2 génotypes (i6 et i7). Au contraire l'espèce *M. ciceri* est homogène pour l'IGS mais diversifiée pour le *recA* avec lequel elle montre 2 génotypes (r9 et r10). L'espèce *M. opportunistum* est diversifiée pour les deux fragments d'ADN (l'IGS et *recA*), elle présente 2 génotypes pour l'IGS (i4 et i5) et 4 génotypes pour le *recA* (r4, r5, r6 et r7).

Parmi les trois génotypes (n1, n2, n3) du *nodC*, le groupe contenant le génotype n2 est le type le plus diversifié pour l'ADNr 16S, IGS et *recA*. Il regroupe les génotypes g4 et g5 de l'ADNr 16S, les

génotypes i4, i5, i6, i8 de l'IGS et la majorité des génotypes *recA* (r4, r5, r6, r7, r8, r9 et r10). Le génotype n1 ne regroupe qu'un seul génotype de chacun des autres ADNs, que ce soit pour l'ADNr 16S (g1), l'IGS (i1) ou bien pour le *recA* (r1). Idem pour le type n3 du *nodC* contenant ADN16S (g2), l'IGS (i2) ou bien pour le *recA* (r2).

Pour, les génotypes du *nifH*, le type h1 est totalement concordant avec le type n1*nodC*. Le type h2 regroupe les génotypes de *M. amorphae* et ceux de *M. ciceri/M. loti*. Le génotype h3 est le plus diversifié en groupant les génotypes de *M. opportunistum*, *M. ciceri* et *M. tamayadense*. Ainsi le génotype h3 du *nifH* regroupe tous les génotypes n3 du *nodC* et la majorité du type n2*nodC* (tous les génotypes n2*nodC* sauf ceux correspondants à l'espèce *M. ciceri/M. loti*), (tableau 16).

## 2- Biogéographie du *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche

Les bactéries *Mesorhizobium* trouvées dans cette étude ainsi que leurs génotypes en ADNs analysés sont distribués différemment par rapport aux sites et par rapport aux trois variétés utilisées.

### 2-1- Distribution du *Mesorhizobium* par rapport aux sites

#### 2-1-1- Situation du *Mesorhizobium* par rapport aux autres genres du rhizobium

En confrontant les valeurs du nombre des rhizobiums totaux isolés par site aux groupes de sites discriminés par l'ACP (selon les caractères physicochimiques des sols), nous remarquons que certains sites appartenant à des groupes différents (Tébessa et Batna) montrent des nombres très proches en rhizobias totaux (19 et 16 respectivement). Aussi certains sites du même groupe (Biskra et Hassi Messaoud) ayant le même climat, présentent des valeurs extrêmes pour le nombre en rhizobias totaux. En effet le nombre en rhizobias totaux est nul à Hassi alors qu'il est assez important à Biskra (28), sachant que ce nombre important vient juste après la valeur maximale (30) des rhizobias trouvée à Jijel. Avec cette distribution nous pourrions dire que les facteurs physicochimiques ainsi que le climat n'ont pas influé sur la répartition des rhizobiums totaux sur les sites. Ce résultat est concordant avec ceux portant sur la distribution du NPP par site, calculé dans la première partie de cette thèse (figure 30). Contrairement à la répartition des rhizobiums totaux isolés, celle des mesorhizobiums sur les sites semble être bien expliquée par l'ACP, notamment par l'axe principal (39,88%). En effet excepté le site de Tébessa (à climat semi-aride et donnant 1 *Mesorhizobium*), dans le premier



grand groupe contenant en majorité les sites arides (Hassi, Biskra et Still) on ne retrouve aucun *Mesorhizobium*. Dans le deuxième groupe contenant en majorité les sites semi-arides ou humide (excepté le site N'Gaous où nous n'avons pu avoir aucun *Mesorhizobium*), le nombre de ce dernier est variable de 1 jusqu'à 17 (figure 30).

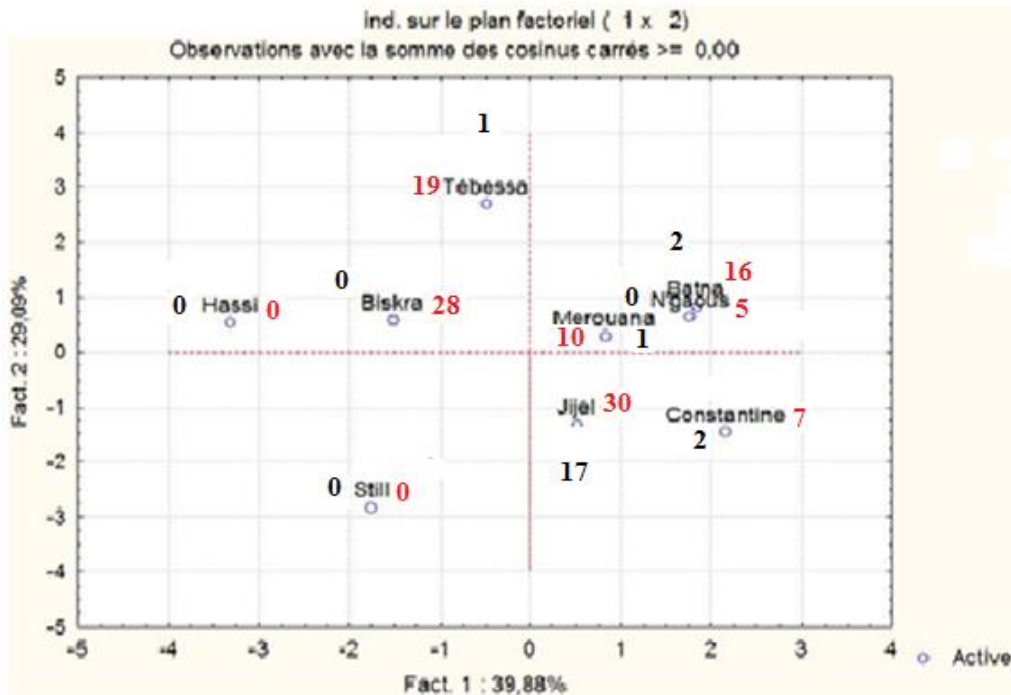


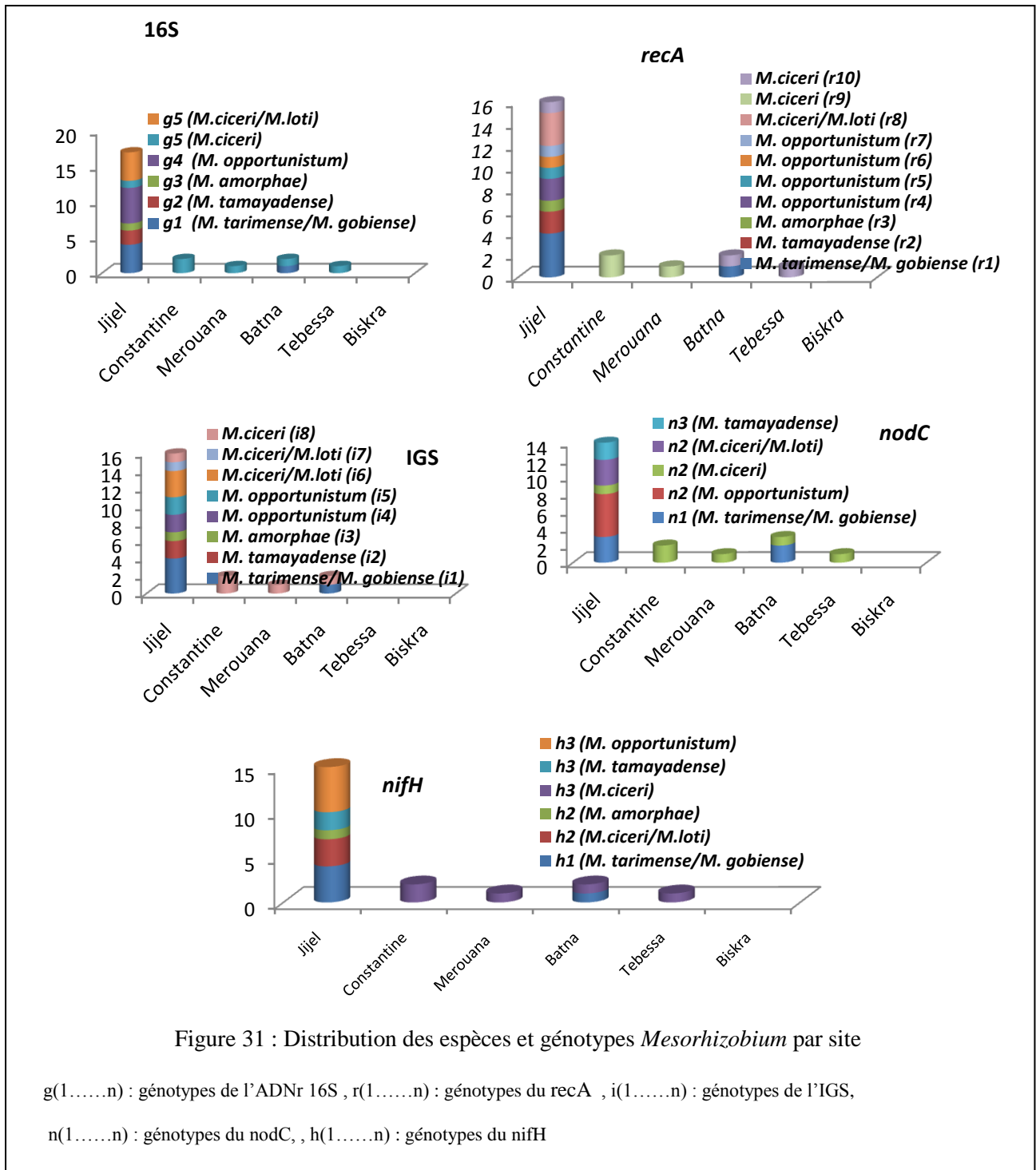
Figure 30 : Répartition des mesorhizobiums et des rhizobiums totaux sur les sites

Chiffre noir : *Mesorhizobium* - Chiffre rouge : rhizobiums totaux

Le site de Jijel à climat humide montre le nombre maximal (17) de *Mesorhizobium* alors que dans les sites présentant un climat semi-aride, ce nombre est variant entre 1 et 2. Ceci permet de penser au probable effet considérable du climat sur la présence du *Mesorhizobium* dans les sites. Il se pourrait que le *Mesorhizobium* préfère un climat humide que semi-aride et qu'il ne tolère pas un climat aride. L'effet climat pourrait être associé à d'autres caractères physicochimiques (sur lesquels l'ACP a discriminé les deux groupes de sites par son axe principal (39,88%), ainsi qu'à d'autres paramètres non examinés dans ce présent travail (figure 33).

### 2-1-2 - Distribution du *Mesorhizobium* par site

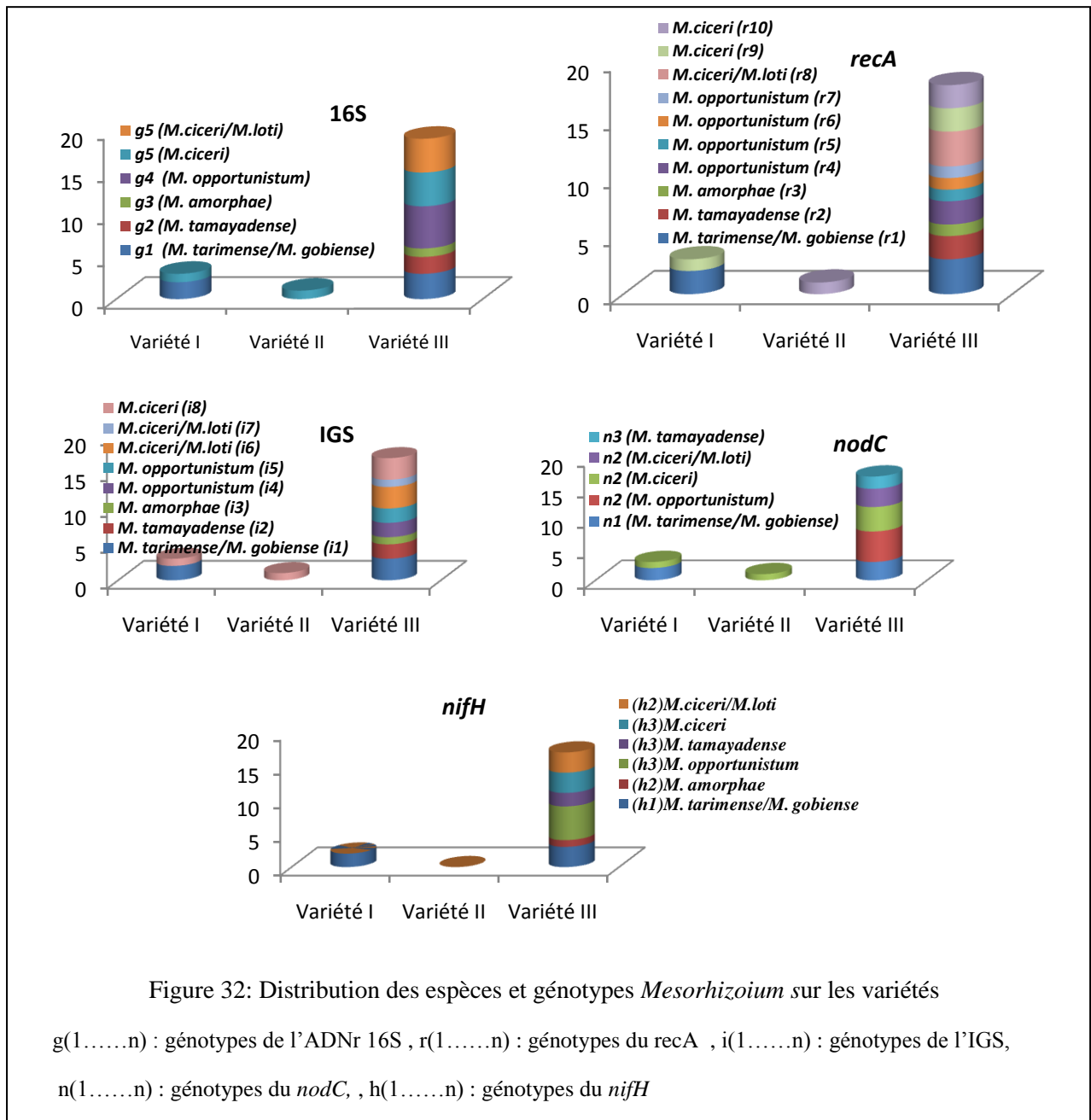
Le site de Jijel est le plus diversifiée en espèces du *Mesorhizobium* et en leurs génotypes, ce site contient la totalité des espèces du *Mesorhizobium* détectées dans ce travail (figure 31).



Les génotypes g1 et g5 de l'ADN16S ; les génotypes r10 du *recA* ; i8 de l'IGS ; n2 du *nodC* et h3 du *nifH*, correspondant respectivement aux bactéries *M. tarimense*/*M. gobiense* et (*M. ciceri*) sont partagés entre les sites de Jijel et Batna (figure 31).

2-2- Distribution du *Mesorhizobium* par variété

Toutes les espèces du *Mesorhizobium* trouvées, semblent pouvoir noduler la variété III du pois chiche. L'espèce *M.ciceri* paraît être la seule capable de noduler les trois variétés (figure 32).



Les bactéries du groupe *M. tarimense/ M. gobiense* (selon la phylogénie 16S/recA) semblent être capable de noduler les variétés I et III et non la variété II. Pour chaque espèce du *Mesorhizobium*, la majorité des génotypes est obtenue avec le site de Jijel et la variété III. Les seuls génotypes qui sont partagés entre les variétés III et I sont g1, g5 de l'ADNr 16S ; r1 et r9 du *recA* ; i1 et i8 de l'IGS ; n1 et n2 du *nodC* et h1 et h3 du *nifH* (figure 32).

La variété I ne contribue dans le genre *Mesorhizobium* que par les génotypes g5 de l'ADNr 16S ; r9 du *recA* ; i8 de l'IGS ; n2 du *nodC* et h1et h3 du *nifH* de l'espèce *M.ciceri* qu'elle partage avec la variété III alors que la variété II n'est présente qu'avec les génotypes g5 de l'ADNr 16S ; r10 du *recA* ; i8 de l'IGS ; n2 du *nodC* de cette même espèce (figure 32).

## II- Discussions supplémentaires à l'article

L'analyse moléculaire des quatre isolats non cités dans l'article (Sam 75, Sam78, Sam 144 et Sam 10) n'a rien ajouté de nouveau dans les résultats concernant la diversité obtenue avec les autres isolats, que ce soit au niveau de l'espèce ou intra espèce, quel que soit l'ADN examiné.

- **Fiabilité de chacun des fragments d'ADN analysé**

L'analyse par Blast de chacun des fragments (ADNr16S, *recA*, IGS) examiné dans cette étude, a montré des affiliations différentes pour les 23 isolats du *Mesorhizobium*. La diversité la plus importante est donnée par le locus *recA* qui a mis en évidence la présence dans ce genre, de quatre espèces (*M.opportunatum*, *M.ciceri*, *tamadayense*, *M. loti*), suivi par celle de l'IGS donnant deux espèces (*M.gobiense* et *M. M.amorphae*).

Le gène *recA* code pour une protéine responsable des recombinaisons génomiques et sa fiabilité dans la discrimination en espèces est bien prouvée dans des études antérieures portant sur le *Mesorhizobium* (Armas-Capote et al., 2014). Il a aussi été cité que les fragments d'ADN ribosomique situés entre 16S et 23S (IGS) peuvent être un marqueur efficace pour détecter des différences génétiques au niveau du genre, au niveau de l'espèce et aussi au niveau intra espèce. La comparaison des régions IGS fournit un outil rapide pour évaluer le degré de parenté entre les souches de rhizobium étroitement apparentées (Willems et al., 2001 ; 2003; Kwon et al.,2005). Ce fragment a été souvent utilisé dans les études taxonomiques des différentes espèces du *Mesorhizobium* (Nour et al., 1994, 1995; Kwon et al.,2005).

Contrairement aux deux précédents fragments (*recA* et IGS), l'analyse par l'ADNr 16S n'a pu détecter aucune espèce pour la totalité des 23 isolats analysés. Ce résultat est concordant avec beaucoup d'autres études portant sur le *Mesorhizobium*, montrant que les bactéries de ce genre présentent une grande similarité dans les séquences du gène de l'ARNr 16S (Alexandre et al., 2009), ce qui limite leur affiliation.

- **Diversité obtenue par analyse des séquences multi locus (MLSA)**

Les résultats d'analyses portant sur les séquences de l'ensemble des fragments ADNr 16S, IGS et *recA*, montrent qu'au sein du genre *Mesorhizobium* contenant 23 isolats, sont présentes plusieurs géno-espèces différentes. Quatre espèces (*M. opportunistum*, *M. tamadayense*, *M. amorphae*, *M. Ciceri*) sont clairement connues être des espèces du *Mesorhizobium* et chacun de deux groupes bactériens est situé entre deux espèces du *Mesorhizobium* (*M. tarimense* / *M. gobiense* et *M. Ciceri* / *M. loti*). Sachant que les isolats portant le génotype (*M. tarimense* / *M. gobiense*) possèdent des séquences IGS de *M. gobiense*, on pourrait considérer que ces isolats représentent l'espèce *M. gobiense*. Les isolats ayant le génotype *M. Ciceri* / *M. loti* pourraient probablement être de nouvelles espèces du *Mesorhizobium*. Pris ensemble, nous pouvons conclure à la présence d'au moins 5 espèces dans le *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche dans l'Est Algérien.

Parmi les espèces obtenues, seulement l'espèce *M. ciceri* est connue être un symbiote spécifique du pois chiche (Nour et al., 2004). Les autres sont des symbiotes spécifiques d'autres légumineuses, certaines d'entre elles ont été trouvées précédemment dans les nodules de pois chiche dans diverses régions du monde (*M. loti*, *M. opportunistum* et *M. amorphae*) alors que d'autres n'ont jamais été rapportés comme symbiotes du pois chiche (*M. gobiense* et *M. tamadayense*).

L'espèce *M. loti* est connue comme symbiote de *Lotus corniculatus* (Jarvis et al., 1982), cependant cette espèce est trouvée comme symbiote du pois chiche au niveau de certains sites de l'Espagne (Rivas et al., 2007), en Portugal (Laranjo et al., 2004 ; Alexandre et al., 2009), en Ind (Rhitu et al., 2012) et en Iran (Asgharzadeh et al., 2013).

L'espèce *M. opportunistum*, a été isolée la première fois à partir de *pelecinus Biserrula* (Nandasena et al., 2009) qui est une plante de pâturage de légumineuses adaptée aux sols acides. D'autres études ont rapporté que cette espèce est nodulante du pois chiche (Laranjo et al., 2012). Aussi, cette espèce est récemment trouvée parmi les microsymbiotes nodulant le pois chiche sauvage (*C. canariense*) endémique des îles Canaries (Armas-Capote et al., 2014).

Une étude antérieure basée sur la caractérisation génétique par des profils plasmidiques et par une analyse de restriction du gène *nifH* a montré que parmi les isolats nodulaires du pois chiche, isolés à partir de trois zones géographiques différentes du sud du Portugal, est

présente l'espèce *M. amorphae* (Rivas et al., 2007), sachant que cette espèce est connue être le symbiote spécifique de *Amorpha fruticosa* (Wang et al., 1999).

Les espèces *Mesorhizobium gobiense* et *M. tarimense* ont été isolées successivement à partir de *Oxytropis glabra* et *Lotus frondosus* qui sont des espèces légumineuses dans le sol du désert, dans la région de Xinjiang, en Chine (Han et al., 2008 (b)).

L'espèce *Mesorhizobium tamadayense* est une espèce isolée partir de *Anagyris latifolia* endémique du ravin de Barranco de Tamadaya situé dans le sud de Tenerife (Laranjo et al., 2012). Jusqu'à présent, aucune étude n'a montré la présence de l'une de deux espèces (*M. gobiense* et *M. tamadayense*) dans les nodules de pois chiche. Parmi ces deux espèces, seulement *Mesorhizobium tamadayense* est trouvée précédemment dans les nodules d'une espèce du pois chiche sauvage (*C. canariense*) du genre *Cicer* (Armas-Capote et al., 2014).

Une grande diversité génétique des isolats nodulaires du pois chiche avait été précédemment rapportée dans plusieurs études, dans le monde entier. Au Maroc, Maatallah et al., (2002), en se basant sur l'analyse ADNr16S RFLP ont détecté 3 groupes parmi 48 isolats analysés. En Inde, Nandwani et Dudeja, (2009) ont trouvé 6 clusters parmi 50 souches examinés avec deux types d'analyses (16S RFLP et profil ERIC) alors que basé sur un analyse ADNr 16S RFLP, Rahi et al., (2012) ont trouvé 4 clusters à partir de 28 isolats. Sur la base des séquences ADNr16S (Alexandre et al., 2009) ont isolé 110 souches au Portugal qui se divisent dans 4 clades, tandis qu'en 2014 et à partir de 113 isolats (Armas-Capote et al., 2014) ont récupéré neuf géno-espèces du *Mesorhizobium* nodulant *Cicer canariense* dans son habitat naturel. Le seul contre-exemple est l'étude de Zhang et al., (2012 (b)) portante sur 95 isolats et à partir de laquelle ils n'ont pu détecter qu'une seule nouvelle espèce, étroitement liée à *M. robina*. Des auteurs ont suggéré que cette faible diversité pourrait être due à la forte alcalinité du sol échantillonné qui sélectionne une seule espèce adaptée à ces conditions abiotiques.

- **Diversité en gènes symbiotiques**

En tenant compte de la grande diversité en genre et en espèce des microsymbiotes du pois chiche détectée dans cette étude et sachant que le pois chiche est une légumineuse qui a souvent été considéré comme un hôte restrictive pour la nodulation, (Broughton et Perret, 1999), l'analyse des gènes symbiotiques portés par les bactéries trouvées dans cette étude nodulantes cette légumineuse s'est avérée nécessaire.

Les deux gènes, *nifH* et *nodC*, ont souvent montré une relation étroite entre les souches rhizobium nodulant la même hôte (Laguerre et al., 2001; Rivas et al., 2002), par conséquent leur analyse peut aider à comprendre la nodulation du pois chiche par des souches endosymbiontes nouvelles de cette légumineuse. Une comparaison de leurs phylogénies avec celles provenant de gènes de ménage peut révéler des événements latéraux de transfert de gènes entre les rhizobiums (Haukka et al., 1998). Ces raisons nous ont poussé à tenter de séquencer et analyser ces deux gènes pour la totalité des isolats obtenus, cependant l'amplification des gènes *nodC* et *nifH* n'est réussi majoritairement dans cette étude, que pour des bactéries du genre *Mesorhizobium*. Ces séquences ont été déposées dans GenBank respectivement sous les numéros d'accession KU894815 à KU894923 et KX463617 à KX46362.

Inversement à l'importante diversité obtenue par le biais de l'analyse des fragments précédents (ADNr 16S, IGS et *recA*), celle des gènes de symbiose s'est montrée assez faible. Chacun des gènes *nodC* et *nifH* n'a pu diviser les différents isolats qu'en trois types dont deux sont très proches successivement des espèces *M.mediterraneum* et *M.ciceri*, connues à être spécifiques au pois chiche (Nour et al., 1994 ; 1995), alors que le troisième type semble être loin de ces deux espèces et plutôt proche d'une souche issue de la chine. Ce résultat laisse penser à un probable échange effectué entre les symbiotes spécifiques au pois chiches et d'autres bactéries, assurant un transfert des gènes symbiotiques de la bactérie infective à une autre de même genre. La bactérie réceptrice devient alors symbiote du pois chiche (Rogel et al., 2011).

- **Situation du *Mesorhizobium* par rapport aux sites et par rapport aux variétés**

Dans l'ensemble, nous avons isolé 23 bactéries de *Mesorhizobium*, leur majorité (19) se trouve avec la variété III et 17 d'entre elles se trouvent avec le sol de Jijel. Nos résultats suggèrent ainsi une répartition inégale du *Mesorhizobium* isolé entre les sites et les variétés. En effet, 28 isolats rhizobium ont été récupérés à partir du site de Batna, (presque le même nombre que celui de Jijel), mais aucun d'entre eux n'était *Mesorhizobium*. Cette distribution asymétrique pourrait être expliquée d'une part par la plus grande capacité de la variété III en nodulation par rapport aux autres variétés et d'autres part à l'effet des conditions climatiques du site de Jijel sur la présence des rhizobiums. Il semble que le climat humide facilite aux mesorhizobiums la réussite par compétitions avec d'autres genres du rhizobium pour noduler le pois chiche notamment si la variété III est la plante hôte.

Les préférences des bactéries du *Mesorhizobium* pour le site de Jijel et la variété III restent des hypothèses puisque la comparaison avec les résultats d'autres travaux montrent que la capacité pour le pois chiche à piéger et à être nodulé avec de nombreuses différentes espèces de *Mesorhizobium* ne semble pas être limitée à une zone spécifique, ni à une variété spécifique. Ceci suggère que cette capacité est commune au sein de *C. arietinum* et peut-être dans le genre. Il a également été montré que les différentes espèces de *Mesorhizobium* sont largement distribuées dans le monde entier avec toute fois quelques exceptions près, pour les espèces *M. tarimense* et *M. gobiense* étant seulement récupérées pas si loin de la Chine. Cependant, nous pensons que plus d'échantillonnage permettrait de récupérer ces espèces ailleurs. Néanmoins selon la distribution bactérienne du genre *Mesorhizobium* détectée dans cette étude sur les sites et sur les variétés, nous pourrions au moins proposer que la combinaison Jijel-Variété III –Souche *Mesorhizobium*, soit probablement fiable pour réussir la culture du pois chiche et augmenter son rendement en Algérie.

### III-Conclusion

Au sein du *Mesorhizobium*, une diversité importante de microsymbiotes de pois chiche est détectée. Au moins 5 espèces (*M.ciceri*, *M. amorphae*, *M. gobiense*, *M. opportunistum* et *M. Tamayadense*) sont présentes, alors que certains isolats pourraient probablement représenter au moins une nouvelle espèce du *Mesorhizoium* (*M.ciceri*/*M.loti*).

Parmi les espèces détectées dans cette étude, *M.gobiens* et *M. tamadayense* n'ont jamais été cités comme symbiotes du pois chiche.

La faible diversité symbiotique détectée, confirme que les différentes espèces du *Mesorhizobium* obtenues, ont un nombre d'origine restreint. Ces espèces pourraient avoir acquis des gènes symbiotiques par transfert à partir de souches spécifiques au pois chiche.

Les symbiotes du pois chiche appartenant au genre *Mesorhizobium*, semblent avoir leur plus grande capacité infective au niveau du sol de Jijel et semblent préférer la variété III comme plante hôte. La combinaison Jijel-Variété III –souche *Mesorhizobium* (quelle que soit son espèce et quel que soit son génotype par rapport aux types d'ADNs examinés), serait probablement avec un très grand intérêt agronomique pour le rendement de pois chiche en Algérie.



