

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للعلوم الفلاحية – الحراش – الجزائر

Ecole National Supérieure Agronomique - El Harrach – Alger

Ecole Doctorale : Amélioration des Productions Végétales et Ressources Génétiques
مدرسة الدكتوراه : تحسين الإنتاج النباتي و الموارد الوراثية

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de magister en Agronomie

Spécialité : Amélioration des Productions Végétales et Ressources Génétiques

Thème

Caractérisation physiologique et moléculaire d'une collection de rhizobiums nodulant quatre espèces du genre *Hedysarum* L., en Algérie

Présenté par: **Elhadi BEZINI**

Devant le jury

Présidente: M^{me}: MEKLIICHE-HANIFI L. (Maître de conférences ; ENSA).
Directeur de thèse: M^r: ABDELGUERFI A. (Professeur ; ENSA).
Co-directeur de thèse : M^{me}: ABDELGUERFI-LAOUAR M. (Maître de Recherche ; INRAA).
Examineurs : M^r: AMRANI S. (Chargé de cours ; FSB/USTHB).
M^r: M'HAMMEDI BOUZINA M. (Maître de conférences ; Univ Chlef).

Promotion : 2007/2009

Soutenu le : 13 / 12/2010

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer en tout premier lieu mon profond remerciement à mes deux professeurs : Mr ABDELGUERFI Aïssa, professeur à l'ENSA, et M^{me} ABDELGUERFI-LAOUAR Meriem, Maître de recherche à l'INRAA-CRP Mehdi Boualem, pour le grand honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de m'encadrer, pour tous leurs conseils précieux, leurs orientations, leurs aides, leurs disponibilité tout au long de ce travail et surtout pour leurs gentillesse et leurs grande modestie.

Merci à M^{me} MEKLIICHE –HANTFI Leïla, Maître de conférence à l'ENSA, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, et à Mr M'HAMMEDI BOUZINA Mahfoud, Maître de conférence à l'université de Chlef d'avoir accepté de juger ce travail.

Un immense merci à Mr. AMRANI Saïd, chargé de cours à la FSB/USTHB, pour ses conseils scientifiques pertinentes et constructives qu'il m'a accordé et pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je suis très reconnaissant à M^{me} AMRANI S. du Laboratoire de Technologie Alimentaire à l'INRAA-CRP Mehdi Boualem pour son aide surtout au début de ce travail.

Je remercié ainsi Mr DJEBBAR R. et M^{me} DJABARA M. Chargés de cours à la FSB/USTHB pour leurs discussions scientifiques. Sans oublier de remercier mes amis BENDIFALLAH N., LAZALI M. et AMOKRANE M.Y. pour leurs aides et leurs encouragements.

Mes vifs remerciements vont également à tous les membres des différentes institutions et laboratoires où ce travail a été accompli:

- ↪ Le laboratoire de Physiologie Végétale et Améliorations des plantes de l'INRAA-CRP Mehdi Boualem, et spécialement à Saïd, Nadjeh, Dalha et Naïma et M^{me} Tiliouine.*
- ↪ Le laboratoire des Sciences du Sol de l'INRAA-CRP Mehdi Boualem,*
- ↪ Le département phytotechnie de l'ENSA en particulier à Mr OUNANE S.M Professeur chef de département et de l'Ecole Doctorale APVRG, M^{me} NOUAR S. responsable du laboratoire d'analyses du sol, et M^{me} ANISSA responsable de la bibliothèque.*

Un remerciement spécial à ma famille qui n'a jamais cessée de m'encourager même dans les moments difficiles.

Enfin, je n'oublierai pas de remercier toute personne ayant contribué de loin ou de près, ne serait ce qu'une proposition, un encouragement, ou une orientation à l'élaboration de ce travail.

E. BEZINI

LISTE DES ABBREVIATIONS

% :	pour cent
°C :	Degré Celsius
µl :	Microlitre,
µm :	Micromètre,
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
ATP:	Adénosine Tri-Phosphate
BET:	Bromure d'éthidium
BSA:	Sérum Albumine Bovine
BTB:	Bleu de bromotymol
bv:	Biovar
CaCl₂:	Chlorure de calcium
CE:	Conductivité Electrique
cm :	Centimètre,
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
dNTP:	Désoxyribonucléotides triphosphate
EDS:	Eau Distillée Stérile
Fig:	Figure
h:	Heure
kDa:	Kilodalton
m :	Mètre
ml :	Millilitre
mm :	Millimètre,
mM:	Milli-molaire
MPa:	Mégapascal
mS:	Millisiemens
MT:	Millions de tonnes
NaCl:	Chlorure de sodium
pb:	Paire de base
PCR:	Réaction en chaîne par polymérase
PEG₆₀₀₀:	PolyEthylène Glycol 6000
PPM:	Partie par million
REP:	Séquence répétitive Extragène Palindromique

t:	Tonnes
Tab:	Tableau
TBE:	Tris Borate EDTA
tr/min:	Tours par Minute
TY:	Tryptone Yeast Extract
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
YEM:	Yeast-Extract Mannitol Agar
YMB:	Yeast-Extract Mannitol liquide (sans agar)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principales caractères distinctifs entre les rhizobiums à croissance rapide et lente	18
Tableau 2: Accroissement du nombre des espèces rhizobiales	19
Tableau 3: Classification actuelle des rhizobiums.....	20
Tableau 4: Contrôle génétique de la symbiose Rhizobium-Légumineuse.....	29
Tableau 5: Liste des différents sites géographiques d'origine des souches étudiées.....	36
Tableau 6: Nombre de nodules, des plantes et des souches étudiées pour chaque espèce d' <i>Hedysarum</i> dans chaque site de collecte.....	38
Tableau 7: Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sols.....	44
Tableau 8: Détail de la collection constituée	45
Tableau 9: Les 5 types distingués de souches.....	47

LISTES DES FIGURES

Fig 1: Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac par la nitrogénase	5
Fig 2: Schéma des échanges entre les partenaires de la symbiose Rhizobium-Légumineuse.....	11
Fig 3: Les espèces du genre <i>Hedysarum</i> étudiées.....	13
Fig 4: Schéma global des différentes étapes aboutissant à la formation du nodule fonctionnel	23
Fig 5: Comparaison entre les deux procédés d'invasion de la racine par les bactéries	25
Fig 6: Coupe longitudinale schématique d'une nodosité de type indéterminé (A) et de type déterminé (B).....	26
Fig 7: Position géographique des zones de collection des nodules et des échantillons de sol	35
Fig 8: Racines d' <i>Hedysarum coronarium</i> var <i>Grimaldi</i> nodulées par différentes souches.....	46
Fig 9: Typologie des isolats selon leurs aspects sur YEM	47
Fig 10: Tolérance des souches nodulant <i>H. coronarium</i> à différentes concentrations de NaCl.....	48
Fig 11: Tolérance des souches nodulant <i>H. aculaolatum</i> à différentes concentrations de NaC.....	49
Fig 12: Tolérance des souches nodulant <i>H. flexuosum</i> à différentes concentrations de NaCl	49
Fig 13: Tolérance des souches nodulant <i>H. capitatum</i> à différentes concentrations de NaCl.....	50
Fig 14: Tolérance des souches nodulant les quatre espèces du genre <i>Hedysarum</i> étudiées à différentes concentrations de NaCl	51
Fig 15: Tolérance des souches nodulant <i>H. coronarium</i> à différents potentiels hydriques.....	53
Fig 16: Tolérance des souches nodulant <i>H. aculeolatum</i> à différents potentiels hydriques.....	54
Fig 17: Tolérance des souches nodulant <i>H. flexuosum</i> à différents potentiels hydriques	54
Fig 18: Tolérance des souches nodulant <i>H. capitatum</i> à différents potentiels hydriques.....	55
Fig 19: Tolérance des souches nodulant les quatre espèces du genre <i>Hedysarum</i> étudiées à différents potentiels hydriques	56
Fig 20: Tolérance des souches nodulant <i>H. coronarium</i> à différentes températures.....	57
Fig 21: Tolérance des souches nodulant <i>H. aculeolatum</i> à différentes températures.....	57
Fig 22: Tolérance des souches nodulant <i>H. flexuosum</i> à différentes températures	58
Fig 23: Tolérance des souches nodulant <i>H. capitatum</i> à différentes températures.....	58

Fig 24: Tolérance des souches nodulant les 4 espèces du genre <i>Hedysarum</i> étudiées à différentes températures	59
Fig 25: Tolérance des souches nodulant <i>H. coronarium</i> à différents pH	61
Fig 26: Tolérance des souches nodulant <i>H. aculeolatum</i> à différents pH	62
Fig 27: Tolérance des souches nodulant <i>H. flexuosum</i> à différents pH.....	62
Fig 28: Tolérance des souches nodulant <i>H. capitatum</i> à différents pH	63
Fig 29: Tolérance des souches nodulant les quatre espèces du genre <i>Hedysarum</i> étudiées à différents pH.....	64
Fig 30: Pouvoir acidifiant ou alcalinisant des souches (test BTB)	64
Fig 31: Réaction des souches nodulant les 4 espèces du genre <i>Hedysarum</i> étudiées dans le milieu YMB+BTB.....	65
Fig 32: Dendrogramme issu de l'analyse des empreintes génétiques Box-PCR des souches isolées de <i>H. coronairum</i> par la méthode UPGMA et basé sur le coefficient de Jaccard	67
Fig 33: Dendrogramme issu de l'analyse des empreintes génétiques Box-PCR des souches isolées de <i>H. aculaolatum</i> par la méthode UPGMA et basé sur le coefficient de Jaccard	68
Fig 34: Dendrogramme issu de l'analyse des empreintes génétiques Box-PCR des souches isolées de <i>H. flexuosum</i> par la méthode UPGMA et basé sur le coefficient de Jaccard	69
Fig 35: Dendrogramme issu de l'analyse des empreintes génétiques Box-PCR des souches isolées de <i>H. capitatum</i> par la méthode UPGMA et basé sur le coefficient de Jaccard	70
Fig 36: Dendrogramme issu de l'analyse des empreintes génétiques Box-PCR des souches par la méthode UPGMA et basé sur le pourcentage de similarité	72
Fig 37: Profils électrophorétiques (gel exemple) obtenu par l'approche Box-PCR chez les souches étudiées.....	74

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Milieux de culture.

Annexe 2 : Préparation du bleu de bromothymol.

Annexe 3 : Composition d'un gel d'agarose horizontal 1.5%.

Annexe 4: Résultats de caractérisation physiologique des souches.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Fixation biologique de l'azote	4
I.1. Mécanisme de la fixation biologique de l'azote	6
I.2. Systèmes et organismes fixateurs d'azote	8
I.2.1. Le système libre	8
I.2.2. Le système associatif ou semi-symbiotique	9
I.2.3. Le système symbiotique	9
Type 1: Symbiose non nodulaire.....	9
Type 1: Symbiose nodulaire.....	9
II. La symbiose Rhizobium-Légumineuse.....	11
II.1. Le macrosymbiote: les légumineuses.....	11
II.1.1. <i>Hedysarum coronarium</i>	14
II.1.2. <i>Hedysarum flexuosum</i>	15
II.1.3. <i>Hedysarum aculeolatum</i>.....	16
II.1.4. <i>Hedysarum capitatum</i>	16
II.2. Le microsymbiote: les rhizobiums	17
II.2.1. Définition	17
II.2.2. Historique et évolution de la taxonomie des rhizobiums	17
II.2.3. Classification actuelle des BNL	19
Les rhizobia nodulant le genre <i>Hedysarym</i>	22
III. Mise en place de la symbiose Rhizobium-Légumineuse.....	23
III.1. La reconnaissance mutuelle.....	23
III.2. L'infection.....	24
III.3. La nodulation proprement dite	25
III.3.1. La structure du nodule	25
III.3.2. Le fonctionnement du nodule	27
III.3.3. Sénescence des nodosités fixatrices	27
IV. Régulation génétique de la symbiose	29
V. Approches d'étude de la diversité des rhizobia.....	30
V.1. Les approches phénotypiques.....	30
V.1.1. La salinité	30
V.1.2. Le stress hydrique.....	31
V.1.3. La température.....	31
V.1.4. Le pH.....	32
V.2. Les approches moléculaires.....	32

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

I.1. Origine du matériel végétal	35
I.2. Caractérisation physico-chimiques des sols	36
I.3. Milieux de culture	37
I.4. Isolement et purification des rhizobia.....	37
I.4.1. Stérilisation des nodules	37
I.4.2. Extraction et purification	37
I.5. Choix d'une collection de travail.....	38
I.6. Test d'authentification des isolats sur leur plante hôte.....	38
I.6.1. Stérilisation du sol et de la tourbe.....	38
I.6.2. Préparation d'inoculum	39
I.6.3. Désinfection des graines	39
I.6.4. Inoculation et semis des graines	39
II. Caractérisation des isolats	39
II.1. Caractérisation physiologique des isolats	39
II.1.1. Tolérance à la salinité (NaCl)	40
II.1.2. Tolérance au stress hydrique	40
II.1.3. Tolérance à la température	41
II.1.4. Tolérance au pH	41
Tendance du pouvoir acidifiant ou alcalinisant des isolats (Test du BTB)	41
II.2. Caractérisation moléculaire des isolats	41
II.2.1. Principe de la PCR	41
II.2.2. Préparation des isolats.....	42
II.2.3. Conditions d'amplification	42
II.2.4. Migration sur gel d'agarose	42
II.2.5. Visualisation des bandes	42
III. Analyse des données	43

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Caractérisation physico-chimiques des sols.....	44
II. Constitution d'une collection de rhizobia nodulant le genre <i>Hedysarum</i>	45
III. Caractérisation physiologique des souches	48
III.1. Tolérance à la salinité	48
III.1.1. <i>Hedysarum coronarium</i>	48
III.1.2. <i>Hedysarum aculeolatum</i>	48
III.1.3. <i>Hedysarum flexuosum</i>	49
III.1.4. <i>Hedysarum capitatum</i>	50
Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre <i>Hedysarum</i>	50
DISCUSSION	51

III.2. Tolérance au stress hydrique	52
III.2.1. <i>Hedysarum coronarium</i>	52
III.2.2. <i>Hedysarum aculeolatum</i>	53
III.2.3. <i>Hedysarum flexuosum</i>	54
III.2.4. <i>Hedysarum capitatum</i>	55
Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre <i>Hedysarym</i>	55
DISCUSSION	56
III.3. Tolérance à la température	56
III.3.1. <i>Hedysarum coronarium</i>	56
III.3.2. <i>Hedysarum aculeolatum</i>	57
III.3.3. <i>Hedysarum flexuosum</i>	58
III.3.4. <i>Hedysarum capitatum</i>	58
Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre <i>Hedysarym</i>	59
DISCUSSION	59
III.4. Tolérance aux pHs	61
III.4.1. <i>Hedysarum coronarium</i>	61
III.4.2. <i>Hedysarum aculeolatum</i>	61
III.4.3. <i>Hedysarum flexuosum</i>	62
III.4.4. <i>Hedysarum capitatum</i>	62
Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre <i>Hedysarym</i>	63
DISCUSSION	65
IV. Caractérisation moléculaire des souches	66
IV.1. <i>Hedysarum coronarium</i>	66
IV.2. <i>Hedysarum aculeolatum</i>	67
IV.3. <i>Hedysarum flexuosum</i>	68
IV.4. <i>Hedysarum capitatum</i>	69
Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre <i>Hedysarym</i>	70
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE	75
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77
ANNEXES	
Annexe 1: Milieux de culture.	
Annexe 2 : Préparation du bleu de bromothymol.	
Annexe 3 : Composition d'un gel d'agarose horizontal 1.5%.	
Annexe 4: Résultats de caractérisation physiologique des souches.	
RESUMES	

Introduction

L'azote réduit est un composant intégral des protéines, des acides aminés ainsi que de la majorité des autres biomolécules. En conséquence, l'acquisition d'azote métaboliquement utilisable est essentielle pour la croissance et la survie de tout organisme.

Dans les systèmes de production agricole, après l'eau, l'azote est l'élément nutritif qui limite le plus la croissance des végétaux. Sa réserve disponible est quasi infinie dans les constituants de la nature: atmosphère $3,9.10^9$ t; terre, mers, sédiments marins $24,5.10^6$ t; roches sédimentaires et primaires $193,4.10^9$ t (**Burns et Hardy, 1975**).

La plupart des systèmes de cultures non légumineuses exigent l'apport d'azote, surtout les variétés modernes à haut rendement, à cause du déficit en azote sur presque tous les sols, particulièrement ceux d'une faible teneur en matière organique et qui ont un rapport élevé de carbone/azote. La déficience en azote assimilé par les plantes est résolue par des apports importants d'engrais azotés ; en effet, parmi les 142 MT des éléments nutritifs apportés aux cultures, dans le monde entier par les engrais minéraux, 85 MT (soit 60%) est à base d'azote (**Roy et al., 2006**).

Cependant, cette stratégie (fertilisation chimique) est de plus en plus controversée, du fait du prix élevé et en augmentation des fertilisants chimiques, de l'impact de leur fabrication sur le réchauffement climatique et des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé des populations.

Une des solutions alternative consiste à exploiter les facultés naturelles qu'ont développées certaines espèces végétales pour s'adapter à des contraintes environnementales. Un exemple d'adaptation aux contraintes du sol est donné par les symbioses fixatrices d'azote dont la symbiose Légumineuses-Rhizobium est la plus importante du fait de son impact environnemental et agricole.