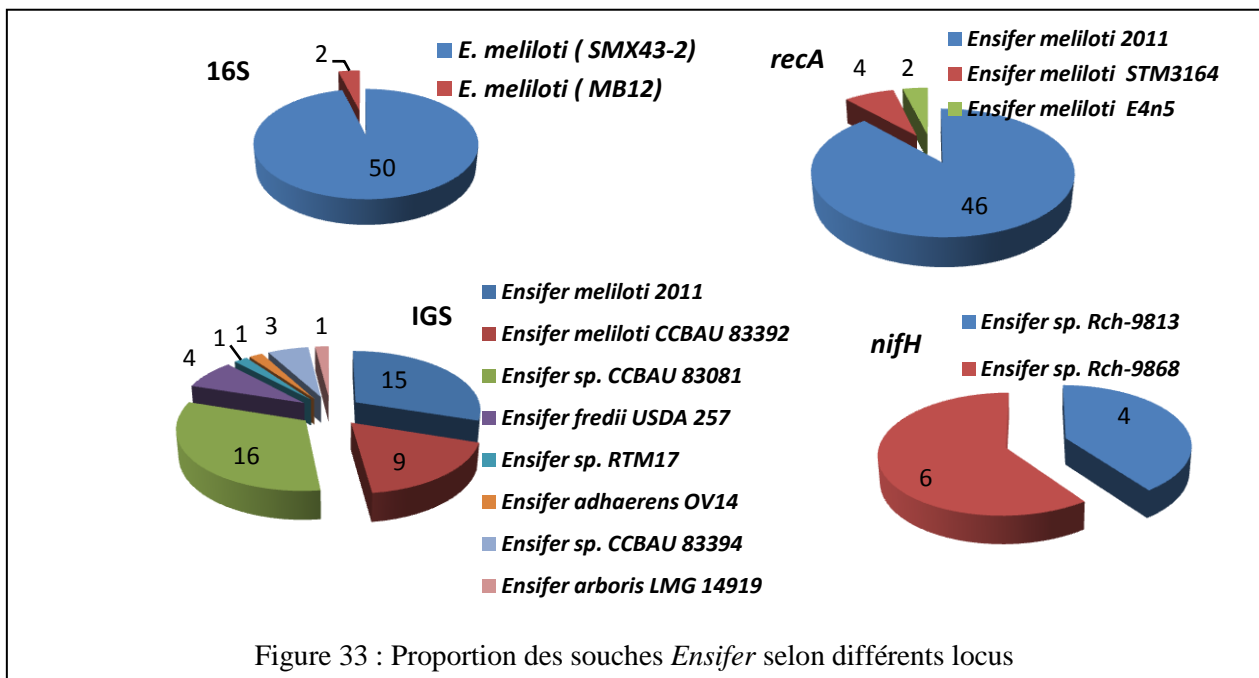
**Chapitre IV : Etude de la  
diversité et de la  
biogéographie des autres  
genres présents dans les  
nodules du pois chiche**

## I-Résultats

### 1-Etude du genre *Ensifer*

#### 1-1- Espèces détectées et fiabilité des ADNs analysés

Au sein du genre *Ensifer*, excepté pour le gène symbiotique *nifH* et quel que soit le locus analysé, la majorité des isolats est affiliée à l'espèce *E. meliloti* (figure 33 et tableau 10 de l'annexe 4).



Selon l'analyse de l'ADNr16S, le plus grand nombre des isolats (50/52), est affilié avec une similitude de 99-100 % à la souche *E.meliloti* SMX43-2 et seulement deux isolats sont affiliés à la souche *E.meliloti* MB12 avec une similitude de 99%.

L'analyse portant sur le locus *recA*, montre que la grande majorité des isolats est affiliée à la souche *Ensifer meliloti* 2011, seulement 4 isolats sont affiliés à *Ensifer meliloti* STM3164 (DS39, DS63, DS24 et DS1) et deux seulement à la souche *Ensifer meliloti* E4n5 (DS37, DS42).

Contrairement aux locus ADNr16S et *recA*, l'analyse par l'IGS montre que les isolats sont bien diversifiés en espèces, ils sont partagés en cinq groupes. Le premier groupe contenant le plus grand nombre d'isolats (24) est celui dont l'espèce *Ensifer meliloti* est présentée par 2

souches type : l'une est *Ensifer meliloti* 2011(15 isolats) et l'autre est *Ensifer meliloti* CCBAU 83392 (9 isolats). Le deuxième groupe contenant 19 isolats est celui contenant des souches *Ensifer sp.* Le troisième groupe ne contient que 4 isolats affiliés à l'espèce *E. fredii*. Chacun des quatrième et cinquième groupes ne contient qu'un isolat, affiliés aux espèces *E. adhaerens* et *E.arboris* respectivement.

La comparaison des séquences du gène *nifH* obtenues à partir de 10 bactéries du genre *Ensifer* avec celles des souches de référence montre que la totalité des isolats est affiliée à deux types de souches non identifiées en espèces (*Ensifer sp. Rch-9813* et *Ensifer sp. Rch-9813*) avec une similitude allant de 91% à 99%, (figure 33 et tableau 10 de l'annexe 4).

L'analyse globale portant sur les quatre fragments d'ADN différents (ADNr 16S, *recA*, IGS et *nifH*), montre que 5 types d'espèces sont mises en évidence dans le genre *Ensifer* (*E. meliloti*, *E. fredii*, *E. adhaerens*, *E. arboris*, *E. meliloti* ), (Tableau 17). Seulement l'espèce *E.meliloti*, est repérée par trois analyses différentes, chacune du reste des espèces n'est mise en évidence que par une analyse unique. En plus de ces espèces, des bactéries *Ensifer sp.* sont présentes, ces dernières pourraient représenter d'autres espèces du genre *Ensifer* (tableau 17).

## 1-2- Génotypes détectés

Le genre *Ensifer* présente 8 génotypes différents de l'ADNr 16S, 6 génotypes sont montrés par la souche *E. meliloti* (SMX43-2) et 2 sont montrés par la souche *E. meliloti* (MB12). Parmi ces derniers, le génotype gE1 de la souche *E. meliloti* (SMX43-2), est le plus dominant (39 isolats). Le génotype gE4 est distribué entre 5 bactéries alors que le génotype gE6 est distribué entre 4 bactéries. Chacun des génotypes gE2, gE3, gE5 de la souche *E. meliloti* (SMX43-2), et chacun des génotypes gE7, gE8 de la souche *E. meliloti* (MB12) n'est représenté que par une seule bactérie (Tableau 17 et Tableau 10 de l'annexe 4).

Le locus *recA* montre trois génotypes dans cette analyse, avec dominance du génotype rE1 qui représente la majorité des isolats. Le génotype rE3 ne représente que 4 isolats (DS63, DS39, DS24 et DS1), alors que le génotype rE2 ne représente que 2 isolats (DS37 et DS42), (Tableau 17 et Tableau 10 de l'annexe 4).

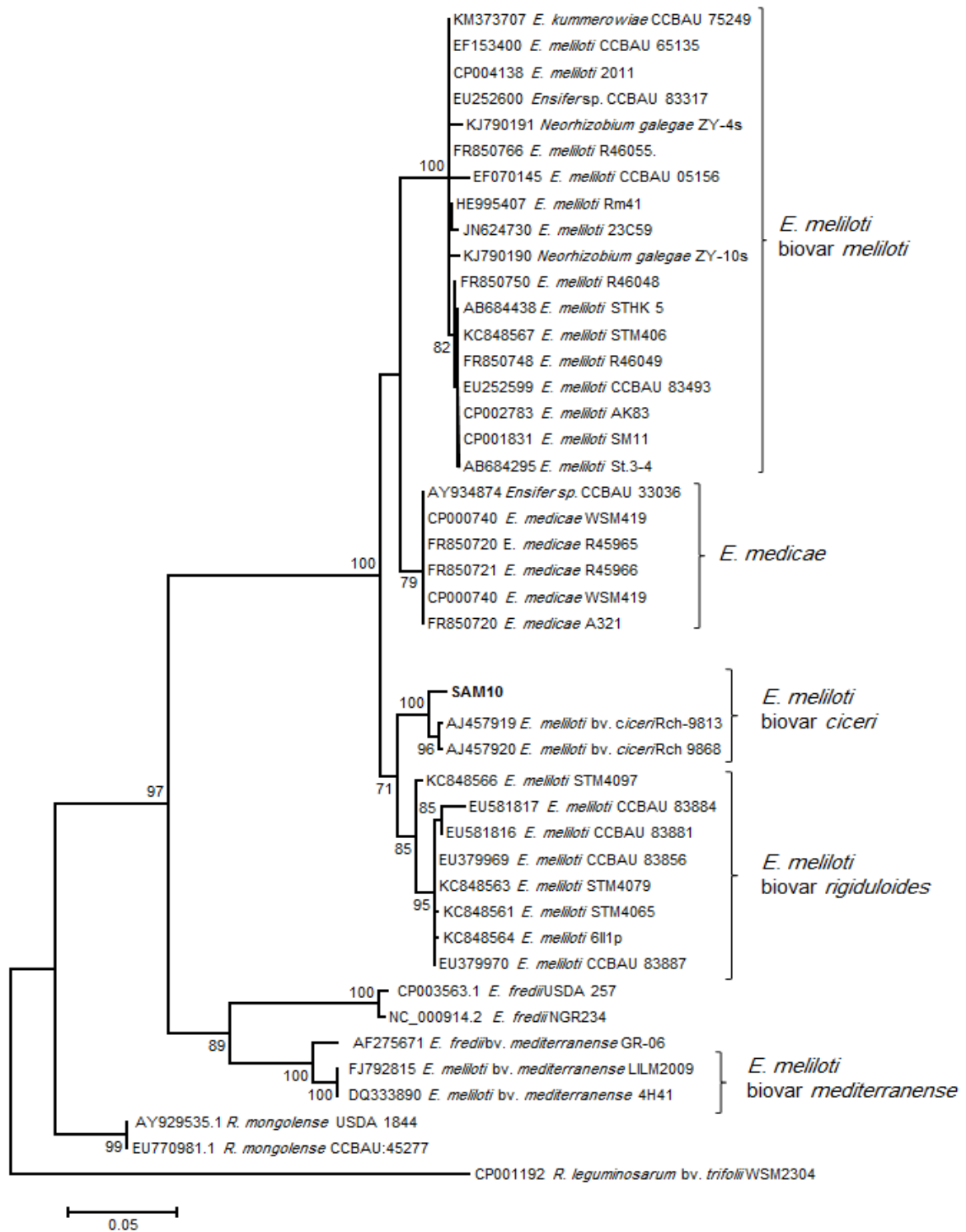


Figure 34 : Phylogénie maximum de vraisemblance des séquences de gènes *nifH* provenant des différentes *Ensifer meliloti* biovars et *E. medicae*. Les nœuds, hautement supportés avec des valeurs de démarrage élevées (> 75%) sont indiqués. La barre d'échelle représente 5% des substitutions de nucléotides.

Tableau 17: Espèces, souches et génotypes du genre *Ensifer* selon les ADNs analysés

Souche	Nombre de souches et nombre de génotypes selon différents locus									
	16S		recA		IGS		nodC		nifH	
	Ni	Ng	Ni	Ng	Ni	Ng	Ni	Ng	Ni	Ng
<i>Ensifer meliloti</i> 2011	/	/	46	1	15	3	/	/	/	/
<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	/	/	/	/	9	1	/	/	/	/
<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	/	/	/	/	16	4	/	/	/	/
<i>Ensifer fredii</i> USDA 257	/	/	/	/	4	2	/	/	/	/
<i>Ensifer sp.</i> RTM17	/	/	/	/	1	1	/	/	/	/
<i>Ensifer adhaerens</i> OV14	/	/	/	/	1	1	/	/	/	/
<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83394	/	/	/	/	3	1	/	/	/	/
<i>Ensifer arboris</i> LMG 14919	/	/	/	/	1	1	/	/	/	/
<i>E. meliloti</i> ( SMX43-2)	50	6	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>E. meliloti</i> ( MB12)	2	2	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Ensifer meliloti</i> STM3164	/	/	4	1	/	/	/	/	/	/
<i>Ensifer meliloti</i> E4n5	/	/	2	1	/	/	/	/	/	/
<i>Ensifer sp.</i> Rch-9813	/	/	/	/	/	/	/	/	4	3
<i>Ensifer sp.</i> Rch-9868	/	/	/	/	/	/	/	/	6	5

Ni :Nombre de souches, Ng : Nombre de génotypes

Le fragment IGS proportionnellement avec sa diversité en espèces, est très diversifié en génotypes. En effet 13 génotypes IGS sont présents, dont 2 sont les plus dominants (iE8, iE9), en représentant chacun 9 bactéries. Pour le *nifH*, 8 génotypes sont présents pour 10 isolats, chacun des génotypes hE3 et hE7 représente 2 bactéries (Tableau 17 et Tableau 10 de l'annexe 4).

### 1-3- Analyse phylogénique du *nifH*

Nous avons reconstruit une phylogénie *nifH* incluant les 10 séquences *nifH* qu'on a pu obtenir dans le genre *Ensifer*. Nous avons inclus dans cette analyse différents biovars déjà décrits chez *Ensifer meliloti* (*E. meliloti biovar meliloti* ; *E. meliloti biovar ciceri* ; *E. meliloti biovar riduloides* ; *E. meliloti biovar mediterrarensis*) et des espèces étroitement liées à *E. medicae* (figure 34). Nous n'avons pas trouvé de séquence *nifH* dans Gen Bank pour *biovar medicaginis*.

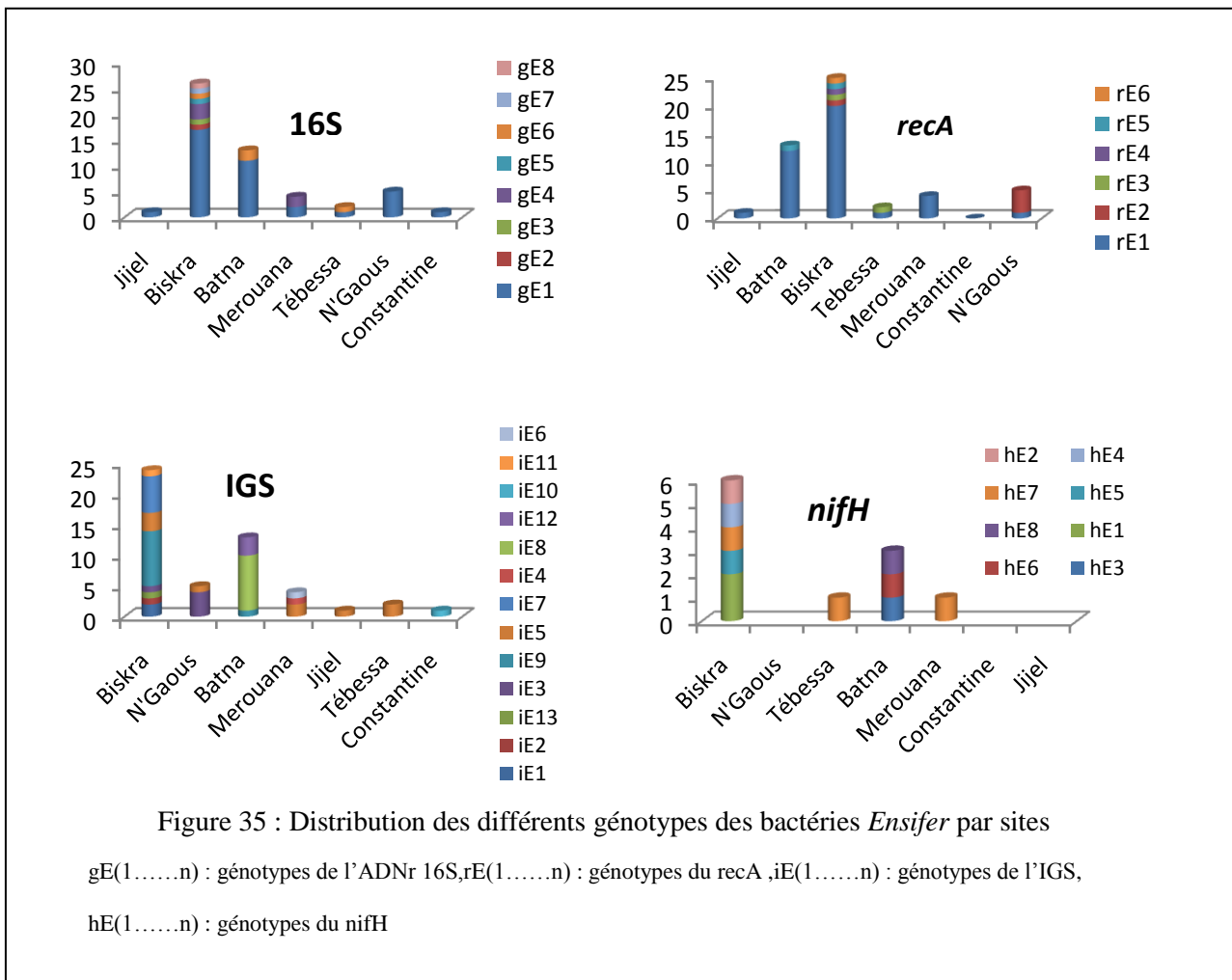
Nos isolats (représentés par l'isolat Sam10) n'ont montré qu'un seul halotype se trouvant dans le même cluster contenant deux souches *E. meliloti* isolées de *Cicer* au Maroc. Ces deux souches ont été déjà identifiées comme un nouvel *biovar*, *E. meliloti* bv. *Ciceri* (figure 34).

### 1-4- Distribution des génotypes des bactéries *Ensifer*

Quelques soient les locus analysés, les génotypes des bactéries *Ensifer* sont distribués différemment selon les sites et selon les variétés.

#### 1-4-1- Distribution par sites

La totalité des 8 génotypes de chacun du locus ADNr16S ; du fragment IGS ; les 6 génotypes *recA* et la majorité des génotypes *nifH* sont présentes dans le site de Biskra (figure 35).



La dominance dans ce site revient aux génotypes gE1 de l'ADNr 16S ; rE1 du *recA* ; iE9 de l'IGS et hE1 du *nifH*. Parmi ces derniers, les génotypes gE1 de l'ADNr 16S et rE1 du *recA* sont distribués sur les 7 sites contenant les bactéries *Ensifer*. Le génotype iE9 de l'IGS est moins distribué que les précédents car il ne se présente que sur trois sites (Biskra, Batna et

Constantine), alors que le génotype hE1 du *nifH* ne se trouve qu'au niveau de Biskra. D'ailleurs, la majorité des génotypes se trouvant dans ce site, ne se trouvent pas dans les autres sites examinés tels que les génotypes gE2, gE3, gE5, gE7 et gE8 de l'ADNr 16S ; les génotypes rE4, re6 du *recA* ; les génotypes iE1, iE2, iE13, iE7, iE11 de l'IGS et les génotypes hE1, hE2, hE4 et HE5 du *nifH*.

Biskra n'est pas le seul site contenant des génotypes qui lui sont spécifiques, par exemple, Batna est le seul site qui présente, les génotypes iE8 et iE12 de l'IGS ; les génotypes hE3, hE6 et hE8 du *nifH* alors que Merouana est le seul site présentant les génotypes iE4 et iE6 de l'IGS portés respectivement par les bactéries *Ensifer meliloti* 2011 et *Ensifer sp. RTM17*, aussi Constantine est le seul site contenant le génotype iE10 de ce même fragment, portée par la souche *Ensifer adhaerens* OV14.

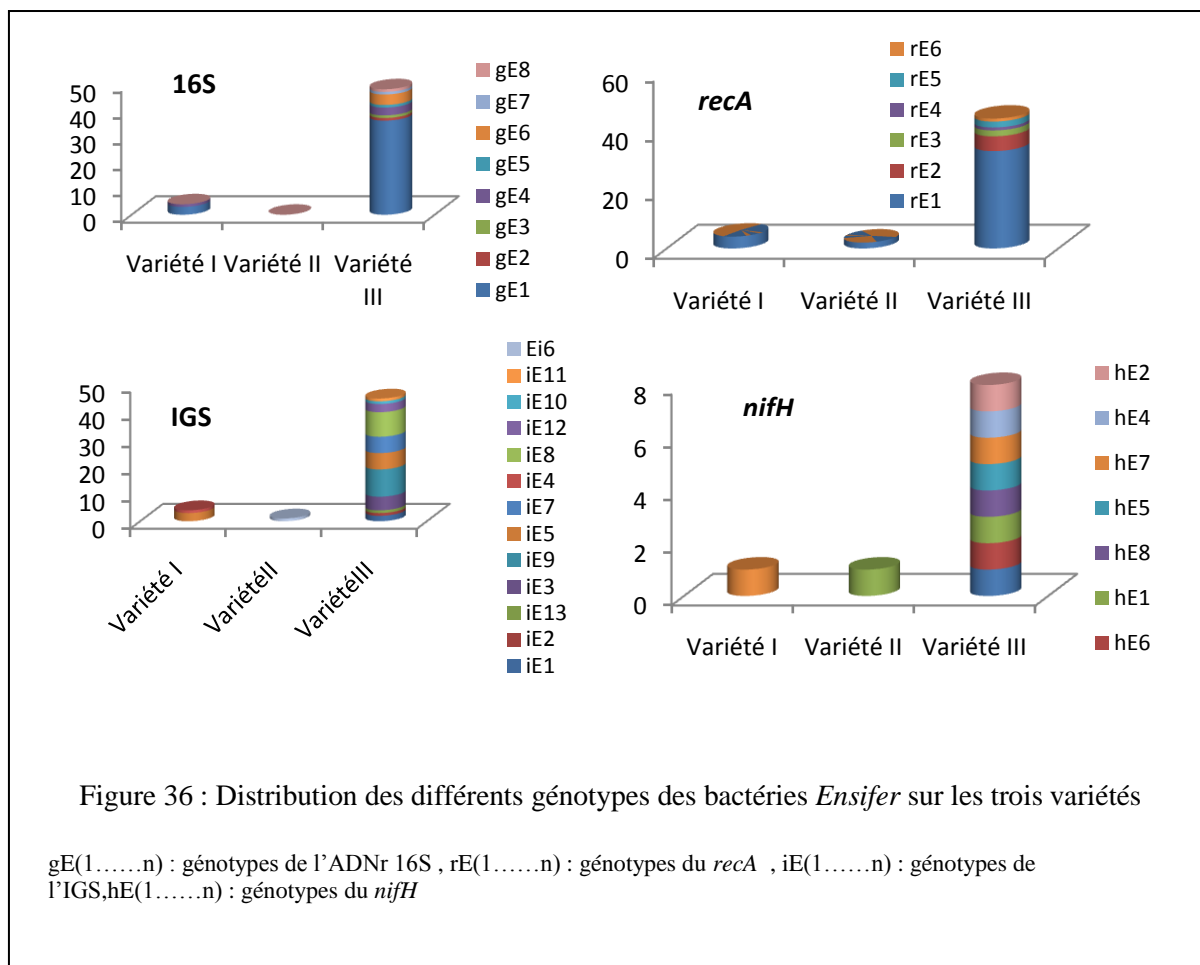
Chacun du reste des génotypes ADNr16S (gE2, gE3, gE5) de la souche *E. meliloti* (SMX43-2) et les génotypes gE7 et gE8 de la souche *E. meliloti* (MB12) n'est présente que sur un site (figure 35).

#### 1-4-2- Distribution par variétés

La variété III est présente avec tous les génotypes ADNr16S, *recA*, IGS et *nifH* du genre *Ensifer*, notamment ceux qui sont dominants (figure 36).

Seulement le génotype dominant rE1 du locus *recA* se trouve partagé entre les trois variétés en se présentant beaucoup plus avec la variété III. Les génotypes gE1 et gE4 du locus ADNr 16S, ainsi que le génotype iE5 de l'IGS et le génotype hE7 du *nifH* se trouvent partagés entre la variété III et la variété I, tandis que le génotype hE1 du même locus se trouve partagé entre la variété III et la variété II.

Pour l'IGS, nous remarquons que le génotype iE4 n'apparaît qu'avec la variété I alors que le génotype iE6 n'apparaît qu'avec la variété II (figure 36).



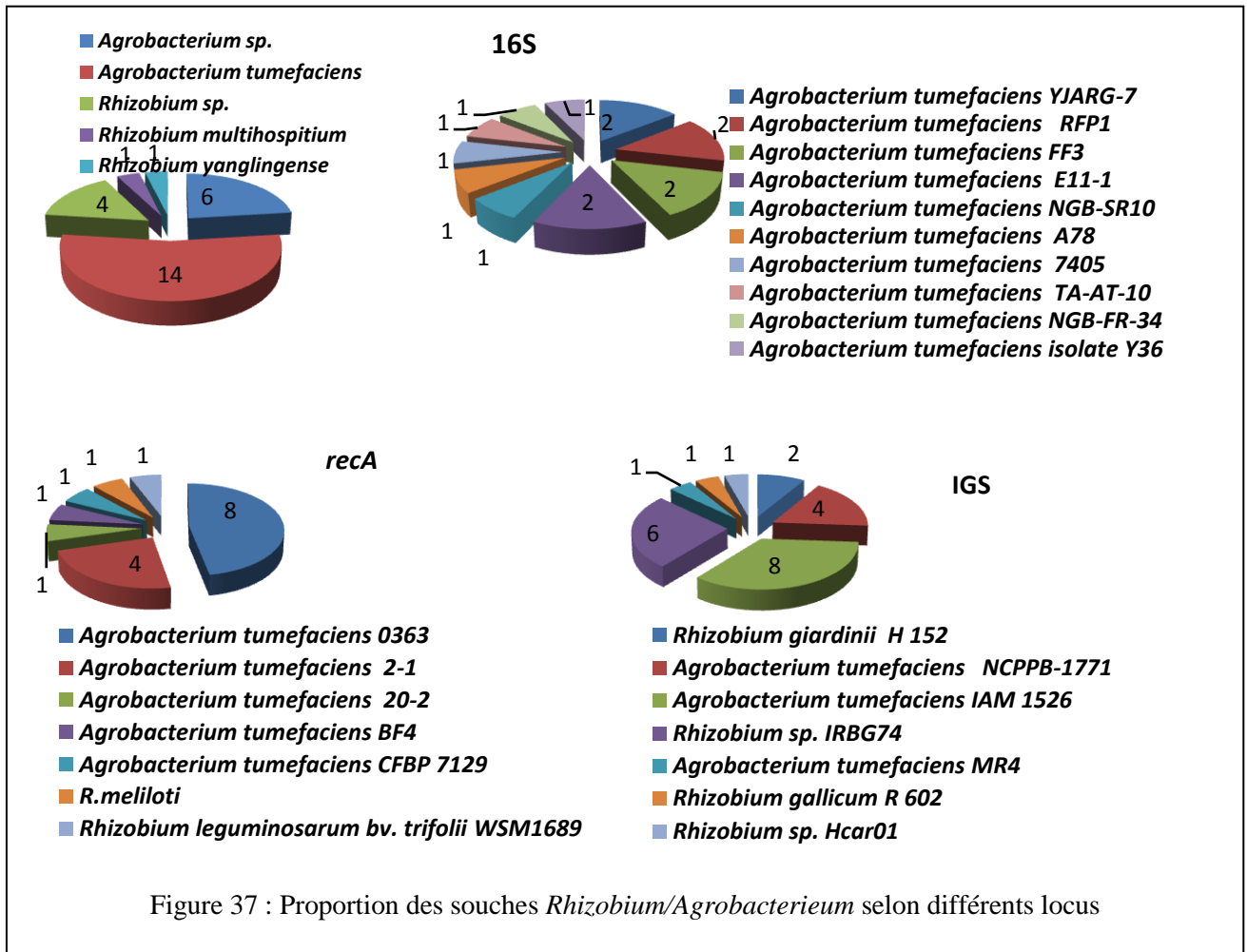
## 2- Etude du genre *Rhizobium/Agrobacterium*

### 2-1-Espèces détectées et fiabilité des ADNs analysés

Parmi 26 bactéries trouvées au sein du groupe *Rhizobium/Agrobacterium*, seulement 6 isolats présentent un ADNr 16S caractéristique du genre *Rhizobium*, le reste des isolats est affilié au genre *Agrobacterium*.

La dominance des bactéries *Agrobacterium* par rapport à celles du genre *Rhizobium* ainsi que la dominance de l'espèce *A. tumefaciens* sont vérifiées par les deux autres analyses (*recA* et IGS), cependant la contribution d'autres différentes espèces est variée selon l'ADN à analyser, que ce soit pour le genre *Agrobacterium* ou bien pour le genre *Rhizobium* (figure 37 et tableau 11 de l'annexe 4).





L'importance dans la diversité en souches pour l'espèce *A. tumefaciens* est mise en évidence par le locus ADNr16S montrant la contribution de 10 souches, suivi par le *recA* qui montre la présence de 5 souches alors que l'analyse l'IGS ne montre la présence que de 3 souches de cette espèce.

Pour le genre *Rhizobium*, malgré que le nombre d'espèce soit idem pour les trois types d'analyse, le type d'espèces contribuant dans ce genre est différent selon l'ADN à analyser.

Contrairement aux deux autres analyses, l'analyse du *recA* est la seule qui a pu affilier la totalité des isolats *Rhizobium/Agrobacterium* à une espèce et à une souche type donnée. Dans cette analyse aucune bactérie *Rhizobium sp.* ou *Agrobacterium sp.* n'a été mise en évidence.

## 2-2- Génotypes détectés

Le résultat global des trois types d'analyse (ADNr16S, *recA* et IGS), montre que 7 espèces sont présentes dans le genre *Rhizobium/Agrobacterium*. En plus de ces 6 espèces d'autres isolats n'ont pas pu être identifiés au niveau de l'espèce, ainsi des souches *Agrobacterium sp.* et *Rhizobium sp.* sont mises en évidence.

L'espèce la plus diversifiée en génotypes est *Agrobacterium tumefaciens* présentant 11 génotypes ADNr16S sur 14 bactéries, 8 génotypes *recA* sur 15 bactéries et 8 génotypes IGS sur 13 bactéries (tableau 18 et tableau 1 de annexe 4).

Tableau 18: Nombre d'isolats et nombre de génotypes dans le genre *Rhizobium/Agrobacterium* selon l'ADN analysé

Souche	16S		<i>recA</i>		IGS	
	Ni	Ng	Ni	Ng	Ni	Ng
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14	11	15	8	13	8
<i>Agrobacterium sp.</i>	6	3	/	/	/	/
<i>Rhizobium giardinii</i>	/	/	/	/	2	2
<i>Rhizobium gallicum</i>	/	/	/	/	1	1
<i>R. meliloti</i>	/	/	1	1	/	/
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	/	/	1	1	/	/
<i>Rhizobium multihospitium</i>	1	1	/	/	/	/
<i>Rhizobium yanglingense</i>	1	1	/	/	/	/
<i>Rhizobium sp.</i>	4	2	/	/	7	4

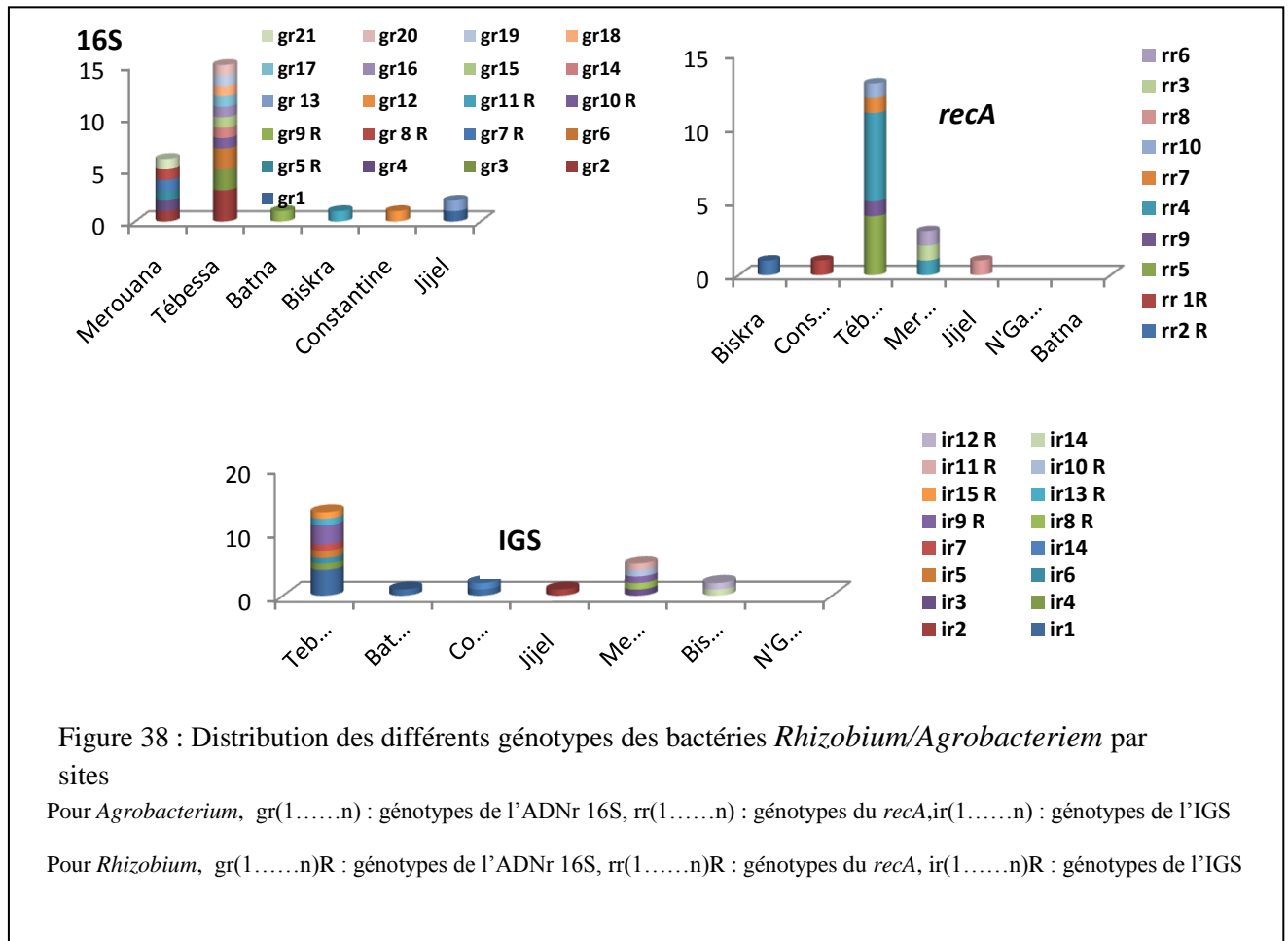
Ni : Nombre de souches, Ng : Nombre de génotypes

## 2-3- Distribution des génotypes des bactéries

### *Rhizobium/Agrobacterium*

#### 2-3-1-Distribution par sites

Au sein du genre *Rhizobium/Agrobacterium*, le site de Tébessa présente la majorité des isolats, 15 bactéries sont présentes dans ce site, parmi lesquelles, 13 se situent dans le groupe *Agrobacterium* et seulement deux isolats sont présents dans le groupe *Rhizobium* (figure 38).



Le site de Merouana prend la deuxième position dans l'apparition des bactéries du genre *Rhizobium/Agrobacteriem*. Ce site contribue par trois bactéries avec trois génotypes différents pour chacun des ADNs analysés.

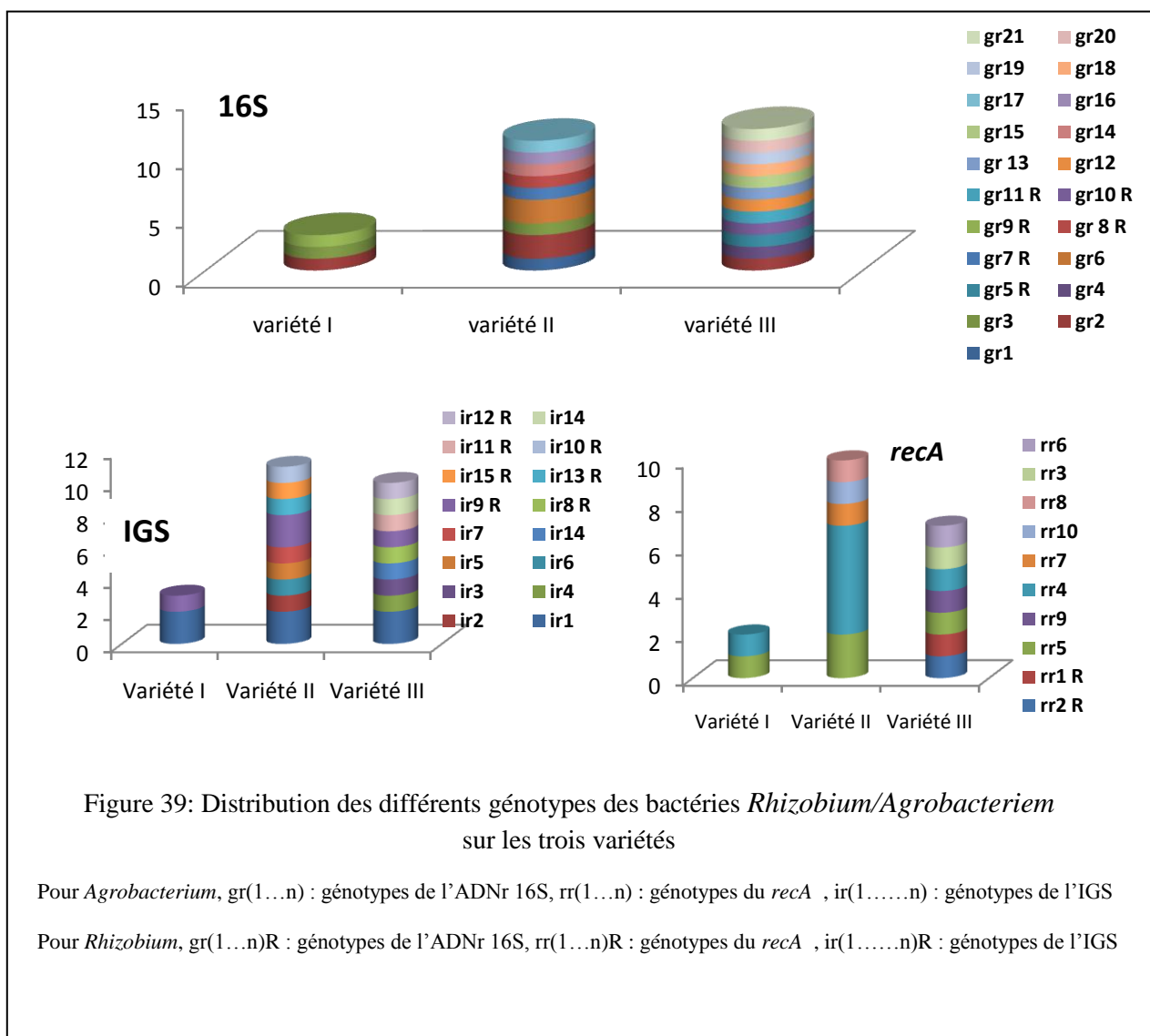
Chacun des sites de Jijel et Constantine ne présente que deux bactéries et chacun des sites de Batna et Biskra ne contribue que par la présence d'une seule bactérie de ce genre, cependant aucune bactérie dont l'origine est N'Gaous n'est présente dans le genre *Rhizobium/Agrobacteriem*.

Tous les génotypes des ADNs analysés sont abondants au niveau du site de Tébessa, notamment gr2 et gr6 de l'ADNr 16S ; rr4 du *recA* ; les génotypes ir1 et ir9R de l'IGS. Le site de Merouana, se trouve le deuxième site après Tébessa le plus diversifié en génotypes de tous les ADNs analysés.

Excepté quelques cas tels que : le génotype gr2 de l'ADNr 16S se trouvant dans les sites de Merouana et Tébessa, le génotype ir1 de l'IGS se trouvant à Batna et à Constantine, le génotype ir9R du même fragment présent à Tébessa et à Merouana, le génotype rr4 du *recA* qui se trouve à Tébessa et à Merouana, chacun des autres génotypes n'est présent que dans un site unique donné.

### 2-3-2-Distribution par variétés

Chacune des analyses portant sur le gène ADNr 16S et *recA*, montre que la variété III est la plus contributive dans la diversité en génotypes de ces deux locus (figure 39).



Cette importance en diversité de génotypes est similaire pour les deux variétés (II et III) par rapport à l'IGS, bien que le plus important nombre en isolat se trouve avec la variété II. Quel

que soit l'ADN analysé, la variété I est la moins contributive pour l'apparition des génotypes.

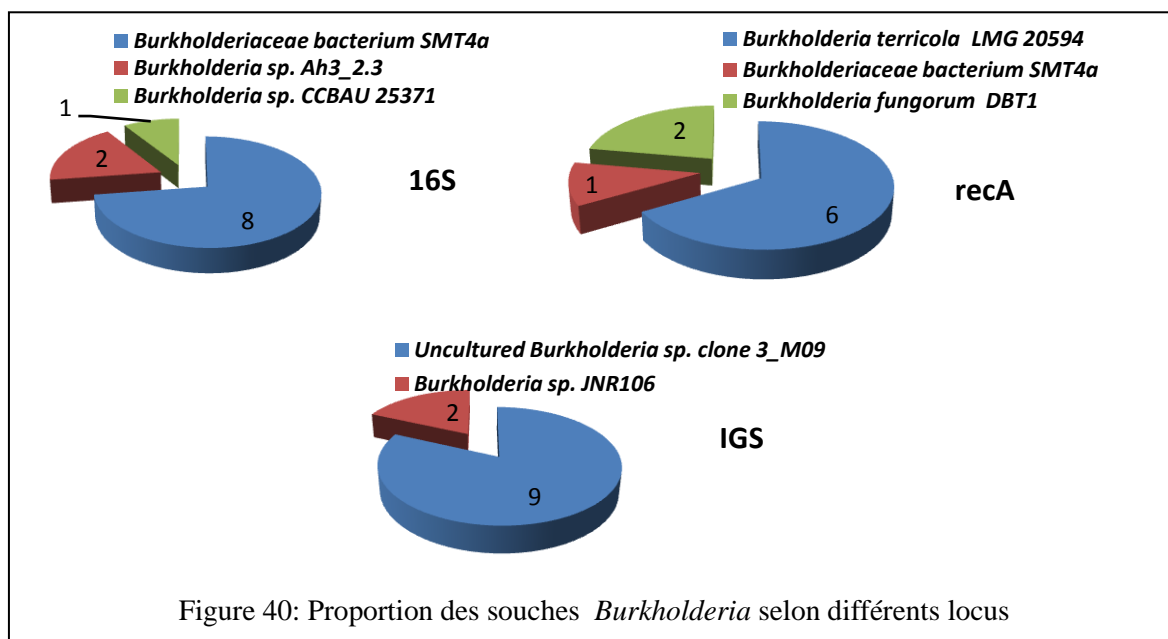
Excepté les génotypes rr4 et rr5 du *recA* (les plus dominants avec la variété II) ; les génotypes ir1 (présent avec les trois variétés avec la même fréquence) et ir9R (plus dominant avec la variété II) de l'IGS ; le génotype gr2 (plus dominants avec la variété II) de l'ADNr 16S, qui sont partagés entre les trois variétés et excepté le génotype gr3 de l'ADNr 16S, partagé entre les variétés I et II d'une façon équivalente, chacun des autres génotypes n'est présent qu'avec une des trois variétés (figure 39).

### 3-Etude du genre *Burkholderia*

#### 3-1-Diversité et fiabilité des ADN analysés

Au sein du genre *Burkholderia* les séquences ADNr 16S des 11 bactéries présentes ont montré que 8 isolats sont à 99% affiliés à la souche *Burkholderia ceebacterium SMT4a* et 2 isolats sont affiliés à des souches *Burkholderia sp.*

L'analyse des neuf séquences *recA* des isolats *Burkholderia* a permis de les partager en trois groupes. Le premier groupe est celui contenant la majorité des isolats et qui sont affiliés à la souche *Burkholderia terricola LMG 20594* avec une similitude de 98% (figure 40 et tableau 12 de l'annexe 4).



Deux isolats sont affiliés à 98% à la souche *Burkholderia fungorum* DBT1 formant le deuxième groupe et le troisième groupe contient seulement une bactérie qui est affiliée à la souche *Burkholderiaceae bacterium* SMT4a avec une similitude de 97%.

L'analyse des séquences du fragment inter génique ADNr 16S-23S des 11 bactéries du genre *Burkholderia* montre que ces bactéries sont regroupées en deux groupes. Le premier groupe contient 9 isolats tous affiliés à la souche *Uncultured Burkholderia sp. clone 3\_M09* avec une similitude située entre 87% et 98%. Le deuxième groupe ne contient que deux isolats affiliés à 91% à la souche *Burkholderia sp. JNR106* (figure 40 et tableau12 de l'annexe 4).

### 3-2-Génotypes détectés

8 génotypes différents de l'ADNr 16S sont présents dans cette analyse parmi les quels 6 sont montrés par la souche *Burkholderia caebacterium*. Les deux autres génotypes correspondent aux deux autres types de bactéries : *Burkholderia sp. Ah3\_2.3* et *Burkholderia sp. CCBAU 25371*.

Quatre génotypes *recA* sont mis en évidence par l'analyse des séquences du gène *recA*. La souche *Burkholderia terricola* LMG 20594 est la seule qui présente deux génotypes différents (rb2 et rb3) avec dominance du génotype rb2. Chacune des autres souches *Burkholderia fungorum* DBT1 (rb1) et *Burkholderia caebacterium* SMT4a (rb4) ne se présente qu'avec un seul génotype, (tableau 19 et tableau12 de l'annexe 4).

Tableau 19 : Souches et nombre de génotypes *Burkholderia* selon les locus

Souche	16S		<i>recA</i>		IGS	
	Ni	Ng	Ni	Ng	Ni	Ng
<i>Burkholderia caebacterium</i> SMT4a	8	6	1	1	/	/
<i>Burkholderia sp. Ah3_2.3</i>	2	1	/	/	/	/
<i>Burkholderia sp. CCBAU 25371</i>	1	1	/	/	/	/
<i>Burkholderia terricola</i> LMG 20594	/	/	6	2	/	/
<i>Burkholderia fungorum</i> DBT1	/	/	2	1	/	/
<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	/	/	/	/	9	7
<i>Burkholderia sp. JNR106</i>	/	/	/	/	2	2

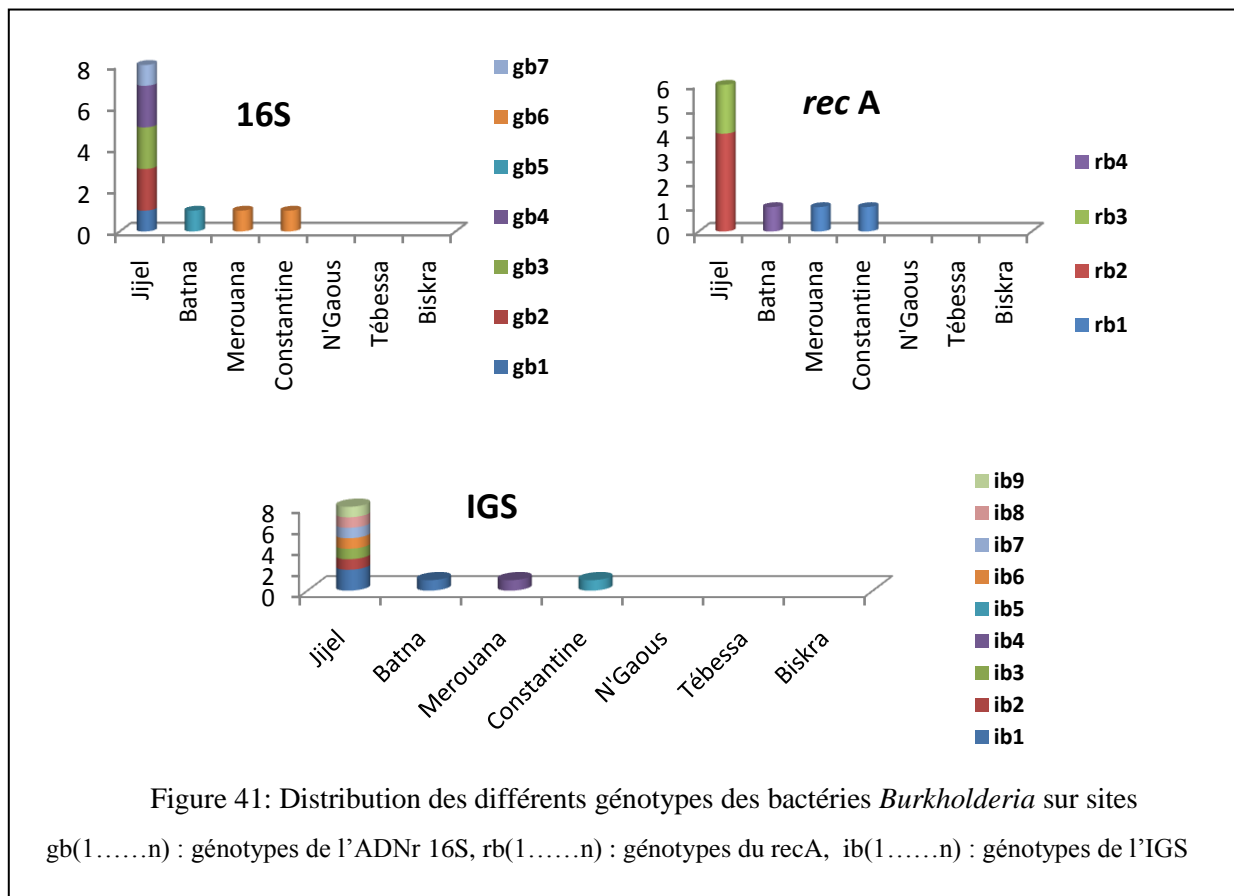
Ni :Nombre de souches, Ng : Nombre de génotypes

Les deux groupes d'isolats montrés par l'analyse des séquences du fragment inter génique ADNr 16S-23S des 11 bactéries *Burkholderia* montrent ensemble un totale de 9 génotypes de l'IGS. Le premier groupe est porteur de 7 différents génotypes dont la dominance revient au génotype *ib1* alors que le deuxième groupe ne contient seulement que deux génotypes, donnés par la souche *Burkholderia sp. JNR106* (tableau 19 et tableau 12 de l'annexe 4).

### 3-3-Distribution des génotypes des bactéries *Burkholderia*

#### 3-3-1-Distribution par sites

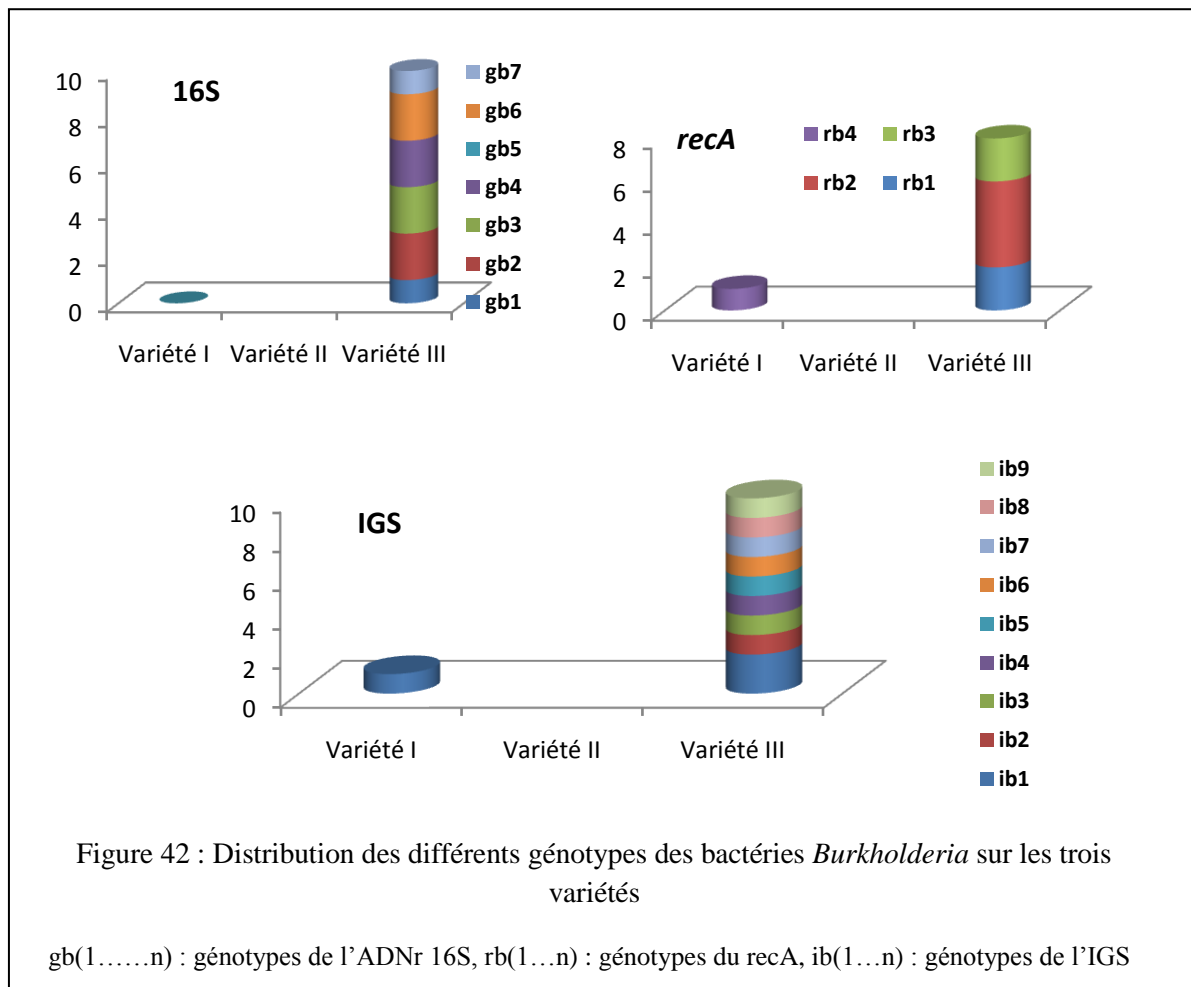
Parmi les 11 bactéries du genre *Burkholderia*, 8 ont le site de Jijel comme origine, les trois autres bactéries présentent des différentes origines (Constantine, Merouana et Batna). Aucune bactérie dont l'origine est le site de N'Gaous, Biskra ou Tébessa n'est trouvée au sein du genre *Burkholderia* (figure 41).



Quel que soit le fragment d'ADN analysé, le site de Jijel est le plus diversifié en génotypes pour les bactéries *Burkholderia* analysées. Ce site présente 5 génotypes différents de l'ADNr 16S, 7 génotypes de l'IGS et 2 génotypes du *recA* (rb2 et rb3) parmi quatre génotypes mis en évidence. Le site de Jijel contient tous les génotypes dominants et ne partage que le génotype ib1 de l'IGS avec Batna. On note qu'à côté du génotype précédent (ib1 de l'IGS), seulement le génotype gb6 de l'ADNr 16S est partagé entre Constantine et Merouana, chacun des autres génotypes ne se trouve que dans un site unique (figure 41).

### 3-3-2-Distribution par variétés

La variété III prend la part majoritaire comme hôte pour les bactéries du genre *Burkholderia*. Selon les locus IGS et ADNr 16S, 10 bactéries parmi 11 sont issus à partir de cette variété et parmi les neufs isolats examinés pour le *recA*, huit ont la variété III comme hôte. La variété I n'est présentée que par une seule bactérie *Burkholderiaceae bacterium SMT4a* alors que la variété II n'est présente pour aucune bactérie *Burkholderia* (figure 42).





Quel que soit l'ADN analysé, la majorité des génotypes sont trouvés avec la variété III. Les seuls génotypes qui apparaissent avec la variété I sont le génotype gb5 de l'ADNr 16S ; rb4 du *recA* et ib1 de l'IGS. Excepté gb1 et gb7, tous les génotypes de l'ADNr 16S apparaissent avec la même fréquence avec la variété III alors que la dominance du génotype rb2 du *recA* et celle du génotype ib1 de l'IGS sont bien claires avec cette variété.

## II – Discussion

- Cas du genre *Ensifer*

L'analyse de l'ADNr 16S et celle du *recA* montrent que la totalité des isolats du genre *Ensifer* a pu être affiliée à une seule espèce *Ensifer meliloti*. Le résultat d'analyse de l'IGS montre que malgré que certains isolats n'ont pas pu être identifiés au niveau de l'espèce d'autres ont pu être affiliés soit à l'espèce dominante *Ensifer meliloti*, soit à d'autres (*E. fredii* ; *E. adhaerens* et *E. arboris*). Ce résultat montre d'une part la fiabilité de l'IGS dans la discrimination des espèces dans ce genre et d'autre part, la grande diversité de ce genre présente dans les nodules du pois chiche et la dominance de l'espèce *Ensifer meliloti*.

*Ensifer fredii* est connue comme microsymbiote du Soja (Chen et al., 1988). Les souches *Ensifer adhaerens* sont des bactéries connues par leur capacité de s'attacher en bout de chaîne à diverses bactéries (Gram-positives et Gram-négatives) vivantes et peuvent provoquer la lyse de ces bactéries. Il est porté aussi que *Phaseolus vulgaris*, *Vigna mungo* et *Macroptilium atropurpureum* peuvent être nodulés par une large gamme de rhizobium (Martínez et al., 1985 ; Michiels et al., 1998 ; Perret et al., 2000), cependant, ils ont constaté qu'une souche *E. adhaerens* (ATCC 33499) ne formait pas de nodules sur ces plantes. Le fait que cette espèce soit nodulaire du pois chiche, connu par son étroit spectre de microsymbiotes est un résultat très intéressant. Ceci pourrait être expliqué par le fait que : soit que cette espèce est rentrée au sein du nodule en s'attachant aux autres microsymbiotes du pois chiche, soit qu'elle a pu acquérir le matériel génétique lui conférant la capacité de nodulation. Cette deuxième hypothèse serait probablement à exclure puisque dans une étude antérieure qui a testé la souche *E. adhaerens* ATCC 33499 pour son pouvoir d'être transformé et induire des nodules avec *R. tropici* CFN299 a prouvé que les transjugants de cette souche ne pouvaient pas noduler le haricot. En effet des mélanges des deux bactéries (*R. tropici* CFN299 et *E. adhaerens* ATCC 33499) dans diverses proportions ont été inoculés sur des racines de semis

de l'haricot, le résultat a montré que *R. tropici* était le seul occupant des nodules d'haricot (Rogel et al., 2001) et donc *E. adhaerens* ATCC 33499 n'a pas pu se transformer en symbiote de cette légumineuse. Ainsi la première hypothèse serait la plus explicatif de la présence de *E. adhaerens* dans le nodule du pois chiche notamment que dans cette étude, cette espèce n'est représentée que par une seule bactérie (DS30).

L'existence du genre *Ensifer* parmi les symbiotes du pois chiche est précédemment signalée par plusieurs études portées sur les symbiotes du pois chiche dans les pays du grand Maghreb, voisins à l'Algérie. Quelques souches d'*Ensifer* sont trouvées au cours d'une prospection sur la totalité du territoire du Maroc (Maatallah et al., 2002). En Tunisie une abondance de 95% en *Ensifer medicae* au Nord, dans des régions à climats humides et subhumides (Aouani et al., 2001) et une abondance de 100% en *E. meliloti* RCR2011 dans les sols qui n'ont jamais été cultivés par le pois chiche et appartenant à des régions arides et sahariennes du même pays (Ben Romdhane et al., 2007). Cette nodulation différentielle du pois chiche par *S. medicae* et *S. meliloti* entre le Nord et le Sud de la Tunisie est étayée par les travaux de Zribi et al., (2004) sur *Medicago truncatula*. Ils ont constaté que *S. medicae* se limitait aux régions semi-arides, sous-humides et littorales supérieures du pays (Nord) où le sol était généralement limoneux, tandis que *S. meliloti* était répandu dans tout le pays (Zribi et al., 2004).

L'une des raisons de la dominance de *S. meliloti* dans cette étude et sa distribution sur différents climats (aride et semi-aride), pourrait être liées à une meilleure adaptation de cette espèce à la sécheresse, au stress osmose et à la température (Dominguez-Ferreras et al., 2009), bien que les isolats de *Mesorhizobium* aient également été récupérés à partir de sols salés (Diouf et al., 2007). Le résultat obtenu dans cette étude concorde avec celui de Ben Romdhane et al., (2007) et celui de Zribi et al., (2004). Les résultats des travaux de Elboutahiri et al., (2010), aussi sont concordants avec les nôtres sur ces points. Ces chercheurs ont mis en évidence une large diversité génotypique et phénotypique des isolats de l'espèce *Ensifer. Meliloti* tolérants aux solutions salines et aux stress hydrique, échantillonnés dans les zones arides et semi-arides du Maroc. Il se pourrait que le climat aride joue un rôle très important dans la présence et la dominance de l'espèce *E. meliloti* dans la nodulation du pois chiche. Sachant que dans cette présente étude, le nombre le plus grand en cette espèce se trouve au niveau de Biskra connue par son climat aride.

L'espèce *Ensifer meliloti* est connue par sa capacité de former une relation symbiotique avec de nombreuses légumineuses. Cette espèce a d'abord été isolée à partir de trois genres apparentés : *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (Jordan, 1984). Plus tard, plusieurs études ont montré que *S. meliloti* peut noduler spontanément de nombreuses plantes légumineuses, dont *Phaseolus vulgaris* (Bromfield et Barran, 1990), *Acacias sp.* (Khbaya et al., 1998 ; Ben Romdhane et al., 2006), *Medicago sativa*, *Melilotus spp* (Yan et al., 2000), *Melilotus officinalis*, *Medicago monspelliaca* (Pandey et al., 2004; Del Villar et al., 2008) et certaines légumineuses sauvages en Tunisie: *Argyrolobium uniflorum*, *Hedysarum carnosum*, *Hippocrepis bicontorta* et *Ononissub sp. Filifolia* (Zakhia et al., 2004). Cette espèce s'est trouvée aussi comme symbiote du Soja (*Glycine max*) (Zhang et al., 2011).

Le genre *Ensifer* et notamment l'espèce *Ensifer meliloti*, en se trouvant avec les microsymbiotes du pois chiche et d'autres légumineuses, a montré sa grande capacité de compétitivité dans l'établissement de la symbiose avec des légumineuses qui ne lui sont pas spécifiques quel que soit l'endroit géologique. Ceci est confirmé par les études antérieures montrant que chez l'espèce *E. 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 et al., 2007).