Cette symbiose, vieille de 60 millions d'années, confère aux Fabacées, l'aptitude unique parmi les plantes de grandes cultures de se nourrir à partir de l'azote de l'air. Elle représente 80% ($90. 10^6$ t) de la fixation biologique de l'azote et contribue à 25-30% de la consommation mondiale de protéines (**Vance, 1996**). Elle peut fournir jusqu'à 90% de l'azote nécessaire à la plante. Cependant, la quantité d'azote fixé est très variable d'une espèce à l'autre et pour une même espèce, car l'activité symbiotique est influencée par les souches bactériennes, la plante hôte et les facteurs du milieu (**Wani et al., 1995**).

L'intérêt du processus de la fixation biologique de l'azote (FBN) se trouve actuellement amplifié par l'exigence permanente d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement.

En effet, en plus de sa participation à l'amélioration de la qualité nutritionnelle des tissus végétaux, elle permet un enrichissement des sols, par les exsudations racinaires au cours du développement de la plante puis lors de la décomposition de ses différents organes. Elle contribue ainsi à la protection de l'environnement, en limitant le recours aux engrais chimiques, sources de pollution des nappes phréatiques et de la couche d'ozone atmosphérique.

Dans les écosystèmes méditerranéens, les légumineuses fixatrices d'azote sont les composantes clés de la succession naturelle (**Zahran, 2001**).

Depuis fort longtemps, les travaux sur les légumineuses ont porté seulement sur la plante, l'aspect symbiotique était considéré comme un aspect particulier qui se traitait à part. Dans la classification de cette famille, seuls les caractères attribués aux plantes ont été pris en compte et aucune coordinance n'a été faite avec les caractéristiques des bactéries fixatrices d'azote qui leur sont associées (**Abdelguerfi-Louar, 2005**).

Les recherches sur la diversité des rhizobia peuvent non seulement améliorer la productivité des récoltes et augmenter la fertilité du sol, mais elles sont également importantes pour la consommation de l'énergie et pour la protection de l'environnement (**Weiwei et al., 2002**).

Dans la dernière décennie, les légumineuses spontanées et leurs symbiontes ont attiré l'attention des écologistes en raison de leur tolérance aux conditions environnementales extrêmes, telles que la salinité, la sécheresse et les températures élevées (**Zahran, 2001 ; Moschetti et al., 2005**).

Cette caractéristique est très importante pour le Bassin Méditerranéen dont les légumineuses fourragères occupent une place économique et sociale importante, en particulier, dans sa rive Sud où la production fourragère se base particulièrement sur les ressources naturelles (**Abdelguerfi-Louar, 2005**).

En Algérie, où le déficit fourrager est important, le genre *Hedysarum*, bien représenté, constitue un patrimoine phytogénétique performant pour la production de fourrage, la protection des sols contre l'érosion, et la valorisation des parcours dégradés (**Abdelguerfi-berrekia et Abdelguerfi, 1986 ; Abdelguerfi et Abdelguerfi-Berrekia, 1987**). En effet, parmi les dix espèces méditerranéennes, neuf espèces sont rencontrées en Algérie (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991**) dont certaines sont typiques des zones arides et semi-arides (**Abdelguerfi-berrekia, 1985**).

La diversité de ce genre en Algérie, d'une part, et sa large adaptation aux conditions édapho-climatique, d'autre part, suggère que notre pays constitue un réservoir de variabilité considérable qui offre de grandes possibilités d'exploitation du matériel végétal autochtone afin de créer des variétés plus productives et mieux adaptées.

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur l'autoécologie, l'identification, la caractérisation de ce genre, mais le deuxième protagoniste associé à la relation symbiotique, le rhizobia, reste

pratiquement assez méconnu en Algérie. Pour les espèces *H. aculeolatum*, *H. flexuosum* et *H. capitatum* aucune étude rapportant la diversité des rhizobia associés à ces légumineuses n'a été jusque là effectuée en Algérie.

Dans cette optique, notre étude porte sur la création d'une collection algérienne de souches de rhizobiums, provenant de différentes espèces du genre *Hedysarum* sur laquelle une étude de la diversité génétique a été entreprise, portant sur :

- Une caractérisation phénotypique des souches vis-à-vis de certaines contraintes abiotiques (salinité, stress hydrique, température et pH) ;
- Une caractérisation moléculaire des souches par l'utilisation des rep-PCR.

Notre travail s'inscrit dans le cadre du projet international (**PERMED**), initié par sept pays du Bassin Méditerranéen et financé par l'Union Européenne, intitulé : « **Amélioration des plantes fourragères locales pour la durabilité des systèmes agricoles Méditerranéens** ».

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Fixation biologique de l'azote

L'azote est un élément très important, du part, de point de vue quantitatif, puisque il représente 2 à 4% du poids sec des tissus végétaux et, d'autre part, du point de vue qualitatif, parce qu'il entre dans la composition de beaucoup de biomolécules importantes :

- La chlorophylle (pigment absorbant la lumière, photosynthèse) contient 4 atomes d'azote (N) ;
- Toutes les protéines (structurelles et enzymatiques) consistent en des chaînes d'acides aminés (la fonction amine est NH_2) ;
- La base d'adénine, le constituant principal de l'adénosine triphosphates (ATP), contient de l'azote ;
- Dans les acides nucléiques (ADN, ARN), les bases azotées (adénine, thymine, cytosine, guanine et uracile) qui forment le "code génétique" contiennent de l'azote.

L'atmosphère est constituée à 78% par l'azote moléculaire (N_2), il représente une réserve pratiquement illimitée d'environ 4.10^{15} tonnes (**Bogusz et Franche, 1985**). Son nom qui signifie "sans vie" provient de sa faible réactivité chimique. Malgré sa grande disponibilité, peu d'organismes ont la capacité d'utiliser directement l'azote moléculaire comme source d'azote.

Dans les systèmes de production agricoles, après l'eau, l'azote est l'élément nutritif le plus déficient. Ceci est en apparence contradiction avec les très larges quantités d'azote existant sur terre, dans les roches, les sédiments et dans l'atmosphère. En fait, la plupart de cet azote est difficilement accessible pour les plantes car elles ne peuvent absorber cet élément que sous ses formes combinées minérales [nitrate (NO_3^-) ou d'ammonium (NH_4^+)]. Cependant, ces formes minérales représentent habituellement moins de 5% de l'azote total dans la plupart des sols (**Duchauffour, 1979 ; Roy et al., 2006**), et elles se trouvent essentiellement dans la solution du sol et une petite quantité de NH_4^+ adsorbée aux sites d'échange cationique sur les colloïdes du sol. Très peu de N est libéré des minéraux du sol.

Dans l'agriculture conventionnelle, la plus grande partie de l'azote minéral vient des engrais dissouts avec une contribution de minéralisation de l'azote organique dans le sol.

La teneur en azote des plantes est de l'ordre de 2 à 4% par rapport au poids sec (**Mengel et Kirkeby, 1982 ; Roy et al., 2006**). Quand cette teneur est inférieure à 1%, des symptômes de carence apparaissent sur la plupart des plantes. Chez les bactéries cette teneur peut atteindre 15 %.

Pour son incorporation dans les molécules biologiques nous distinguerons deux processus : la fixation biologique, apanage uniquement des microorganismes fixateurs, et la fixation non biologique portant sur l'azote minéral.

Quelle que soit sa forme initiale, l'azote est converti en ammoniac ou en ion ammoniac qui est transformé en fonction amine ou amide.

La fixation biologique de l'azote est, sur terre, le second plus important processus biochimique après l'assimilation du CO_2 (la photosynthèse). Elle assure la réduction enzymatique de N_2 (azote moléculaire) en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH_3): cette forme de N combiné, appelée intermédiaire-clé, représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné (Fig. 1).

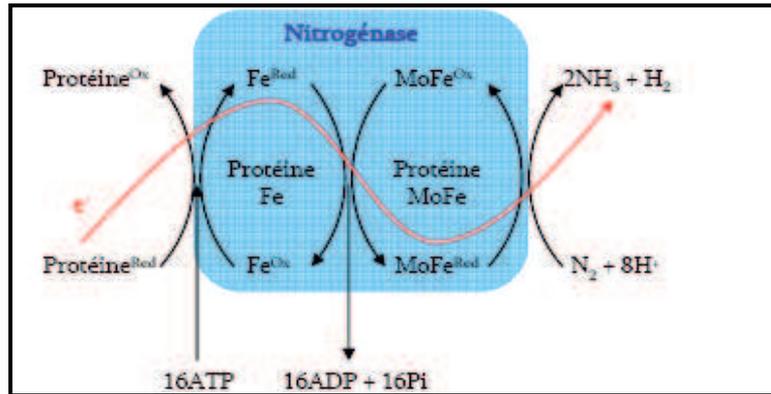


Figure 1: Mécanisme moléculaire de la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac par la Nitrogénase. Le flux d'électrons est orienté de gauche à droite (Godfroy, 2008).

A l'échelle de la planète, la fixation biologique annuelle de l'azote est estimée de 120 à 180 MT/an (Freibeg *et al.*, 1997) dont la participation des systèmes symbiotique est de 120 MT soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Paul et Clark, 1989).

La fixation biologique de l'azote est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible.

Ce processus est comparable à celui de la photosynthèse qui permet de produire des substances glucidiques à partir du gaz carbonique (CO_2) de l'atmosphère. Mais, alors que la photosynthèse est le fait de tous les végétaux (sauf les végétaux saprophytes), la fixation de l'azote atmosphérique est exclusivement destinée à certaines plantes, réalisée en symbiose ou non par certains organismes procaryotes.

Ces organismes procaryotes produisent une enzyme, la nitrogénase : elle permet de réaliser la synthèse de l'ammoniac qui est une réduction fortement endothermique de N_2 en NH_3 , dans les conditions du sol, alors que les procédés industriels de Haber-Bosch (1910) requièrent une température de $500\text{ }^\circ\text{C}$ et une pression de l'ordre de 300-400 atmosphères.

I.1. Mécanisme de la fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique appelé complexe nitrogénase (Fig. 1). Ce complexe enzymatique a été mis en évidence uniquement chez des procaryotes (Eubactéries et Archaea). La réaction globale catalysée est la suivante :



Le complexe nitrogénase peut également réduire les protons en dihydrogène ou encore l'acétylène (C_2H_2) en éthylène (C_2H_4) quand les organes fixateurs d'azote sont incubés dans une atmosphère contenant au moins 10% de C_2H_2 (Garrett et Grisham, 2000).

La source première de l'énergie utilisée dans la fixation de l'azote est constituée des glucides produits par la plante hôte au cours de la photosynthèse (Hopkins, 2003).

Le complexe nitrogénase le plus étudié comprend deux composantes metalloprotéiques : une ferroprotéine (protéine Fe) et une ferro-molybdo-protéine (protéine FeMo). Il peut représenter jusqu'à 5% des protéines cellulaires (Garrett et Grisham, 2000). Les gènes qui codent ces deux protéines et les autres protéines nécessaires à la réaction ou à sa régulation sont groupés dans un même opéron appelé *nif* (pour Nitrogen Fixation) (Svistonoff, 2003). La protéine Fe est une *réductase* (encore appelée *nitrogénase 1*), et est composée d'un homo-dimère de 64 kDa codé par le gène *nifH*, c'est le composant donneur d'électrons, il contient le site de liaison de l'ATP (Halbleib et Ludden, 2000). Pour chaque électron récupéré du donneur et cédé à la *nitrogénase 2* (la protéine MoFe), il y a consommation de 2 liaisons phosphates riches en énergie (2 ATP). La protéine MoFe (*nitrogénase 2*) est un tétramère de 230 kDa codé par les gènes *nifD* et *nifK* ; elle contient le site réducteur du substrat (Svistonoff, 2003). Chaque protéine MoFe contient deux ions molybdène sous la forme d'un cofacteur fer-molybdène-soufre (Fe-Mo-Co) (Hopkins, 2003).

D'après Svistonoff (2003), les électrons transférés par la protéine Fe et la protéine FeMo proviennent : (i) de NADH, H^+ ou/et FADH_2 fournis par les processus cataboliques (cycle de Krebs, oxydation des acides gras, etc), (ii) de la ferrédoxine ou/et de NADPH, H^+ formé au cours de la photophosphorylation acyclique.

Le cycle commence avec la liaison d'une molécule d'ATP à la protéine Fe réduite, ce qui provoque un changement conformationnel et permet le transfert d'un électron de la protéine Fe à la protéine FeMo. L'hydrolyse d'un ATP est couplée à ce transfert. Le complexe se dissocie ensuite, la protéine Fe est alors réduite par un donneur d'électrons (ferrédoxine ou flavodoxine) et l'ADP est échangé contre un ATP. Le cycle est répété jusqu'à ce que suffisamment d'électrons soient transmis à la protéine FeMo ce qui lui permet, par l'intermédiaire du molybdène de les transférer au diazote ce qui produit de l'ammoniac (Halbleib et Ludden, 2000).

La nitrogénase est une enzyme relativement peu active qui transfère au maximum 12 paires d'électrons par seconde et par molécule d'enzyme, cela signifie que l'enzyme ne réduit que trois molécules

d'azote par seconde. Comme cette activité est très réduite, les bactéries fixatrices d'azote contiennent une grande quantité de nitrogénase, ce qui leur permet de disposer suffisamment d'azote réduit pour leur croissance (**Garrett et Grisham, 2000**).

La formation de l'ammoniac s'accompagne toujours de celle d'hydrogène gazeux. Cette activité hydrogénase constitue une perte d'énergie qui réduit l'efficacité de la nodosité car 25 à 30% d'ATP et des électrons fournis à la nitrogénase peuvent être consommés par la production d'hydrogène (**Hopkins, 2003**).

Il existe des bactéries fixatrices d'azote telle que *Bradyrhizobium* possédant une enzyme oxygène-dépendante, nommée hydrogénase (*Hup*⁺), membranaire permettant de recycler l'hydrogène produit par la nitrogénase afin d'améliorer l'efficacité des nodosités (**Qubit, 1999 ; Halbleib et Ludden, 2000**). Cela résulte du couplage de l'oxydation de H₂ et de la production d'ATP. Les électrons libérés sont reversés dans le pool de réducteurs de la nitrogénase (**Hopkins, 2003**). Le gène *Hup* permettant le recyclage de l'hydrogène est beaucoup plus fréquent dans les associations symbiotiques à *Frankia* que dans celles à *Rhizobium* (**Davet, 1996**).

Le complexe nitrogénase est extrêmement sensible au dioxygène qui l'inactive de manière irréversible, même lorsque la pression partielle de ce gaz est très réduite (0,01atm), alors que l'énergie requise pour la fixation de l'azote implique une activité respiratoire aérobie chez les bactéroïdes. Des mécanismes biologiques plus ou moins élaborés ont été développés par les fixateurs d'azote pour protéger l'enzyme de l'oxygène (**Halbeib et Ludden, 2000**) :

- La vie en anaérobie, comme dans le cas de *Clostridium* ;
- La respiration intense (rapide) des bactéroïdes empêche l'accumulation d'oxygène, et diminue son taux intra-nodulaire (*Azotobacter*) (**Davet, 1996**) ;
- L'existence d'une barrière, gangue muqueuse de nature polysaccharide, au niveau des cellules internes du cortex nodulaire empêche la diffusion libre d'oxygène dans la cellule, c'est le cas de *Beijerinckia* (**Davet, 1996**) ;
- Sa localisation, chez l'hôte, dans une structure anatomique qui sert de barrière à sa diffusion (**Blondeau, 1980 ; Halbeib et Ludden, 2000**). Par exemple, les cyanobactéries sont capables de fixer l'azote tout en produisant activement de l'oxygène par la photosynthèse. La particularité des cyanobactéries est de séparer les deux métabolismes, fixation de l'azote et photosynthèse, dans deux types de cellules distinctes. Les cellules qui fixent l'azote sont appelées hétérocystes et sont dotées d'une paroi plus épaisse qui contribue à isoler la nitrogénase de l'oxygène ambiant ;
- La synthèse d'une protéine spécifique, lég'hémoglobine, hémoprotéine analogue à l'hémoglobine de notre sang, dont la partie « **globine** » est synthétisée par la plante et la partie « **hème** » par le *Rhizobium*. Cette protéine capte l'oxygène avec une très haute affinité, et le

distille en petite quantité aux bactéroïdes (**Vargas et al., 1996**) selon un dosage critique préservant l'intégrité de la nitrogénase (**Pelmont, 2005**). Elle est localisée dans les cellules hôtes infectées par les bactéroïdes, et peut constituer jusqu'à 30% des protéines de cellule hôte et conférer au nodule une couleur rose (**Hopkins, 2003**).

La fixation de l'azote est un processus très coûteux en énergie ce qui impose une régulation. La transcription des gènes *nif* est réprimée par l'ammonium (NH₄), et aussi par le dioxygène, qui rend la fixation impossible en inactivant la nitrogénase (**Garrett et Grisham, 2000 ; Svistoonoff, 2003**). La répression des gènes *nif* par l'ion NH₄, le produit de la fixation de l'azote, est une façon simple et efficace d'inhiber la fixation quand le produit de celle-ci n'est plus nécessaire (**Garrett et Grisham, 2000**). Certains diazotrophes régulent également la fixation au niveau post-traductionnel en inactivant le complexe enzymatique dès que des quantités suffisantes d'ammonium sont présentes ou quand la quantité d'ATP disponible devient insuffisante (**Garrett et Grisham, 2000 ; Halbleib et Ludden, 2000**). Les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote peuvent consommer près de 20% de l'ATP produite par la plante hôte (**Prescott et al., 2003**).