Malgré que les géotypes des gènes ADN<sub>r</sub>16S, *recA* et IGS sont distribués sur tous les sites prospectés, leur abondance est située au niveau de Biskra et avec la variété III. Une fois de plus la variété III montre sa grande capacité et sa grande disponibilité d'être nodulée, mais cette fois si avec un autre genre, dans un autre site et avec un autre climat. La variété III en agissant ainsi, montre sa tolérance et sa grande compétence à être nodulée au moins dans deux types de climats extrêmes (humide et aride). Il semble que cette variété de pois chiche sélectionne son microsymbiote spécifique en fonction du climat. Dans un climat humide le *Mesorhizobium* est son partenaire alors que dans un climat aride c'est le genre *Ensifer* qui prend la relève. Avec ce comportement la variété III donne un spectre de nodulation plus large que les deux autres variétés même si son symbiote en nodulation est conditionné par le climat.

Dans tous les cas, une combinaison des trois partenaires Biskra-Variété III-*E. meliloti* pourrait être d'une grande valeur dans les applications agronomiques concernant le pois

chiche dans le cas d'exploitation des sols arides en Algérie pour augmenter le rendement en cette légumineuse.

Le nombre des bactéries de l'espèce *E. meliloti* diminue au fur et à mesure qu'on quitte la région aride de Biskra allant vers les régions semi arides et humide du nord. Ces résultats renforcent les hypothèses précédentes concernant la bonne adaptation de l'espèce *M. meliloti* aux conditions aride ou proche de l'aride (Ben Romdhane et al., 2007).

- **Concernant le genre *Rhizobium/Agrobacterium***

Les trois analyses effectuées (ADNr 16S, *recA* et IGS) ont montré que parmi les isolats nodulaires obtenus, 26 sont partagés en deux groupes (*Agrobacterium* et *Rhizobium*). L'abondance est clairement donnée à la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Les espèces *Rhizobium multihospitium* et *Rhizobium yanglingense* sont détectées par l'analyse du gène ADNr16S. Les espèces *R. leguminosarum* et *R. meliloti* sont mises en évidence par l'analyse *recA*. L'analyse de l'IGS a mis en évidence les deux espèces : *R. giardinii* et *R. gallicum*. En plus de ces espèces connues du genre *Rhizobium*, d'autres isolats *Agrobacterium sp* et *Rhizobium sp.* sont trouvés par ces trois analyses et pourraient correspondre à des nouvelles espèces.

*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie qui se développe dans le sol et qui infecte les végétaux en induisant la formation par la plante des tumeurs bénéfiques pour sa croissance. Sachant que la structure d'où l'isolement des bactéries est effectué, correspond bien à des nodules et non à des tumeurs, la présence de cette espèce au niveau des nodules de pois chiche pourrait être expliquée par deux hypothèses.

La première hypothèse s'appuie sur l'acquisition de cette espèce en gènes de nodulation à partir des bactéries rhizobium qui les possèdent, ce qui lui permet l'infection et la formation des nodules. Des études précédentes supportent cette hypothèse, les gènes impliqués dans l'absorption des exsudats de racine de l'haricot ont été localisés sur le plasmide c (qui porte les gènes *nod-nif*) et sur le plasmide a (180 kb) de *R. tropici* CFN299 et ces gènes d'absorption jouent un rôle dans la symbiose (Rosenblueth et al., 1998). On a trouvé que le plasmide b contenait des déterminants symbiotiques qui conféraient un avantage symbiotique à *A. tumefaciens* hébergeant seulement le plasmide c (Martínez et al., 1987). Dans une expérience transfert *in vitro*, ils ont constaté que les plasmides a et b étaient co-transférés de *R. tropici* CFN299 avec le plasmide *nod-nif*, dans *A. tumefaciens* (Martínez et al., 1987). Le

transconjugant de *A. tumefaciens* contenant les trois plasmides a mieux nodulé et fixé plus d'azote que les transconjugants ne contenant que le plasmide c (Martínez et al., 1987). Ainsi il se pourrait que dans notre cas, *A. tumefaciens* a pu acquérir les gènes de nodulation existant chez les bactéries nodulantes du pois chiche. Aussi l'abondance de cette espèce dans le site de Batna, sa faiblesse dans les sites contenant le genre *Ensifer* et son absence dans le site de Jijel riche en *Mesorhizobium* laisse penser à sa faible compétitivité en présence de ces genres. En effet des expériences portant sur la compétition entre *R. tropici* CFN299 et *A. tumefaciens* (hébergeant des plasmides *R. tropici* a, b et c), sur le haricot ont montré que *A. tumefaciens* n'a pas été récupéré à partir des nodules, ce qui indique que ce transconjugant n'était pas aussi compétitif pour la formation de nodules que le type sauvage *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1990).

La deuxième hypothèse justifiant la présence *A. tumefaciens* dans le nodule du pois chiche est que cette espèce serait entrée dans le nodule déjà formé par le symbiote spécifique de cette plante. Les grandes capacités d'infection et d'échanges génétiques de cette bactérie avec les plantes permettent de renforcer ces deux hypothèses.

Les bactéries du genre *Rhizobium* trouvées dans les nodules du pois chiche sont connues être des microsymbiotes spécifiques d'autres légumineuses. Les espèces de *Rhizobium multihospitium* et *Rhizobium yanglingense* sont isolées à partir des plantes légumineuses sauvages trouvées en chine et caractérisées par Han et al., (2008 (a)).

Les autres espèces obtenues, nodulent d'autres légumineuses tout à fait loin du pois chiche. par exemple *R. giardinii* et *R. gallicum* sont trouvés dans les nodules de *Phaseolus vulgaris* (Amarger et al., 1997). L'espèce *R. meliloti* est connue être le microsymbiote de la luzerne (Dénarié et al., 1992 ; Sawada et al., 2003) . L'espèce *R. leguminosarum* est trouvée dans les nodules de la lentille (Essalmani et Lahlou., 2003) et dans ceux de différentes autres légumineuses selon ses biovars. Dans le cas du Pois (*Pisum*) et de Vesce (*Vicia*) c'est *R. leguminosarum biovar viciae* qui est présente. Dans le cas de Trèfle (*Trifolium*), c'est *R. leguminosarum biovar trifolii* qui est le microsymbiot. Pour le cas d'haricot (*Phaseolus*) c'est *R. leguminosarum biovar phaseoli* qui est présent (Dénarié et al., 1992 ; Sawada et al., 2003).

Certaines souches du rhizobium synthétisent et excrètent dans leur environnement des substances défavorables ou toxiques pour d'autres rhizobiums. Par exemple 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). Il se pourrait que d'autres espèces du même genre, les souches du *Mesorhizobium* et les souches d'autres genres sont sensibles à certains de ces composés ce qui pourrait expliquer la présence de la souche *R. leguminosarum* ou autre souche du genre *Rhizobium* parmi les microsymbiotes du pois chiche.

Le grand nombre en génotypes des ADNs analysés prouve l'importante diversité trouvée dans ce genre. En plus de cette diversité, l'analyse des différents fragments d'ADN utilisés, montre une certaine spécificité de génotypes par rapport à certains sites et par rapport aux trois variétés au niveau du genre *Rhizobium/Agrobacterium*. Par exemple l'analyse du fragment ADNr 16S-23S a permis de montrer que seulement un génotype IGS est commun entre trois sites (Batna, Tébessa et Constantine), chacun du reste des autres génotypes ne se trouve que sur un site donné. La variété III se trouve spécifique pour l'expression de 6 génotypes ADNr 16S-23S et la variété II se trouve spécifique pour l'expression de 7 génotypes de ce fragment d'ADN. Ce partage de génotypes entre ces deux variétés est d'une grande importance dans la culture et le rendement du pois chiche. Dans tous les cas, pour la totalité des analyses, la dominance de l'espèce *A.tumefaciens* dans le site de Tébessa est clairement apparue par rapport aux autres sites. Ces résultats permettent de qualifier la combinaison *A.tumefaciens-Variété II- Tébessa* parmi les meilleures combinaisons pour l'amélioration de la culture et du rendement en pois chiche dans l'Est Algérien.

- **Concernant *Burkholderia***

La présence de bactéries apparentées au genre *Burkholderia* est un résultat très intéressant car dans la littérature, aucune association *Cicer-arietinum-Burkholderia* n'a été citée jusqu'à ce jour. Le genre bactérien *Burkholderia* est bien connu pour ses membres pathogènes humains, animaux et végétaux, toutefois, il contient également des espèces et des souches qui sont bénéfiques pour les plantes et peuvent être potentiellement exploitées dans les processus biotechnologiques (Moulin et al., 2001 ; Gyaneshwar et al., 2011 ; Suárez-Moreno et al., 2012). Les bêta-rhizobias appartenant à ce genre sont des symbiotes de légumineuses retrouvées principalement associés au genre *Mimosa* (Moulin, 2001).

Dans cette étude l'analyse du gène ADNr16S a montré la dominance de l'espèce *Burkholderiaceae bacterium SMT4a*. L'analyse du gène *recA* a détecté trois espèces : *Burkholderia terricola*, *Burkholderia fungorum* et *Burkholderiaceae bacterium*, avec une

dominance de l'espèce *Burkholderia terricola*, cependant aucune espèce de *Burkholderia* n'est détectée par l'IGS. En plus de la diversité trouvée, ce résultat témoigne la fiabilité du gène *recA* dans l'analyse du genre *Burkholderia* et la faiblesse de l'IGS à discriminer les espèces au sein de ce genre.

Les différents génotypes des ADN analysés dans le genre *Burkholderia* sont dominants dans le site de Jijel avec la variété III. Ceci montre une autre fois le rôle de cette variété dans son adaptation à ce site et aux différents types de génotypes des rhizobiums trouvés au sein de ce genre. Ce résultat permettrait d'ajouter la combinaison « Jijel-variété III – *Burkholderia* » aux combinaisons précédentes, estimées être fiables dans la culture et la nodulation du pois chiche ainsi que dans son rendement.

### III- Conclusion

Une importante diversité au sein des trois autres genres de rhizobium existant dans les nodules du pois chiche est détectée par analyse des séquences ADNr 16S, *recA* et IGS. La fiabilité de chacun des ADN utilisés dans la mise en évidence des espèces et des souches est dépendante du genre considéré. Pour le cas des genres *Ensifer* et *Rhizobium/Agrobacterium* c'est l'IGS qui a pu mettre en évidence le plus grand nombre d'espèces et le plus grand nombre en génotypes. Le cas du genre *Burkholderia* est semblable à celui du *Mesorhizobium*, puisque c'est le gène *recA* qui semble être le plus déterminant en espèces et en génotypes.

Pris ensemble, c'est l'espèce *E. Melliloti* qui se trouve le symbiote le plus dominant par rapport aux autres espèces présentes dans les nodules quel que soit le genre considéré. Celle-ci est plus présente au niveau de Biskra et avec la variété III. Dans le genre *Rhizobium/Agrobacterium*, l'espèce dominante *A.tumefaciens* est plus présente dans le site de Tébessa et avec la variété II. Dans le cas du genre *Burkholderia*, les bactéries ne sont présentes avec importance que sur le site de Jijel avec la variété III.

La capacité de nodulation des trois genres : *Ensifer*, *Rhizobium/Agrobacterium* et *Burkholderia* serait expliquée par une acquisition du matériel symbiotique spécifique du pois chiche à partir des bactéries du *Mesorhizobium* spécifiées pour cette nodulation.

# **Discussion générale, conclusion et perspectives**



La demande pour une utilisation plus efficace de l'azote fixé biologiquement comme une alternative aux engrais azotés chimiques pour les systèmes agricoles a stimulé l'augmentation du nombre d'études sur la diversité des rhizobiums et sur la tolérance aux stress environnementaux. Ainsi, la présence dans le sol d'une grande diversité de bactéries rhizobium autochtones capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote efficaces représente une opportunité pour optimiser la production des légumineuses et un facteur de développement d'une agriculture biologique.

Parmi les buts soulignés par l'état Algérien, est celui qui vise à l'augmentation de la production du pois chiche en élargissant les superficies de culture et en profitant de nouvelles surfaces du pays. Sans doute, pour atteindre cet objectif, des essais d'inoculation de certains sols avec des rhizobias spécifiques à haute performance symbiotique peuvent être entre autres entrepris.

Le pois chiche une légumineuse qui a été souvent considérée comme une hôte à gamme étroite en symbiotes (Broughton et Perret, 1999), néanmoins des études récentes ont montré que le pois chiche est capable d'établir des symbioses avec plusieurs espèces de *Mesorhizobium*. En effet, les espèces :*M. amorphae*, *M. loti*, *M. huakuii*, *M. opportunistum*, *M. muleiense* et *M. tianshanense*, ont été signalées former des nodules fonctionnels sur les racines de pois chiches. Il faut noter que dans la majorité des cas, ces différents symbiotes portent des gènes de symbiose (*nodC* et *nifH*) identiques à ceux portés par *M. Ciceri* et *M. mediterraneum* (Laranjo et al., 2004; Rivas et al., 2007; Laranjo et al., 2008; Alexandre et al., 2009; Laranjo et al., 2012; Zhang et al., 2012(a)).

Dans cette étude, nos objectifs étaient d'examiner la diversité et la biogéographie des rhizobiums qui nodulent le pois chiche dans le territoire Algérien. Ce dernier est connu par son un espace très immense prenant ainsi beaucoup de temps et d'efforts pour être prospecté dans une seule étude. Par conséquent une simple partie de ce territoire serait sans doute suffisante pour l'examen de la diversité rhizobiums, c'est ainsi qu'on a considéré l'Est algérien comme un cas d'étude. En même temps afin d'élargir le champ d'examen de cette diversité, l'impact du génotype de la plante hôte s'est avéré nécessaire. Suite à ces données, l'estimation des couples symbiotiques (variété-rhizobium) performants pour une bonne nodulation de pois chiche dans certains sites algériens est devenue alors un autre objectif souligné dans cette étude.

Ainsi nous avons décidé de faire une collection des rhizobiums qui nodulent cette légumineuse dans certains régions de l'Est, puis d'établir leurs géotypes et leur diversité géographique. Dans ce cadre, trois variétés de pois chiche d'hiver de type kabuli sont semés dans des échantillons de sol qui n'ont jamais été cultivés et qui appartiennent à 9 sites de l'Est Algérien. Ces derniers représentent différentes zones climatiques allant du climat humide, semi-aride à aride.

En considérant que le sol comme le troisième partenaire de la symbiose rhizobium-légumineuse, il devient nécessaire de caractériser ce partenaire autant qu'on le fasse pour le microsymbiote et sa plante hôte. Dans ce contexte et toute en se basant sur l'hypothèse de Mérelle (1998), la détermination de certains paramètres des différents sols est alors réalisée. Ces paramètres sont choisis en fonction de leur importance dans la symbiose et selon la disponibilité des moyens d'analyse. Comme analyse physico-chimique, nous avons opté pour une étude granulométrique, une mesure de pH dans l'eau, une détermination de la teneur en carbone totale et en azote totale suivie par le calcul du rapport C/N. Comme analyse microbiologique nous avons calculé le nombre le plus probable (NPP) de rhizobium nodulant le pois chiche dans chacun des sites prospectés.

Si les caractéristiques physico-chimiques des sols sont relativement stables dans le temps, il n'en est pas forcément de même pour les propriétés biologiques, qui peuvent montrer des fluctuations saisonnières (Billes et *al.*, 1975). Ainsi au cours de cette étude, pour éviter au maximum des perturbations liées aux facteurs abiotiques tels que le gel et la sécheresse, les prélèvements des échantillons de sol pour tous les sites ont été effectués après l'hiver (Mars, 2012). L'échantillonnage dans notre étude a obéi aux recommandations de Chaussod et *al.*, (1986) qui rapportent que les études d'ordre biologique ne peuvent être réalisées en toute rigueur que sur des sols en place ou bien fraîchement prélevés. Ainsi, selon les tests ciblés, aussitôt après le prélèvement, une part des échantillons a été rapidement stockée à 4°C jusqu'à utilisation et une autre a été mise à sécher.

- **Les sols prospectés possèdent différents caractères**

Les différentes classes de sols obtenues selon les caractères physicochimiques (acidité, carbone, azote et décomposition de la matière organique), reflètent la diversité des sols existant en Est Algérien et constituent alors un outil d'exploitation pour réussir différents cultures d'aspect agronomique et dont le pays en a besoin. D'une autre part cette variabilité

des sols renforce notre certitude sur le bon choix des sites sur lesquelles sont basés les objectifs soulignés dans cette thèse. Sachant que plus les sols sont différents, plus la chance de trouver une diversité bactérienne importante serait augmentée, par conséquent la diversité des rhizobiums serait probablement augmentée aussi. En effet si nous savons que dans un gramme de sol se trouve plus de 4000 espèces bactériennes et plus de 2000 champignons (Torsvick *et al.*, 1994 ; Hawksworth, 2001 ; Schaefer et Schauer mann, 1990), alors que pouvons conclure sur la diversité microbienne s'il s'agissait de plusieurs classes de sols détectées dans ce travail et que pouvons-nous conclure sur la diversité attendue en rhizobium en examinant ces sites ? Ces résultats nous paraissaient très prometteuses pour la diversité recherchée.

Ensemble, les caractères physicochimiques et microbiologiques des neuf sols qu'on a pu déterminer dans ce travail ainsi que leurs différents climats permettent d'avoir une idée sur leur capacité ou non de pouvoir assurer une culture des pois chiche et par conséquent avoir une idée sur ceux qui nécessitent une inoculation.

La capacité d'assurer la culture de pois chiche, paraît être négligeable sur deux sites parmi neuf (Hassi et Still). Les sols de ces sites sont pauvres en carbone, en azote, très sableux et leur densité en rhizobias est presque nulle. Le reste des sites, semble avoir une disponibilité variable pour leur culture en pois chiche, même si certains d'entre eux nécessitent probablement une inoculation. En effet selon, Thies *et al.*, (1991) et selon Brochwell *et al.*, (1995), dans les sols où les rhizobias sont déjà fortement présents (plus de  $10^3$  bactéries/g de sol), l'inoculation est souvent sans succès par compétition avec les souches autochtones. Par contre, quand la taille de la population des rhizobiums autochtones spécifiques à une légumineuse précise est faible (moins de 50 bactéries par gramme de sol), l'introduction de nouvelles souches doit être suggérée. Ainsi en plus des cas des sols de Hassi ( $0,0315 \cdot 10^3$ ) et Still ( $0,176 \cdot 10^3$ ), une inoculation serait suggérée pour les sols de Batna ( $0,592 \cdot 10^3$ ), Merouana ( $0,184 \cdot 10^3$ ) et N'Gaous ( $0,0598 \cdot 10^3$ ).

- **Des bactéries non rhizobiums se trouvent dans les nodules du pois chiche**

Cette présente étude n'est pas la première à déclarer la présence des bactéries non rhizobium dans les nodules de certaines légumineuses, ce résultat a été souvent cité (Elvera- Recuenco *et al.*, (2000) ; Tokala *et al.*, (2002) ; Benhizia *et al.*, (2004) et Muresu *et al.*, (2008). Ce qui est unique à notre étude est le rôle majoritaire de la variété III dans la sélection des microsymbiotes rhizobiums par rapport aux non rhizobiums. En comparant avec les deux autres variétés, la III semble donner plus de chance aux rhizobiums qu'aux non rhizobiums

pour leur présence dans le nodule. Sachant que les exsudats de la plante hôte, rend la rhizosphère plus spécifique et favorable à ses partenaires symbiotiques (Sharma *et al.*, 2004), il est probable que cette spécificité entre la variété III et les rhizobiums serait liée aux types d'exsudats racinaires de cette variété, qui feraient un signal beaucoup plus compris par les rhizobiums que celui donné par les deux autres variétés (Limpens et Bisseling, 2003). Les exsudats de ces dernières (notamment la variété II), faciliteraient probablement la tâche aux non rhizobiums pour être présents dans leurs nodules contrairement à la variété III.

Quel que soit le type de langage entre chacune des variétés et les non rhizobiums, la présence de ce type de bactérie dans les nodules du pois chiche est un grand point d'interrogation. Par ailleurs, d'autres travaux devraient être lancés pour comprendre les mécanismes qui leur aient donné la chance d'être présents dans les nodules avec les rhizobiums. Les tests de nodulations portés sur le genre *Rahnella* sont en cours comme initiation pour répondre à des telles questions. Il est à noter que notre étude est la première avoir déclaré la présence de ce genre dans le nodule de pois chiche.

- **Le pois chiche est-il une hôte prometteuse ou restrictive pour la nodulation ?**

Avec la présence de quatre genres différents dans ses nodules et chacun d'eux est diversifié en espèces et souches différentes, nous pourrions considérer que *C. arietinum* est un hôte prometteuse à large spectre pour les microsymbiotes, cependant avant de prendre une telle conclusion, la présence du matériel symbiotique au sein de ces quatre genres devait être vérifié même si le test de nodulation était positif pour la majorité des isolats testés. Nous n'oublions pas qu'excepté le genre *Mesorhizobium* pour lequel nous avons obtenu presque la totalité des séquences des gènes symbiotiques (*nodC* et *nifH*), nous n'avons pas pu amplifier les gènes *nodC* pour la totalité des trois autres genres et que nous n'avons pu amplifier que 10 séquences *nifH* du genre *Ensifer*.

Si nous confrontons le taux élevé de nodulation à l'échec d'amplification des gènes de nodulation pour les trois autres genres (autre que le *Mesorhizobium*), nous pourrions penser à deux types d'hypothèses pour expliquer cette situation : La première hypothèse s'appuie sur l'absence de ces gènes chez les isolats de ces genres et dans ce cas leur nodulation détectée dans le test de nodulation, serait le résultat d'une contamination par une souche *Mesorhizobium* malgré la purification répétée sur boîtes. Cette hypothèse ne semble pas être

probable et peut être rejetée car tous ces trois genres ont été décrits précédemment comme contenant des espèces symbiotiques (Lindström et al., 2015), nous n'oublions pas que l'absence de gènes de nodulations pourrait être soit d'origine soit obtenue suite à une perte au cours de la culture des bactéries concernées.

La deuxième hypothèse est que ces trois genres pourraient posséder leurs gènes symbiotiques même si on n'est pas arrivé à les amplifier. L'échec de leur amplification devient alors un problème dont la cause est à discuter. Généralement l'échec d'amplification d'ADN est lié à la mauvaise qualité ou quantité d'ADN, mais ce n'est pas notre cas. Par exemple pour le genre *Ensifer*, tous les isolats ont été amplifiés et séquencés pour l'ADNr16S et *recA*. L'ADN étant de bonne qualité pour l'amplification par PCR, il n'est donc pas clair pourquoi nous pourrions seulement amplifier quelques souches pour *nifH* et aucune pour *nodC*. Les mutations dans une séquence d'amorces peuvent aussi entraîner une défaillance d'amplification, mais il se pourrait que l'échec de leur amplification revient au fait que les couples amorces que nous avons utilisé n'étaient pas spécifiques à ces locus. En effet le genre *Burkholderia* et éventuellement d'autres genres, peuvent-être trop divergents pour nos amorces spécifiques à amplifier les locis symbiotiques. Des études antérieures ont montré que les gènes symbiotiques échantillonnées à partir de *Burkholderia* étaient assez divergentes par rapport aux gènes symbiotiques des alphaproteobacterias (Chen et al., 2003). Ben Romdhane et al., (2007), en Tunisie ont isolé dans les climats arides et sahariens à partir du pois chiche des *Ensifer meliloti biovar medicaginis* qui sont inefficients. Ce biovar présentait des divergents gènes de nodulation, (Villegas et al., 2006), ce qui pourrait également expliquer pourquoi nous ne pouvions pas amplifier son gène *nodC*, sachant qu'on a obtenu le même biovar *Ensifer* dans notre échantillonnage. D'autre part, deux séquences *nodC* disponibles de *E. meliloti* *Ciceri* (souches Rch 9868 et Rch 9813) sont très similaires à celles obtenues à partir des souches de *Mesorhizobium*, laissant ouverte la question de la divergence des gènes de nodulation des isolats *Ensifer* nodulant le pois chiche.

En tenant compte du fait que les bactéries du genre *Mesorhizobium* formant cette importante diversité portent des gènes *nodC* et *nifH* presque identiques à seulement ceux de trois espèces dont deux sont connues comme spécifiques pour le pois chiche (*M.Ciceri* et *M.mediterraneum*), on peut conclure que le pois chiche est un hôte restrictive pour la nodulation, comme suggéré par Broughton et Perret, (1999) au moins dans le genre *Mesorhizobium*.

Les isolats des autres genres trouvés dans cette étude pourraient avoir des gènes symbiotiques dont l'origine est la même que celle trouvée pour le *Mesorhizobium* ce qui pourrait confirmer la restrictivité du pois chiche. D'autre part ces isolats pourraient avoir d'autres espèces comme origines de gènes symbiotiques et dans ce cas nous pourrions envisager un spectre plus large pour la restrictivité du pois chiche en vers la nodulation. Cet envisagement nécessite la vérification de la nodulation des bactéries des quatre différents genres obtenus ainsi que la complémentation d'analyse de gènes symbiotiques pour les genres avec lesquels on a obtenu un échec d'amplification dans cette étude et ainsi voir si vraiment ils contiennent les gènes de nodulation. Les résultats concernant ce point doivent être approfondis pour voir encore, si cette association aboutit à une fixation efficiente de l'azote. Il est possible que ces bactéries non connues être spécifiques pour le pois chiche, aient acquis des gènes de nodulation (Martens et al., 2008) mais que leur symbiose se traduit juste par la formation de nodules inefficients. Ce cas est déclaré par l'étude portant sur *Ensifer meliloti biovar medicaginis* qui donnait des nodules inefficients sur le pois chiche (Ben Romdhane et al., 2007).

La mise en évidence de la possession de gènes de nodulation ainsi que la capacité de nodulation des bactéries, permettrait de confirmer l'hypothèse du transfert latéral du matériel symbiotique (Rivas et al., 2007; Laranjo et al., 2008), qui pourrait se faire entre les souches du même genre ou entre des genres différents. Les travaux sont en cours pour résoudre ces incertitudes en particulier pour le cas des bêta proteobacterias.

Dans tous les cas, plus d'un tiers des 32 espèces *Mesorhizobium* décrites a été rapporté comme nodulant *Cicer*. Une telle promiscuité d'un genre bactérien unique, dans le même genre de plante, et surtout au sein de la seule espèce *Cicer arietinum* n'a jamais été rapportée dans d'autres espèces de légumineuses, même celles qui se présentent dans le même clade *Vicoid*, comme *Medicago*, *Lens* ou *Pisum*.

Il faut noter que la diversité existante dans les sols peut être plus importante que celle que nous avons trouvée par la méthode piégeage-isolement.

- **La réussite du piégeage est non corrélé avec les variétés et les sites cependant les quatre genres nodulant le pois chiche seraient probablement structurés géographiquement**

En écartons les cas des sites de Hassi et Still, qui ont réagi faiblement au piégeage, nous pouvons dire que, le choix du sol et de la variété ainsi que la combinaison de ces deux paramètres, semblent être cruciale pour l'obtention de plantes, de nodules et même pour la détection et la récupération des bactéries nodulaires dans le cas de pois chiche. En effet notre étude montre que même si sa coopération semble être bien meilleur avec les sols de Biskra et Jijel, la variété III a donné avec tous les sols le plus grand nombre de plantes, de nodules et de rhizobias isolés. La variété II ne semble bien coopérer qu'avec le sol de Tébessa.

La distribution déséquilibrée de plantes, nodules obtenues et rhizobiums isolés justifiée par effet variété, effet sol et effet interaction entre les deux, ne pourrait être que des hypothèses surtout que la comparaison des résultats par rapport aux plantes obtenues est réalisée dans cette étude sur le nombre de plante et non pas sur les paramètres de croissance de la plante. Sachant qu'on a eu des germinations mortes, on pourrait lier la distribution du nombre de plantes non pas à un effet de site ou de variété mais plutôt à un effet aléatoire des germinations qui meurent. De plus nous n'avons pas pu détecter de corrélation entre les paramètres du sol et le nombre moyen de nodules ainsi que le nombre de rhizobiums calculé (NPP) et le nombre de rhizobiums isolés. Par exemple, le site aride de Biskra a entraîné un nombre élevé de plantes de nodules et d'isolats, avec des caractéristiques presque similaires à celles des sites de Hassi et Still, (l'aridité, un pH presque neutre ou un faible niveau de carbone et d'azote total). Ainsi nos résultats se montrent non concordants avec ceux obtenus par d'autres études (Zahran ., 1999; Zribi et al., 2004). Ces données suggèrent alors qu'il est difficile de prédire si l'inoculation artificielle dans un site donné, ne sera décidée qu'en se basant sur les paramètres abiotiques des sols. Les paramètres non examinés dans notre caractérisation des sols, comme la salinité, peuvent aussi avoir joué un rôle dans la distribution de rhizobia sur ces sites.

La distribution des quatre genres obtenus semble être influée par plusieurs paramètres tels que : facteurs du sol, climat et variabilité dans la capacité métabolique (Hynes et Ocnell, 1990 ; Kohler et al., 2010 ; Wielbo, 2012). L'effet variété semble aussi intervenir dans cette distribution (Depret et Laguerre, 2008). Tous ces paramètres auraient contribué à situer la grande présence des genres *Mesorhizobium* et *Burkholderia* au niveau de Jijel, celle du genre

*Ensifer* à Biskra et celle du genre *Rhizobium* au niveau de Tébessa avec la variété II. La variété III semble préférer coopérer avec les genres *Mesorhizobium*, *Burkholderia* et *Ensifer*. La variété I quand a elle semble suivre les mêmes préférences que la variété III mais agit plus faiblement en nodulation que cette dernière. Tous ces résultats et ces hypothèses nécessitent une vérification par d'autres études prenant en compte un nombre de bactéries plus important que celui sur le quel est basée cette présente étude, notamment pour les cas de trois genres (*Rhizobium*, *Mesorhizobium* et *Burkholderia*). Ainsi selon les résultats obtenus, nous pourrions au moins conclure que la présence du genre *Ensifer* dans tous les sites montre sa bonne adaptation à différents climats et à différentes conditions du sol par rapport aux autres genres. La tolérance du genre *Ensifer* a certains facteurs est déjà été signalée dans des travaux antérieurs portant sur la tolérance de ce genre à la sécheresse, au stress osmose et à la température (Dominguez-Ferreras et al., 2009). Les qualités de ce genre permettent de l'envisager pour une application comme inoculum fiable dans la culture de pois chiche.

- **La diversité trouvée pourrait être originaire d'un transfert latéral**

Pris ensemble, les analyses moléculaires utilisées dans cette étude nous ont permis de mettre la lumière sur la grande diversité des microsymbiotes du pois chiche se trouvant dans le genre du *Mesorhizobium* et dans trois autres genres connus comme microsymbiotes spécifiques à d'autres légumineuses autres que le pois chiche. Cette importante diversité serait obtenue au dépend d'un transfert latéral des gènes symbiotiques à partir des espèces du *Mesorhizobium* dont deux au moins (*M.ciceri* et *M. mediterraneum*) sont déclarées être spécifiques pour le pois chiche (Nour et al., 1994 ; 1995).

Le transfert latéral des gènes est décrit comme un mécanisme naturel important chez les bactéries rhizobiums (Rogel et al., 2011). Les gènes acquis par transfert latéral ne sont pas distribués de manière homogène dans les génomes. Une grande partie de ces séquences sont groupées sur des plasmides et sur des régions chromosomiques particulières appelées îlots génomiques (Hacker and Kaper, 2000; Hacker and Carniel, 2001).

Il est rapporté que les îlots chromosomiques (ou génomiques) contiennent souvent des gènes de « mobilité » comme des gènes impliqués dans la conjugaison (Burrus et al., 2002; Manson et Gilmore, 2006). Ceci suggère que les îlots génomiques sont des éléments génétiques mobiles capables de se transférer et/ou de se maintenir par intégration. D'ailleurs, un îlot génomique a été défini comme une région chromosomique dont les propriétés suggèrent son acquisition par un ou plusieurs événements de transfert horizontal (Hacker et Kaper, 2000; Hacker et Carniel, 2001). Des analyses portées sur les génomes de bactéries et d'archées ont



révélé qu'une très grande majorité d'entre eux portent des îlots génomiques acquis par transfert horizontal et que l'acquisition de ceux-ci joue un rôle essentiel dans l'évolution de ces organismes (Dobrindt et *al.*, 2004).

Dans le cas du *Mesorhizobium*, les gènes de symbiose sont en commun localisés dans les îlots chromosomique de symbiose (SI) (Sullivan et *al.*, 1995, Kaneko et *al.*, 2000; Nandasena et *al.*, 2007(b)) et rarement dans les plasmids (Xu et Murooka, 1995; Wang et *al.*, 1999; Zhang et *al.*, 2000).

Un segment (SI) dont la longueur est située entre 500 et 611pb, d'une souche nodulante de l'espèce *M. loti*, (*M. loti* ICMP 3153), était transmissible à une espèce non-symbiotique de *Mesorhizobium* et a pu conférer au receveur la capacité de noduler des espèces *Lotus* (Sullivan et Ronson, 1998). Dans une autre étude, d'autres souches (*M. loti* R7a et *M. Ciceri* *bv. bisserulae* WSM1271), ont montré également un (SI) pouvant être transféré à d'autres mesorhizobiums dans le sol (Sullivan et *al.*, 2002; Nandasena et *al.*, 2007(a)). Le transfert latéral du SI a été démontré non seulement pour le genre *Mesorhizobium* mais aussi pour d'autres genres. Ce transfert est démontré dans le champ, à partir de la souche *B. japonicum* inoculante du soja pour à la fois les souches *B. elkanii* et *E. fredii*. Ceci fut le premier rapport de transfert du SI entre les différents genres des rhizobias (Barcellos et *al.*, 2007). Toutes ces informations supportent l'hypothèse expliquant l'importante diversité des microsymbiotes du genre *Mesorhizobium* trouvée dans cette étude.

L'échoue en obtention des séquences symbiotiques pour le reste des genres trouvés (autres que *Mesorhizobium*) dans cette étude, nous empêche de conclure actuellement sur le transfert entre les différents genres cependant il est prouvé que le transfert latéral de gènes symbiotiques s'est produit au cours de l'évolution entre les rhizobias appartenant à des espèces différentes et même à des genres différents (Segovia et *al.*, 1993, Barcellos et *al.*, 2007, Laguerre et *al.*, 2001).

Nous notons d'autre part que même si classiquement, une bactérie peut acquérir la capacité de noduler et de fixer l'azote avec une légumineuse lors de l'intégration des gènes symbiotiques dans son génome, avec l'acquisition de l'île chromosomique de gènes symbiotique, ceci est une condition nécessaire mais pas suffisante. En effet des études antérieures ont montré que la transformation génétique dans certains cas est non efficace. Des chercheurs ont montré que le transfert du plasmide symbiotique de *Cupriavidus taiwanensis* vers la bactérie pathogène *Ralstonia taiwanensis* n'a pas tourner ce dernier en un symbiote (Marchetti et *al.*, 2010). D'autres parts des études ont montré que plusieurs autres gènes tels

que ceux codant pour les exopolysaccharides sont connus pour être impliqués dans la spécificité symbiotique (Hirsch, 1999).

Il semble que la variabilité génétique des bactéries nodulaires des racines de pois chiche soit assez élevée et qu'il soit nécessaire de travailler davantage pour localiser précisément la position taxonomique et la spécificité symbiotique de ces bactéries.

- **Ilya-t-il un mutualisme entre les genres *Mesorhizobium* et *Burkholderia* ?**

La présence des genres *Mesorhizobium* et *Burkholderia* dans presque les mêmes sites et leur présence commune dans le site de Jijel avec la variété III permet de penser à une certaine relation entre ces deux genres. Cette relation pourrait exister soit dans la complémentarité de leurs différentes activités, soit dans le développement de la plante et soit dans l'établissement de la symbiose. Dans tous les cas la présence du genre *Burkholderia* au niveau nodulaire du pois chiche donne l'idée d'élargir le spectre de nodulation de ces bêta-rhizobies. Leur capacité de nodulation ne serait plus limitée au genre *Mimosa*, ces bactéries pourraient noduler d'autres légumineuses tel que le pois chiche. D'autre part, cette présence intranodulaire permet d'élargir le spectre de microsymbiotes du pois chiche qui a été souvent considéré comme plante restrictive (Broughton et Perret, 1999), si bien sûr la capacité de nodulation de ce genre serait vérifiée avec des tests plus approfondis.

- **L'espèce dominante *Ensifer meliloti* abrite les mêmes haplo types *nifH* que ceux des bactéries *E. meliloti* bv. *Ciceri***

En se trouvant dans tous les types de sols et climats et avec le plus grand nombre, l'espèce *Ensifer meliloti* montre sa grande capacité de compétitivité pour noduler le pois chiche. Cette compétitivité, serait probablement expliquée par sa grande capacité dans les échanges génétiques latéraux lui permettant la possession des gènes d'infection et de nodulation à partir des souches possédant ces outils. Il se pourrait que l'acquisition de ces outils par les bactéries de l'espèce *Ensifer meliloti* est dépendante des propriétés caractéristiques de la bactérie et de sa tolérance aux conditions de l'environnement ce qui conditionne la réussite et la dominance de cette espèce dans la nodulation du pois chiche dans la majorité des sites examinés.

Malgré qu'aucune séquence *nodC* n'a été obtenue et qu'on a pu obtenir que 10 séquences *nifH*, pour le genre *Ensifer*, nous avons voulu comprendre l'origine de ces séquences, en

reconstruisant une phylogénie *nifH* comprenant des séquences provenant des différents biovars déjà décrits dans *Ensifer meliloti* ainsi que des séquences des espèces étroitement liées à *E. medicae*. Les haplo types que nous avons obtenus dans notre étude tombent dans le même clade que ceux de deux autres souches *E. meliloti* isolées de *Cicer* au Maroc (données non publiées). Ces deux souches ont été précédemment suggérées comme une nouvelle biovar : *E. meliloti* bv. *Ciceri* (Maâtallah et al., 2002; Rogel et al., 2011). Ceci suggère que les isolats *E. meliloti* bv. *ciceri* qui peuvent noduler et fixer de l'azote en symbiose avec du pois chiche, abritent des haplo types spécifiques de *nifH* (et peut-être d'autres gènes *nif* tels que *nifD* ou *nifK*), comme plusieurs autres biovars décrits jusqu'à présent (Rogel et al., 2011). Il n'est pas clair si un tel regroupement est dû à l'adaptation à un hôte spécifique, à un dérivé génétique ou à une divergence due à une structure géographique. Des études supplémentaires à celles de cette présente thèse seraient nécessaires pour répondre à ces différentes questions.

- **L'Est Algérien présente une diversité en rhizobiums nodulant le pois chiche plus importante que celle des pays voisins.**

Même si elle ne couvre pas la totalité du territoire du pays, à notre connaissance, cette étude est l'unique portant sur la diversité des rhizobiums du pois chiche au niveau de l'Est Algérien et elle est l'une des rares études du grand Maghreb menée dans ce contexte. Ces études n'ont touché que les régions du nord du grand Maghreb tels que le Maroc (Maatallah et al., 2002) et la Tunisie (Aouani et al., 2001 ; L'Taief et al., 2007 ; Ben Romdhane et al., (2007). Toutes ces études ont révélé une diversité des mycosymbiotes moindre pour la nodulation du pois chiche par rapport aux présents résultats. En effet, dans cette présente étude, le niveau de diversité des rhizobiums nodulant le pois chiche trouvé, semble avoir un spectre plus large que celui des pays voisins que ce soit pour le genre *Mesorhizobium*, connu être spécifique à cette légumineuse ou pour les autres genres trouvés.

Pour le cas du genre *Mesorhizobium*, cette diversité paraît plus au moins semblable avec celles trouvés dans d'autres régions plus loin tels que le Portugal et l'Espagne (Laranjo et al., 2004; Rivas et al., 2006). En effet en Tunisie, les études de L'taief et al., (2007), basée sur la caractérisation phénotypique et la RFLP du gène ADNr 16S pour 48 isolats ont montré que la diversité des rhizobiums nodulant le pois chiche sur ce territoire ne dépassait pas l'existence des deux espèces spécifiques pour cette plante avec une abondance de l'espèce *Mesorhizobium cicieri*, représentant 40 isolats et seulement 8 isolats représentent l'espèce *M. mediterraneum*. Au Maroc, l'étude de Maatallah et al., (2002), n'a abouti qu'à trois

groupes au sein du *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche et un seul groupe en *Ensifer* contenant quatre isolats.

Cette différence de diversité en espèces et en intra- espèces entre l'Algérie et les pays voisins (Maroc et Tunisie) pourrait être expliquée par plusieurs points. Ceci pourrait être lié à l'historique des cultures de pois chiche dans les sites prospectés dans ces trois cas d'étude. On peut citer le cas d'une probable incompatibilité entre le pois chiche et les bactéries rhizobiums présentes dans les champs cultivés dans les pays voisins. En effet, la taille des populations de rhizobium est connue depuis longtemps augmenter après la sénescence des champs contenant des hôtes de légumineuses incompatibles (Wilson 1926).

Sachant que les sites utilisés dans notre cas n'ont jamais été cultivés, l'absence de la plante hôte est un élément important qui peut aussi interférer sur la diversité et la densité de la population naturelle des rhizobiums (Martinez-Romero et Caballero-Mellado, (1996). Cette hypothèse est appuyée par les résultats d'autres études qui ont signalé une diminution de la diversité des rhizobias associés à la présence de la plante hôte (Coutinho et *al.*, 1999) ou à la présence d'autres plantes. Nous pouvons citer comme exemple le cas de la plante *E. camaldulensis* qui impacte négativement sur la diversité des rhizobiums associés aux acacias sahéliens au Sénégal (Soumare et *al.*, 2013).

L'introduction d'une nouvelle culture peut avoir un impact sur les populations bactériennes autochtones. Les flavonoïdes exsudés par les racines de certaines plantes influent sur la capacité des rhizobiums à survivre dans la rhizosphère, à coloniser les racines et affecter la compétitivité des rhizobiums et leurs interactions symbiotiques avec les légumineuses (Cooper, 2004). Dans certains cas, les plantes introduites peuvent recruter des «bactéries opportunistes» locales qui ont une spécificité croisée pour noduler ces plantes (Martinez-Romero et Caballero-Mellado, 1996). Cela semble être le cas du haricot commun (Mhamdi et *al.*, 2002) et du pois chiche en Tunisie (Aouani et *al.*, 2001), dans les deux cas, des nodules ont été induits par des souches d'*Ensifer*. Par conséquent, la grande diversité obtenue dans cette étude pourrait revenir à l'utilisation des sols qui n'ont jamais été cultivés.

Cette différence en diversité se présentant avec une gamme taxonomique plus large des bactéries trouvées par rapport aux pays voisins serait liée probablement aussi à d'autres facteurs tels que la différence des caractéristiques des sols examinés et l'utilisation dans notre étude de plusieurs cultivars traditionnels. La spécificité et la promiscuité sont variables chez

les cultivars, comme l'ont démontré des chercheurs dans le cas de *Phaseolus vulgaris* (Aguilar et al., 2004). L'utilisation d'un cultivar moderne d'élite de pois chiche devrait être utilisée pour tester cette hypothèse.

## **II Conclusion générale**

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des populations naturelles des bactéries symbiotiques du pois chiche. Cette présente étude s'étend sur plusieurs sites de l'Est Algérien montrant trois étages climatique : humide, semi-aride et aride et prenant trois variétés de type kabuli comme plante hôte.

\* - La caractérisation des différents échantillons de sol montre des différences entre les sites prospectés en leurs constitutions physicochimiques et en leur contenance en nombre de rhizobias estimé.

\*- Un total de 194 isolats est piégé et isolé à partir d'une collection de nodosités fraîches de pois chiche. Ces isolats ont subi une caractérisation moléculaire basée sur le séquençage de 5 fragments d'ADN (ADNr16S, *recA*, IGS, *nodC* et *nifH*).

\*- Le séquençage du gène ADNr16S, adopté comme un premier moyen de caractérisation génétique a permis de diviser les bactéries nodulaires en rhizobium et non rhizobium avec dominance des rhizobias.

\*- L'analyse par l'ADNr 16S, *recA* et IGS a permis de mettre en évidence 4 genres de rhizobias : *Mesorhizobium* ; *Ensifer* ; *Rhizobium/Agrobacterium* et *Burkholderia*. Leur répartition géologique semble être influencée par certains facteurs du sol et le type de climat, qui ont permis de situer la grande présence des genres *Mesorhizobium* et *Burkholderia* au niveau de Jijel, celle du genre *Ensifer* à Biskra et celle du genre *Rhizobium* au niveau de Tébessa.

\*-La variété III s'est montré la plus fiable en symbiose en se trouvant dans tous les sites et en se présentant comme plante hôte de la majorité des souches appartenant aux quatre genres trouvés, cependant une certaine spécificité pourrait être attribuée entre la variété II et le genre *Rhizobium* dans le site de Tébessa.

\*-La distribution des symbiotes par rapport aux sites et variétés permet de détecter différentes combinaisons site-genre-variété (*Mesorhizobium*-variété III-Jijel ; *Ensifer*-variété III-Biskra ; *Rhizobium*-variété II-Tébessa), qui peuvent être explorées dans la culture et l'amélioration du rendement en pois dans l'Algérie.

\*- L'échec d'amplification des gènes symbiotiques pour les genres *Ensifer*, *Rhizobium/Agrobacterium* et *Burkholderia* nous a forcé de focaliser sur le genre *Mesorhizobium* pour la suite des analyses.

\*- L'analyse phylogénique du 16S/recA et la vérification par IGS ont permis de situer les isolats *Mesorhizobium* dans 5 géno-espèces différentes du *Mesorhizobium* (*M. amorphae*, *M. opportunistum*, *M. tamayadense*, *M. ciceri* et *M. gobiense*), alors que les bactéries se situant entre deux espèces différentes (*M. ciceri/M. loti*) pourrait être une nouvelle espèce.

\*-Cette présente étude montre pour la première fois que les espèces *M. tamadayense* et *M. gobiense* et les genres *Rhizobium* et *Burkholderia* sont des microsymbiotes du pois chiche. Contrairement à ce qui est connu, cette étude montre pour la première fois que le genre *Ensifer* est le microsymbiote principale du pois chiche.

\*-La grande diversité obtenue dans l'Est algérien (au niveau du genre, espèce et intra-espèce), serait expliquée par l'acquisition des gènes symbiotiques qui serait probablement réalisée par transfert latérale.

\*-L'analyse symbiotique des gènes *nodC* et *nifH* montre que les symbiotes mesorhizobiums peuvent acquérir ces gènes soit à partir des espèces spécifiques du pois chiche (*M. ciceri* et *M. mediterraneum*) soit à partir d'une autre espèce dont la souche type est originaire de la Chine.

\*À notre connaissance, cette étude est la première évaluation systématique des rhizobiums de pois chiche présente en Algérie. Aucun exemple de la croissance de la diversité des espèces symbiotes d'un genre bactérien unique associé à une légumineuse cultivée n'est mentionné dans la littérature. Cette étude a montré cette propriété pour le cas des partenaires pois chiche et *Mesorhizobium*.

-\* La multiple infection nodulaire du pois chiche mise en évidence dans cette étude par la grande diversité en genre et espèces, ouvre certainement un large spectre pour la sélection des partenaires symbiotiques fiables à la culture et au rendement du pois chiche en Algérie.

### **III Perspectives**

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué et pourraient également servir de base génétique pour les travaux ultérieurs.

\*-La présente étude a contribué à trouver dans l'Est Algérien les différents genres qui pourraient être des microsymbiotes du pois chiche, la mise en évidence de leur possession en gènes symbiotiques, de leur capacité de nodulation confirmera cette grande diversité au niveau du genre.

\*-La connaissance du potentiel de chacun des symbiotes (en genre et en espèce et intra-espèce) en efficacité serait d'un grand intérêt pour le rendement en pois chiche.

\*-La spécificité et les implications biologiques de l'interaction des différents genres sur le pois chiche doivent être approfondies par des expériences de co-inoculation avec les symbiotes spécifiques, (*Mesorhizobium mediterraneum* et *Mesorhizobium ciceri*). La compétition entre ces genres et le genre *Mesorhizobium* pour la nodulation de pois chiche pourrait être drastique pour le succès de l'inoculation et mérite un soin particulier.

\*-Des études taxonomiques et phylogénétiques seront utiles pour élucider la co-évolution entre *S. meliloti* et ses différents hôtes, y compris *Cicer arietinum*.

\*-La connaissance des bases moléculaires des mécanismes de la tolérance aux stress pour les rhizobiums trouvés dans cette étude, serait très intéressante. Il serait intéressant de comparer le transcriptome des souches résistantes et sensibles soumises à l'environnement souligné afin d'étudier les gènes qui pourraient être responsables de la différence sur la tolérance.

\*-Plus d'échantillonnages donnerait plus de diversité symbiotique associée au pois chiche, nous pensons que l'exploration des zones géographiques plus larges et plus diverses en conditions biotiques, en utilisant différents cultivars pour le piégeage, conduira à détecter

d'autres espèces actuellement non encore décrites comme capables d'induire des nodules et fixer de l'azote sur le pois chiche.

\*-Sachant que non seulement les gènes *nodC* et les gènes *nif* sont impliqués dans l'association symbiotique, examiner les gènes exopolysaccharides bactériens serait une étude intéressante. En effet la question sur la capacité de la plante de faire face à une variété de tels composés sécrétés par les bactéries ou s'il y a une faible diversité parmi les espèces au sein du même genre est encore une question ouverte.

\*-S'agissant des non rhizobiums trouvés dans cette étude, il serait très intéressant de savoir par voie moléculaire, la cause de leur présence intra nodulaire, par conséquent savoir leur rôle dans l'établissement et la fonctionnalité de la symbiose voir même dans la tolérance des rhizobiums pour le stress notamment au cours de la symbiose.



*Références  
bibliographiques*

**Références bibliographiques**

**AAC. 2006.** Agriculture et Agroalimentaire Canada. Pois chiche : Situation et perspectives. Le bulletin bimensuel. 19: 13 -16.

**Abdoulaye Sy, Giraud Eric, Jourand Philippe, Garcia Nelly, Willems Anne, De Lajudie Philippe, Prin Yves, Neyra Marc, Gillis Monique, Boivin-Masson Catherine, Dreyfus Bernard. 2001.** Methylo-trophic Methylobacterium Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes J Bacteriol. 183(1): 214–220.

**Afnor. 1981.** Qualité des sols : Mesure du pH (H<sub>2</sub>O).Méthode électrométrique. AFNOR 81 197.

**Aftab A, Asghari B, Mussarat F. 2010.** Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. Agron. Sustain. Dev. 30: 487-495.

**Aguilar OM, Riva O and Peltzer E. 2004.** Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:13548- 13553.

**Ahmad MH, Rafique Uddin M, Mc Laughlin W. 1984.** Characterization of indigenous rhizobia from wild legumes. FEMS Microbiol. Lett. 24: 197-203.

**Alazard D and Duhoux E. 1988.** Diversity of stem nodulationsite in *Aeschynomene spp* .Journal of Plant Physiology.132 : 123-125.

**Alexandre A, Brígido C, Laranjo M, Rodrigues S, Oliveira S. 2009.** A survey of chickpea rhizobia diversity in Portugal reveals the predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*. Microb Ecol. 58: 930- 941.

**Alexandre A, Laranjo M&Oliveira S.2006.**Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. Microb Ecol.51: 128–136.

**Alexandre A, Laranjo M, Young JPW, Oliveira S. 2008.** dnaJ is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. Int J Syst Evol Microbiol. 58:2839-2849.

**Altschul, SF, Madden TL, Schäffer, AA, Zhang J, Zhang Z, Miller, W & Lipman DJ. 1997.**"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

**Amarger N, Macheret V and Laguerre G. 1997.** *Rhizobium gallicum sp. nov.* and *Rhizobium giardinii sp. nov.* from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. 1. of Syst Bact. 47: 996-1006.

**Amooaghaie R. 2011.** The effect of hydro and osmopriming on *alfalfa* seed germination and antioxidant defenses under salt stress. Afr J Biotech. 10: 6269-6275.

**Aoki T, Akashi T, Ayabe S. 2000.** Flavonoids of leguminous plants: Structure, biological activity and biosynthesis. Journal of Plant Research. 113: 475-488.

**Aouani ME, Mhamdi R, Jebara M, Amarger N. 2001.** Characterisation of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. Agronomie. 21: 577-581.

- Ardley Julie K , Parker Matthew A, De Meyer Sofie E, Trengove Robert D, O'Hara Graham W, Reeve Wayne G, Yates Ron J, Dilworth Michael J, Willems Anne and Howieson John G. 2012.** *Microvirga lupini sp. nov., Microvirga lotononidis sp. nov. and Microvirga zambiensis sp. nov.* are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 2579–2588.
- Armas-Capote N, Perez-Yepe J, Martinez-Hidalgo P, Garzon-Machado V, Del Arco-Aguilar M, Velazquez E and Leon-Barrios M. 2014.** Core and symbiotic genes reveal nine *Mesorhizobium* genospecies and three symbiotic lineages among the rhizobia nodulating *Cicer canariense* in its natural habitat (La Palma, Canary Islands) *Syst Appl Microbiol*. 37 (2) : 140-148.
- Asgharzadeh A, Rafiee M, Kargar M, Asadi Rahmani H. 2013.** Genetic diversity of chickpea-nodulating *Mesorhizobium* species native to Iranian soils. *Iranian Journal of Soil Research*. 27(1): 121-129.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R E, Moor D D, Seidman JG, Smith JA. and Struhl. 1987.** *Current protocols in molecular biology*. Wiley Inter Science. Volume 1. Chapitre 1.2.1.
- Aydi S, Sassi S, Abdely C. 2008.** Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula L.* subjected to salt stress. *Plant and Soil*. 312: 59-67.
- Babar BM, Shah T M, Abbas G and Ahsanul haq M. 2009.** Genotype X environment interaction for seed yield in Kabuli chickpea (*Cicer arietinum L.*) genotypes developed through mutation breeding. *Pakistan Journal of Botany*. 4:1883-1890.
- Bacha F et Ounane SM. 2003.** Etude de l'effet du stress hydrique sur les activités des enzymes nitrate réductase et nitrogénase de la culture du pois chiche (*Cicer arietinum L.*). Institut National de la Recherche agronomique d'Algérie. 13:1111-1992.
- Bailey LD. 1983.** Effects of Potassium fertilizer and fall harveste on *Alfafa* grown on the eastern Canadian prairies. *Canadian Journal of Soil Science*. 63: 211-219.
- Barcellos FG, Menna P, da Silva Batista JS, Hungria M. 2007.** Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indige-nous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in aBrazilian Savannah Soil. *Appl Environ Microbiol*. 73:2635–43.
- Baudoin JP. 2001.** Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 5 (4) : 221-230.
- Beck DP, Materon LA and Afandi E. 1993.** *Practical Rhizobium-Legume Technology Manual*. Technical Manual N.º 19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo. 389 pp.
- Ben Romdhane S, Aouani Mohamed Elarbi, Mhamdi Ridha. 2007.** Inefficient nodulation of chickpea (*Cicer arietinum L.*) in the arid and Saharan climates in Tunisia by *Sinorhizobium meliloti* biovar *medicaginis*. *Annals of Microbiology*. 57 (1):15-19.
- Ben Romdhane S, Nasr H, Samba-Mbaye R, Neyra M, Gorbali MH, De Lajudie P. 2006.** Genetic diversity of *Acacia tortilis ssp. raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S–23S rDNA genes analysis. *J. Appl. Microbiol*. 100(3): 436-445.
- Bena G, Lyet A, Huguet T, Olivieri I. 2005.** *Medicago - Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *J Evol Biol*. 18:1547–1558.

- Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A and Squartini A. 2004.** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst Appl Microbiol.* 27: 462-468.
- Benson DR and Silvester WB. 1993.** Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev.* 57: 293-319.
- Beijerinck MW. 1888.** Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. *Bot. Zeitung.* 46: 725 -804.
- Beijerinck MW. 1890.** Künstliche Infection von *Vicia Faba* mit *Bacillus radicola*. Ernährungsbedingungen dieser Bacterie. *Bot. Zeitung.* 52: 837-843.
- Billes G, Cortez J, et Lossaint P. 1975.** Etude comparative de l'activité biologique des sols sous peuplements arbustifs et herbacés de la garrigue méditerranéenne. 1) Minéralisation du carbone et de l'azote. *Rev Ecol Biol Sol.* 12 : 115-139.
- BISMIS-2014 : 2014 Meeting of Bergey's International Society for Microbial Systematics – Defining Microbial Diversity in the Genomic Era (7-10 April 2014, Edinburgh, Scotland) ,** at [http://bismis.org/?cm=body\\_bismis2014](http://bismis.org/?cm=body_bismis2014).
- Blondel J. 1995.** Biogéographie, approche écologique et évolutive. Masson. Paris. 1995.
- Bordeleau LM and Prevost D. 1994.** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil.* 161:115-125.
- Borucki W, Sujkowska M. 2008.** The effects of sodium chloride salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum L.*). *plants Acta Phys Plant.* 30: 293-301.
- Braune PH, Planquaert PH et Wery J. 1988.** Pois chiche culture –utilisation (Brochure). Ed ITCF 11p.
- Breedveld MW, Miller KJ. 1998.** Cell-surface  $\beta$ -glucans. In: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas JJ, editors. *The Rhizobiaceae*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 81–96.
- Breedveld MW, Yoo JS, Reinhold VN & Miller KJ. 1994.** Synthesis of Glycerophosphorylated Cyclic Beta-(1,2)-Glucans by *Rhizobium meliloti ndv* Mutants. *Journal of Bacteriology.* 176: 1047-1051.
- Brencic A, Winans SC. 2005.** Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69:155–194.
- Brewin N J, Downie JA, Young JPW. 1992.** Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology*. M.R Josha Lederberg. Rockefeller University New York. 3: 239-248.
- Brewin NJ. 2004.** Plant cell wall remodelling in the rhizobium legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23: 293-316.
- Brockwell J, Bottomley PJ, Thies JE. 1995.** Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility. *Plant Soil.* 174: 143-180.
- Brockwell J. 1963.** Accuracy of a plant infection technique for counting populations of *Rhizobium*. *Applied Microbiology.* 11: 377–383.
- Brockwell J. 1980.** Experiments with crop and pasture legumes-principles and practice. In *Methods for evaluating Biological Nitrogen Fixation*, (Bergersen, Ed). 417-488. Wiley, New York.

- Bromfield, E. S. P., and L. R. Barran. 1990.** Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can J Microbiol.* 36:369–372.
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. 2003.** Beans (*Phaseolus spp.*). Model food legumes. *Plant and Soil.* 252: 55–128.
- Broughton WJ, Jabbouri S and Perret X. 2000.** Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol*182:5641-5652.
- Broughton, WJ, Perret X. 1999.** Genealogy of legume-rhizobium symbioses. *Current Opinion in Plant Biology.* 2: 305-311.
- Burdon JJ, Gibson AH, Searle SD, Woods MJ & Brockwell J. 1999.** Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian *Acacia*: within species interactions. *Journal of Applied Ecology.* 36: 398 – 408.
- Burrus V, Pavlovic G, Decaris B and Guédon G. 2002.** Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol.* 46: 601-610.
- Calvet G et Villemin P. 1986.** Interprétation des analyses de terre, IPAS, SADEF-SCPA, Aspach le Bas, France. 25 p.
- Carelli M, Gnocchi, S Fancelli S et al. 2000.** Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different *alfalfa* cultivars in Italian soils. *Applied and Environmental Microbiology.* 66: 4785-4789.
- Carlson, RW, Kalembasa S, Turowski D, Pachori P & Noel KD. 1987.** Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *Journal of Bacteriology.* 169: 4923-4928.
- Cermola M, Fedorova E, Taté R, Riccio A, Favre R, Patriarca EJ. 2000.** Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol.Plant Microbe Interact.* 13: 733–741.
- Cervantes E, Sharma SB, Mallet F, Vase J, Truchet G and Rosenberg C. 1989.** The *Rhizobium Meliloti* host range nodQ gene encodes a protein which shares homology with translation elongation and initiation factors. *Mol. Microbiol.* 3:745-755.
- Cesar AI, Esther MG, Daniel M, Ruben L, Estibaliz L, Erena GQ. 2011.** Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress.* 2011; 5: 24-31.
- Chaabena A, Abdelguerfi A, Baameur M. 2004.** Comportement et caractérisation de quelques variétés de luzerne (*Medicago sativa L.*) dans la région de Ouargla. *Cah Agric.* 13: 271-6.
- Charpy roubaud C, Charpy L and Larkum AW. 2001.** Atmospheric dinitrogen fixation by benthic communities of tike hau Lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia) and its contribution to benthic primary production *Mar Biol.* 139: 991-997.
- Chataigné G. 2007.** Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de doctorat, université Paul Sabatier. France.
- Chaussod R, Nicolardot B, Catroux G et Chrétien J. 1986.** Relations entre les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de quelques sols cultivés. *Sciencedu Sol.* 24: 213-226.