I.2. Systèmes et organismes fixateurs d'azote

La fixation d'azote est l'apanage du domaine des procaryotes simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé Nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac. Malgré cette simplicité apparente, la fixation biologique de l'azote est en fait un processus biochimique et physiologique complexe (**Hopkins, 2003**).

Les procaryotes qui fixent l'azote, appelés : organismes diazototrophes ou fixateurs d'azote, présentent une large diversité. Cependant ils sont incapables étant isolés de fixer l'azote à cause de son coût énergétique élevé (les diazototrophes doivent utiliser, pour réduire une molécule d'N₂, 16 ATP sans compter les autres dépenses énergétiques consenties pour ses autres fonctions) (**Streeter, 1993**). Trois systèmes de fixation biologique de l'azote sont à distinguer chez les plantes.

I.2.1. Le système libre

Ce système est composé de bactéries fixatrices d'azote atmosphérique vivant à l'état libre dans le sol (*Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*,...) sans être en contact avec les plantes. Les microbes responsables de cette fixation libre sont majoritairement des cyanobactéries cyanophycées dépourvues de plastes, des bactéries photosynthétiques ainsi que des bactéries hétérotrophes (**Reddy et Ladha, 1995**). La quantité totale d'azote fixée annuellement par les bactéries libres représente environ 50 MT

(Paul et Clark, 1989), mais elle ne couvre que 16 à 20% du besoin total de la plante en azote (Zhu et al., 1984).

I.2.2. Le système associatif ou semi-symbiotique

Ce système englobe toutes les bactéries diazotrophes vivant en étroite association avec la plante hôte (la rhizosphère, le rhizoplan, voire même les tissus racinaires) et fixant directement l'azote sans être transformées en bactéroïdes. Ils sont également qualifiés de fixateurs non symbiotiques (Tilak et al., 2005).

Une espèce très étudiée, *Azospirillum brasilense*, colonise les rhizosphères de plantes telles que les céréales cultivées et diverses monocotylédones tropicales.

Ce système peut atteindre des niveaux de fixation de l'ordre de 50 à 100 kg N/ha/an.

I.2.3. Le système symbiotique

Ce système, communément qualifié de symbiose fixatrice d'azote, est constitué de deux types de symbiose :

Type 1 : Symbiose non nodulaire

Ce type d'association symbiotique ne provoque pas la formation de nodules. Il inclut les Cyanobactéries, du genre *Anabaena* et *Nostoc*, associées à des fougères aquatiques (*Azolla*) et à des gymnospermes (Cycadales) (Hill, 1992).

Type 1 : Symbiose nodulaire

Ce type de symbiose est marqué par la formation d'un véritable nouveau organe, plus ou moins évolué (poches, nodules,...), qui permet des échanges intimes entre le macrosymbiote ou l'hôte, qui est la plante, et le microsymbiote, la bactérie.

Deux groupes de végétaux forment des symbioses nodulaires avec des bactéries diazotrophes: les légumineuses qui s'associent aux rhizobia et les plantes actinorhiziennes du genre *Casuarina* et *Alnus*, dont les partenaires symbiotiques sont des bactéries Actinomycètes du genre *Frankia*.

La symbiose Rhizobium-légumineuses serait à elle seule responsable de la fixation d'environ 50% d'azote fixé biologiquement par an (Trinchant et al., 1997). Broughton et Perret (1999) la considèrent comme le système symbiotique le plus évolué car chacun des acteurs de cette association a développé une voie de métabolisation capable de capter une substance inorganique présente dans l'atmosphère, et de la transformer en éléments assimilables, subvenant à des besoins complémentaires : la bactérie, par la voie diazotrophe, assure la couverture mutuelle des besoins en matières azotées; et la plante, par la photosynthèse, assure la couverture des besoins énergétiques.

La symbiose entre les rhizobia et les légumineuses est la plus intéressante car en plus du niveau de fixation qui est très élevé, elle concerne un groupe de plantes très important pour l'homme, les légumineuses.

Selon **Drevon (1992)**, les symbioses avec nodosités sont des systèmes fixateurs plus efficaces que les bactéries libres et que les systèmes associatifs pour les raisons suivantes: (i) elles ont une structure interne pour l'approvisionnement en photosynthétats ; (ii) la structure nodulaire protège le microorganisme contre la compétition d'autres microorganismes ; (iii) elles ont un système efficace pour le transfert des produits de la fixation vers les parties de la plante hôte. Les systèmes associatifs ou libres au contraire ne fixent l'azote que lorsque les conditions externes d'environnement le permettent.

II. La symbiose Rhizobium-Légumineuse

Les plantes de la famille des légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées rhizobiums (Fig. 2).

Cette association se caractérise par la formation d'un petit organe particulier situé au niveau des racines, le nodule (ou nodosité), au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit à son symbiote une niche écologique et les éléments nutritifs issus de la photosynthèse, nécessaires à son métabolisme.

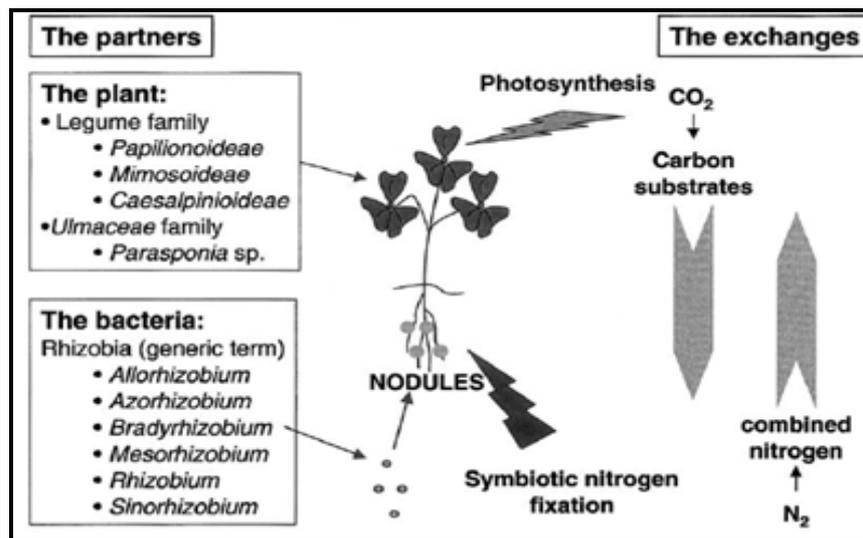


Figure 2: Schéma des échanges entre les partenaires de la symbiose Rhizobium-Légumineuse (Lindström *et al.*, 2002).

II.1. Le macrosymbiote: les légumineuses

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les rhizobia appartiennent toutes à la superfamille des Fabacées (=Légumineuses) à l'exception de *Parasponia tomentosa* qui appartient à celle des Ulmacées (Svistoonoff, 2003).

Les *Fabaceae* constituent la troisième superfamille par ordre d'importance chez les angiospermes. La famille des Fabacées comprend 17000 à 19000 espèces (de Lajudie *et al.*, 1998a) réparties en 650 genres (Sprent, 1995 ; Renier, 2008), ce qui la place en seconde position derrière les *Poaceae* en termes de diversité (Renier, 2008). Répandue sur tout le globe, sauf les îles glacées de l'Antarctique, cette famille très diversifiée est subdivisée en trois sous famille : les *Mimosoideae*, les *Caesalpinioideae* et les *Papilionoideae* :

- La sous-famille des *Caesalpinioideae*, comprenant environ 150 genres et 2200 espèces, rassemble principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et

subtropicales. Seules 23% des espèces de cette sous-famille sont connues pour être nodulées par les rhizobia (**Godfroy, 2008**) ;

- ▶ La sous-famille des *Mimosoideae* rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille possède plus d'une soixantaine de genres et environ 2500 espèces, dont la majorité (90%) sont nodulées (**Godfroy, 2008 ; Kamal et al., 2009**) ;
- ▶ Enfin, les *Papilionoideae* représentent la sous-famille la plus diverse avec environ 430 genres et plus de 12000 espèces (**Renier, 2008**), dont 97% des espèces sont connues pour être nodulées par les rhizobia (**Godfroy, 2008**).

Malgré l'importance numérique de la famille des légumineuses reconnue en botanique, moins de 100 espèces sont utilisées en agriculture (**Burton, 1979**) et seulement 2800 espèces ont été examinées pour la nodulation racinaire ou caulinaire (**de Lajudie et al., 1998a**), ce qui représente environ 20% du total des espèces et 57% de 650 genres des plantes légumineuses (**Sprent, 1995**).

L'intérêt des légumineuses réside dans leur teneur élevée en protéines de haute valeur nutritive en complément de celle des céréales, et elles jouent aussi un rôle important dans les systèmes de cultures en contribuant à l'amélioration de la fertilité du sol par les reliquats d'azote qu'elles laissent, et en font ainsi un excellent précédent cultural.

Parmi les légumineuses, les espèces du genre *Hedysarum*, appartenant à la tribu des Hédysarées dans la sous-famille des *Papilionoideae*, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (**Boussaid et al., 1995 ; Hannachi-Salhi et al., 2002**). Elles fournissent une approche alternative utilisable pour valoriser et augmenter les ressources phylogénétiques (**Trifi-Farah et Marrakchi, 2000**). Comparé aux différents genres des trifoliées, ce genre ne présente pas de grandes difficultés dans la classification des unités taxinomiques (**Abdelguerfi-Laouar et al., 2002**). Il renferme plus de 100 espèces (**Squartini et al., 2002**) annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames (**Baatout, 1991 ; Boussaid et al., 1995**). Il présente une vaste aire de distribution: Europe tempérée, Afrique du Nord, Asie mineure, Sibirie, Amérique du Nord et dans les régions arctiques (**Squartini et al., 2002 ; Issolah et al., 2006**). Les espèces de ce genre sont rassemblées dans deux groupes distingués par leur morphologie, leur système de reproduction, leur caryotype et leur origine géographique (**Issolah et al., 2006**). Le premier groupe inclut les espèces alpines, arctiques et asiatiques dont le nombre chromosomique de base est $X=7$ ($2n=2x=14$), et le second groupe, d'origine Méditerranéenne, est défini par un nombre chromosomique de base $X=8$ ($2n=2x=16$) (**Quezel et Santa 1962 ; Boussaid et al., 1995 ; Issolah et al., 2006**). Dans le dernier groupe, les peuplements sont caractérisés par une protandrie marquée et sont exploités en pâture. Leurs graines, qui se ressement naturellement, favorisent leur utilisation pour

la protection des sols. Ils couvrent une large aire de répartition qui s'étend en Afrique du Nord de l'étage humide, au nord, à l'étage saharien supérieur, au sud (Trifi-Farah *et al.*, 1989 ; Abdelguerfi-Berrechia *et al.*, 1991 ; Boussaid *et al.*, 1995). Le groupe méditerranéen compte dix espèces (Abdelkefi et Marrakchi, 2000 ; Hannachi-Salhi *et al.*, 2002):

- Les espèces diploïdes: *H. coronarium* L. ; *H. carnosum* Desf. ; *H. spinosissimum* L. avec les deux sous-espèces subsp. *capitatum* Desf. et subsp. *euspinosissimum* Briq ; *H. flexuosum* L. et *H. aculeolatum* Munby [subsp. *micranthum* (Batt) Maire et subsp. *mauritanicum* (Pomet) Maire].
- Les espèces di-tétraploïdes: *H. pallidum* Desf. ; *H. naudinianum* Coss et *H. perrauderianum* Coss.
- Les espèces *H. humile* L. ainsi que *H. membranaceum* Coss et Bal ne sont pas définies du point de vue caryologique.

Dans les pays maghrébins (Algérie, Tunisie et Maroc) les espèces du genre *Hedysarum* sont caractérisées par une diversité considérable qui concerne aussi bien la morphologie que les aires de répartition de leurs peuplements. Toutefois, elles sont menacées par une érosion génétique incontestable comme en témoigne l'extinction de *H. humile* et *H. flexuosum* en Tunisie (Ben Fadhel *et al.*, 1997) et la raréfaction de *H. naudinianum* , *H. perrauderianum*, *H. humile*, *H. Carnosum* et *H. pallidum* en Algérie (Abdelguerfi-Berrechia *et al.*, 1991).

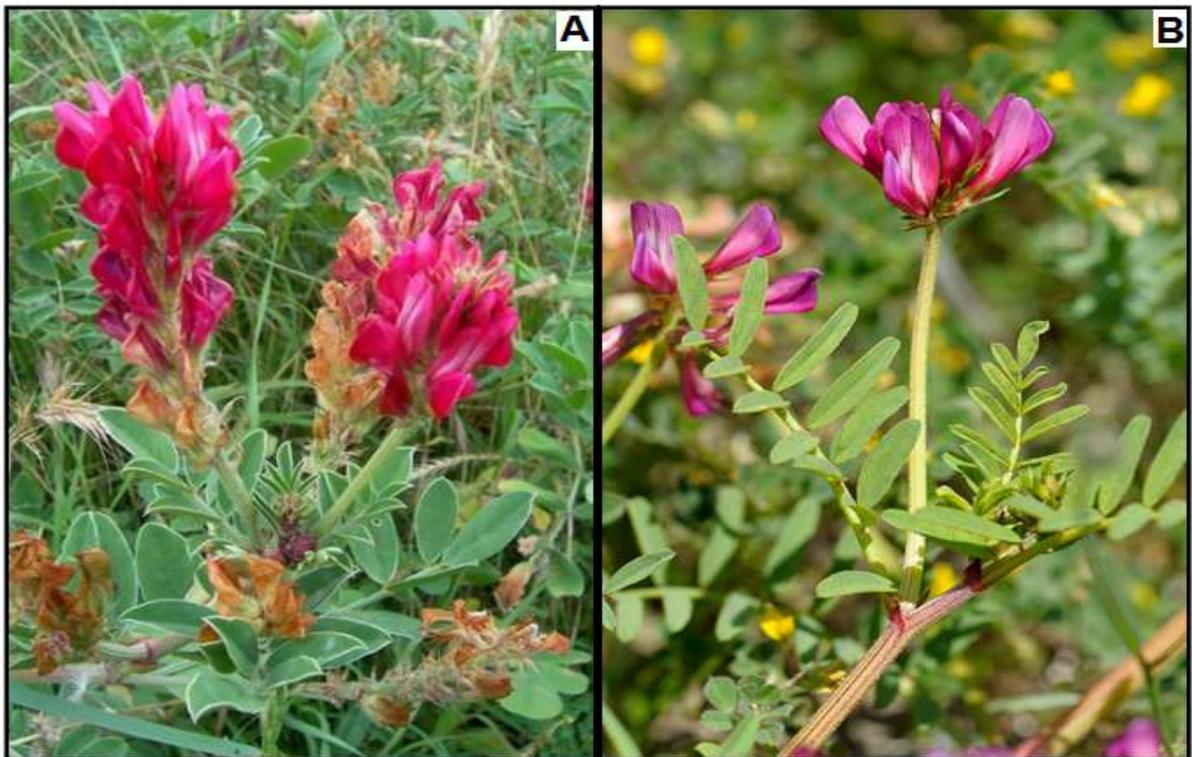


Figure 3: Les espèces du genre *Hedysarum* étudiées.
A. *H. Coronarium* (<http://lh5.ggpht.com>) ; **B.** *H. spinosissimum* subsp. *capitatum* (<http://www.florealpes.com>).

Cette érosion serait accélérée par l'exploitation des cultures, le surpâturage, la dégradation des sols ainsi que les changements climatiques. Par ailleurs, il semble que cette érosion soit particulièrement accentuée au Maroc et, à un degré moindre, en Tunisie. L'Algérie paraît moins affectée par cette érosion (**Hannachi-Salhi et al., 2002**).

En Algérie, le genre *Hedysarum* comprend dix espèces annuelles ou pérennes, certaines sont endémiques (*H. naudinianum* Coss et *H. perrauderianum* Coss) et parfois très localisées (*H. perrauderianum*). Elles poussent rarement ensemble sur même point géographique dont la pluviométrie et l'altitude demeurent les facteurs les plus importants dans leur distribution, par conséquent, il semble que chaque grande région géographique soit caractérisée par une espèce de *Hedysarum* particulière (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991**).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés aux quatre espèces qui sont : *H. coronarium* L.; *H. flexuosum* L.; *H. aculeolatum* Munby et *H. spinosissimum* subsp. *capitatum* Desf. que nous appellerons dans cette thèse, par commodité, *H. capitatum*.