- Chen W M, 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. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:1729-1735.
- Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson, C.2003.** Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -Proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol.* 185: 7266-7272.
- Chen WM, Zhu WF, Bontemps C, Young JPW, Wei GH. 2010.** *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 958-962.
- Chen WM, Zhu WF, Bontemps C, Young JPW, Wei GH. 2011.** *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61:574-579.
- Chen WX , Yan GH, Li JL. 1988.** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 28:392-397.
- Chen WX, Li GS, Qi YL, Wang ET, Yuan HL, Li JL. 1991.** *Rhizobium huakuii* sp. nov. Isolated from the Root-Nodules of *Astragalus sinicus*. *Int J Syst Bacteriol.* 41:275-280.
- Chen WX, Wang E, Wang SY, Li YB, Chen XQ. 1995.** Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing rootnodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, Peoples-Republic-of-China. *Int J Sys Bacteriol.* 45:153-159.
- 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.
- Cleyet-Marel Jean-Claude, Sophie Rome, Xavier Salducci & Jacques Wery. 1996.** Importance des composés phénoliques dans les interactions entre plantes et microorganismes: exemple des relations *Rhizobium*/ légumineuses, *Acta Botanica Gallica: Botany Letters.* 143(6): 521-529.
- Cooper JE. 2004.** Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology.* 41: 1-62.
- Cooper JE. 2007.** Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol.* 103:1355-65.
- Cordovilla MP, Ocana A, Ligero F, Lluch C.1995.** Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes *Rhizobium* symbiosis. *J Plant Nutr.* 18:1595-1609.
- Coutinho HLD, Kay HE, Manfio GP, Neves MCP, Ribeiro JRA, Rumjanek NG & Beringer JE. 1999.** Molecular evidence for shifts in polysaccharide composition associated with adaptation of soybean *Bradyrhizobium* strains to the Brazilian Cerrado soils. *Environ Microbiol.* 1: 401-408.
- CRAAQ. 2003.** Guide de référence en fertilisation. ed. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, Sainte-Foy. Xx. 294 pp.
- Crossman LC, 2004.** Plasmid replicons of *Rhizobium*. *Biochemical Society Transactions.* Volume 33, part 1.
- Cullimore JV, Nieble A, Bono JJ and Ranjeva R. 1997.** Identification of a high affinity binding site for lipo-oligosaccharidic NodRm factors in the microsomal fraction of *Medicago* cell suspension cultures. *Mol Plant Microb Interacts.*10:132-134.

- Cunningham S, Kollmeyer WO & Stacey G. 1991.** Chemical control of interstrain competition for soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1886-1892.
- Danso SKA. 1995.** Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertilizer research.* 42: 33- 41.
- Davet P. 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA ed. 383 p.
- David M, Daveran ML, Batut J, Dedieu A, Domergue O, Ghai J, Boistard P, Kahn D. 1988.** Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell.* 54:671-683.
- Davis PH. 1969.** Materiel for a flora of Turkey, XIX -Leguminosae - *Viciae*, Notes Roy Bot Gard Ed. 29: 312-313.
- De Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins MD, Lindström K, Dreyfus B, Gillis M. 1998.** Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium sp. nov.* *Int J Syst Bacteriol.* 48:369-382.
- De Meyer S E, Tan HW, Andrews M, Heenan P B and Willems A. 2016.** *Mesorhizobium calcicola sp. nov.*, *Mesorhizobium waitakense sp. nov.*, *Mesorhizobium sophorae sp. nov.*, *Mesorhizobium newzealandense sp. nov.* and *Mesorhizobium kowhii sp. nov.* isolated from *Sophora* root nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 786-795.
- De Meyer S E, Tan HW, Andrews M, Heenan P B and Willems A. 2015.** *Mesorhizobium waimense sp. nov.* isolated from *Sophora longicarinata* root nodules and *Mesorhizobium cantuariense sp. nov.* isolated from *Sophora microphylla* root nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 3419-3426.
- Deakin WJ and Broughton WJ. 2009.** Opinion: symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 312-320.
- Debellé F and Sharma SB. 1986 (a).** Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucleic Acids Res.* 14:7453-7472.
- Debellé F, Rosenberg C, Vasse J, Maillet F, Martinez E, Denarie J and Truchet G. 1986 (b).** Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 168:1075–1086.
- Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénarié J, Boivin C. 2001.** Nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochim Pol.* 48:359–365.
- Degefu T, Wolde-Meskel E, Liu B, Cleenwerck I, Willems A and Frostegård Å. 2013.** *Mesorhizobium shonense sp. nov.*, *Mesorhizobium hawassense sp. nov.* and *Mesorhizobium abyssinicae sp. nov.*, isolated from root nodules of different agroforestry legume trees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 1746-1753.
- Del Villar, M., R. Rivas, A. Peix, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, P. van Berkum, A. Willems, and E. Velázquez. 2008.** Stable low molecular weight RNA profiling showed variations within *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* nodulating different legumes from the alfalfa cross-inoculation group. *FEMS Microbiol. Lett.* 282:273-281.
- Delauney AJ and Verma DPS. 1988.** Cloned nodulin genes for symbiotic nitrogen fixation. *Plant*

Mol Biol Rep. 6: 279-285.

**Denarié J et Truchet.1979.** Physiologie Végétale. 17 (4): 643-667.

**Denarié J, Debelle F and Rosenberg C. 1992.** Signaling and host range variation in nodulation. Annu Rev Microbiol. 46: 497-531.

**Dénarié 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.

**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.

**Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C, Saby NPA, Lelievre M, Maron PA, Martin MP, Chemidlin-Prévost-Bouré N, Toutain B, Arrouays D, Lemanceau P, Ranjard L, 2009.** Biogeographical patterns of soil bacterial communities. Environmental Microbiology Report. 1: 251-255.

**Deschamps M. et Wery J. 1985.** Influence de l'eau et de l'azote sur la croissance et la nutrition azotée de 2 légumineuses à graines. In Nutrition azotée des légumineuses. Les colloques de l'INRA. 271-280.

**Diouf D, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B and De Lajudie. 2007.** Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microb Ecol* . 54:553–566.

**Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-H, Srinivasa Reddy MS and Wang L. 2002.** The phenyl propanoid pathway and plant defense, a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. 3: 371-390.

**Djordjevic SP, Chen H, Bately M, Redmond JW and Rolfe BG. 1987.** Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *J Bacteriol*. 169: 53 60.

**Dobrindt Ulrich, Hochhut Bianca, Hentschel Ute & HackerJörg. 2004.** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2 : 414-424.

**Dominguez-Ferreras A, Soto MJ, Pérez-Arnedo R, Olivars and Sanjuan J. 2009.** Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* osmotolerance and nodulation of alfalfa roots. *J Bacteriol*. 191:7490–7499.

**Dommergues Y, Duhaux E and Hoang GD. 1999.** Les arbres fixateurs d'azote; caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Y. Dommergues (Ed). Edition espaces. Paris. 34: 47.

**Downie JA. 1998.** Functions of rhizobial nodulation genes. In: *The Rhizobiaceae* (eds. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ). Kluwer academic publishers, Dordrecht, Boston, London. 387-402.

**Doyle JJ and Luckow MA. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol*. 131: 900-910.

**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.

**Duke JA. 1981.** Handbook legumes of world economic importance Ed. Plenum press, New-York and London. 25p.

**Earl CD, Ronson CW & Ausubel FM.1987.** Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* fixA, fixB, fixC, and fixX genes. *J Bacteriol.*169:1127–1136.

**Egamberdiyeva D, Isalm KR. 2008.** Salt-tolerant rhizobacteria: plant growth promoting traits and physiological characterization within ecologically stressed environments. In:Ahmad I, Pichtel J, Hayat S (eds) Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 257- 281.

**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.

**Elvera- Recuenco M et Van Vuurde JW. 2000.** Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can J Microbiol.* 46(11):1036-1041.

**Essalmani Haiat and Lahlou Houria. 2003.** Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*. Bioprotection mechanisms of the lentil plant by *Rhizobium leguminosarum* against *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*. *Comptes Rendus. Biologies* .326 (12) :1163-1173.

**Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC. 2003.** Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology*. 132: 1982–1988.

**Faghire M, Bargaz A, Farissi M, Palma F, Mandri B, Lluch C, Tejera García NA, Herrera-Cervera JA, Oufdou K and 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.

**FAOSTAT. 2014.** Food and agriculture organization: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> ou : [http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/G1\\*/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/G1*/E) (consultée le 12/3/2014).

**FAOSTAT. 2016. Food and agriculture organization:** <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (page consultée le 02/7/2017).

**FAOSTAT. 2017. Food and agriculture organization :** <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (page consultée le 02/8/2017).

**Farissi M, Bouizgaren A, Faghire M, Bargaz A, Ghoulam C. 2011.** Agro-physiological responses of Moroccan *Alfalfa (Medicago sativa L.)* populations to salt stress during germination and early seedling stages. *Seed Sci Technol*. 39: 389- 401.

**Fierer N and Jackson RB. 2006.** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 626–631.

**Fisher HM. 1994.** Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. *Microbiological reviews*. 58:352-386.

**Fisher RA et Yates T. 1963.** Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medicals Research.

Olivier & Boyd, Edinburgh.

**Frank B. 1889.** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 7:332-346.

**Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret X. 1997.** Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature. 387:394–401.

**Gage DJ. 2004.** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 280–300.

**Gagnard J, Huguet C et Ryser JP. (1988).** l'analyse du sol et du végétal dans la conduite de la fertilisation, le contrôle de la qualité des fruits. Secrétariat générale OILB/SROP, Edition - Diffusion ACTA. 87 P.

**Galibert F, Finan TM, Long SR, Pühler A et al. 2001.** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science. 293: 668-672.

**Gao JL, Turner SL, Kan FL, Wang ET, Tan ZY, Qiu YH, Gu J, Terefework Z, Young JPW, Lindström K and Chen WX. 2004.** *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.54: 2003-2012.

**Garcia-Rodriguez, FM & Toro N. 2000.** *Sinorhizobium meliloti* nfe (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. Molecular Plant-Microbe Interactions.13: 583-591.

**Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilps SA, et Young JPW. 2001.** Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 2037–2048.

**Gaur YD and Sen AN. 1979.** Cross-inoculation group specificity in *Cicer rhizobium* symbiosis. New Phytol. 83: 745–754.

**Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND. 2005.** Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. Plant Physiology. 137: 1228– 1235.

**Geurts R., Fedorova E. and Bisseling T. 2005.** Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. Curr. Opin. Plant. Biol. 8: 346-352.

**Ghosh W and Roy P. 2006.** *Mesorhizobium thioganicum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolitho autotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 91-97.

**Girard C. 1985.** L'installation du pois chiche de printemps. In - Bulletin FNAMS semences. pp: 25-27.

**Glazebrook J & Walker G C. 1989.** A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Cell. 56: 661-672.

- González V, Bustos P, Ramírez-Romero MA, Medrano-Soto A, Salgado H, Hernández-González I, Hernández-Celis JC, Quintero V, Moreno-Hagelsieb G, Girard L, Rodríguez O, Flores M, Cevallos MA, Collado-Vides J, Romero D & Dávila G. 2003.** The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biology*. 4: R36.
- Govers F, Nap JP, van Kammen A, Bisseling T. 1987.** Nodulins in the developing root nodule. *Plant Physiol Biochem*. 25: 309-322.
- Graham PH and Vance CP. 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*. 131: 872–877.
- Guan SH, Chen WF, Wang ET, Lu YL, Yan XR, Zhang XX, Chen WX. 2008.** *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. in China. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58:2646-2653.
- Guckert A, Laperriere C. 1985.** Effet du stress hydrique sur la fixation d'azote par le trèfle blanc. Nutrition azotée des légumineuses. Les colloques de l'INRA. 245-250.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliott GN, Bentemps C, Estrada-de Los Santos, Gross E, Dos Reis FB, Sprent JI, Young JP and James EK. 2011.** Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 24: 1276–1288.
- Hacker J and Carniel E. 2001.** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep*. 2: 376-381.
- Hacker J and Kaper JB. 2000.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*. 54: 641-679.
- Hamadache A et Ait Abdallah F. 1998.** Lutte contre les adventices en culture du pois chiche d'hiver : un facteur déterminant pour la valorisation du matériel végétal et du semis précoce. *Céréaliculture*. N°33 ISSN.1011-9582.
- Han TX, Han LL, Wu LJ, Chen WF, Sui XH, Gu JG, Wang ET et Chen WX. 2008 (b).** *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. And *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58 (11): 2610-2618.
- Han TX, Wang ET, Wu LJ, Chen WF, Gu JG, Gu CT, Tian CF, et Chen WX. 2008 (a).** *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58: 1693-1699.
- Han, LL et al. 2009.** Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant Soil*. 324: 291–305.
- Harrison PW, Lower RPJ, Kim NKD, Young JPW . 2010.** Introducing the bacterial chromid: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol*. 18 : pp. 141–148.
- Haukka K, Lindström K and 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. *Appl Environ Microbiol*. 64: 419-426.
- Hawksworth DL. 2001.** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 105: 1422-1432.

- Herfort L, Schouten S, Abbas B et al. 2007.** Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology*. 62: 242-257.
- Hernandez-Lucas I, Rogel-Hernandez MA, Segovia L, Rojas-Jimenez K & Martinez-Romero E. 2004.** Phylogenetic Relationships of *Rhizobia* Based on Citrate Synthase Gene Sequences. *Systematic and Applied Microbiology*. 27: 703-706.
- Herrera-Cervera JA, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Tichy HV, Requena N, Amarger N, Martinez-Romero E, Olivares J, Sanjuan J. 1999.** At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 30:87–97.
- Herridge DF, Marcellos H, Felton WL, Turner GL, Peoples MB. 1995.** Chickpea increases soil-N fertility in cereal systems through nitrate sparing and N<sub>2</sub> fixation. *Soil Biol Biochem*. 27:545–551.
- Hirsch AM, Lum MR and Downie JA. 2001.** What makes the rhizobial-legume symbiosis so special? *Plant Physiol*. 127: 1484- 1492.
- Hirsch AM. 1999.** Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol*. 2:320–326.
- Hirsch, AM.1992.** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol*. 122: 211–237.
- Homna M. & Ausubel FM. 1987.** *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 8558-8562.
- Hopkin WG. 2003.** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. 99-120.
- Horvath B, Kondorosi E, John M, Schmidt J, Torok I, Gyorgy LZ, Barabas I, Wieneke U, Schell J, and Kondorosi A. 1986.** Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium-meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell*. 46: 335-344.
- Howarth B, Sachem CWB, Schell J & Kondorosi A. 1987.** Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal interacting with the *nodD* gene product. *EMBO Journal*. 6: 841-848.
- Humphries MM, Thomas DW and Speakman JR. 2002.** Climate mediated energetic constraints on the distribution of hibernating mammals. *Nature*. 418:313–316.
- Hynes M.F. & O'Connell M.P. 1990.** Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 36: 864–869.
- Jarvis BDW, Pankhurst CE, Patel JJ. 1982.** *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int J. Syst Bacteriol*. 32: 378-380.
- Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WC, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC and Gillis M. 1997.** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium gen. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 895–898.
- Jean Jacques, Mbonigaba Muhinda , Innocent Nzeyimana , Charles Bucagu , Marc Culot. 2009.** Caractérisation physique, chimique et microbiologique de trois sols acides tropicaux du Rwanda sous jachères naturelles et contraintes à leur productivité. *Biotechnol. Agron Soc Environ*.

13(4): 545-558.

**Jebara M, Aouani ME, Mhamdi R, Ghrir R, Mar M. 2000.** Effet du sel sur des isolats de *Sinorhizobium sp.* de Tunisie in vitro ou en association avec *Medicago sp.* Cah Agric. 9 : 99-102.

**Jha PK, Nair S, Gopinathan MC, Babu CR. 1995.** Suitability of rhizobia-inoculated wild legumes *Argyrolobium flaccidum*, *Astragalus gra\_eolens*, *Indigofera gangetica* and *Lespedeza stenocarpa* in providing a vegetational cover in an unreclaimed lime stone quarry. Plant Soil. 177: 139-149.

**Jiang J, Gu B, Albright LM & Nixon BT. 1989.** Conservation between Coding and Regulatory Elements of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* *det* Genes. *Journal of Bacteriology*. 171: 5244-5253.

**Jiao YS, Liu YH, Yan H, Wang ET, Tian CF, Chen WX, Guo BL, Chen WF. 2015.** Rhizobial Diversity and Nodulation Characteristics of the Extremely Promiscuous Legume *Sophora flavescens*. Mol Plant-Microbe interct. 28 : 1338-1352.

**Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. 2007.** How symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. Nature. 5: 619-33.

**Jordan DC. 1982.** Transfer of *rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J Syst Bacteriol.* 32: 136-139.

**Jordan DC. 1984.** Family III. *Rhizobiaceae* Conn, 1938. In: Krieg NR, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore. 1: 234-256.

**Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Kawashima K, Kimura T, Khida Y, Kiyokawa C, Kohora M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochuzoki Y, Nakayama S, Shimpo S, Suqimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S. 2000.** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNARes. 7:331-8.

**Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M & Tabata S. 2002 (a).** Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*. 9: 189-197.

**Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M & Tabata, S. 2002(b).** Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (supplement). *DNA Research*. 9: 225-256.

**Kape R, Parniske M & Werner D, 1992.** Isoliquiritigenin, a strong *nod* gene and glyceollin resistance inducing flavonoid from soybean root exudate. *Appl Environ Microbial*. 58:1705-1710.

**Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Ahemad M and Oves M. 2009.** Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: current status. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds). Microbial strategies for crop improvement. Springer, Germany. pp: 105-132.

- Khbaya B, Neyra M, Normand P, Zerhari K, Filali-Maltouf A. 1998.** Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia spp.* in Morocco assessed by analysis of the rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4912-4917.
- Kiers ET, Hutton MG, Denison RF. 2007.** Human selection and the relaxation of legume defences against ineffective rhizobia. *Proceedings of the Royal Society Biology. Biological Sciences.* 274:3119–26.
- Kiers ET, Rousseau RA, Denison R F. 2006.** Measured sanctions: legume hosts detect quantitative variation in rhizobium cooperation and punish accordingly. *Evolutionary EcologyResearch* .8: 1077–1086.
- Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF. 2003.** Host sanctions and the legume rhizobium mutualism. *Nature.* 425: 78-81.
- Kohler P.R.A, Zheng JY, Schoffers E and Rossbach S. 2010.** Inositol catabolism, a key pathway in *Sinorhizobium meliloti* for competitive host nodulation. *Appl Environ Microbiol.* 76: 7972–7980.
- Kondorosi E, Kondorosi A. 2000.** Control of root nodule organogenesis. In *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process.* Triplett, Horizon n Scientific Press, Wymondham, UK.
- Kosslak AM, Bookland R , Barkei J, Paaren HE & Appelbaum ER. 1987.** Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 8:7428-7432.
- Kosslak RM, Joshi RS, Bowen BA, Paaren HE & Appelbaum ER. 1990.** Strain-specific inhibition of *nod* gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1333-1341.
- Kouas Saber, Labidi Nahla , Debez Ahmed and Abdelly Chedly. 2005.** Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag (Germany).* 25 (3): 389-393.
- Kucey RMN. 1989.** The influence of rate and time of mineral N application on yield and N<sub>2</sub> fixation by field bean. *Canadian Journal of Plant Science.* 69: 427-436.
- Kwon SW, Park JY, Kim JS, Kang JW, Cho YH, Lim CK, Parker MA et Lee GB. 2005.** Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55: 263-270.
- L'taief B, Sifi B, Gtari M, Mainassara ZA and Lachaal M. 2007.** Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Tunisia. *Canadian Journal of Microbiology.* 53: 427-434.
- Ladizinsky G et Alder A. 1975.** Seed protein electrophoresis of the annual species of *Cicer L.* *Israel. J. Res.* 25(1): 61-64.
- Ladizinsky G. 1987.** Pulse domestication before cultivation. *Econ. Bot.* 41: 60-65.
- Ladizinsky G. 1989.** Pulse domestication: Fact and Fiction. *Econ. Bot.* 43: 131-133.
- Lagares A, Caetano-Anolles G, Niehaus K, Lorenzen J, Ljunggreen HD, Puhler A, Favelukes G. 1992.** A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharides mutant altered in competitiveness for nodulation

of Alfalfa. J Bacteriol 174: 5941–5952.

**Laguerre G, Allard MR, Revoy F et Amarger N. 1994.** Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR- amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 56-63.

**Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P et 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.

**Laranjo M, Alexandre A, Rivas R, Velázquez E, Young JPW and Oliveira S. 2008.** Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species” *FEMS Microbiology Ecology.* 66 (2): 391-400.

**Laranjo M, Branco C, Soares R, Alho L, Carvalho MD and Oliveira S. 2002.** Comparison of *Chickpea rhizobia* isolates from diverse portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *J Applied Microbiol.* 92: 1043-1050.

**Laranjo M, MacHado J, Young JPW, Oliveira S. 2004.** High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiol Ecol.* 48:101–107.

**Laranjo M, Young J P W, Oliveria S. 2012.** Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. *Systematic and Applied Micobiology.* 35: 359-367.

**Laranjo Marta, Alexandra Ana, Oliveira Solange. 2014.** Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research.* 169:2– 17.

**Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD and Higgins DG. 2007.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23:2947–2948.

**LeRouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC and Denarié J. 1990.** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signals. *Nature.* 344: 781-784.

**Limpens E et Bisseling T. 2003.** Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology.* 6: 343-350.

**Lin, Dong Xu, Wang, En Tao, Tang, Hui, Han, Tian Xu, He, Yu Rong, Guan, Su Hua, Chen, Wen Xin . 2008.** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 1409-1413.

**Lindstrom K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010.** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology.* 161(6): 453-463.

**Lindström K, Aserse AA, Mousavi SA. 2015.** Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. In *Biological Nitrogen Fixation*, 1st ed., de Bruijn, F.J., Ed.; Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey. pp: 21-37.

**Lindström K, Polkunen J and Kansanen P. 1985.** Effect of dinoseb on nitrogen fixation of red clover (*Trifolium pratense*). *Soil Biol Biochem.* 17: 865-869.

- LPSN**: Liste of Prokaryotic names with standing in nomenclature (2017). (<http://www.bacterio.net/mesorhizobium.html>; consulté le 13 /10/2017).
- Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS. 2003.** Amino-acid cycling drives Nitrogen fixation in the legume– rhizobium symbiosis. *Nature*. 422: 722-726.
- López M, Herrera-Cervera JA, Iribarne C, Tejera NA, Lluch C. 2008.** Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: nodule carbon metabolism. *J Plant Physio* . 165: 641- 650.
- Lozupone CA and Knight R. 2007.** Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 11436-11440.
- Lu YL, Chen WF, Wang ET, Han LL, Zhang XX, Chen WX, Han SZ. 2009.** *Mesorhizobium shangrilense* sp nov., isolated from root nodules of *Caragana* species. *Int J Syst Evol Microbiol*. 59: 3012-3018.
- Maatallah J, Berraho EB, Munoz S, Sanjuan J and Lluch C. 2002.** Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J Appl Microbiol*. 93: 531–540.
- Maatougi E.H., Bouznad Z., Labdi. M., 1996.** Chickpea in Algeria. Adaptation of Chickpea in the West Asia and North Africa Region. Edited by N P Saxena, M C Saxena, Johansen, S M Virmani and H harris. 262p.
- MacLean AM, Finan TM, Sadowsky MJ. 2007.** Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiol*. 144:615–22.
- Maier RJ. 1986.** Biochemistry Regulation and Genetics of Hydrogen Oxidation in *Rhizobium*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 3: 17-38.
- Manson JM and Gilmore M.S. 2006.** Pathogenicity island integrase cross-talk: a potential new tool for virulence modulation. *Mol Microbiol*. 61: 555-559.
- Mantelin S, Fisher-Le Saux M, Zakhia F, Bena G, Bonneau S, Jeder H, De Lajudie P & Cleyet-Marel JC. 2006.** Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56: 827–839.
- Marchetti M, Capela D, Glew M, Cruveiller S, Chane-Woon-Ming B, Gris C, Timmers T, Poinot V, Gilbert L B, Heeb P, Medigue C, Batut J and Masson-Boivin C. 2010.** Experimentalevolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol*. 8:e1000280.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, Willems A. 2008.** Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 58:200-214.
- Martens M, Delaere M, Coopman R, De Vos P, Gillis M, Willems A. 2007.** Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57:489-503.
- Martinez E, Palacios R and Sanchez F 1987.** Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J Bacteriol*. 169: 2828-2834.



- Martinez E, Pardo MA, Palacios R & Cevallos MA. 1985.** Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. J Gen Microbiol 31: 1779-1786.
- Martinez-Hidalgo P, Ramirez-Bahena M H, Flores-Felix JD, Igual J M, Sanjuan J, Leon-Barrios M, Peix A and Velazquez E. 2016 .** Reclassification of strains MAFF 303099T and R7A into *Mesorhizobium japonicum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66: 4936-4941.
- Martinez-Hidalgo P, Ramirez-Bahena M H, Flores-Felix JD, Rivas R, Igual JM, Mateos P F, Martínez-Molina E, León-Barrios M, Peix A and Velázquez E. 2015.** Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 1703-1708.
- Martinez-Romero E and Caballero-Mellado J. 1996.** *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit Rev Plant Sci. 15: 113-140.
- Martinez-Romero E and Rosenblueth M. 1990.** Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. Applied and Environmental Microbiology . 56: 2384-2388.
- Maynaud G, Willems A, Soussou S, Vidal C, Mauré L. 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.
- Mc Dermott TR, Graham PH, Brandwein DH. 1987.** Viability of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. Arch Microbiol. 148:100-106.
- Mercado-Blanco Jesús, Toro. Nicolás. 1996.** Plasmids in rhizobia : the role of non symbiotic plasmids. MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions. N7. (9): 535-545.
- Mérelle F. 1998.** L'analyse de terre aujourd'hui. GEMAS. Nantes. 184p.
- Mezni M, Albouchi A, Bizid E, Hamza M. 2010.** Minerals uptake, organic osmotica contents and water balance in *Alfalfa* under salt stress. J Phytol. 01–12.
- Mhamdi R, Laguerre G, Aouani ME, Mars M. and Amerger N.2002.** Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. FEMS Microbiol Ecol. 41: 77-84.
- Michiels Jan, Dombrecht Bruno, Vermeiren Nicolas, Xi Chuanwu, Luyten Ellen, Vanderleyden Jos. 1998.** *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. FEMS Microbiology Ecology 26 : 193-205.
- Moolani MKY and Chandra S. 1970.** Gram cultivation in Haryana. Haryana Agricultural University. Hisar. India. 15pp.

- Moulin L, Avarre JC, Jaubert M, Barbe V, Béna G, Cartiaux F, Delajudie P, Dreyfus B, Elmerich D, Fardoux J, Hannibal L, Kojadinovic M, Lajus A, Mangenot SG, Medigue C, Pignol D, Prin Y, Rouy Z, Stacey G, Sadowsky M, Vallenet D, Vermeglio A, Vuillet L and Giraud E. 2006.** Absence de genes nod chez certaines souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques révélée par l'analyse de la séquence de leurs génomes. In : SFP. 7èmes Rencontres plantes-bactéries, 20-23 mars 2006, Aussois, France. Resumes. Angers : INRA, p. 39. Rencontres plantes bactéries. 7, 2006-03-20/2006-03-24, Aussois, France.
- 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.
- Mpepereki S, Makonese F et Wollum AG.1997.** Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna uniuicula* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*. 22: 275-292.
- Muller S, Pereira PAA and Martin P. 1993.** Effect of different levels of mineral nitrogen on nodulation and N<sub>2</sub> fixation of two cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*. 152: 139-143.
- Munns DN. 1977.** Soil acidity and related factors. In J. M. Vincent, A. S. Whitney and J. Bose (eds). 211-236.
- Muresu R, Polone E, Sulas L, Baldan B, Tondello A, Delogu G, Cappuccinelli P, Alberghini S, Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Mori B, Calamassi R, Dazzo FB, et Squartini A. 2008.** Coexistence of predominantly non culturable rhizobia with diverse endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 383-400.
- Nandasena KG, O'Hara GW, Tiwari RP and Howieson JG. 2007 (a).** In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *Environ. Microbiol.* 9: 2496-2511.
- Nandasena KG, O'Hara GW, Tiwari RP, Willems A, Howieson JG. 2007(b).** *Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae*, a novel biovar nodulating the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57: 1041-5.
- Nandasena KG, O'Hara GW, Tiwari RP, Willems A, Howieson JG. 2009.** *Mesorhizobium australicum* sp nov and *Mesorhizobium opportunistum* sp nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59: 2140-2147.
- Nandwani R & Dudeja SS. 2009.** Molecular diversity of a native mesorhizobial population of nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Indian soils. *J Basic Microbiol.* 49: 463-470.
- Nguyen TM, Pham VHT and Kim J. 2015.** *Mesorhizobium soli* sp. nov., a novel species isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. in South Korea by using a modified culture method. *Antonie van Leeuwenhoek* 108: 301-310.
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr and Deerfield DWII. 1997.** GeneDoc: Analyse and Visualisation of Genetic. A tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Noel KD. 2009.** Rhizobia. In: Encyclopedia of Microbiology, 3<sup>rd</sup> edition, ed. Schaechter M. Oxford: Elsevier. pp: 261-277.
- Normand P, Cournoyer B, Nazaret S, et Simonet P.1992.** Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* .111: 119-124.

- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M and Simonet P. 1996.** Molecular Microbial Ecology Manual 3.4.5: 1-12.
- Nour SM, Cleyet-Marel J-C, Normand P, Fernandez MP. 1995.** Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum L.*) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 45: 640-648.
- Nour SM, Fernandez MP, Normand P, Cleyet-Marel JC. 1994.** *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum L.*). Int J Syst Bacteriol. 44: 511-522.
- Obaton M, 1971.** Influence de la composition chimique du sol sur l'utilité de l'inoculation des graines de luzerne avec *Rhizobium meliloti*. Plant Soil Special Volume. 273-285.
- Oldroyd G. 2001.** Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. Annals of Botany. 87: 709-718.
- Olsen G J & Woese CR. 1993.** Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7: 113-123.
- Oresnik IJ, Twelker S, Hynes MF. 1999.** Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. Appl Environ Microbiol. 65: 2833–2840.
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P and Udvardi MK. 2005.** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Curr Biol. 15: 531-535.
- Overmann J et Tuschak C. 1997.** Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria. Arch Microbiol. 167: 302–309.
- Pandey P, Sahgal M, Maheswari DK & Johri BN. 2004.** Genetic diversity of rhizobia isolated from medicinal legumes growing in the sub-Himalayan region of Uttaranchal. Curr Sci 86: 202–207.
- Parker MA & Spoerke JM. 1998.** Geographic structure of lineage associations in a plant-bacterial mutualism. Journal of Evolutionary Biology. 11: 549 – 562.
- Parker MA, Doyle JL & Doyle JJ. 2004.** Comparative phylogeography of Amphycarpaea legumes and their root-nodule symbionts in Japan and North America. Journal of Biogeography. 31: 425 – 434.
- Parker MA. 1995.** Plant fitness variation caused by different mutualist genotypes. Ecology. 76: 1525 - 1535.
- Parker MA. 1999.** Mutualism in metapopulations of legumes and rhizobia. American Naturalist. 153: S48 – S60.
- Peck MC, Fisher RF, Long SR. 2006.** Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol. 188:5417–27.
- Pellock BJ, Cheng HP, Walker GC. 2000.** Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. Journal of Bacteriology. 182: 4310-4318.
- Pelmont J. 1995.** Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications

Universitaires. 2: 541-572.

**Perret X, Staehelin C and Broughton W J. 2000.** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:180-201.

**Peters NK, Frost JW& Long S, 1986.** A plant favone, luteoline, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Sciences.* 233: 977-980.

**Peters NK, Verma DPS. 1990.** Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 3: 4-8.

**Pfeffer SR. 1994.** Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 522-526.

**Pietsch G, Friedel JK, Freyer B. 2007.** Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Research.* 102: 104-118.

**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.

**Rahi P, Kapoor R, Young JPW, Gulati A. 2012.** A genetic discontinuity in root-nodulating bacteria of cultivated pea in the Indian trans-Himalayas. *Mol Ecol.* 21:145–159.

**Ramírez-Bahena MH, Hernández M, Peix A, Velázquez E and León barrios M. 2012.** *Mesorhizobial* strains nodulating *Anagyrislatifolia* and *Lotusberthelotii* in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobiumtamadayense* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 334-341.

**Raven PH, Evert RF et Eichlorn SE. 2000.** *Biologie végétale.* 6ème Edition de boeck, Paris.

**Rhithu Rai, Prasanta K Dash, Trilochan Mohapatra & Aqbal Singh. 2012.** Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian Journal of Experimental Biology.* 50: 340-350.

**Rivas R, Laranjo M, Mateos PF, Oliveira S, Martinez-Molina E&Velázquez E. 2007.** Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Lett Appl Microbiol.* 44: 412- 418.

**Rivas R, Peix A, Mateos PF, Trujillo ME, Martínez-Molina E&Velázquez E. 2006.** Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil.* 287:23–33.

**Rivas R, Velázquez E, Willems A, Vizcaíno N, Subba-Rao NS, Mateos PF, Gillis M, Dazzo FB, et Martínez-Molina E. 2002.** A new species of *Devosia* that forms a nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Appl Environ Microbiol.* 68: 5217- 5222.

**Rogel M Antonio, Hernandez-LucasIsmael, Kuykendall L David, Balkwill David L and Martinez-RomeroEsperanza. 2001.** Nitrogen-Fixing Nodules with Ensifer adhaerensHarboring Rhizobium tropiciSymbioticPlasmids. *Applied and Environmental Microbiology.* p. 3264–3268.

**Rogel MA, Ormeno-Orrillo E, Martínez Romero E. 2011.** Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol.* 34: 96–104.

- Rolfe BG, Gresshoff PM. 1988.** Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 39 : 297-319.
- Rosenblueth M, Hynes MF, Martínez-Romero E. 1998.** *Rhizobium tropici* teu genes involved in specific uptake of *Phaseolus vulgaris* bean-exudate compounds. *Mol Gen Genet.* 258(6):587-98.
- Sadiki M et Halila H. 1997.** Les ressources génétiques des légumineuses à graines et leur utilisation dans les pays du pourtour mediterranéen. Colloque de l'INRA Rance. 33 p.
- Sanjuan J & Olivares J. 1989.** Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. *Journal of Bacteriology.* 171: 4154-4161.
- Santos MA, Nicola's MF and Hungria M. 2006.** Identification of QTL associated with the symbiosis of *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* and soybean. *Pesq. Agrop. Bras.* 41: 67 -75.
- Sawada H, Kuykendall LD and Young JM. 2003.** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol.* 49: 155-179.
- Saxena MC, Singh K B. 1987.** The chickpea. Ed- CAB internat. 399 p.
- Sbabou L, Regragui A, Filali-Maltouf A, Ater M, Bena G. 2016.** Local genetic structure and world wide phylogenetic position of symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strains associated with a traditional cultivated crop, *Vicia ervilia*, from Northern Morocco. *Syst Appl Microbio.* 39 :409-147.
- Schaefer M, Schauerma NNJ. 1990.** The soil fauna of beech forests: comparison between a mull and a moder soil. *Pedobiologia.* 34: 299-314.
- Schlöter M, Dilly O et Munch JC. 2003.** Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosystems Environ.* 98 : 255-262.
- Segovia L, Young J P W and Martinez-Romero K. 1993.** Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoh* type 1 strains as *Rhizobium eth sp. nov.* In. *J Sys Bacterio.* 43 : 374-377.
- Shaharoon B, Arshad M et Zahir ZA. 2006.** Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett Appl Microbiol.* 42: 155-159.
- Shahzad MS, Khalid A, Arshad M, Khalid M and Mehboob I. 2008.** Integrated use of plant growth promoting bacteria and P-enriched compost for improving growth, yield and nodulation of chickpea. *Pak. J. Bot.* 40: 1735-144.
- Sharma HC, Sharma KK and Crouch JH. 2004.** Genetic transformation of crops for insect resistance: Potential and limitations. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 23: 47-72.
- Sharma P and Sharma P. 2008.** Biological Nitrogen fixation: Legume-rhizobium physiology, phytohormone mediated response to nodulation and nitrogen fixation. In: Malik C.P., Kaur B., Wadhvani C. (eds): *Advanced Topics in Biotechnology and Plant Biology*, M.D. Publications Pvt. Ltd, New Delhi. pp: 399-445.
- Sharma PK, Kundu BS, Dogra RC. 1993.** Molecular mechanism of host specificity in legume *Rhizobium* symbiosis. *Biotechnol. Adv.* 11:714-779.

- Silva C, Vinuesa P, Eguiarte LE, Esperanza-Martinez R and Souza V. 2003.** *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico, population genetics and biographic implications. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 884-893.
- Silva Claudia, Feng Ling Kan, Esperanza Martinez-Romero. 2007.** Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago.spp.* in Mexico *J Microbiology Ecology*. 60 : 477-489.
- Simms EL, Taylor DL, Povich J, Shefferson RP, Sachs JL, Urbina M and Tausczik Y. 2006.** An empirical test of partner choice mechanisms in a wild legume-rhizobium interaction. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 3: 77-81.
- Simms EL, Taylor DL. 2002.** Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legumes and rhizobia. *Integrative and Comparative Biology*.42: 369-380.
- Singh F and Diwakar B. 1995.** Chickpea Botany and production Practices. Skill Development series ICRISAT India. 16: 502-324.
- Singleton PW, E1 Swaify SA and Bohlool BB. 1982.** Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Env. Micr.* 44(4) : 884-890.
- Slattery JF, Coventry DR. and Slattery WJ. 2001.** Rhizobial ecology as affected by soil environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 41: 289-298.
- Somasegaran P and Hoben HJ. 1994.** Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobia technology. In Springer-Verlag. New York. 450 p.
- Soumare Abdoulaye, Diop Tahir, Lahcen Ouahmane, Bassene Gora, Duponnois Robin, Ibrahima Ndoye. 2013.** Impact de *Eucalyptus camaldulensis* sur la diversité des rhizobiums associés à *A.senegal* et *A. seyal* au Sénégal. *Journal of Applied Biosciences* 67:5183– 5193.
- Spaink, HP. 2000.** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 54: 257-288.
- Sritharan V and Barker RHJ.1991.** A simple method for diagnosing *M. tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. *Mol. Cell. Probes*. 5: 385–395.
- Stepkowski T, Czaplinska M, Miedzinska K, Moulin L. 2003.** The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. *Syst Appl Microbiol*. 26: 483-494.
- Stougaard J.2000.** Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant physiology* 124, 531-540.
- Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V. 2012.** Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microbial Ecology*. 63: 249–266.
- Sullivan JT and Ronson, CW. 1998.** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5145–5149 (with published erratum in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9059).

- Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, Scott DB, et Ronson CW. 1995.** Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 8985-8989.
- Sullivan JT, Trzebiatowski JR, Cruickshank RW, Gouzy J, Brown SD, Elliot RM, Fleetwood DJ, Mc Callum NG, Rossbach U, Stuart GS, Weaver JE, Webby RJ, de Bruijn FJ & Ronson CW. 2002.** Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Journal of Bacteriology*. 184: 3086-3095.
- Summerfield RJ, Hadley P, Roberts EH, Minchin FR and Rawthorne S. 1984.** Sensitivity of chickpea (*Cicer arietinum L.*) to hot temperatures during the reproductive period. *Exp. Agric.* 20: 77 - 93.
- Taffouo VD, Kouamou JK, Ngalangue LMT, Ndjeudji B, Akoa A. 2009.** Effects of salinity stress on growth, Ions partitioning and yield of some cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp.*) Cultivars. *Inter J Botany*. 5(2): 135-143.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 30: 2725–2729.
- Tan HW, Weir BS, Carter N, Heenan PB, Ridgway HJ .2012.** Rhizobia with 16S rRNA and nifH Similar to *Mesorhizobium huakuii* but Novel recA, glnII, nodA and nodC Genes are Symbionts of New Zealand Carmichaelinae. *PLoS ONE*. 7(10): e47677.
- Tarlera S, Jangid K, Ivester AH, Whitman WB, Williams MA. 2008.** Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. *FEMSMicrobiology Ecology*. 64: 129-140.
- 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.
- Thies JE, Singleton PW and Bohloo1 BB. 1991.** Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *App Environ Microbiol*. 57: 19-28.
- Thompson CC, ThompsonFL, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Dawyndt P& Swings J.2004.** Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 919-924.
- Thrall PH, Burdon JJ & Woods M. 2000.** Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian legumes: within and among genera interactions. *Journal of Applied Ecology*. 37: 52 – 65.
- Thrall PH, Hochberg ME, Burdon JJ & Bever J. 2007.** Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology and Evolution*. 22: 120 -126.
- Tian C, Wang E, Han T, Sui X, Chen, W. 2007.** Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. *Archives of Microbiology*. 188: 273-282.
- Tilak KVBR, Ranganayaki N, Pal KK, De R, Saxena AK, Shekhar Nautiyal C, Mittal S, Tripathi AK, Johri BN. 2005.** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*. 89: 136-150.

- Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF et Morra MJ. 2002.** Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol.* 68: 2161-2171.
- Toomsan B, Rupella OP, Mittal S, Dart PJ et Clark KW. 1984.** Counting *Cicer Rhizobium* using a plant infection technique. *Soil Soil Biochem.* 16(5): 503-507.
- Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL, Sorheim R, Michalsen J, Salte K. 1994.** Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E. (Eds.), *Beyond the Biomass*. Wiley, Chichester. pp: 39-48.
- Truchet O, Barker DG, Camut S, de Billy F, Vasse J and Huguet T. 1989.** *Alfalfa* nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol Gen Genet.* 219: 65-68.
- Turner SL and Young JP. 2000.** The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol.* 17(2): 309-19.
- Ueda T, Suga Y, Yahiro N and Matsuguchi T. 1995.** Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC segment *J Bacteriol.* 177: 468-472.
- Valérie Genot, Gilles Colinet, Vincent Brahy et Laurent Bock. 2009.** «L'état de fertilité des terres agricoles et forestières en région wallonne (adapté du chapitre 4 - sol 1 de " L'Etat de l'Environnement wallon 2006-2007 ")», *Biotechnol Agron Soc Environ.* 13(1): 121-138.
- Valverde A, Velázquez E, Gutiérrez C, Cervantes E, Ventosa A, Igual JM. 2003.** *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:1979-1983.
- Van Rhijn P & Vanderleyden J. 1995.** The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews.* 59: 124-142.
- Vance ED, Brookes PC and Jenkinson DS. 1987.** An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology et Biochemistry.* 19: 703-707.
- Varin S, Lemauiel-Lavenant S, Cliquet JB, Diquelou S, Padraic T and MichaelsonYeates T. 2009.** Functional plasticity of *Trifolium repens* L. in response to sulphur and nitrogen availability. *Plant Soil.* 317: 189-200.
- Vázquez M, Santana O & Quinto C. 1993.** The NodI and NodJ Proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Strains are Similar to Capsular Polysaccharide Secretion Proteins from Gram-Negative Bacteria. *Molecular Microbiology.* 8: 369-377.
- Vekemans X, Godden B, et Penninckx M. 1989.** Factor analysis of the relationships between several physico-chemical and microbiological characteristics of some Belgian agricultural soils. *Soil Biol Biochem.* 21: 53-58.
- Velázquez E, Igual JM, Willems A, Fernandez MP, Muñoz E, Mateos PF, Abril A, Toro N, Normand P, Cervantes E, Gillis M, Martínez-Molina E. 2001.** *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 1011-1021.
- Vernans V, Bautista, Rsaria G. Monsalud and Akira Yokota. 2010.** *Devosia yakushimensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 60 : 627-632.



- Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Maure L, Escarre J, Bena G, Brunel B, Cleyet- Marel JC. 2009.** *Mesorhizobium metallidurans* sp nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalcolours soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59: 850-855.
- Villegas MDC, Rome S, Maure L, Domergue O, Gardan L, Bailly X, Cleyet-Marel JC, Brunel B. 2006.** Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. *medicaginis*) of *S. meliloti*. *Syst Appl Microbiol.* 29:526–538.
- Vincent JM. 1970.** A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP handbook, no. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, England.
- Vincent JM. 1982.** The basic serology of rhizobia. In Nitrogen Fixation in Legumes, ed Vincent J.M. pp:13-26. Sydney. Academic Press.
- Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Werner D, Martínez-Romero E. 2005.** *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55: 569-575.
- Vinuesa P, Rojas-Jimenez K, Contreras-Moreira B, Mahna SK, Prasad BN, Moe H, Selvaraju SB, Thierfelder H, Werner D. 2008.** Multilocus Sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic Continent. *Appl Environ Microbiol.* 74: 6987-6996.
- Wang ET, van Berkum P, Sui XH, Beyene D, Chen WX, Martínez-Romero E. 1999.** Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 51-65.
- Wang FQ, Wang ET, Liu J, Chen Q, Sui XH, Chen WF, Chen WX. 2007.** *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57: 1192-1199.
- Wang Z, Brown JH, Tang Z and Fang J. 2009.** Temperature dependence, spatial scale, and tree species diversity in eastern Asia and North America. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:13388.
- Weir BS. 2012.** The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et Lae DJ. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173:697-703.
- Werner D. 1992.** Symbioses of Plants and Microbes. Chapman and Hall, London, New York. pp: 130-131.
- Werner D. 2005.** Production and biological nitrogen fixation of tropical legumes. In: Werner D and Newton W E. (eds) Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment, Springer, Netherlands. pp: 1-13.
- Wery J. 1986.** Le pois -chiche - des possibilités à exploiter. *Rev. Cultivar* (199). pp: 48- 49.
- Wielbo J. 2012.** Rhizobial communities in symbiosis with legumes: genetic diversity, competition and interactions with host plants. *Cent Eur J Biol.* 7: 363–372.
- Wilkinson HH & Parker MA. 1996.** Symbiotic speciali-zation and the potential for genotypic coexistence in a plant-bacterial mutualism. *Oecologia.* 108: 361- 367.

- Willems A, Coopman R, et Gillis M. 2001.** Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bra-dyrhizobium*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 623–632.
- Willems A, Fernández-López M, Muñoz-Adelantado E, Goris J, De Vos P, Martínez-Romero E, Toro N, et Gillis M. 2003.** Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* com.nov. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1207-1217.
- Williams PC and Singh U. 1987.** The chickpea nutritional quality and the evaluation of quality in breeding programmes. In : Saxena M. C., Singh K. B. (eds), The chickpea, CAB International Wellingford. UK. pp: 329-356.
- Wilson JK. 1926.** Legume bacteria population of the soil. *Journal of the American Society of Agronomy.* 18: 911-919.
- Xu Y, Murooka Y. 1995.** A large plasmid isolated from *Rhizobium huakuii* bv. renege that includes genes for both nodulation of *Astragalus sinicus* cv. Japan and nitrogen-fixation. *J Ferment Bioeng.* 80:276–9.
- Yadav J, Verma JP, Rajak VK, Tiwari KN. 2011.** Selection of Effective Indigenous *Rhizobium* Strain for Seed Inoculation of Chickpea (*Cicer aritenium* L.) Production. *Bacteriol J.* 1:24–30.
- Yan Ai Min, En Tao Wang, Feng Ling Kan, Zhi Yuan Tan, Xin Hua Sui, Barbara Reinhold-Hurek and Wen Xin Chen. 2000.** *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus spp.* in arid saline soils in Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50 : 1887–1891.
- 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.
- Yannarell AC and Triplett EW. 2005.** Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 227-239.
- Yelton MM, Yang SS, Edie SA, Lim ST. 1983.** Characterization of an effective salt-tolerant, fast growing-strain of *Rhizobium japonicum*. *J Gen Microbiol.* 129 : 1537-1547.
- 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) Willems *et al.* 2003 legitimate? Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53: 2107-2110.
- Young JP, Crossman L, Johnston A, Thomson N, Ghazoui Z, Hull K, Wexler M, Curson A, Todd J, Poole P, Mauchline T, East A, Quail M, 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 Biol.* 7: 34.

- Yuan CG, Jiang Z, Xiao M, Zhou E M, Kim CJ, Hozzein W N, Park D J, Zhi X Y and LI W J. 2016.** *Mesorhizobium sediminum* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 4797-4802.
- Zaat SA, Wijffelman CA, Mulders IHM, VanBrusse IAN, Lugtenberg BJJ. 1988.** Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes. *Plant Physiol.* 86:1298-303.
- Zablutowicz RM and Focht DD. 1981.** Physiological characteristics of cowpea rhizobia evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Appl Environ Microbiol.* 41: 679-685.
- Zahran HH, Sprent JL. 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(4): 968-989.
- Zahran HH. 2001.** Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and Biotechnology *J Biotechnol.* 91: 143-153.
- Zaidi A, Khan MS, Ahemad M and Oves M. 2009.** Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 56: 263-284.
- Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Cleyet-Marel JC, Gillis M, Dreyfus B, P. De Lajudie . 2004.** Characterization of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 27 : 380-395.
- Zhang JJ, Liu TY, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Zhang XX, Li Y, Li Y and Chen WX. 2012 (a).** *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62:2737–2742.
- Zhang JJ, Lou K, Jin X, Mao PH, Wang ET, Tian CF, Sui XH, Chen WF. & Chen WX. 2012(b).** Distinctive *Mesorhizobium* populations associated with *Cicer arietinum* L. in alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant Soil.* 353: 123–134.
- Zhang XX, Turner SL, Guo XW, Yang HJ, Debelle F, Yang GP, Dénarié J, Young JPW and Li FD. 2000.** The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. *Appl Environ Microbiol.* 66:2988–95.
- Zhang Yan Ming, Li Ying Jr, Chen Wen Feng , Wang En Tao, Tian Chang Fu, Li Qin Qin , Zhang Yun Zeng , Sui Xin Hua , and Chen Wen Xin . 2011.** Biodiversity and Biogeography of Rhizobia Associated with Soybean Plants Grown in the North China Plain . *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 77(18): 6331–6342.
- Zhao CT, Wang ET, Zhang YM, Chen WF, Sui XH, Chen WX, Liu HC and Zhang XX. 2012.** *Mesorhizobium silamurunense* sp. nov., isolated from root nodules of *Astragalus* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 2180-2186.
- Zheng WT, Li Y, Wang R, Sui XH, Zhang XX, Zhang JJ , Wang ET and Chen WX. 2013.** *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63: 2002-2007.
- Zhou J, Bruns M et Tiedje J. 1996.** DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol.* 62 : 316-322.

**Zhou PF, Chen WM, Wei GH. 2010.** *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. Int J Syst Evol Microbiol. 60: 2552-2556.

**Zhou S, Li Q, Jiang H, Lindström K and Zhang X. 2013.** *Mesorhizobium sangaii* sp. nov., isolated from the root nodules of *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii*. Int J Syst Evol Microbiol. 63: 2794-2799.

**Zhu H, Choi H-K, Cook DR, Shoemaker RC. 2005.** Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. Plant Physiology. 137: 1189-1196.

**Zhu Y J , Kun J , Chen Y L , Wang S K , Sui X H and Kang L H. 2015.** *Mesorhizobium acaciae* sp. nov., isolated from root nodules of *Acacia melanoxylon* R. Br Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65 : 3558-3563.

**Zribi K, Jeidi N, Mh amdi R, Aouani ME et Hu gu T. 2004.** Diversité génétique et polymorphisme symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* noduant *Medicago truncatula* en sols tunisiens des régions arides. In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM, pp: 1 49 -1 52 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62).

**Zurdo-Pineiro, Jose Luis, Rivas Raul, Trujillo Martha E, Vizcaino Nieves, Carrasco Jose Antonio Chamber, Manuel Palomares, Antonio Mateos, Pedro F, Martinez-Molina Eustoquio, Velazquez Encarna. 2007.** *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius*. in Spain Int J Syst Evol Microbiol. 57: 784-788.

# *Annexes*

## **ANNEXE 1 : Composition des milieux de culture, différentes solutions et Marqueurs de taille**

### **YEM (YeastExtract-Mannitol, Vincent, 1970)**

Mannitol : 2,5g

Extrait de levure : 0,35g

$K_2HPO_4, 3H_2O$  : 0,46g

$KH_2PO_4$  : 0,12g

$MgSO_4, 7H_2O$  : 0,46g

NaCl : 0,1g

Agar : 15g

Stériliser à 121°C pendant 20min.

### **YEMA R-C**

Il s'agit du milieu YEM +15g/l Agar + Rouge Congo à 0,025g/l.

## **Composition de la solution nutritive de la plante sans azote (g/l)**

### **Solution 1**

$CaCl_2, 2H_2O$  Calcium : 294,10

### **Solution 2**

$KH_2, PO_4$  Phosphore : 136,10

$MgSO_4, 7H_2O$  Magnésium : 194,21

$K_2SO_4$  Potassium : 87,00

### **Solution 3**

$MnSO_4, H_2O$  Manganèse : 0,338

$H_3BO_3$  Bore : 0,247

$ZnSO_4, 7H_2O$  Zinc : 0,288

$CuSO_4, 5H_2O$  Cuivre : 0,1

$CoSO_4, 7H_2O$  Cobalt : 0,056

#### **Solution 4**

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O Molybdène : 0,048

#### **Solution 5**

Na<sub>2</sub>Fe EDTA Fer : 6,48

Prendre 5ml de chaque solution 1 à 5 et les mélanger dans 5 litres d'eau distillée. Le pH doit être ajusté entre 6,6 et 6,8 avec du NaOH 1N. Compléter ensuite le volume jusqu'à 10 litres. Pour la solution nutritive azotée, ajouter du KNO<sub>3</sub> à 0,05% (w/v) de la solution nutritive Préparée.

#### **Préparation des solutions du tampon de lyse**

- Solution de SDS 10% : dissoudre 2g de SDS dans 16ml H<sub>2</sub>O sous agitation magnétique, Compléter à 20ml avec du H<sub>2</sub>O.

- Solution de NaOH 5N : dissoudre 5g de NaOH dans 16ml H<sub>2</sub>O sous agitation magnétique, Compléter à 20ml avec du H<sub>2</sub>O.

Préparer une solution de NaOH 0,1N et 0,5% SDS en prélevant 10µl de NaOH 5N et 25µl de SDS 10% et compléter avec de l'eau bidistillée stérile à 500µl.

Le mélange doit être à chaque fois fraîchement préparé.

#### **Composition du tampon Tris-EDTA (10 :1)**

Préparer des solutions de 1M Tris (pH 8,0) et 0,5M EDTA.

Pour une solution TE (10 :1), mélanger - 1ml de Tris 1M

- 200µl d'EDTA 0,5M

- 988µl d'eau bidistillée stérile

- Stériliser à 121°C pendant 20min. et conserver à température ambiante.

#### **Composition du tampon de charge**

Préparer en mélangeant les composés suivants :

- 0,25% bleu de bromophénol

- 50% glycérol

- 50% TE (10 :1)

- Conserver à -20°C.

**Composition du tampon Tris – Borate – EDTA (solution 10X concentrée)**

Préparer en mélangeant:

- 109g de Tris
- 55,7g d'acide borique
- 9,3g d'EDTA

Mélanger les différents poids dans 1 litre H<sub>2</sub>O bi distillée, Stériliser à 121°C pendant 20min. et conserver à température ambiante.

**Préparation du Bromure d'Ethidium (1mg/ml)**

- Dissoudre 10mg de Bromure d'Ethidium dans 10ml d'eau bi distillée.
- Mettre la préparation dans une bouteille noire ou envelopper avec du papier aluminium.
- Conserver à température ambiante ou à 4°C.

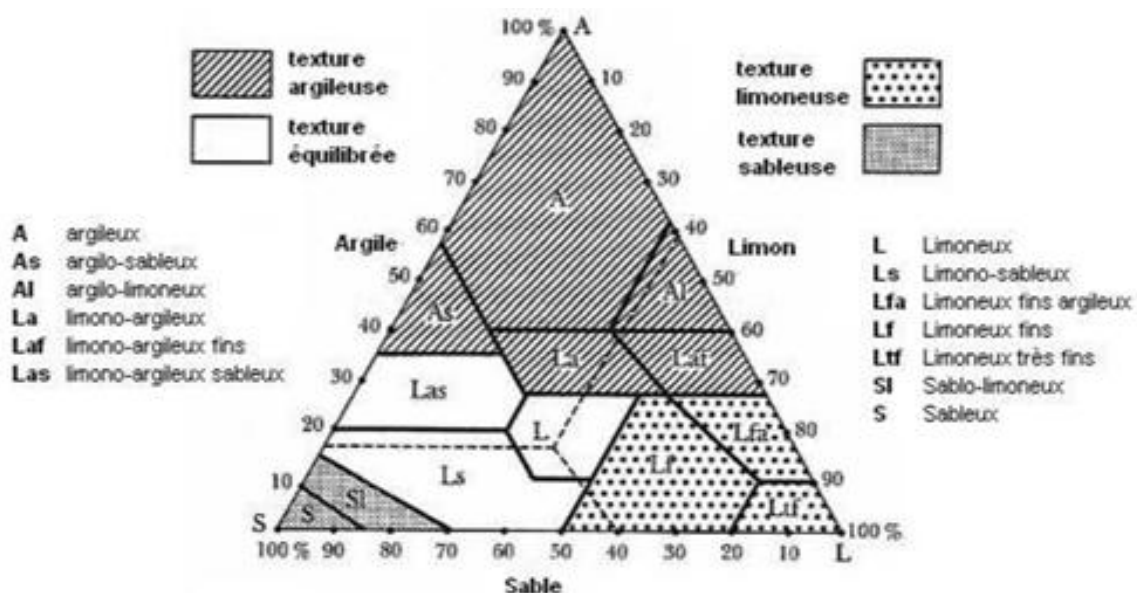
Attention : ce produit est très cancérigène, mettre des gants et un masque avant toute manipulation en évitant les courants d'air car la poudre est très légère.