II.1.1. *Hedysarum coronarium*

Hedysarum coronarium L. (Fig. 3A) également appelé sulla ou sainfoin d'Espagne, récemment reclassée par **Choi et Ohashi (2003)** comme *Sulla coronaria* (L.) Choi & Ohashi, est une plante d'origine du Bassin Méditerranéen (**Villax, 1963**), diploïde d'un nombre chromosomique de base X=8 ou X=9 (**Issolah et al., 2006**), préférentiellement allogame avec un faible degré d'autogamie estimé à 10% (**Louati-Namouchi et al., 2000**). C'est une espèce bisannuelle à puissant système racinaire de type pivotant (**Lapyronie, 1982**) ou annuelle, selon les conditions du milieu (**Boussaid et al., 1995 ; Abdelguerfi et Laouar, 2002**). Elle présente des tiges ascendantes, cylindriques, assez grosses, ordinairement glabres et plaines. Ses feuilles imparipennées (**Villax, 1963**) sont composées de 3 à 5 paires de folioles ovales, grandes (2-4 X 1-2,5 cm). Les fleurs, d'un rouge vif et parfois blanches, sont longues de 14-20 mm en grappes allongées, denses et longuement pédonculées (20-80mm). Le fruit est une gousse droite, large de 4-5 mm, à articles couverts d'aiguillons (**Quezel et Santa, 1962**). Le sulla présente un exemple intéressant des espèces à utilisation multiple (**Sulas et al., 1997 ; Bullitta et Sulas, 1998**) à cause de ses nombreuses caractéristiques tant sur le plan biochimique qu'agronomique. *H. coronarium* est la seule espèce de son genre qui a été domestiquée, elle est utilisée comme fourrage dans plusieurs pays, particulièrement en Espagne, en Italie et en Afrique du nord. (**Boussaid et al. 1995 ; Abdelkefi et Marrakchi, 2000 ; Trifi-Farah et Marrakchi 2000 ; Hannachi-Salhi et al., 2002**). Sa domestication date de la fin du XVIIIème siècle en Italie et en Sicile (**Restuccia, 1976**). A l'état spontané, cette espèce se localise sur des sols argilo-limoneux bien drainés des zones méridionales de la moitié occidentale du bassin méditerranéen (**Hannachi-Salhi et al., 2002 ; Trifi-Farah et al., 2004**). Elle pousse en Algérie Orientale, Espagne Méridionale, en Italie, au Nord et au

Centre du Maroc, Malte, Sicile, Sardaigne et en Tunisie et semble même exister en Grèce et en Egypte (**Boussaid et al., 1995 ; Hannachi-Salhi et al., 2002**).

En Algérie, *H. coronarium* est une espèce très commune dans les broussailles et les pâturages des terrains argileux, dans le Tell constantinois, mais très rare ailleurs (El Kantara, Alger, Oran) (**Quezel et Santa, 1962**). D'après **Abdelguerfi-Berrekia et al. (1991)**, cette espèce semble se limiter au Nord-Est du pays et paraît étroitement localisée sous les effets de facteurs pédologiques et climatiques à la fois. Elle ne se trouve que sous des pluviométries supérieures à 450 mm, sur les sols lourds des régions bien arrosées, à des altitudes variables (inférieures à 460 m), d'une texture fine à moyenne, à conductivité très faible à moyenne, généralement pauvres en potassium et en calcaire total.

Malgré que *H. coronarium* présente une adaptation à nos conditions pédoclimatiques, sa culture reste toujours restreinte. En petite Kabylie, une pratique courante des agriculteurs consiste à préserver des populations naturelles qui, en se ressemant d'année en année, finissent par constituer de véritables prairies où le sulla est fauché et mis en bottes (**Hannachi-Salhi et al., 2002**).

II.1.2. *Hedysarum flexuosum*

Hedysarum flexuosum L. (Fig. 3B) est une espèce diploïde ($2n=16$), annuelle, préférentiellement allogame (**Hannachi-Salhi et al., 2002**), d'une aire de répartition limitée au sud de la péninsule Ibérique et à l'Afrique du Nord (**Abdelkefi et Marrakchi, 2000**). Cette espèce, dont le développement végétatif est hivernal (**Abdelkefi et Marrakchi, 2000**), présente un appareil végétatif qui rappelle celui de *H. coronarium* avec néanmoins une pilosité plus importante et une plus grande robustesse des tiges (**Hannachi-Salhi et al., 2002**).

Elle est caractérisée par des gousses généralement très flexueuses et des petites fleurs pourpre-violacé, de 8-12 mm, en grappes denses très allongées dont la carène est très arrondie dans sa partie dorsale (alors qu'elle forme un angle net chez les autres espèces). Ses feuilles à 2-3 paires de folioles grandes presque orbiculaires (**Quezel et Santa, 1962 ; Hannachi-Salhi et al., 2002**).

En Algérie, *H. flexuosum* est une espèce du centre Nord du pays qui se développe sous les étages humide et sub-humide, d'une pluviométrie élevée (supérieure à 550 mm), à des altitudes moyennes (jamais au dessus de 600 m), le plus souvent sur des sols de pente très prononcée, peu caillouteux, riches en limons, pauvres en sable, de texture très fine à fine, de pH compris entre 6,2 et 8,1, pauvres en potassium et en phosphore. Elle est plus rare sur les sols ayant une teneur de plus de 25% de calcaire total (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991**).

Une diversité de ports, au sein de l'espèce, est révélée par l'existence de types morphologiques prostré et érigé (**Ben Fadhel et al., 1997**). Elle est en étroite relation avec l'altitude car, selon **Abdelguerfi-Berrekia (1985)**, les populations de faibles altitudes sont caractérisées par un port érigé (port dressé ou orthotrope) alors que celle d'altitudes plus élevées ont un port prostré (port rampant ou

plagiotope). Cette diversité de port présente une adaptation écologique des populations ; à des altitudes élevées, le port rampant est idéal pour assurer une protection des sols contre l'effet des agents érosifs (**Abdelguerfi-Berrekia et Abdelguerfi, 1986**). Ainsi, le port érigé confère une adaptabilité des populations aussi bien à la fauche qu'à la pâture (**Abdelkefi et Marrakchi, 2000**).

II.1.3. *Hedysarum aculeolatum*

Hedysarum aculeolatum Munby., est une espèce endémique du centre et de l'Ouest algérien (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991 ; Hannachi-Salhi et al., 2002**), diploïde et annuelle, qui semble être comparable à *H. coronarium* de par son appareil végétatif qui est activement brouté (**Hannachi-Salhi et al., 2002**). Elle présente une aire de répartition très limitée (répartition algéro-marocaine) (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991 ; Hannachi-Salhi et al., 2002**). Cependant, elle montre un polymorphisme morphologique inter-population en fonction des variations pédoclimatiques (**Kheffache et Combes, 1992**).

En Algérie, cette espèce se rencontre assez communément dans les broussailles et les pâturages, vivant en groupe ou en pieds isolés (**Quezel et Santa, 1962**), sous les étages subhumide et semi-aride chaud. Elle semble fortement influencée par la pluviométrie : sa présence ne se manifeste que dans les zones moyennement arrosées (entre 400 et 550 mm) et à basses altitudes (moins de 210 m), sur des sols en pente, de texture moyenne et le plus souvent grossière (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991**). La teneur en matière organique, en potassium et en sodium, de ces sols, est variable, le magnésium et le phosphore sont en quantité importante, le calcaire est très peu toléré (**Kheffache, 1988**).

II.1.4. *Hedysarum capitatum*

Hedysarum spinosissimum subsp. *capitatum* (*Hedysarum* en tête, Hédisare capité) est une espèce annuelle diploïde ($2n=16$) (**Benhizia et al., 2004**), tardive et préférentiellement allogame (**Abdelkefi et Marrakchi, 2000 ; Hannachi-Salhi et al., 2002 ; Yagoubi et Chriki 2004**), largement distribuée dans le Bassin Méditerranéen occidental (**Benhizia et al., 2004**). Du point de vue morphologique *H. capitatum* se rapproche de *H. coronarium* (**Hannachi-Salhi et al., 2002**). En Algérie, cette espèce serait très commune dans le Tell, mais très rare ailleurs (**Quezel et Santa, 1962**). Selon **Abdelguerfi-Berrekia et al. (1991)**, *H. capitatum* présente une large répartition, elle se rencontre à Blida, Berouaghia, Cap Ivi, Oran, Saida, El Aouinet et Sétif. Elle est la seule espèce dans son genre qui va de l'étage bioclimatique aride à l'humide. Limitée aux régions ayant une pluviométrie inférieure à 650mm, elle pousse surtout à des altitudes moyennes voire élevées. Elle préfère les sols riches en limons, de texture moyenne à tendance limoneuse et généralement instable, riches en calcaire total et à pH alcalin (**Abdelguerfi-Berrekia et al., 1991 ; Abdelguerfi, 2002**).

II.2. Le microsymbiote : les rhizobiums

II.2.1. Définition

Les rhizobia (ou rhizobiums) sont des bactéries aérobies du sol, capables d'induire sur les racines des légumineuses (luzerne, soja, pois, féverole pour ne citer que des exemples d'intérêt agricole) et avec le genre *Parasponia* de la famille des *Ulmacées* (Skerman *et al.*, 1980 ; Rolfe et Gresshoff, 1988) la formation d'organes particuliers, les nodosités, au sein desquels elles se différencient en bactéroïdes capables d'assimiler l'azote de l'air (Benata *et al.*, 2008), ce qu' aucune plante n'est capable de faire directement, sont communément appelées rhizobiums ou rhizobia.

Actuellement, certains auteurs préfèrent substituer au terme de « rhizobia », qui est un terme dérivé du nom du genre *Rhizobium*, le terme de bactéries nodulant les légumineuses "BNL" (Zakhia *et al.*, 2004). Mise à part leur capacité à établir une symbiose avec les légumineuses, aucun caractère cultural, morphologique, physiologique ou biochimique, ne peut distinguer les rhizobia des autres bactéries du sol. Ils sont des bactéries gram négatif, à tendance microaérophile, en forme de bâtonnets de 0.1 à 1 sur 2 µm courts et arrondis à leurs extrémités, généralement mobiles par une ciliature polaire ou péritriche, aérobies strictes, chimiotrophes et hétérotrophes (Vincent 1981 ; Jordan, 1984 ; Elkan, 1992). Ils ne fixent pas l'azote moléculaire quand ils sont à l'état libre dans le sol, mais ils acquièrent cette propriété en se liant aux cellules racinaires des légumineuses dans des organes bien structurés « les nodosités ».

II. 2.2. Historique et évolution de la taxonomie des rhizobiums

Vers la fin du 19^{ème} siècle, il était établi que l'azote atmosphérique peut être assimilé par les racines nodulées des légumineuses grâce à des micro-organismes symbiotiques (El-Hillali, 2006 ; Willems, 2006). Plus tard, en 1889, Frank a inventé le nom du rhizobium originellement avec une seule espèce, *R. leguminosarum* (Frank, 1889 in Willems, 2006).

Baldwin et Fred (1929 in El-Hillali, 2006), ont rapporté que la classification des différents rhizobiums devrait être basée sur la spécificité de l'espèce bactérienne par rapport à la plante hôte. Cela a conduit à la constitution de "groupes d'inoculation croisée" (Elkan 1992), dont un rhizobia d'une espèce dans un groupe de nodulation croisée est supposé être capable à noduler toutes les autres espèces de ce groupe. Ce concept est resté pour longtemps la base de la classification des rhizobia (Jordan, 1984 ; Elkan, 1992). Ainsi, Fred *et al.* (1932 in El-Hillali, 2006), ont pu identifier six groupes de nodulation croisée, *Rhizobium leguminosarum* pour *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* et *Lens* ; *R. trifolii* pour *Trifolium* ; *R. phaseoli* pour *Phaseolus* ; *R. meliloti* pour *Glycine max* et *R. lupini* pour *Lupinus*. Les souches non classées étaient désignées par *Rhizobium sp.* Lohnis et Hansen (1921 in El-Hillali, 2006), ont montré que les rhizobiums présentent une croissance soit lente soit rapide dans le milieu synthétique. Les bactéries à croissance lente n'acidifient pas le milieu de culture et nodulent les

légumineuses des régions tropicales, alors que les bactéries à croissance rapide acidifient le milieu de culture et nodulent les légumineuses des régions tempérées (Norris, 1965). Ceci a permis à Jordan (1984), de classer les rhizobiums à croissance rapide et les rhizobiums croissance lente en deux genres séparés *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, respectivement, ayant des caractéristiques physiologiques et biochimiques distincts (Tab. 1) :

Tableau 1: Principales caractères distinctifs entre les rhizobiums à croissance rapide et lente (Elkan, 1992 in Haddadji, 2002 modifié).

Caractéristique	Rhizobiums à croissance rapide	Rhizobiums à croissance lente
Temps de génération	Inférieur à 6 heures	Supérieur à 6 heures
Nutrition carbonée	Utilisent une grande variété de sources de carbone: pentoses, hexoses, mono, di et tri-saccharides	Utilisent une variété réduite de sources de carbone: pentoses, hexoses.
Voies métaboliques	Utilisent les voies glycolytiques des pentoses phosphates, d'Enter-Doudoroff et d'Embden-meyerhoff	Utilisent les voies d'Enter-Doudoroff et d'Embden-meyerhoff et le cycle des hexoses
Flagellation	Péritriche	Subpolaire
Production de polysaccharides extracellulaires	Forte	Faible
Localisation de gènes symbiotiques	Plasmides et Chromosomes	Chromosomes
Localisation de gènes de fixation	<i>nif H, nif D, nif K</i> sur le même opéron	<i>nif H, nif D, nif K</i> sur des opérons séparés
Résistance aux antibiotiques	Faible	Elevée
Réaction en milieu de culture	Réaction acidifiante	Réaction alcalinisante
Espèces nodulées	Légumineuses des régions tempérées.	Légumineuses des régions tropicales

Cependant, plusieurs contre-exemples ont été rapportés :

- Des bactéries à taux de croissance différents peuvent être également isolées à partir d'une même espèce comme *Glycine max* (Scholla et Elkan, 1984), voire même de la même plante comme le genre *Acacia* qui peut être nodulée par des *Rhizobium* (Barnett *et al.*, 1993), des *Bradyrhizobium* (Dupuy *et al.*, 1994) et par des *Sinorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1994) ;
- *Lupinus* et *Corallina* qui sont des légumineuses des régions tempérées, sont nodulées par des bactéries à croissance lente (Allen et Allen, 1981). En revanche, *Sesbania* et *leucaena* qui sont des légumineuses des régions tropicales, sont nodulées par des bactéries à croissance rapide.

Ces observations discordantes entre la croissance de la bactérie et la gamme d'hôte ont jeté le doute sur la validité de cette classification, et le concept des groupes d'inoculation croisée, qui a été employé précédemment comme critère taxonomique important, est devenu seulement un test complémentaire des autres méthodes (Jordan, 1984).

En effet, une classification de rhizobia corrélée avec les caractéristiques symbiotiques se heurte avec la complexité des mécanismes moléculaires impliqués dans la spécificité d'hôte (Perret *et al.*, 2000), et également la difficulté d'établir la gamme de l'hôte (Pueppke et Broughton, 1999), en particulier en raison du grand nombre de légumineuses.

Une telle classification exige une standardisation des essais de nodulation et le contrôle parfait des conditions de croissance de plantes. Bien que sous-estimé probablement, il est bien établi que beaucoup de rhizobia peuvent noduler différents genres de légumineuse, et que beaucoup de légumineuses peuvent être nodulées par plusieurs espèces rhizobiales (**Laguerre et al., 2001**). Ces limites ont conduit les scientifiques à rechercher d'autres approches afin de classer ces bactéries, en employant une grande diversité des caractères morphologiques, nutritionnelles et métaboliques (**Graham, 1964**), ainsi que la sérologie (**Vincent et Humphrey, 1970**), les simples caractéristiques d'ADN (**De Ley et Rassel, 1965**) et l'analyse des plasmides dans la classification des rhizobiums. Mais ce n'est qu'après l'identification par **Woese (1987)** que les ADNr 16S des bactéries sont spécifiques à ces bactéries que la taxonomie des rhizobiums s'est considérablement modifiée (Tab. 2).

Tableau 2: Accroissement du nombre des espèces rhizobiales (**Willems, 2006**, modifiée et actualisé)

Classe	Genre	Nombre d'espèces						
		Avant 1980	81-85	86-90	91-95	96-00	01-06	07-09
Alpha-proteobactéries	<i>Rhizobium</i>	4	4	5	10	10	18	28
	<i>Bradyrhizobium</i>		1	1	3	3	7	7
	<i>Sinorhizobium</i>			2	5	8	14	15
	<i>Azorhizobium</i>			1	2	2	3	3
	<i>Mesorhizobium</i>					7	11	16
	<i>Allorhizobium</i>					1	1	1
	Methylobacterium						1	1
	Devosia						1	1
	Ochrobactrum						1	2
	Phyllobacterium						4	4
Beta-proteobactéries	<i>Shinella</i>							1
	<i>Burkholderia</i>					1	5	7
	<i>Ralstonia</i>						1	1
TOTAL		4	5	9	20	32	67	87

Depuis lors, les taxonomistes bactériens reconnaissent la nécessité de ne plus baser le système de classification des bactéries sur des similarités de fonction (diazotrophes, phototrophes, nodulation) et d'adopter une approche nécessitant la convergence du maximum de données (phénotypiques, génotypiques, phylogénétiques) pour déterminer les groupes taxonomiques ou taxons bactériens (**Zakhia et de Lajudie, 2006**). Cette approche, appelée taxonomie polyphasique a considérablement modifié la perception que les taxonomistes bactériens avaient des relations entre divers groupes de microorganismes (**Olsen et al., 1994**).

Elle intègre toutes les informations génotypiques, phénotypiques et phylogénétiques recueillies sur la cellule bactérienne (**Zakhia et de Lajudie, 2006**).

II.2.3. Classification actuelle des BNL

En effet, des bactéries appartenant à différents genres et classes taxonomiques sont aujourd'hui connues pour leur capacité symbiotique. Ainsi, les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Burkholderia*, *Ralstonia* (**Zakhia et de Lajudie, 2006**), *Phyllobacterium* (**Valverde et al., 2005**) et *Shinella* (**Lin et al., 2008**) [classe des α -protéobactéries] et *Burkholderia* et *Ralstonia* [classe des β -

protéobactéries] ainsi que certaines Gamma-protéobactéries (**Benhizia et al., 2004**), forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes de légumineuses (**Moulin et al., 2001 ; Chen et al., 2001**) (Tab. 3).