## Annexe 2 : Analyse du sol

**Tableau 1 : Diagramme triangulaire des classes texturales de sol (d'après les dimensions des particules USDA)**

Texture du sol (pourcentage, poids sec) basé sur la classification granulométrique USDA (US département of agriculture)				
Appellation courante des sols	Sable	Limon	Argile	Classe texturale
<b>Sols sableux</b>	86-100	0-14	0-10	<b>Sable</b>
(Texture grossière)	70-86	0-30	0-15	<b>Sable limoneux</b>
<b>sols limoneux</b> (texture modérément grossière)	50-70	0-50	0-20	<b>limon sableux</b>
<b>sols limoneux</b> (texture moyenne)	23-52	28-50	7- 27	<b>Limon</b>
	20-50	74-88	0- 27	<b>Limon silteux</b>
	0-20	88-100	0-12	<b>limon très fin (Silt)</b>
<b>sols limoneux</b> (texture modérément fine)	20-45	15-52	27-40	<b>Limon-argileux</b>
	45-80	0-28	20-35	<b>Limon-sablo-argileux</b>
	0-20	40-73	27-40	<b>Limon-silto-argileux</b>
<b>Sols argileux</b> (Texture fine)	45-65	0-20	35-55	<b>Argile sableuse</b>
	0-20	40-60	40-60	<b>Argile silteuse</b>
	0-45	0-40	40-100	<b>Argile</b>



**Figure 1 : Diagramme triangulaire des classe texturales de sol d'après les dimensions des particules USDA (Masson, 2012)**

**Tableau n° 2 : Echelle d'interprétation du pH eau selon (GAGNARD et al., 1988)**

pH eau	< 5,5	5,5 - 6,5	6,5 - 6,8	6,8 - 7,2	7,2 - 7,5	7,5 - 8,5	> 8,5
appréciation	Fortement acide	acide	Très légèrement acide	Voisin de la neutralité	Légèrement alcalin	alcalin	Fortement alcalin

**Tableau 3: paramètres chimiques et physiques des différents sites**

Sites	Climat	pH	Argile (%)	Limon (%)	sable (%)
Tebessa	Semi arid	8.2	31	32	37
Still	Arid	7.2	14	10	76
Hassi Messaoud	Arid	7.4	11	22	67
Batna	Semi arid	7.6	31	36	33
N'gaous	Semi arid	8.2	24	24	51
Biskra	Arid	7.7	18	15	67
Jijel	humid	8.1	24	16	59
Merouana	Semi arid	7.8	36	26	38
Constantine	Semi arid	7,9	71	15	13

### Annexe 3: Calcul du NPP

**Tableau 4: Equivalent d'1 g de sol frais en sol sec**

	Equivalent d'1 g de sol frais en sol sec
Constantine	0,906
Batna	0,98
Marouana	0,922
Hassi Messaoud	0,984
N'Gaous	0,97
Still	0,964
Jijel	0,989
Biskra	0,936
Tebessa	0,942

**Tableau 5: Nombre de pots montrant des nodules**

Sites	nombre de pots montrant les nodules/Dilution								Nombre total des pots positifs
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	
Constantine	2	2	1	2	2	3	0	0	12
Batna	2	3	3	2	0	0	0	0	10
Merouana	0	2	2	4	0	0	0	0	8
Hassi Messaoud	0	2	3	0	0	0	0	0	5
N'gaous	0	2	0	2	2	0	0	0	6
Still	1	3	2	2	0	0	0	0	8
Jijel	0	4	3	1	3	3	0	0	14
Biskra	4	3	2	3	3	0	0	0	15
Tebessa	0	1	4	3	2	0	0	0	10

**Tableau 6: Table de Cochra (calcul de l'intervalle de confiance du NPP selon les dilutions)**

No. of samples per dil. <i>n</i>	Factor for 95% confidence limits Dilution ratio (a)			
	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

**Tableau 7 : Nombre de rhizobium estimé par la méthode MPN (Vincent, 1970), Dilution par un facteur de dix (Table de Yates et Fisher, 1963).**

Tubes positifs		Etape de dilution (s)			
n=4 40	n=2 20	s=10 $7 \times 10^8$			
39					
38	19	6.9			
37		3.4			
36	18	1.8			
35		1.0			
34	17	$5.9 \times 10^7$			
33		3.1			
32	16	1.7	s=8 $7 \times 10^6$		
31		1.0			
30	15	$5.8 \times 10^6$	6.9		
29		3.1	3.4		
28	14	1.7	1.8		
27		1.0	1.0		
26	13	$5.8 \times 10^5$	$5.9 \times 10^5$		
25		3.1	3.1		
24	12	1.7	1.7	s=6 $7 \times 10^4$	
23		1.0	1.0		
22	11	$5.8 \times 10^4$	$5.8 \times 10^4$	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	$5.8 \times 10^3$	$5.8 \times 10^3$	$5.9 \times 10^3$	
17		3.1	3.1	3.1	
16	8	1.7	1.7	1.7	s=4 $7 \times 10^2$
15		1.0	1.0	1.0	
14	7	$5.8 \times 10^2$	$5.8 \times 10^2$	$5.8 \times 10^2$	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	$5.8 \times 10^1$	$5.8 \times 10^1$	$5.8 \times 10^1$	$5.9 \times 10^1$
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	$5.8 \times 1$	$5.8 \times 1$	$5.8 \times 1$	$5.8 \times 1$
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

**Tableau 8 : calcul du NPP par site**

	M (n=4et s=8) Cellules/g de sol frais	NPP /faible dilution ( $10^{-1}$ ) (NPP/g sol frais)	NPP /g sol sec	NPP( $10^3$ )	Interval de confiance du NPP pour f=3,80
Constantine	$1,7 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^3$	$1,88 \cdot 10^3$	$1,88 \cdot 10^3$	$[0,49 \cdot 10^3 - 7,14 \cdot 10^3]$
Batna	$5,8 \cdot 10^1$	$5,8 \cdot 10^2$	$5,92 \cdot 10^2$	$0,592 \cdot 10^3$	$[0,15 \cdot 10^3 - 2,25 \cdot 10^3]$
Merouana	$1,7 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^2$	$1,84 \cdot 10^2$	$0,184 \cdot 10^3$	$[0,05 \cdot 10^3 - 0,70 \cdot 10^3]$
Hassi Messaoud	3,1x1	3,1.10	3,15.10	$0,0315 \cdot 10^3$	$[0,008 \cdot 10^3 - 0,12 \cdot 10^3]$
N'gaous	5,8x1	5,8x10	5,98.10	$0,0598 \cdot 10^3$	$[0,016 \cdot 10^3 - 0,23 \cdot 10^3]$
Still	$1,7 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^2$	$1,76 \cdot 10^2$	$0,176 \cdot 10^3$	$[0,046 \cdot 10^3 - 0,67 \cdot 10^3]$
Jijel	$5,8 \times 10^2$	$5,8 \times 10^3$	$5,86 \cdot 10^3$	$5,86 \cdot 10^3$	$[1,54 \cdot 10^3 - 22,27 \cdot 10^3]$
Biskra	$10^3$	$10^4$	$1,07 \cdot 10^4$	$10,7 \cdot 10^3$	$[2,81 \cdot 10^3 - 40,66 \cdot 10^3]$
Tebessa	5,8.10	$5,8 \cdot 10^2$	$5,89 \cdot 10^2$	$0,589 \cdot 10^3$	$[0,15 \cdot 10^3 - 2,24 \cdot 10^3]$

M : nombre de rhizobia estimé par l'infection de plantes pour 1 ml de dilution, n : nombre de répétitions, s : nombre de dilutions

## Annexe 4 : Caractérisation moléculaire

Tableau 9 : Affiliation par Blast et géotypes des bactéries *Mesorhizobium* selon les locus (23isolats)

Isolats	Site	V	16S			recA			IGS			nodC			nifH		
			Affiliation	SD %	Gn	Affiliation	SD %	Gn	Affiliation	SD %	Gn	Affiliation	SD %	Gn	Affiliation	SD %	Gn
Sam 122	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP100</i>	99	g4	<i>M. sp. CCANP113</i>	100	r4	<i>M. sp. 85-Elvas</i>	99	i5	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	99	h3
Sam80	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP100</i>	91	g4	<i>M. opportunistum WSM2075</i>	99	r7	<i>M. sp. PM-I-6-Portimao</i>	98	i4	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	99	h3
Sam96	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP100</i>	99	g4	<i>M. sp. CCANP113</i>	99	r4	<i>M. sp. 85-Elvas</i>	96	i5	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	99	h3
Sam130	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP100</i>	99	g4	<i>M. opportunistum WSM2075</i>	98	r6	<i>M. sp. PM-I-6-Portimao</i>	98	i4	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	98	h3
Sam93	Jijel	III	<i>M. sp. ISA0605</i>	99	g5	<i>M. loti MAFF303099</i>	94	r2	<i>M. amorphae RCAN10</i>	100	i2	/	/	/	<i>M. ciceri CPN52</i>	99	h2
Sam104	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP100</i>	99	g4	<i>M. opportunistum WSM2075</i>	98	r5	MD	/	/	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	99	h3
Sam106	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP122</i>	99	g2	<i>M. tamadayense</i>	96	r2	<i>M. sp. CCBAU 11270</i>	87	i2	<i>M. ciceri CPN39</i>	99	n3	<i>M. ciceri USDA 3378</i>	99	h3
Sam125	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP122</i>	99	g2	<i>M. tamadayense</i>	96	r2	<i>M. sp. CCBAU 11270</i>	87	i2	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n3	<i>M. ciceri CPN34</i>	99	h3
Sam56	Jijel	III	<i>M. sp. STM 4664</i>	99	g1	<i>M. sp. GAC138P</i>	99	r1	<i>M. gobiense CCBAU 83346</i>	98	i1	<i>M. mediterraneum CPN16</i>	99	n1	<i>M. ciceri CPN45</i>	100	h1
Sam75	Jijel	I	<i>M. sp. STM 4664</i>	98	g1	<i>M. sp. GAC138P</i>	99	r1	<i>M. gobiense CCBAU 83346</i>	98	i1	<i>M. mediterraneum CPN16</i>	99	n1	<i>M. ciceri CPN45</i>	99	h1
Sam78	Jijel	I	<i>M. sp. STM 4664</i>	99	g1	<i>M. sp. GAC138P</i>	99	r1	<i>M. gobiense CCBAU 83346</i>	98	i1	<i>M. mediterraneum CPN16</i>	99	n1	<i>M. ciceri CPN45</i>	99	h1
Sam77	Jijel	III	<i>M. sp. STM 4664</i>	99	g1	<i>M. sp. GAC138P</i>	99	r1	<i>M. gobiense CCBAU 83346</i>	97	i1	<i>M. mediterraneum CPN16</i>	99	n1	<i>M. ciceri CPN45</i>	99	h1
Sam76	Jijel	III	<i>M. sp. STM 4664</i>	99	g1	<i>M. sp. GAC138P</i>	99	r1	<i>M. gobiense CCBAU 83346</i>	98	i1	<i>M. mediterraneum CPN16</i>	99	n1	<i>M. ciceri CPN45</i>	99	h1
Sam123	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	<i>M. sp. CCANP79</i>	98	r8	<i>M. ciceribiovarbi serrulae WSM1271</i>	90	i6	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN52</i>	99	h2
Sam144	Merouana	I	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	<i>M. sp. CCANP79</i>	99	r9	<i>M. ciceri CV-16-Elvas</i>	100	i8	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	100	h3
Sam126	Constantine	III	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	<i>M. sp. CCANP79</i>	99	r9	<i>M. ciceri CV-16-Elvas</i>	100	i8	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	99	h3
Sam102	Constantine	III	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	<i>M. sp. CCANP79</i>	100	r9	<i>M. ciceri CV-16-Elvas</i>	100	i8	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	100	h3
Sam116	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	<i>M. sp. CCANP79</i>	98	r8	<i>M. ciceribiovarbi serrulae WSM1271</i>	90	i6	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN52</i>	99	h2
Sam121	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	<i>M. sp. CCANP79</i>	98	r8	<i>M. ciceri biovarbiserrulae WSM1271</i>	99	i6	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN52</i>	100	h2
Sam 105	Jijel	II	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	<i>M. ciceribiovarbiserrulae WSM1271</i>	99	r10	<i>M. ciceri CV-16-Elvas</i>	99	i8	<i>M. ciceri CPN34</i>	99	n2	MD	/	/
Sam156	Tébessa	III	<i>M. sp. CCANP93</i>	98	g5	<i>M. ciceribiovarbi serrulae WSM1271</i>	99	r10	MD	/	/	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	99	h3
Sam154	Batna	III	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	<i>M. ciceribiovarbiserrulae WSM1271</i>	99	r10	<i>M. ciceri CV-16-Elvas</i>	99	i8	<i>M. ciceri Rch-10B</i>	99	n2	<i>M. ciceri CPN34</i>	100	h3
Sam131	Jijel	III	<i>M. sp. CCANP93</i>	99	g5	MD	/	/	<i>M. loti 75-Elvas</i>	91	i7	MD	/	/	MD	/	/

V : variété, SD : similitude, GN : génotype

## Annexes

**Tableau 10: Affiliation et géotypes des isolats *Ensifer* selon les locus**

			Affiliation selon les locus (52)											
			16S			recA			IGS			nifH		
isolat	Site	V	souche	SD %	GN	souche	SD %	GN	souche	SD%	GN	souche	SD %	GN
Sam2	Biskra	III	E. meliloti(SMX43-2)	100	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	99	iE7	/	/	/
Sam37	Biskra	III		100	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	/	/	/
Sam10	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9868	98	hE7
Sam19	Marouana	I		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/
Sam26	Marouana	I		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE4	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9868	99	hE7
Sam51	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/
Sam55	Batna	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	/	/	/
Sam57	N'Gaous	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	100	iE3	/	/	/
Sam60	Batna	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	/	/	/
Sam61	Batna	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9813	91	hE3
Sam62	Batna	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9868	98	hE8
Sam64	N'Gaous	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	100	iE3	/	/	/
Sam68	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	100	iE3	/	/	/
Sam70	Batna	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9813	99	hE6
Sam71	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	/	/	/
Sam72	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/
Sam74	N'Gaous	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/
Sam81	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	100	iE3	/	/	/
Sam82	Batna	III		99 %	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	/	/	/
Sam83	Batna	III		99 %	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	/	/	/
Sam84	N'Gaous	III	99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	100	iE3	/	/	/	
Sam86	Batna	III	99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE11	/	/	/	
Sam92	N'Gaous	III	99 %	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100 %	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	100	iE10	/	/	/	
DS1	Biskra	III	99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> STM3164	100	rE3	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/	
DS50	Jijel	III	99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/	
Sam107	Batna	III	99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	/	/	/	

V : variété, SD : similitude, GN : géotype

Suite tableau 10: Affiliation et géotypes des isolats *Ensifer* selon les locus

			Affiliation selon les locus (52 isolats)												
			16S			recA			IGS			nifH			
isolat	Site	V	souche	SD %	GN	souche	SD %	GN	souche	SD %	GN	souche	SD %	GN	
Sam137	Batna	III	E. meliloti (SMX43-2)	99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> CCBAU 83392	84	iE8	/	/	/	
DS32	Batna	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83394	99	iE12	/	/	/	
DS47	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer fredii</i> USDA 257	90	iE1	/	/	/	
DS48	Tebessa	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/	
DS49	Biskra	I		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/	
DS66	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer fredii</i> USDA 257	86	iE13	/	/	/	
DS77	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/	
Sam88	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	/	/	/	
Sam85	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	/	/	/	
Sam89	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	/	/	/	
Sam90	Biskra	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	/	/	/	
DS53	Biskra	II		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	/	/	/	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9813	98	hE3	
DS30	Constantine	III		99	gE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer adhaerens</i> OV14	84	iE10	/	/	/	
Sam8	Biskra	III		99	gE2	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9868	98	hE5	
Sam54	Biskra	III		99	gE3	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	/	/	/	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9868	93	hE2	
DS51	Marouana	III		99	gE4	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/	
DS43	Biskra	I		99	gE4	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/	
DS76	Marouana	II		99	gE4	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> RTM17	99	iE6	/	/	/	
DS38	Biskra	III		99	gE4	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer arboris</i> LMG 14919	87	iE11	/	/	/	
DS24	Biskra	III		99	gE8	<i>Ensifer meliloti</i> STM3164	100	rE3	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9868	96	hE4	
DS52	Biskra	III		99	gE6	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	iE5	/	/	/	
DS39	Batna	III		99	gE6	<i>Ensifer meliloti</i> STM3164	100	rE3	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83394	99	iE12	/	/	/	
DS33	Batna	III		99	gE6	<i>Ensifer meliloti</i> 2011	100	rE1	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83394	99	iE12	/	/	/	
DS37	Tebessa	III		99	gE6	<i>Ensifer meliloti</i> E4n5	100	rE2	<i>Ensifer sp.</i> CCBAU 83081	84	iE9	/	/	/	
DS63	Biskra	III		E. meliloti (MB12)	99	gE5	<i>Ensifer meliloti</i> STM3164	100	rE3	<i>Ensifer fredii</i> USDA 257	90	iE1	<i>Ensifer sp.</i> Rch-9813	98	hE1
DS42	Biskra	III			99	gE7	<i>Ensifer meliloti</i> E4n5	100	rE2	<i>Ensifer fredii</i> USDA 257	90	iE1	/	/	/

V : variété, SD : similitude, GN : géotype

Tableau 11: Affiliation et géotypes des bactéries *Rhizobium/Agrobacterium*

Isolat	Site	V	Affiliation selon le locus (26 isolats)								
			16S			recA			IGS		
			souche	SD	GN	souche	SD	GN	souche	SD	GN
Sam12	Merouana	III	<i>Rhizobium sp. 4.11</i>	99%	gr5(R)	/	/	/	<i>Rhizobium giardinii</i> H 152	88%	ir11(R)
DS75	Merouana	II	<i>Rhizobium sp. RS3-4 B</i>	98%	gr7(R)	/	/	/	<i>Rhizobium giardinii</i> H 152	93%	ir10(R)
Sam30	Tébessa	II	<i>Rhizobium sp. M51</i>	99%	gr 8(R)	/	/	/	<i>Rhizobium sp.</i> IRBG74	81%	ir13(R)
Sam145	Batna	I	<i>Rhizobium sp. 8_55</i>	98%	gr9(R)	/	/	/	<i>Agrobacterium tumefaciens IAM</i> 1526	99%	ir1
Sam 94 (S24)	Tébessa	III	<i>Rhizobium multihospitium MIR-6</i>	98%	gr10(R)	/	/	/	/	/	/
Sam91	Biskra	III	<i>Rhizobium yanglingense</i> strain SPT1	98%	gr11(R)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1689	90%	rr2(R)	<i>Rhizobium gallicum R</i> 602	98%	ir12(R)
Sam29	Merouana	III	<i>Agrobacterium</i> sp. APW2	99%	gr 2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 0363	99%	rr4	<i>Rhizobium sp.</i> IRBG74	81%	ir9(R)
DS25	Tébessa	II	<i>Agrobacterium</i> sp. APW2	99%	gr 2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 0363	99%	rr4	<i>Rhizobium sp.</i> Hcar01	84%	ir15(R)
Sam24	Tébessa	II	<i>Agrobacterium</i> sp. APW2	99%	gr2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 0363	99%	rr7	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NCPPB-1771	79%	ir5
DS3 (S3)	Constantine	III	<i>Agrobacterium</i> sp. APW2	97%	gr12	/	/	/	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NCPPB-1771	81%	ir14
DS16	Tébessa	I	<i>Agrobacterium</i> sp. APW2	99%	gr2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 0363	99%	rr4	<i>Rhizobium sp.</i> IRBG74	82%	ir9(R)
Sam50	Jijel	III	<i>Agrobacterium</i> sp. EC080527_02	97%	gr 13	/	/	/	/	/	/
DS15	Tébessa	II	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> YJARG-7	99%	gr14	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 2-1	99%	rr5	<i>Agrobacterium tumefaciens IAM</i> 1526	99%	ir1
Sam5	Jijel	II	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> YJARG-7	100%	gr1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 20-2	99%	rr8	<i>Agrobacterium tumefaciens IAM</i> 1526	99%	ir2
Sam49	Tébessa	I	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> RFP1	98%	gr3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 2-1	99%	rr5	<i>Agrobacterium tumefaciens IAM</i> 1526	99%	ir1
Sam40	Tébessa	II	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> RFP1	98%	gr3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 2-1	99%	rr5	<i>Agrobacterium tumefaciens IAM</i> 1526	99%	ir1
Sam4	Merouana	III	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> FF3	98%	gr4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> BF4	99%	rr6	<i>Agrobacterium tumefaciens MR4</i>	94%	ir3

V : variété, SD : similitude, GN : géotype



Suite Tableau 11: Affiliation et géotypes des bactéries *Rhizobium/Agrobacterium*

Affiliation selon le locus (26 isolats)											
			16S			recA			IGS		
Isolat	Site	V	souche	SD	GN	souche	SD	GN	souche	SD	GN
Sam28	Merouana	III	<i>Agrobacteriumtumefaciens FF3</i>	95%	gr21	<i>Agrobacterium tumefaciens CFBP 7129</i>	99%	rr3	<i>Rhizobium sp. IRBG74</i>	80%	ir8(R)
Sam32	Tébessa	II	<i>Agrobacteriumtumefaciens E11-1</i>	99%	gr6	<i>Agrobacterium tumefaciens 0363</i>	98%	rr4	<i>Rhizobium sp. IRBG74</i>	81%	ir9(R)
Sam33	Tébessa	II	<i>Agrobacteriumtumefaciens E11-1</i>	99%	gr6	<i>Agrobacterium tumefaciens 0363</i>	99%	rr4	<i>Rhizobium sp. IRBG74</i>	82%	ir9(R)
DS26	Tébessa	III	<i>Agrobacteriumtumefaciens NGB-SR10</i>	99%	gr15	/	/	/	/	/	/
Sam7	Tébessa	II	<i>Agrobacteriumtumefaciens A78</i>	99%	gr16	<i>Agrobacterium tumefaciens 0363</i>	99%	rr4	<i>Agrobacteriumtumefaciens NCPPB-1771</i>	79%	ir6
Sam39	Tébessa	II	<i>Agrobacteriumtumefaciens 7405</i>	97%	gr17	<i>Agrobacterium tumefaciens 0363</i>	99%	rr10	<i>Agrobacteriumtumefaciens NCPPB-1771</i>	81%	ir7
Sam48	Tébessa	III	<i>Agrobacteriumtumefaciens TA-AT-10</i>	99%	gr18	/	/	/	<i>Agrobacteriumtumefaciens IAM 1526</i>	99%	ir4
DS13	Tébessa	III	<i>Agrobacteriumtumefaciens NGB-FR-34</i>	98%	gr19	<i>Agrobacterium tumefaciens 2-1</i>	98%	rr 9	<i>Agrobacteriumtumefaciens IAM 1526</i>	99%	ir1
DS64	Constantine	III	<i>Agrobacteriumtumefaciens isolate Y36</i>	97%	gr20	<i>R.meliloti</i>	99%	rr1(R)	<i>Agrobacteriumtumefaciens IAM 1526</i>	99%	ir1

V : variété, SD : similitude, GN : géotype

Tableau 12 : Affiliation et géotypes des bactéries *Burkholderia*

Affiliation selon les locus (11 isolats)											
			16S			recA			IGS		
Souche	Site	V	Affiliation	SD %	GN	Affiliation	SD %	GN	Affiliation	SD %	GN
SAM110	Jijel	III	<i>Burkholderia sp. CCBAU 25371</i>	99	gb1	<i>Burkholderia terricola LMG 20594</i>	99	rb2	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	89	ib8
SAM129	Jijel	III	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	99	gb2	/	/	/	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	98	ib9
SAM87	Jijel	III	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	99	gb2	/	/	/	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	89	ib6
SAM11	Jijel	III	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	99	gb3	<i>Burkholderia terricola LMG 20594</i>	93	rb2	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	89	ib1
SAM36	Jijel	III	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	99	gb3	<i>Burkholderia terricola LMG 20594</i>	99	rb2	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	88	ib1
SAM117	Jijel	III	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	99	gb4	<i>Burkholderia terricola LMG 20594</i>	99	rb3	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	87	ib3
SAM97	Jijel	III	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	99	gb4	<i>Burkholderia terricola LMG 20594</i>	99	rb3	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	88	ib2
Sam146	Batna	I	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	99	gb5	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	97	rb4	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	89	ib1
SAM111	Jijel	III	<i>Burkholderiaceae bacterium SMT4a</i>	99	gb7	<i>Burkholderia terricola LMG 20594</i>	99	rb2	<i>Uncultured Burkholderia sp. clone 3_M09</i>	89	ib7
DS44	Merouana	III	<i>Burkholderia sp. Ah3_2.3</i>	99	gb6	<i>Burkholderia fungorum DBT1</i>	99	rb1	<i>Burkholderia sp. JNR106</i>	91	ib4
SAM18	Constantine	III	<i>Burkholderia sp. Ah3_2.3</i>	99	gb6	<i>Burkholderia fungorum DBT1</i>	99	rb1	<i>Burkholderia sp. JNR106</i>	91	ib5

V : variété, SD : similitude, GN : géotype

**Tableau 13: Souches du *Mesorhizobium* et Numéros d'accèsion des séquences dans Gene Bank selon les locus**

IGS.sqn	SAM75	KU894815	nifH.sqn	SAM130	KU894850	recA.sqn	SAM121	KU894888
IGS.sqn	SAM77	KU894816	nifH.sqn	SAM144	KU894851	recA.sqn	SAM122	KU894889
IGS.sqn	SAM56	KU894817	nifH.sqn	SAM154	KU894852	recA.sqn	SAM123	KU894890
IGS.sqn	SAM76	KU894818	nifH.sqn	SAM156	KU894853	recA.sqn	SAM126	KU894891
IGS.sqn	SAM78	KU894819	nifH.sqn	SAM96	KU894854	recA.sqn	SAM130	KU894892
IGS.sqn	SAM80	KU894820	nifH.sqn	SAM125	KU894855	recA.sqn	SAM144	KU894893
IGS.sqn	SAM102	KU894821	nifH.sqn	SAM106	KU894856	recA.sqn	SAM96	KU894894
IGS.sqn	SAM116	KU894822	nodC.sqn	SAM75	KU894857	recA.sqn	SAM154	KU894895
IGS.sqn	SAM121	KU894823	nodC.sqn	SAM77	KU894858	recA.sqn	SAM156	KU894896
IGS.sqn	SAM122	KU894824	nodC.sqn	SAM56	KU894859	recA.sqn	SAM125	KU894897
IGS.sqn	SAM123	KU894825	nodC.sqn	SAM76	KU894860	recA.sqn	SAM106	KU894898
IGS.sqn	SAM126	KU894826	nodC.sqn	SAM78	KU894861	recA.sqn	SAM105	KU894899
IGS.sqn	SAM130	KU894827	nodC.sqn	SAM80	KU894862	recA.sqn	SAM93	KU894900
IGS.sqn	SAM144	KU894828	nodC.sqn	SAM102	KU894863	16S.sqn	SAM75	KU894901
IGS.sqn	SAM96	KU894829	nodC.sqn	SAM104	KU894864	16S.sqn	SAM77	KU894902
IGS.sqn	SAM154	KU894830	nodC.sqn	SAM116	KU894865	16S.sqn	SAM56	KU894903
IGS.sqn	SAM125	KU894831	nodC.sqn	SAM121	KU894866	16S.sqn	SAM76	KU894904
IGS.sqn	SAM106	KU894832	nodC.sqn	SAM122	KU894867	16S.sqn	SAM78	KU894905
IGS.sqn	SAM105	KU894833	nodC.sqn	SAM123	KU894868	16S.sqn	SAM80	KU894906
IGS.sqn	SAM93	KU894834	nodC.sqn	SAM126	KU894869	16S.sqn	SAM102	KU894907
IGS.sqn	SAM131	KU894835	nodC.sqn	SAM130	KU894870	16S.sqn	SAM104	KU894908
nifH.sqn	SAM75	KU894836	nodC.sqn	SAM144	KU894871	16S.sqn	SAM116	KU894909
nifH.sqn	SAM77	KU894837	nodC.sqn	SAM154	KU894872	16S.sqn	SAM121	KU894910
nifH.sqn	SAM77	KU894837	nodC.sqn	SAM156	KU894873	16S.sqn	SAM122	KU894911
nifH.sqn	SAM56	KU894838	nodC.sqn	SAM96	KU894874	16S.sqn	SAM123	KU894912
nifH.sqn	SAM76	KU894839	nodC.sqn	SAM7	KU894875	16S.sqn	SAM126	KU894913
nifH.sqn	SAM78	KU894840	nodC.sqn	SAM125	KU894876	16S.sqn	SAM130	KU894914
nifH.sqn	SAM80	KU894841	nodC.sqn	SAM106	KU894877	16S.sqn	SAM144	KU894915
nifH.sqn	SAM93	KU894842	nodC.sqn	SAM105	KU894878	16S.sqn	SAM96	KU894916
nifH.sqn	SAM102	KU894843	recA.sqn	SAM75	KU894879	16S.sqn	SAM7	KU894917
nifH.sqn	SAM104	KU894844	recA.sqn	SAM77	KU894880	16S.sqn	SAM154	KU894918
nifH.sqn	SAM116	KU894845	recA.sqn	SAM56	KU894881	16S.sqn	SAM156	KU894919
nifH.sqn	SAM121	KU894846	recA.sqn	SAM76	KU894882	16S.sqn	SAM125	KU894920
nifH.sqn	SAM122	KU894847	recA.sqn	SAM78	KU894883	16S.sqn	SAM106	KU894921
nifH.sqn	SAM123	KU894848	recA.sqn	SAM80	KU894884	16S.sqn	SAM105	KU894922
nifH.sqn	SAM126	KU894849	recA.sqn	SAM102	KU894885	16S.sqn	SAM93	KU894923
			recA.sqn	SAM104	KU894886			
			recA.sqn	SAM116	KU894887			

**Nom et prénom : Dekkiche Samia**

**Doctorat En sciences : Option Biochimie et Microbiologie appliquées**

**Titre Diversités taxonomique et moléculaire des rhizobiums nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) dans l'Est Algérien**

---

**Résumé :** Des bactéries nodulantes fixatrices d'azote du pois chiche ont été étudiées pour leur diversité et leur biogéographie en prenant en compte trois variétés d'hiver différentes comme plante hôte. L'étude a inclus neuf sites de l'Est Algérien sous différents climats et avec des sols présentant différentes caractéristiques physicochimiques. Afin d'exploiter ces sites dans un objectif agronomique, les bactéries nodulantes les plus efficaces dans ces régions sont recherchées. Des isollements bactériens ont ainsi été réalisés dans chacun des sites par piégeages. L'étude moléculaire qui a porté sur l'analyse des séquences de cinq fragments d'ADN : ADN<sub>r16S</sub>, *recA*, IGS 16S-23S, *nodC* et *nifH*, montre que les nodules sont occupés par une grande diversité de bactéries, que cela soient des rhizobiums ou des non rhizobiums.

Au sein des rhizobiums, quatre genres ont été identifiés: *Ensifer* (46%), *Rhizobium/Agrobacterium* (23%), *Mesorhizobium* (21%) et *Burkholderia* (10%), avec une diversité d'espèce dans chaque genre. Des grandes différences sont remarquées entre les sites et les variétés pour leur capacité à induire des nodules et d'engager un genre ou une espèce rhizobienne déterminé(e) comme symbiote. Une certaine spécificité est détectée entre les genres *Mesorhizobium* et *Burkholderia* avec le site de Jijel ainsi qu'entre le genre *Ensifer* et Biskra et entre le genre *Rhizobium* et Tébessa. Dans ce dernier couple, la variété II a donné le plus grand nombre de nodules alors que la capacité à former des nodules de la variété III est beaucoup plus élevée avec les trois autres genres. Malgré ces variations, aucune corrélation significative entre les caractérisations chimiques et physiques des échantillons de sol et celles du génotype de la plante n'a été trouvée.

Au sein du *Mesorhizobium*, au moins 5 géno-espèces différentes connues sont présentes (*M.ciceri*, *M. amorphae*, *M. gobiense*, *M. opportunistum* et *M. Tamayadense*). Certains isolats pourraient probablement représenter au moins une nouvelle espèce de *Mesorhizoium*, proche du complexe *M.ciceri/M.loti*. Contrairement aux séquences ADN<sub>r16S</sub>, IGS et *recA* qui présentent de la diversité moléculaire de séquence, la diversité symbiotique est faible. Ceci pourrait refléter une acquisition au sein de ces espèces des gènes symbiotiques par transfert latéral.

À notre connaissance, cette étude est la première évaluation systématique des rhizobiums de pois chiches en Algérie. Pour la première fois il est montré que les espèces *M. gobiens* et *M. tamadayense*, sont des symbiotes du pois chiche. Aussi, pour la première fois, il est révélé que le genre *Mesorhizobium* n'est pas dominant et la nodulation du pois chiche n'est pas limitée au genre *Mesorhizobium* et peut être réalisée par différents genres de rhizobiums, même si des études complémentaires sont nécessaires pour finaliser cet aspect. Cela ouvre des possibilités d'utilisation de souches bactériennes avec un large spectre d'espèces pour la sélection des partenaires symbiotiques fiables à la culture et au rendement du pois chiche en Algérie.

**Mots clés :** *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, ADN<sub>r16S</sub>, *recA*, IGS, *nodC*, *nifH*, pois chiche, diversité.