Tableau 3 : Classification actuelle des rhizobiums.

Genre	Espèce	Hôte	Références
Rhizobium	<i>R. lupinii</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>	Schroeter, 1886
	<i>R. leguminosarum</i>		Frank, 1889
	Biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, viciae, Lens, Lathyrus</i>	Jordan, 1984
	Biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Jordan, 1984
	Biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Jordan, 1984
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>	Lindström, 1989
	Biovar <i>orientalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Nick, 1998
	Biovar <i>officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	Nick, 1998
	<i>R. tropici</i>		Martinez-Romero et al., 1991
	Type II A	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala</i>	Martinez-Romero et al., 1991
	Type II B	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala</i>	Martinez-Romero et al., 1991
	<i>R. etli</i>		Segovia et al., 1993
	Biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hernandez-Lucas et al., 1995
	Biovar <i>mimosae</i>	<i>Mimosas, Leucaena, Phaseolus</i>	Wang et al., 1999a
	<i>R. gallicum</i>		Amarger et al., 1997
	Biovar <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	Biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	<i>R. giardinii</i>		Amarger et al., 1997
	Biovar <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	Biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	<i>R. hainanense</i>	<i>Acacia, Macroptilium, Stylosanthes</i>	Chen et al., 1997
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>	Van Berkum et al., 1998
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang et al., 1998
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla, Gueldenstaedtia,</i>	Tan et al., 2001
	<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>	Bouzar et Jones, 2001
	<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	Young et al., 2001
	<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp, Lespedeza</i>	Wei et al., 2002
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini et al., 2002
	<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>	Wei et al., 2003
	<i>R. daejeonense</i>	<i>Medicago sativa</i>	Quan et al., 2005
	<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Valverde et al., 2006
	<i>R. cellulosityticum</i>	<i>Sciure de Populus alba</i>	García-Fraile et al., 2007
	<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>	Gu et al., 2008
	<i>R. multihospitium</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Han et al., 2008b
	<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>	Peng et al., 2008
	<i>R. phaseoli</i>		Ramirez-Bahena et al., 2008
	<i>R. pisi</i>		Ramirez-Bahena et al., 2008
	<i>R. selenitirefucens</i>		Hunter et al., 2007
	<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Berge et al., 2009
	<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	Tian et al., 2009
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia, Dalbergia</i>	Lin et al., 2009	
Sinorhizobium	<i>S. meliloti</i>	<i>Melilotus, Medicago, Trigonella</i>	Dangeard, 1926
	<i>S. fredii</i>		Scholla et Elkan, 1984
	Chémovar <i>fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>	Scholla et Elkan, 1984
	Chémovar <i>sinensis</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
	<i>S. xinjiangense</i>	<i>Glycine</i>	Chen et al., 1988
	<i>S. saheli</i>	<i>Acacia, Sesbania spp, Prosopis</i>	de Lajudie et al., 1994
	Biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia spp</i>	Boivin et Giraud, 1999
	Biovar <i>sesbania</i>	<i>Sesbania spp</i>	Boivin et Giraud, 1999
	<i>S. terengae</i>		de Lajudie et al., 1994
	Biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia spp</i>	Loretet et al., 1996
	Biovar <i>sesbania</i>	<i>Sesbania spp,</i>	Loretet et al., 1996
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i>	Rome et al., 1996
	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick et al., 1999
	<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick et al., 1999
	<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei et al., 2002
	<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang et al., 2002

Tableau 3 suite : Classification actuelle des rhizobiums.

Genre	Espèce	Hôte	Références
Sinorhizobium	<i>S. abri</i>	<i>Abrus precatorius</i>	Ogasawara <i>et al.</i> , 2003
	<i>S. adhaerens</i>	<i>Medicago</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Pithecellobium</i>	Willems <i>et al.</i> , 2003
	<i>S. americanum</i>	<i>Acacia spp.</i>	Toledo <i>et al.</i> , 2003
	<i>S. indiaense</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Ogasawara <i>et al.</i> , 2003
	<i>S. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret <i>et al.</i> , 2007
Mesorhizobium	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Cicer</i> , <i>Astragalus</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
	<i>M. huakuui</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i> , <i>Sophora</i> , <i>Glycine</i>	Chen <i>et al.</i> , 1995
	<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i> , <i>Leucaena</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999b
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velázquez <i>et al.</i> , 2001
	<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao <i>et al.</i> , 2004
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao <i>et al.</i> , 2004
	<i>M. thiogangeticum</i>	Rhizosphere de <i>Clitoria ternatea</i>	Ghosh et Roy, 2006
	<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
	<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp</i>	Guan <i>et al.</i> , 2008
	<i>M. gobiense</i>	Légumineuses du désert de Xinjiang, Chine	Han <i>et al.</i> , 2008a
	<i>M. tarimense</i>	Légumineuses du désert de Xinjiang, Chine	Han <i>et al.</i> , 2008a
	<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal <i>et al.</i> , 2009
Bradyrhizobium	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i>	Jordan, 1982 et 1984
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
	<i>B. liaoningensis</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Van Berkum et Eardly, 2002
	<i>B. Yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>	Yao <i>et al.</i> , 2002
	<i>B. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2004
	<i>B. canariense</i>	<i>Genistoid legumes</i>	Vinuesa <i>et al.</i> , 2005
	<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Phaseolus</i> <i>Astragalus</i> , <i>Oxytropis</i> , <i>Onobrychis</i>	Parker, 2002 Laguerre <i>et al.</i> , 1997
Allorhizobium	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998c
Azorhizobium	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. johannae</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
	<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Moreira <i>et al.</i> , 2006
Methylobacterium	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp</i> ; <i>Lotononis</i>	Sy <i>et al.</i> , 2001
Devosia	<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2003
Ochrobactrum	<i>O. lupinus</i>	<i>Lupinus albus</i>	Trujillo <i>et al.</i> , 2005
	<i>O. cytisi</i>	<i>Cystisus scoroiarius</i>	Zurdo-Piñeiro <i>et al.</i> , 2007
Phyllobacterium	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium repens</i> , <i>Lupinus albus</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2005
	<i>P. ifriqiense</i>		Mantelin <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. bourgognens</i>		Mantelin <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. leguminum</i>		Mantelin <i>et al.</i> , 2006
Shinella	<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Lin <i>et al.</i> , 2008
Burkholderia	<i>B. caribensis</i>	<i>Macharieum lunatum</i> , <i>Mimosa</i>	Achouak <i>et al.</i> , 1999
	<i>B. phymatum</i>	<i>Macharieum lunatum</i>	Moulin <i>et al.</i> , 2001
	<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus carnosa</i>	Moulin <i>et al.</i> , 2001
	<i>B. dolosa</i> (<i>B. cepacia</i>)	<i>Alysicarpus</i>	Vermis <i>et al.</i> , 2004
	<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i>	Chen <i>et al.</i> , 2006
	<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	Chen <i>et al.</i> , 2008	
Ralstonia	<i>R. taiwanensis</i>	<i>Mimosa pudica</i> ; <i>Mimosa diplotricha</i>	Chen <i>et al.</i> , 2001

Cette classification est loin d'être définitive comparativement au grand nombre et à la vaste distribution des légumineuses hôtes, elle représente un champ en extension continuée qui s'affine sans cesse et s'enrichit régulièrement de nouveaux taxons au gré de nouvelles techniques et surtout de l'isolement de nouvelles souches particulièrement dans les zones tropicales et méditerranéennes, où la diversité est encore mal documentée.

Ainsi, l'habitat naturel de rhizobium s'est étendu aux tissus racinaires des plantes non légumineuses, notamment des graminées telle que le maïs (**Chabot et al., 1996**), le riz (**Chi et al., 2005**), le sorgho (**Matiru et Dakora, 2004**) et le blé (**Sabry et al., 1997**).

Les rhizobia nodulants le genre *Hedysarum*

Rhizobium sullae, anciennement "*Rhizobium hedysari*", est la seule espèce rhizobiale reconnue à ce jour d'être, capable de noduler le genre *Hedysarum*, exactement l'espèce d' *H. coronarium* (**Squartini et al., 2002**).

Le couple, *R. sullae* - *H. coronarium* présente un haut degré de spécificité. En effet, jusqu'à nos jours, aucune souche isolée des nodules d'*H. coronarium* n'a été capable de noduler une autre espèce et *vice versa* (**Benhizia et al., 2004**). Ainsi, **Cabrera et Ruiz-Argüeso (1979)** ont rapporté l'absence de nodulation croisée entre le *sulla* et différentes autres légumineuses telles que *Trifolium repens*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Glycine max*, *Cicer arietinum* etc.

Cette spécificité est observée même au sein du même genre (*Hedysarum*) ; en effet, **Glatzle et al. (1986)** ont rapportés que des souches isolées, au Maroc, de *H. coronarium* et de l'espèce étroitement liée *H. flexuosum* peuvent noduler les deux espèces mais les nodules formés sur les racines de la dernière espèce sont ineffectives. Même la souche à large spectre d'hôte NGR234 qui nodule plus de 100 légumineuses ainsi qu'une non légumineuse est aussi incapable de noduler le *sulla* (**Broughton 2002** cité par **Squartini et al., 2002**).

Ainsi, les rhizobia nodulant le *sulla* sont absents dans les sols où cette espèce ne se développe pas spontanément (**Casella et al., 1984 ; Glatzle et al., 1986 ; Moso et al., 1988**), et il a été démontré que l'extension de sa culture dans des nouvelles régions tels que l'Australie, les Etats-Unis et l'Inde, exige l'inoculation du des rhizobiums de *sulla* (**Casella et al., 1984**).

Récemment, des souches isolées des espèces *Hedysarum spinosissimum* L. subsp. *capitatum* Desf., *Hedysarum pallidum* Desf. et *Hedysarum carnosum* Desf., qui sont les parents étroits de *H. coronarium*, appartenant à la sous classe des gamma-protéobactéries ont été mises en évidence (**Benhizia et al., 2004**). Mais les propriétés physiologiques, biochimiques, et génétiques de ces souches n'ont pas encore été déterminées.

III. Mise en place de la symbiose: Rhizobium-Légumineuse

L'établissement de la symbiose Rhizobium-Légumineuse (Fig. 4) est un phénomène fortement complexe qui implique des interactions anatomiques, morphologiques, et biochimiques importantes entre les racines de la plante hôte et les bactéries (**Hopkins, 2003**). D'une manière générale, la symbiose Rhizobium-Légumineuse peut se résumer en trois étapes clés :

- La pré-infection qui correspond au dialogue moléculaire se mettant en place entre les deux partenaires symbiotiques (reconnaissance mutuelle);
- L'infection correspondant à l'entrée des bactéries libres dans la légumineuse ;
- La nodulation proprement dite qui correspond à la formation et le développement du nodule.

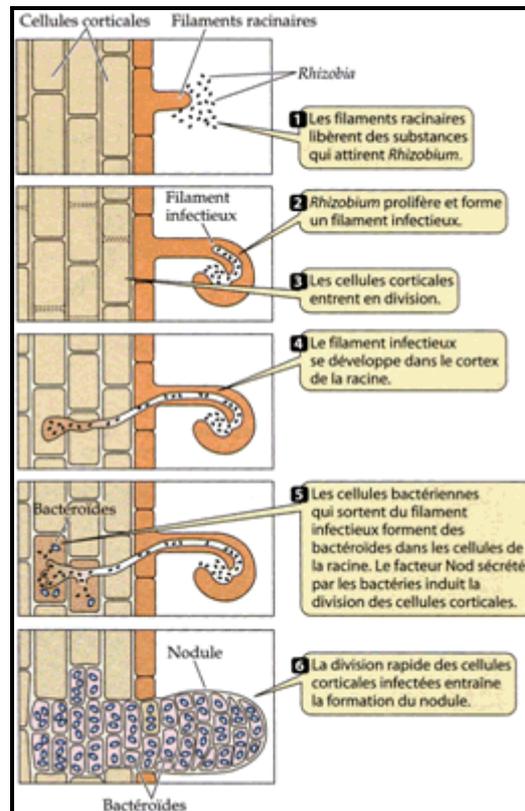


Figure 4 : Schéma global des différentes étapes aboutissant à la formation du nodule fonctionnel (**Perry et al., 2004**).

III.1. La reconnaissance mutuelle

Malgré leur diversité taxonomique, tous les rhizobia établissent la symbiose en utilisant les mêmes mécanismes moléculaires, comportant l'échange de signal moléculaire entre les deux partenaires (**Ba et al., 2002**). Les gènes bactériens dits de nodulation (gènes *nod*, *nol*, *noe*), qui comprennent les gènes de structure et les gènes régulateurs, jouent un rôle central dans ce dialogue (**Boivin et al., 1998** ; **Ba et al., 2002**).

Les racines de la plante exsudent des substances chimiques de reconnaissance qui diffèrent entre les espèces, il s'agit principalement des flavonoïdes (**Ba et al., 2002** ; **Hopkins, 2003** ;

Moschetti et al., 2005) qui appartiennent, en général, à trois groupes chimiques: les flavones, les flavanones et les isoflavones. Ces exsudats attirent les bactéries du voisinage (phénomène de chimiotactisme), qui en retour produisent et sécrètent des signaux extracellulaires lipo-chitono-oligosaccharides substitués appelés facteurs de nodulation (facteurs *nod*) (**Hopkins, 2003 ; Prescott et al., 2003**). Ces facteurs sont les molécules principales de signalisation (**Perret et al., 2000**); ils jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules (**Dénarié et al., 1996 ; Schultze et Kondorosi, 1998**). Leur production est le résultat de l'expression des gènes structuraux suite à l'activation des protéines régulatrices *NodD* (**Ba et al., 2002**).

Les facteurs *Nod*, produits par les rhizobiums en réponse à la présence d'une plante hôte, sont des molécules diffusibles synthétisées et sécrétées spécifiquement au cours de l'établissement de la symbiose. Ces molécules sont de nature lipo-chito-oligosaccharidique.

Chaque espèce de rhizobium produit une famille de facteurs *Nod* spécifiques qui diffèrent des facteurs *Nod* d'une autre espèce par différents groupements chimiques au niveau des sucres ainsi que par la nature de l'acide gras, notamment sa longueur et son niveau d'insaturation (**Lerouge et al., 1990 ; Dénarié et al., 1996**). La variabilité dans la structure des facteurs *Nod* pourrait être employée pour caractériser les isolats de rhizobia (**Lortet et al., 1996 ; Moschetti et al., 2005**). La caractérisation des facteurs *Nod* peut être utilisée comme un outil de classification symbiotique des souches de rhizobium (**Lortet et al., 1996**).

D'autres molécules produites par les rhizobia pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance des bactéries par la plante ou dans l'infection des cellules végétales. Parmi ces molécules figurent les polysaccharides extracellulaires (EPS), les lipopolysaccharides, les antigènes K, les lectines et les glucanes cycliques (**Broughton et al., 2000 ; Spaink, 2000**).

III.2. L'infection

L'infection débute juste après que le rhizobium s'adsorbe par chimiotactisme au poil absorbant. L'adhésion, vraisemblablement irréversible, des cellules bactériennes aux cellules épidermiques de la plante hôte est rendue possible par l'action des deux partenaires : la plante par les lectines et le rhizobium par les polysaccharides de surface (Rhicaadhésine, chez *R. leguminosarum*) (**Hopkins, 2003 ; Perry et al., 2004**).

Il existe une variabilité dans le type d'infection et dans la morphologie des nodules chez les légumineuses. Les rhizobia sont capables de pénétrer à l'intérieur des légumineuses via deux modes d'infection distincts (**Sprent, 1993**) (Fig. 5) :

- L'infection intracellulaire ou l'invasion par l'épiderme via les poils absorbants (**RHC**, "root hair curling"); l'invasion de la racine se fait via les poils absorbants en croissance. Le recourbement du poil permet la constitution d'un cordon d'infection (**it**: infection thread) qui

véhicule les bactéries jusqu'au primordium nodulaire (**np**: nodule primordium). Ce mécanisme est le plus courant, on l'observe au niveau des racines (surtout secondaires) enterrées.

- L'infection intercellulaire ou l'invasion par le cortex externe via une pénétration intercellulaire au niveau de fissures de l'épiderme ou "*crack entry*" (**LRB**, "lateral root base invasion"); l'invasion se fait de manière intercellulaire au niveau de l'épiderme. L'induction de la mort de quelques cellules au point d'entrée permet la formation d'une poche d'infection (**ip**: infection pocket), à partir de laquelle les cordons d'infections emmènent les bactéries jusqu'au primordium nodulaire ; ce mode est plus diffus que dans le processus "RHC".

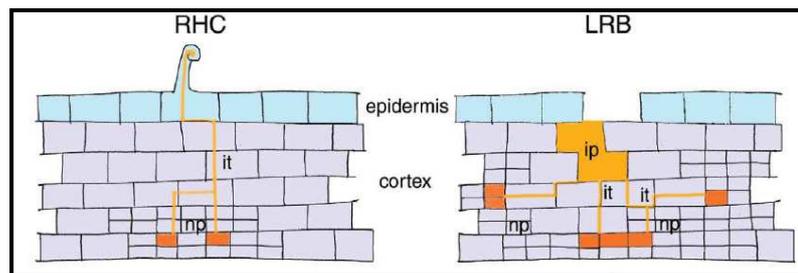


Figure 5: Comparaison entre les deux procédés d'invasion de la racine par les bactéries (Goormachtig *et al.*, 2004). RHC, "root hair curling"; LRB, "lateral root base invasion" ou "*crack entry*"

III.3. La nodulation proprement dite

En parallèle et simultanément à l'infection de la racine par les bactéries se développe un nouvel organe qui accueillera les bactéries : le nodule ou nodosité. Le nodule est un organe spécialisé, spécifiquement mis en place pour la symbiose plante/micro-organismes fixateurs et qui requiert un programme d'organogénèse unique. Le nombre, la masse et la position des nodules sont contrôlés par la plante en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique (Schauser *et al.*, 1999 ; Svitoonooof, 2003).

III.3.1. La structure du nodule

Les nodules des fabacées présentent une structure similaire à celle d'une tige. De la périphérie vers l'intérieur du nodule, on trouve (Svitoonooof, 2003):

- Un tissu périphérique qui assure les échanges avec le reste de la plante et la protection des tissus internes, et est formé :
 - ▶ d'un cortex externe constitué en majorité par des cellules parenchymateuses ;
 - ▶ d'un cortex moyen ;
 - ▶ des tissus vasculaires constitués surtout de phloème et entourés par un endoderme et un péricycle ;

- ▶ Le cortex interne formé de une à trois couches de cellules ;
- Un tissu central parenchymateux qui contient les cellules infectées par les rhizobia et des cellules non infectées plus petites. C'est le siège de la fixation d'azote.

Sur la base de leur morphologie, de leur structure et de la durée de fonctionnement du méristème nodulaire, on distingue trois types de nodules chez les légumineuses (Fig. 6) :

- Dans les nodules déterminés, les divisions cellulaires à l'origine du primordium nodulaire ont lieu au niveau du cortex externe. La persistance du méristème chez ces espèces est très éphémère et la croissance en longueur du nodule est limitée. Une croissance en épaisseur a lieu par hypertrophie des cellules corticales et par des divisions de cellules qui contiennent déjà des rhizobia. Ce processus se traduit par une forme sphérique et un état de différenciation identique pour toutes les cellules (Svitonnooff, 2003). Les nodules déterminés se rencontrent généralement chez les légumineuses tropicales : soja, arachide, cowpea, haricot, etc.

- Chez les espèces à nodules indéterminés, les divisions cellulaires ont lieu au niveau du cortex interne, la zone méristématique qui produit le nodule est persistante. De ce fait, ces nodules ont une croissance indéfinie, ce qui se traduit par une forme allongée. Ce type de nodules est observé surtout chez les légumineuses tempérées : pois, lentille, trèfle, luzerne, fève, vigne, etc.

- Un troisième type intermédiaire a été identifié chez le genre *Lupinus* et *Sesbania rostrata*. Les divisions cellulaires se font soit dans le cortex externe soit dans le cortex interne, conduisant à la formation de nodosités soit déterminées soit indéterminées (Hirsch *et al.*, 2001).

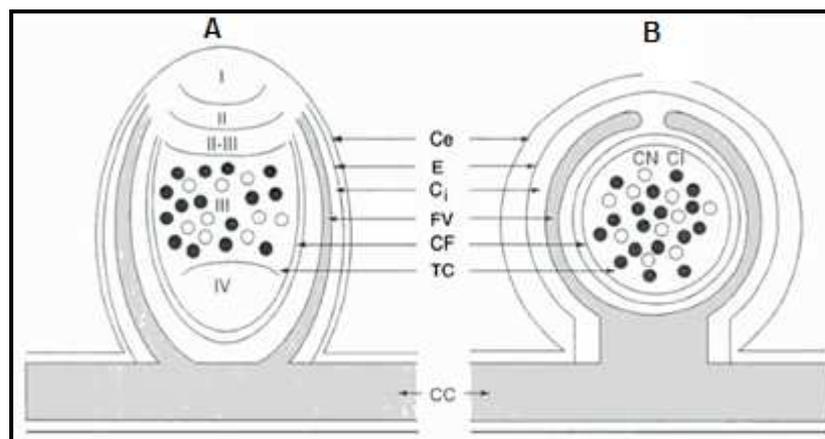


Figure 6: Coupe longitudinale schématique d'une nodosité de type indéterminé (A) et de type déterminé (B). **I:** Zone méristématique, **II:** zone d'infection, **II-III:** zone fixatrice d'azote, **IV:** zone de sénescence ; **Ce:** cortex externe, **E:** endoderme, **Ci:** cortex interne, **FV:** faisceau vasculaire, **CF:** couche frontière, **TC:** tissu central, **CC:** cylindre central de la racine, **CI:** cellule infectée, **CN:** cellule non infectée (Franssen *et al.*, 1992).

III.3.2. Le fonctionnement du nodule

Lorsque l'association symbiotique entre les bactéries fixatrices d'azote et le partenaire plante est fonctionnelle, les bactéroïdes, à l'intérieur du nodule, transforment l'azote atmosphérique en ammonium directement assimilable par la plante grâce à la nitrogénase bactérienne (**Smith et Gallon, 1993**) (Fig. 1).

Une activité glutamine synthétase cytoplasmique et un glutamate synthétase (GOGAT) plastidique très importantes dans les nodules pourraient incorporer rapidement l'ammonium dans des acides aminés (glutamine et glutamate respectivement) (**Svitonoff, 2003**).

Des études récentes ont montré qu'un échange d'acides aminés entre le bactéroïde et le cytoplasme (Glu/Gln ; Asp/Asn) permet d'exporter l'azote vers la cellule végétale et le xylème (**Lodwig et al., 2003**).

Suivant la forme d'exportation d'azote, on distingue deux types de plantes symbiotiques (**Schubert et Bolland, 1990**) :

- ▶ Les plantes à amide : regroupant généralement les légumineuses de régions tempérées dont l'exportation de l'azote se fait surtout sous forme d'amides (asparagine surtout, accessoirement glutamine).

La synthèse d'asparagine consomme de l'aspartate (ou ses précurseurs, malate et oxaloacétate) qui seraient synthétisés par une PEP carboxylase et une malate déshydrogénase à partir du CO₂. 9-30% du CO₂ provenant de la respiration serait recyclé par ce mécanisme (**Kahn et al., 1998**).

- ▶ Les plantes à uréides, regroupant essentiellement les légumineuses des régions tropicales, où les formes prépondérantes de transport de l'azote sont les uréides (allantoïne et acide allantoïque) dont la production implique la synthèse *de novo* de purine (**Schubert et Boland, 1984 ; Kahn et al., 1998**).

III.3.4. Sénescence des nodosités fixatrices

La capacité fixatrice d'azote des cellules infectées est une étape passagère suivie d'une sénescence dans une durée plus ou moins courte (**Kijne, 1975**).

Cette durée est influencée principalement par quatre facteurs :

- ▶ l'état physiologique de la légumineuse ;
- ▶ la teneur en humidité du sol ;
- ▶ la présence de parasites ;
- ▶ et la souche de rhizobia formant le nodule.

La sénescence des nodules se déroule différemment selon leur type. Les nodules indéterminés peuvent persister plus d'une saison (**Vance *et al.*, 1982**) tandis que les nodules déterminés peuvent persister seulement quelques semaines (**McDermott et Graham, 1989**).

Les études morphologiques des cellules sénescents de nodule ont révélé l'existence d'activités protéolytiques, croissantes avec l'âge des nodosités, associé à un désordre dans la membrane pér bactéroidienne et la formation de grandes vacuoles contenant les bactéroïdes dégradés (**Kijne, 1975 ; Mellor et Wiemken, 1988**). Ces activités affectent l'ultra structure des nodosités, et sont responsables de la lyse des protéines solubles et plus particulièrement de la leghémoglobine dont la disparition entraîne une perte importante de l'activité fixatrice. Ainsi, des altérations de l'environnement racinaire (rareté de l'eau, excès de sel, excès de nitrates...) provoquent une sénescence précoce avec l'induction de ces mêmes activités protéolytiques (**Trinchant *et al.*, 1997**).

IV. Régulation génétique de la symbiose

L'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse est sous contrôle génétique à la fois du génome bactérien et celui de la plante hôte (Schultze et Kondorosi, 1998 ; Wang *et al.*, 2002 ; Mutch *et al.*, 2003) (Tab. 4).

Chez le microsymbiote (rhizobium) la régulation de la symbiose est assurée par une batterie de gènes (classés en trois groupes : *nod*, *fix* et *nif*) localisée soit au niveau chromosomique (*Bradyrhizobium*) soit au niveau plasmidique (pSym ou plasmide Sym) (*Rhizobium*) (Mercado-Blanco et Toro, 1996 ; Schultze et Kondorosi, 1998 ; Dénarié, 2000 ; Raven *et al.*, 2003).

En revanche, on parle pour les gènes de plante de gènes de noduline (Legocki et Verma, 1980) qui sont spécifiquement induite par les rhizobiums (Govers *et al.*, 1987). En fonction de leur cinétique d'apparition, on distingue : les nodulines précoces et les nodulines tardives (Scheres *et al.*, 1990).

Tableau 4: Contrôle génétique de la symbiose Rhizobium-Légumineuse.

Groupe	Gène	Fonction	Référence
Le microsymbiote : les rhizobia			
Nod	<i>nodD</i>	Code pour une protéine cytoplasmique soluble NodD.	Moschetti <i>et al.</i> , 2005
	<i>nodA</i>	Contrôle le transfert d'un acide gras sur l'atome d'azote ainsi libéré	Spaink, 1995 ; Carlson <i>et al.</i> , 1994
	<i>nodB</i>	Contrôle la désacétylation du résidu N-acétyl-glucosamine de l'extrémité non réductrice de la molécule, le rendant ainsi disponible pour l'acylation	
	<i>nodC</i>	Possède une activité N-actyl-glucosaminyl-transférase, et pourrait donc catalyser la synthèse de la chaîne d'oligochitine	
	gènes <i>nod</i> spécifiques <i>hsn</i> (<i>host specific nod genes</i>)	Ils codent pour la biosynthèse ou le transfert des différents substituants qui confèrent aux facteurs <i>Nod</i> leur spécificité vis-à-vis de telle ou telle plante (deuxième niveau de spécificité).	Dénarié <i>et al.</i> , 1996 ; Perret <i>et al.</i> , 2000 ; Tipllett et Sadowsky, 1992
Nif	<i>nifD</i>	Code pour la sous-unité α de la protéine MoFe	Sadowsky, 2005 ; Vance, 2005
	<i>nifK</i>	Code pour la sous-unité β de la protéine MoFe	
	<i>nifH</i>	Code pour la protéine Fe	Fischer, 1994
	<i>nifB</i>	Codent pour la biosynthèse du cofacteur de la protéine FeMo.	
	<i>nifE</i>		
	<i>nifN</i>	Codent pour les protéines de transport des électrons.	Hopkins, 2003
	<i>nifF</i>		
	<i>nifJ</i>		
	<i>NifA</i>	L'activateur de transcription des gènes <i>nif</i> (régulation positif) et autorégule sa propre synthèse	Pelmont, 2005
	<i>NifL</i>	Freine l'activité de <i>nifA</i> et retarde l'expression des gènes <i>nif</i> (régulation négatif)	
Fix	<i>fixA,B,C,X</i>	Pour la chaîne de transport des électrons à la nitrogénase	Delgado <i>et al.</i> , 1998
	<i>fixG,H,I,S</i>	Inconnue	
	<i>fixN,O,Q,P</i>	Codent pour le cytochrome oxydase qui est exigé pour la respiration des rhizobia dans le cas de faibles teneurs en oxygène	
Le macrosymbiote : la légumineuse			
Nodulines précoce	<i>ENOD12</i>	Codent des protéines riches en proline, vraisemblablement associées à la formation des parois des filaments d'infection	Mylona <i>et al.</i> , 1995
	<i>ENOD5</i>		
	<i>ENOD40</i>	Semble impliqué dans des modifications de la balance hormonale de la plante	
Nodulines tardives		La légghémoglobine : capte l'oxygène avec une très haute affinité, et le distille en petite quantité aux bactéroïdes	Vargas <i>et al.</i> , 1996

V. Approches d'étude de la diversité des rhizobia

Deux types d'approches sont actuellement les plus utilisés pour étudier la diversité des rhizobiums. Il s'agit des approches phénotypiques (surtout physiologiques) et des approches moléculaires.

V.1. Les approches phénotypiques

Ces approches font appel principalement aux caractéristiques symbiotiques (la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée), morphologiques (les caractéristiques de la cellule bactérienne et de la colonie), biochimiques (la présence et/ou l'activité de différents enzymes tels que la glutamate déshydrogénase) et physiologiques (la tolérance des souches à certains facteurs de l'environnement telle que la salinité) des bactéries en utilisant des techniques standardisées (**Zakhia et de Lajudie, 2006**).

Elles sont toujours admises comme étape primordiale pour la séparation et l'identification des souches nouvellement isolées et constituent la base de la description formelle des taxa.

Dans ce volet, les critères retenus dans notre travail sont des critères physiologiques basés sur l'aptitude des souches à croître en présence de différents niveaux de certains facteurs environnementaux à savoir la salinité (NaCl), le stress hydrique (PEG6000), la température et le pH. Cette analyse phénotypique classique constitue la base de la microbiologie (**Zakhia et de Lajudie, 2006**).

V.1.1. La salinité

Parmi les facteurs environnementaux, la salinité limite, d'une manière délétère, la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (**Ben Khaled et al., 2003**). Les deux composantes impliquées dans la sensibilité de la symbiose au sel sont, d'une part, le développement et le fonctionnement des nodosités et, d'autre part, la croissance et l'aptitude des organes photosynthétiques à approvisionner les nodosités en photosynthétats (**Saadallah et al., 2001**).

Dans le sol, la salinité affecte la multiplication et la survie du rhizobium (**Dua, 1992**), affecte le processus de nodulation (**Banet et al., 1996**), inhibant l'expansion et la courbure des poils absorbants (**Sprent et Zahran, 1988**) et entraînant une diminution du nombre de nodules, réduit leur contenu en légghémoglobine (**Delgado et al., 1993**), diminue l'activité de la nitrogénase (**Delgado et al., 1993**), altère la diffusion intranodulaire de l'oxygène (**Escuredo et al., 1996**) et accélère la sénescence des nodules (**Sunuta et al., 1995**).

Ainsi, la diminution des photosynthétats fournis pour les nodules (**Georgiev et Atkins, 1993**) et la réduction des substrats fournis pour la respiration des bactéroïdes (**Delgado et al., 1993**) constituent la principale limitation de la fixation symbiotique de l'azote sous contrainte saline (**Ben Khaled et al., 2003**).

Généralement, les rhizobia sont plus tolérantes au stress salin que leurs légumineuses hôtes (**Saadallah et al., 2001**).

V.1.2. Le stress hydrique

Le stress hydrique peut avoir un impact dramatique sur la symbiose légumineuse-rhizobium car il réduit fortement la croissance et la survie des populations rhizobiales. Selon **Hungria et Vargas (2000)**, la formation, la longévité et le fonctionnement de nodules, la synthèse du léghémoglobine sont diminués sous contrainte hydrique ce qui accélère ainsi la sénescence des nodules.

L'effet du stress hydrique sur la symbiose dépend généralement de la phase de la croissance et de développement de la plante, mais aussi de la sévérité de la contrainte hydrique (**Zahran, 1999**). Il est plus affectant pendant la phase végétative que la phase reproductrice (**Pena-Cabriales et al., 1993**).

Les deux partenaires et toutes les étapes de l'établissement de la symbiose *Rhizobia*-légumineuse sont sensibles au stress hydrique (**Serraj et al., 1999**). Les souches de rhizobia à croissance rapide sont plus sensibles au stress hydrique par rapport aux souches à croissance lente (**Sprent, 1971**). Les nodules déterminés sont plus sensibles au stress hydrique par rapport aux nodules indéterminés (**Serraj et al., 1999**).

V.1.3. La température

La température joue un rôle important dans le processus de fixation de l'azote du fait que sa valeur critique est variable selon les espèces rhizobiales: 30°C pour le trèfle et le pois (**Michiels et al., 1994**), 30 à 33°C pour le haricot (**Piha et Munns, 1987**) et 35 à 40°C pour les graines d'arachide et de soja (**Michiels et al., 1994**).

Selon **El-Hillali (2006)**, l'exposition des rhizobia aux hautes températures peut mener à la perte du plasmide symbiotique et par conséquent la perte de la capacité infective de la bactérie. Les températures élevées peuvent mener à la réduction du nombre de cellules au dessous du niveau demandé pour une bonne nodulation.

V.1.4. Le pH

Le pH du sol joue un rôle prépondérant aussi bien dans la survie et la prospérité des rhizobactéries, que dans la croissance de leur plante hôte. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour s'établir dans le sol (**Bordeleau et Prévost, 1994**).

L'acidité est, généralement, plus néfaste que ne l'est l'alcalinité (**Coventry et Evans, 1989**). Elle affecte considérablement tous les stades de la symbiose rhizobium-légumineuse (**Cooper, 1982 ; Richardson et al., 1988**), inhibe la croissance racinaire, réduit considérablement le nombre des nodosités et l'activité nitrogénasique, et affecte l'ultrastructure nodulaire.

Le pH du sol a une grande influence sur la survie et la multiplication des rhizobiums. Face à l'acidité, les souches de rhizobium présentent différents mécanismes de tolérance: l'exclusion et l'expulsion des protons H⁺ (**Chen et al., 1993a**), la forte teneur en potassium et en glutamate du cytoplasme des cellules stressées (**Aaron et Graham, 1991**), le changement de la composition des lipopolysaccharides (LPS) (**Chen et al., 1993b**), et l'accumulation de polyamines (**Fujihara et Yoneyama, 1993**).

L'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums. Selon **Jordan (1984)**, la majorité de ces bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9.5, ainsi les souches à croissance lente semblent plus tolérantes au pH basique par rapport aux souches à croissance rapide. L'effet négatif que représente le pH alcalin du sol est l'indisponibilité des minéraux indispensables autant pour le rhizobium que pour la plante hôte tel que le fer et le manganèse (**Bordeleau et Prévost, 1994**).

VI.2. Les approches moléculaires

Il s'agit de techniques qui ciblent directement les acides nucléiques ADN ou ARN. Elles sont actuellement les méthodes dominantes pour la caractérisation du fait que la nouvelle conception de la notion "diversité", suite aux progrès biotechnologiques, doit refléter la variabilité des génomes (les similarités et les dissemblances).

Ces approches sont moins dépendantes des variables de croissance des bactéries, plus stable, prennent moins de temps, permettent, d'une part, la détermination des relations phylogénétiques entre les isolats microbiens et, d'autre part, de placer les souches dans leurs groupes spécifiques (**Abdelguerfi-Laouar, 2005**).

Bien qu'à l'heure actuelle diverses techniques moléculaires sont disponibles, l'amplification d'ADN, appelée PCR (Polymerase Chain Reaction) est, certainement, la mieux adaptée pour étudier la biodiversité bactérienne (**Vandamme et al., 1996**). Mise au point en 1985 par Karry MULLIS (**Cardinet, 2000** cité par **Abdelguerfi-Laouar, 2005**), elle est dotée de caractérisation rapide, simple et nécessitant très peu de matériel biologique. En plus, elle offre la possibilité d'obtenir un grand nombre de copies d'une séquence nucléique cible à partir d'une faible quantité d'ADN, le fragment

amplifié peut atteindre une taille de 4000 paires de bases (parfois plus sous certaines conditions) (**Prin et al., 1993**).

Il est clair que l'application et l'utilisation de l'approche moléculaire pour l'identification et la classification des microorganismes a fortement progressé avec l'avènement de la PCR (**Abdelguerfi-Laouar 2005**) qui a permis le développement de nombreuses techniques de typage génétique qui ont l'intérêt d'être universelles, simples et rapides. L'une des techniques moléculaires, employant l'amplification d'ADN (PCR), utilisée pour l'étude de la diversité génétique des rhizobia consiste à amplifier différentes classes de séquences répétées qui existent en multiples copies dans le génome bactérien (**Versalovic et al., 1991**). Les séquences répétitives, courtes et hautement conservées dans l'espèce, existent en multiples copies dans le génome de la plupart des bactéries Gram négatives et plusieurs Gram positives (**Lupski et Weinstock, 1992**). Ainsi, elles semblent particulièrement nombreuses sur les génomes des rhizobiums comparativement aux autres procaryotes (**Abdelguerfi-Laouar, 2005**). Dans l'approche moléculaire utilisant les séquences répétées (appelée communément REP-PCR), trois familles de séquences répétées sont les plus utilisées à savoir les séquences Repetitive Extragenic Palindromic (REP) de 35 à 40 pb (**Sharples et Lloyd, 1990**), Enterobacterial Repetitive Intergenic (ERIC) de 124 à 127 pb (**Hulton et al., 1991**) et l'élément BOX de 154 pb contenant trois unités: BoxA, BoxB et BoxC (**Versalovic et al., 1991 et 1994 ; Versalovic et Lupski, 1998**). Ces séquences sont localisées en orientation inverse dans des zones distinctes sur le chromosome bactérien (**Versalovic et al., 1994**). Elles paraissent hautement conservées chez les souches apparentées et très distinctes entre les différentes espèces ou genres bactériens (**Versalovic et al., 1991**). Du fait que ces séquences sont hautement conservées chez les *Rhizobiaceae*, leur amplification est utilisée pour le typage et la phylogénie des rhizobiums (**Santos et al., 1999**) ainsi que pour étudier la diversité et la taxonomie de certaines bactéries endophytes associatives (**Mittal, 2004**).

L'application de la rep-PCR aux rhizobiums a été initiée par **de Bruijn (1992)**. Ce dernier a utilisé la REP-PCR chez des souches de *S. meliloti* en utilisant des amorces de 18 à 22 pb conçues d'une manière complémentaire aux séquences inversées (**Versalovic et al., 1991**). Depuis, ces PCR sont considérées comme des méthodes efficaces pour établir l'empreinte génomique des bactériens.

Le point fort de la rep-PCR est celui d'être absolument indépendante de la purification de l'ADN, du fait que les fragments amplifiés issus d'une cellule cultivée en boîte (une seule colonie), d'une préculture, voire même d'un extrait nodulaire, présentent des profils électrophorétiques similaires (**El-Hillali, 2006**). Ce qui renforce le caractère stable de cette méthode dans l'étude de la diversité des souches.

Dans notre étude, nous avons utilisé les rep-PCR comme technique d'empreinte génétique et nous avons choisi les amorces Box pour la caractérisation de la diversité génétique des souches de bactéries nodulant les espèces du genre *Hedysarum*.

MATERIEL

ET

METHODES

I.1. Origine du matériel végétal

Notre étude a porté sur des isolats issus de nodules de différentes espèces du genre *Hedysarum*, à savoir *H. coronarium* ; *H. flexuosum* ; *H. aculeolatum* et *H. capitatum*, conservés, au froid (+4°C), dans des tubes contenant un dessiccateur (CaCl_2) en granulé couvert par du coton cardé.

Ces nodules, récoltés *in situ*, proviennent de plusieurs prospections menées par Dr. Laouar M. (INRAA) et Pr. Abdelguerfi A. (ENSA) pendant la période du printemps des années 2003, 2006 et 2007 dans différentes régions du pays (Fig. 7).

Les régions prospectées sont réparties selon l'échelle bioclimatique d'Hemberger de l'étage aride à hiver froid jusqu'à l'étage humide à hiver doux, elles présentent une variation remarquable d'altitude (de 28 m à 1010 m) et de pluviométrie moyenne annuelle (de 100 mm à 1000 mm).

L'ensemble des sites de collecte des nodules et de prélèvement des échantillons du sol figure dans le tableau 5. Les nodules ont été prélevés dans chaque site sur une ou plusieurs plantes.

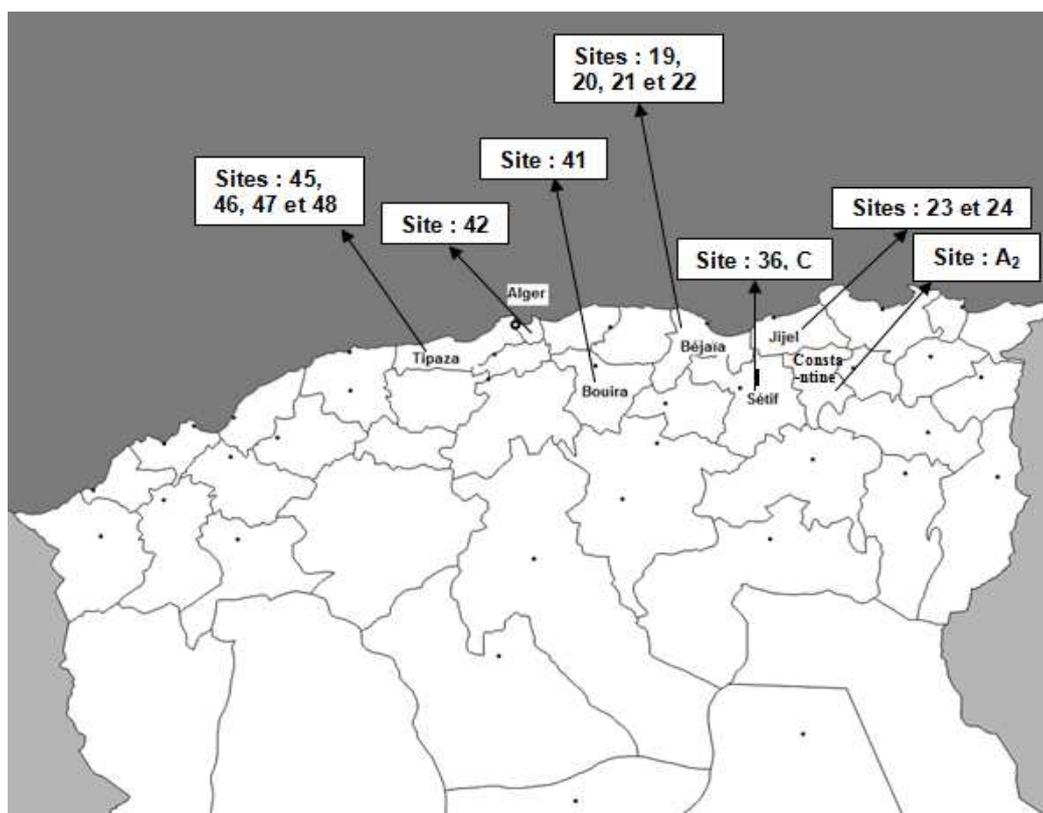


Figure 7: Position géographique des zones de collection des nodules et des échantillons de sol.

Tableau 5. Liste des différents sites géographiques d'origine des souches étudiées.

Espèce	Code du site	Wilaya	Année de prospection	Wilaya ou localité prospectée	Nombre de plants	Altitude	Etage bioclimatique
<i>H. coronarium</i>	19	Bejaia	2003	Rmila	4	200 m	Sub-humide
	20	Bejaia	2003	Oued Ghir	2	250 m	Sub-humide
	21	Bejaia	2003	Souk El Thnine	2	50 m	Sub-humide
	22	Bejaia	2003	Amoucha	3	900 m	Sub-humide
	23	Jijel	2003	Alouana	2	50 m	Sub-humide
	24	Jijel	2003	El Kannar	1	40 m	Sub-humide
	36	Sétif	2003	Beni Fouda	1	1010 m	Sub-humide
	C	Sétif	2007	Nord de Sétif	1	-	Sub-humide
<i>H. flexuosum</i>	41	Bouira	2003	Bouira	1	600 m	Sub-humide
	42	Alger	2003	Dely Brahim	1	28 m	Sub-humide
	45	Tipaza	2006	Tipaza	2	-	Sub-humide
<i>H. aculeolatum</i>	46	Tipaza	2006	Tombeau de la Chrétienne	1	-	Sub-humide
	47	Tipaza	2006	Moujou	2	-	Sub-humide
	48	Tipaza	2006	Demousse	2	-	Sub-humide
<i>H. capitatum</i>	19	Bejaia	2003	Rmila	1	200 m	Sub-humide
	A ₂	Constantine	2007	Près de Constantine	2	-	Semi-aride

I.2. Caractérisation physico-chimiques des sols

Des échantillons de sols ont été systématiquement prélevés dans tous les sites de collecte. L'analyse de ces échantillons représente une étape importante dans la détermination des caractéristiques édaphiques relatives à chaque site de collecte.

Les échantillons du sol prélevés des sites ont subi une série d'analyses physiques et chimiques. Les échantillons ont d'abord été séchés à l'air libre, puis broyés et tamisés à 2mm. Les analyses ont été réalisées selon les protocoles en vigueur au niveau des laboratoires du département Pédologie de l'ENSA et de l'INRAA et correspondent à ceux préconisés par **Duchaufour (1970)** et **Aubert (1978)**.

Les analyses effectuées sur ces sols sont :

- pH (1/2,5) ;
- Conductivité électrique (1/5 à 25°C) ;
- Calcaire total (méthode volumétrique) ;
- Carbone (méthode Anne) pour le calcul de la matière organique ;
- Azote total (méthode Kjeldhal) ;
- Phosphore (méthode Joret-Hebert).

Ces analyses ont été effectuées dans le laboratoire des analyses du sol au niveau du département Phytotechnie de l'ENSA.

I.3. Milieux de culture

Les tests de caractérisation ont été menés soit dans des boîtes de Pétri (milieu solide), soit dans des tubes à essai (milieu liquide).

Quatre milieux de culture ont été utilisés (Annexe 1):

- Le milieu **Yeast-Extract Mannitol Agar (YEM)** solide avec le Rouge Congo pour l'isolement, la culture des isolats et sans le Rouge Congo pour leur caractérisation vis-à-vis du pH ;
- Le milieu **YMB** (liquide) pour la caractérisation des souches envers le stress hydrique et pour le test du BTB;
- Le milieu **Tryptone Yeast Extract (TY)** pour la purification et la caractérisation physiologique des souches (stress salin et température) ;
- Le milieu **TY à 80%** pour la conservation des souches ;
- Le milieu **TY liquide** pour l'inoculation ainsi que pour la caractérisation moléculaire des souches.

I.4. Isolement et purification des rhizobia

I.4.1. Stérilisation des nodules

Une grappe ou quelques nodules de la plante sont mis dans de l'eau distillée pendant 30 minutes (le temps de voir les nodules devenir roses) ; puis les nodules sont lavés plusieurs fois avec de l'eau distillée pour les débarrasser des grains de terre et d'autres déchets.

La stérilisation des nodules se réalise par leur trempage dans de l'eau de Javel (12° diluée à 25%) pendant 2-3 minutes, tout en agitant le tube, pendant cette période. Ensuite, les nodules sont relavés encore plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile (EDS) pour les débarrasser de l'eau de Javel.

I.4.2. Extraction et purification

Dans une boîte de pétri stérile, on dissèque la grappe en nodules sans les blesser à l'aide d'un scalpel stérile et d'une pince (passée à la flamme). Trois nodules pour chaque plante ont été choisis pour le reste du protocole.

Chaque nodule choisi est mis dans un tube contenant 1ml EDS (c'est le témoin) puis transféré dans une série de quatre ou cinq tubes de 1ml d'EDS. Dans le deuxième tube de la série à l'aide d'un outil stérile, on écrase un nodule pour libérer les bactéries. C'est le tube de la solution mère (SM), à partir duquel différentes concentrations de suspensions bactérienne (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) sont obtenues. De chaque tube (T, SM, 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) 0,3ml sont étalés à la surface d'une boîte de Pétri contenant du milieu YMA, à l'aide des billes stériles de 0,4mm de diamètre.

Après 48h d'incubation à 28°C, les colonies d'aspect gommeux et translucide et de couleur rose clair, caractéristique des souches de rhizobiums, sont purifiées par repiquages successifs sur milieu YMA.

Les souches ainsi purifiées et nommées sont conservées à 4°C dans des Eppendorfs contenant du milieu TY à 80% incliné.

I.5. Choix d'une collection de travail

De toute la collection de souche de rhizobiums isolée, il n'a été retenu que celles où nous sommes sûrs de leur appartenance aux nodules étudiés. Donc, la sélection des souches à étudier a été effectuée sur la base d'absence de colonies dans la boîte (de pétri) témoin, à l'exception de 3 souches dont le témoin présente des contaminations. Le nombre de souches varie de 1 à 4 souches par nodule. Le nombre total des souches choisies est de 89 souches (Tab. 6).

Tableau 6: Nombre de nodules, des plantes et des isolats étudiés pour chaque espèce de *Hedysarum* dans chaque site de collecte.

Espèce	Sites	Plantes	Nodules	Isolats	Total
<i>H. coronarium</i>	19	4	5	10	43
	20	2	3	7	
	21	2	2	7	
	22	3	3	7	
	23	2	3	5	
	24	1	1	1	
	36	1	1	2	
<i>H. aculeolatum</i>	C	1	1	4	25
	46	1	1	6	
	47	2	2	8	
<i>H. flexuosum</i>	48	2	3	11	15
	41	1	2	6	
	42	1	1	2	
<i>H. capitatum</i>	45	2	2	7	06
	A ₂	2	2	5	
	19	1	1	1	
TOTAL	15	28	33	89	89

I.6. Test d'authentification des isolats sur leur plante hôte

La capacité d'induire la formation de nodosités sur la racine de la légumineuse hôte est un critère de base dans la caractérisation des rhizobia. Elle reste le seul paramètre sélectif décisif pour l'identification des rhizobiums.

I.6.1. Stérilisation du sol et de la tourbe

Le sol est stérilisé 3 fois, espacées de 24 heures, par autoclavage humide pendant 1h à 120°C. Ce sol provient d'une parcelle de la Station expérimentale Mahedi Boualem (INRAA).

Il est fortement alcalin (pH 8,4), non salé (CE=0,4ms), riche en matière organique (3,18% MO) et peu calcaire (6,86 % CaCO₃).

La tourbe a été stérilisée par autoclavage humide pendant 1h à 120°C dans des tubes à essai (5 g/tube).

I.6.2. Préparation d'inoculum

L'inoculum est obtenu après la préparation d'une pré-culture et cela par l'ensemencement d'une culture récente de 24h dans des tubes à essai contenant 5 ml du milieu TY liquide ; ces derniers ont été incubés pendant 24h à 28°C sous agitation rotative à 200 tours/mn. Chaque 2,5 ml de cette pré-culture a étéensemencé par la suite dans des tubes à essai contenant 20 ml du milieu TY. Ces tubes sont incubés sous agitation rotative à 200 tours/mn à 28°C pendant 24h.

I.6.3. Désinfection des graines

Les graines utilisées sont seulement celles de *Hedysarum coronarium*, variété *Grimaldi* (variété d'origine Italienne), qui nous ont été aimablement fournies par Abdelguerfi A. (ENSA). Elles sont désinfectées par trempage pendant 30 secondes dans l'acide sulfurique concentré (95%), puis elles sont débarrassées de tout acide par plusieurs rinçages successifs à l'eau distillée stérile.

I.6.4. Inoculation et semis des graines

L'inoculation a été réalisée par la méthode de mélange tourbe-inoculum (Dusting) qui consiste à mélanger, avant le semis, la graine avec un substrat à base de tourbe (Deaker *et al.*, 2004).

Les graines stérilisées sont inoculées avant le semis par immersion pendant trois heures dans un mélange contenant l'inoculum (20ml) et la tourbe stérile (5g). Elles sont semées par la suite à raison de 5 graines par pot (15x10mm) à une profondeur de 2 cm environ. Les pots sont humectés 24 heures avant le semis. Ainsi, 10 pots non inoculés sont utilisés en tant que témoin pour s'assurer des conditions d'asepsie de la culture des plantes. Ces derniers sont ensuite placés dans une serre en verre, et arrosés régulièrement tous les quatre jours avec de l'EDS pour éviter toute contamination extérieure. Au bout de 4-5 semaines, les plantes sont déterrées et inspectées pour la présence ou l'absence de nodosités.

II. Caractérisation des isolats

II.1. Caractérisation physiologiques des isolats

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme une étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées (Konate, 2007). Elle permet, d'une part, de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent

entre les souches et, d'autre part, d'exploiter ces variations pour la sélection des souches efficaces, compétitives et indifférentes aux divers stress environnementaux.

En effet, les facteurs environnementaux affectent tous les aspects de la fixation symbiotique d'azote. Parmi les facteurs les plus importants figurent la salinité, le pH, la température et le stress hydrique. La tolérance à ces quatre facteurs a été évaluée pour les 89 souches choisies de la collection de notre étude.

Une échelle de notation des bactéries a été retenue pour l'ensemble des caractères physiologiques étudiés qui est :

0 : pas de croissance

+ : faible croissance

++ : croissance modérée ou moyenne

+++ : croissance optimale (correspond à la croissance du témoin sans stress)

II.1.1. Tolérance à la salinité(NaCl)

La tolérance à la salinité (NaCl) des souches est déterminée par l'estimation visuelle de leur croissance sur un milieu de culture TY solide renfermant des teneurs croissantes en NaCl à raison de deux répétitions (deux boîtes) pour chaque souche et pour chaque concentration. Le sel a été ajouté au milieu avant autoclavage à des concentrations variant de 200 mM à 2000mM. C'est ainsi que dix concentrations salines sont retenues dans ce travail : 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 et 2000 mM. Les boîtes de Pétri sont inoculées à partir des pré-cultures bactériennes préparées sur milieu TY solide sans sel. La croissance des bactéries est estimée visuellement après 48h d'incubation à 28°C en comparaison à un témoin sans sel pour chaque isolat séparément.

II.1.2. Tolérance au stress hydrique

L'évaluation de la tolérance des isolats au stress hydrique a été effectuée sur milieu YMB liquide à pH 7 ajusté à des potentiels hydriques de -0,5 et -1,5 MPa en ajoutant successivement: 188,35 et 356 g/l du polyéthylène glycol 6000 (PEG₆₀₀₀) (Elboutahiri *et al.*, 2010 ; Thami-Alami de l'INRA Maroc, communication personnelle).

Le milieu YMB additionné à la concentration adéquate du PEG₆₀₀₀ est inoculé avec 0,1 ml d'une préculture (24h) de chaque isolat à raison de deux répétitions. Ainsi, un témoin (milieu YMB sans PEG₆₀₀₀) a été réalisé pour chaque isolat.

Après 48h d'incubation à 28°C sous agitations rotative à 200tr/min, la tolérance au stress au stress hydrique a été déterminée visuellement en notant la présence ou l'absence de la turbidité.

II.1.2. Tolérance à la température

Ce test a été réalisé sur le milieu de culture du TY solide et selon la procédure décrite précédemment pour la tolérance à la salinité.

La capacité des souches à tolérer différentes températures a été notée après 48h d'incubation des boîtes ensemencées à 24, 32, 36 et 40°C, en comparaison à un témoin à 28°C pour chaque isolat.

II.1.3. Tolérance au pH

L'évaluation de la tolérance des souches aux différents pH a été effectuée sur du YMA selon la procédure décrite pour les tests précédents. Le pH du milieu a été ajusté avec la solution tampon phosphaté (K_2HPO_4/KH_2PO_4 ou Na_2HPO_4/KH_2PO_4). C'est ainsi que deux pH différents sont retenues dans ce travail: 6 et 8.

La notation de la croissance s'effectue après incubation des boîtes ensemencées à 28°C pendant 48h, en comparaison au témoin correspond à chaque isolat.

Tendance du pouvoir acidifiant ou alcalinisant des isolats (Test du BTB)

Le pouvoir acidifiant ou alcalinisant des isolats a été évaluée après 24 heures d'incubation sous agitation rotative (200 tr/min) à 28°C des tubes à essai inoculés contenant 5ml du milieu TY liquide additionné d'un indicateur de pH (virage à pH 6 et pH 7,6), le bleu de bromotymol (BTB), à une concentration de 0,0025% (w/v) (Annexe 2).

Le pouvoir a été identifié par le changement de la coloration des tubes ensemencés en comparaison aux tubes témoins (non ensemencés): une coloration jaune indique une réaction acide (souche acidifiante) et une coloration bleu foncé indique une réaction basique (souche alcalinisante). Lorsque ce virage n'est pas obtenu et un trouble bactérien révélateur de croissance est observé à l'œil nu, la souche est considérée comme neutre.

II.2. Caractérisation moléculaire des isolats

II.2.1. Principe de la PCR

Une réaction de PCR standard correspond à la succession d'une quarantaine de cycles comportant chacun trois étapes à savoir la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier, les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences qui encadrent la cible à amplifier, l'enzyme Taq polymérase et un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP).

II.2.2. Préparation des isolats

Les isolats sont cultivés sur TY liquide, incubés à 28°C sous agitation (180 tr/min) pendant 48h et sont utilisés directement pour la PCR.

II.2.3. Conditions d'amplification

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl comprenant : 5 µl du tampon de réaction (Gitschier Buffer 5x); 0,4 µl du Bovine Serum Albumin (BSA) (10mg/ml); 2,5 µl du DMSO (100%); 1,25 µl des dNTP (1:1:1:1); 1µl d'amorce BOXA1R (1µg/1µl), 5'-CTACGGCAAGGGGACGCTGACG-3'); 0,4 µl de Taq polymérase (50µg/ml) (kit Invitrogen).

L'amplification de l'ADN a été conduite dans un thermocycleur (GeneAmp PCR Système 9700) selon le programme suivant :

- Une dénaturation initiale de l'ADN à 95°C en 2 min.
 - Dénaturation de l'ADN à 94°C en 0:03 min
 - Hybridation de l'amorce à 92°C en 0:30 min
 - Polymérisation des amorces à 50°C en 1 min
 - Elongation finale à 65°C en 8 min.
 - Maintient d'ADN amplifié: 4°C, +∞
- } 35 cycles

II.2.4. Migration sur gel d'agarose

A la fin de l'amplification et pour matérialiser et interpréter les résultats de Box-PCR, 10µl de chaque produit d'amplification, additionné de 3µl du tampon de charge (Blue de bromophénol), ont été déposés sur un gel d'agarose horizontal de 1.5% (Annexe 3) contenant du bromure d'éthidium (1µl de BET/25µl de TBE) dans la cuve d'électrophorèse recouverte du tampon d'électrophorèse (TBE 1x).

Afin d'obtenir la migration des fragments d'ADN, une impulsion électrique de 80V, 110 mA a été appliquée pendant 9 heures.

Le1Kb (Marker ladder) a été utilisés comme marqueur de taille lors de chaque migration effectuée.

II.2.5. Visualisation des bandes

Après électrophorèse, la visualisation des bandes est réalisée sur un transilluminateur UV (ETX-F26.M), puis photographiées par une caméra digitale et à l'aide du logiciel Doc -ItLS version 6.5.2.a.

III. Analyse des données

Les résultats de l'ensemble des tests physiologiques ont été présentés sous forme de graphes à l'aide du logiciel Excel (Office 2007). Ces graphes permettent une meilleure compréhension des résultats.

Pour les résultats de la caractérisation moléculaire, la notation des profils génotypiques a été réalisée par un système binaire : 1 pour la présence et 0 pour l'absence de chaque bande BOX pour chaque isolat.

Ce tableau binaire a servi de base pour la construction des dendrogrammes en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group of Mean Averages) à l'aide du logiciel **M.V.S.P.** (**M**ulti-**V**ariate **S**tatistical **P**ackage) version 3.12 de kovach computing services.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

I. Caractérisation physico-chimiques des sols

Le tableau 7 récapitule les résultats d'analyses physicochimiques des sols prélevés de chaque site prospecté.

A l'exception du sol du site 46B qui a une valeur de CE de 1,25 mS/cm, tous les sols sont très faiblement affectés par la salinité car les valeurs de leurs CE varient de 0,11 à 0,46 mS/cm.

Sur les 14 sols analysés, 12 sont fortement alcalins ayant un pH de 8,1 à 8,67 et deux sites (23 et 46B) sont légèrement alcalins (pH 7,96 et 7,5 respectivement).

Les sols enregistrent des taux très différents en matière organique; certains (19, 20 et 23) sont pauvres en matière organique (< 1,5% MO), d'autres (41, 47 et 48) sont relativement assez riches (1,69 à 2,43%). Les sols des sites 21, 22, 24, 36, 42, 46A et 46B sont riches en matière organique car leurs taux sont supérieurs à 2,5% (2,54 à 7,3%).

Tableau 7: Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sols.

Site	CE (ms)	pH Eau	MO (%)	CaCO ₃ (%)	C (%)	N (%)	C/N	P (ppm)
19	0.18	8.27	1,4	6,1	0,8	0,05	16	0,274
20	0.15	8.33	1,4	5,9	0,8	0,08	10	0,207
21	0.21	8.19	7,3	3,5	4,3	0,27	15,93	0,329
22	0.25	8.47	6,4	16,3	3,7	0,16	23,13	0,37
23	0.25	7.96	1,4	1,1	0,8	0,06	13,33	0,709
24	0.18	8.67	4,6	2	2,7	0,2	13,5	0,461
36	0,11	8,3	3,14	39<	1,85	0,007	264,29	0,273
41	0,28	8,4	2,43	22,71	1,42	0,0035	405,71	0,168
42	0.42	8,1	3,07	18,43	1,78	0,0088	202,27	0,107
45	0.33	8,4	3,28	30,86	1,91	0,0035	545,71	0,128
46A	0.32	8,2	3,17	17,14	1,46	0,007	208,57	0,302
46 B	1.25	7,5	2,54	38,16	1,48	0,007	211,43	0,094
47	0.44	8,2	1,9	35,14	1,11	0,0053	209,43	0,087
48	0.46	8,6	1,69	10,71	0,98	0,0035	280	0,081

CE : conductivité électrique ; MO : matière organique ; C : carbone, N : azote total, C/N : rapport carbone/azote, P : phosphore

En ce qui concerne le taux de calcaire, les sols (21, 23 et 24) sont légèrement pourvus en calcaire (<5% CaCO₃), les sols 19, 20 sont peu calcaires (6,1 et 5,9% respectivement), alors que les sols 22, 41, 42, 46A et 48 sont moyennement calcaires avec des valeurs comprises entre 10,71 et 22,71%. Les sols notablement calcaires sont représentés par les sites 45, 46B et 47 qui ont un taux de calcaire supérieur à 25%.

Les teneurs en azote total sont généralement inférieures à 0,5% et sont donc très faibles.

Les valeurs obtenues pour le phosphore assimilable sont inférieures à 50 ppm, ceci signifie que tous les sols sont très pauvres en phosphore.

II. Constitution d'une collection de rhizobia nodulant le genre *Hedysarum*

L'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires des plantes de quatre espèces du genre *Hedysarum* collectés des différentes zones géographiques en Algérie nous a permis de constituer une collection très importante de 431 souches (Tab. 8).

Vu le nombre très important des souches isolées, nous n'avons étudié que celles provenant sûrement des nodules (absence de colonies chez le témoin : nodule et eau stérile). Elles sont au nombre de 89 souches. Le nombre de souches issus de chaque espèce dans chaque site de collecte figure dans le tableau 8.

Les souches choisies ont fait l'objet d'un test d'authentification. Elles ont induit la formation des nodosités sur les racines des plantules inoculées contrairement aux témoins sans inoculation (Fig. 8).

Elles ont formé sur le milieu YEM solide des colonies circulaires de 1 à 3 mm de diamètre d'un aspect gommeux translucide ou crémeux et ont pu être visibles en 1 à 2 jours d'incubation à 28°C. Ceci indique que nos isolats sont des rhizobia à croissance rapide. La même observation a été rapportée par **Benguedouar et Squartini (2005)**, chez deux isolats A₁ et A₆ provenant de la région de Constantine.

Tableau 8: Détail de la collection constituée.

Espèces	Sites	Plants	Nodules	Souches
<i>H. coronarium</i>	09	24	54	238
<i>H. aculeolatum</i>	03	11	18	82
<i>H. flexuosum</i>	03	07	15	67
<i>H. capitatum</i>	04	49	12	44
TOTAL	18*	91	99	431

* : un site est commun entre deux espèces.

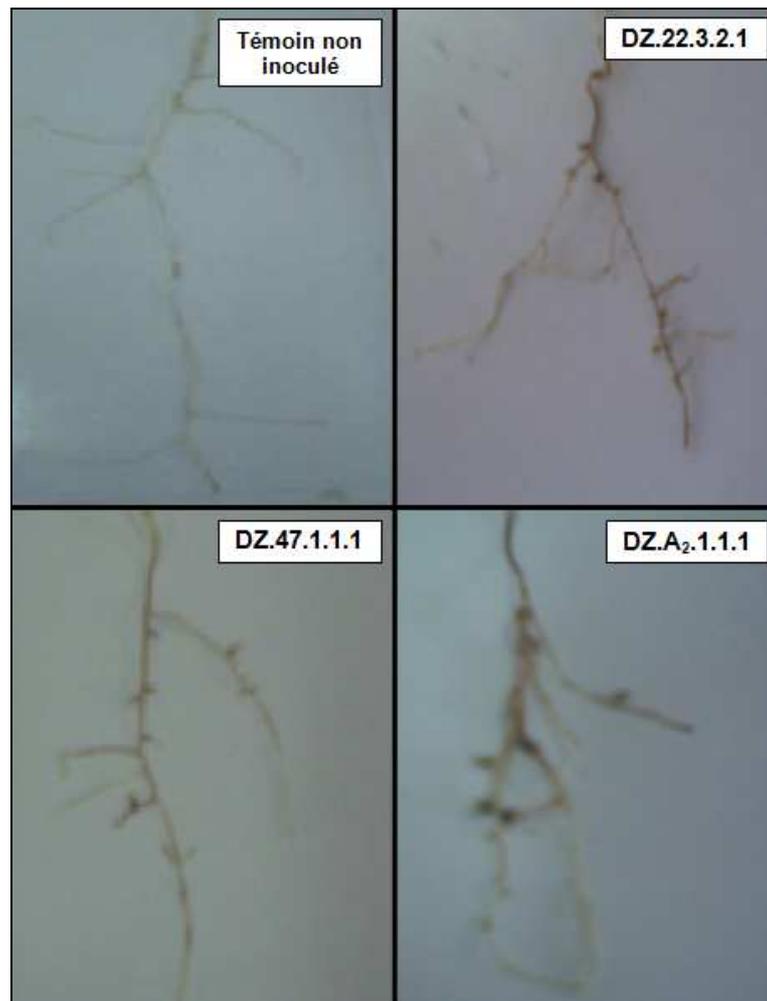


Figure 08: Racines de *Hedysarum coronarium* var *Grimaldi* nodulées par différentes souches.

La collection des souches choisies pour l'étude présente différents aspects sur le milieu de culture YEM solide, de ce fait elles ont été classées en 5 types (Tab. 9):

Type 1: les souches présentent un aspect complètement gélatineux (Fig. 9A), il compte 42 souches et appartiennent aux quatre espèces étudiées ;

Type 2: les souches présentent des extrémités gélatineuses entourant un milieu sec (Fig. 9B) ;

Type 3: les souches présentent des extrémités secs non ramifiées (Fig. 9C) ;

Type 4: rassemble des souches ayant des extrémités secs ramifiées (Fig. 9D) ;

Type 5: ce type ne contient que 2 souches isolées de *H. coronarium*, elles s'étalent et forment un aspect continu.

Tableau 9: Les 5 types distingués de souches.

Type	Espèce	Nombre	Total
1	<i>H. coronarium</i>	13	42
	<i>H. aculeolatum</i>	14	
	<i>H. flexuosum</i>	13	
	<i>H. capitatum</i>	2	
2	<i>H. coronarium</i>	2	7
	<i>H. flexuosum</i>	2	
	<i>H. capitatum</i>	3	
3	<i>H. coronarium</i>	8	12
	<i>H. aculeolatum</i>	4	
4	<i>H. coronarium</i>	18	26
	<i>H. aculeolatum</i>	7	
	<i>H. capitatum</i>	1	
5	<i>H. coronarium</i>	2	2

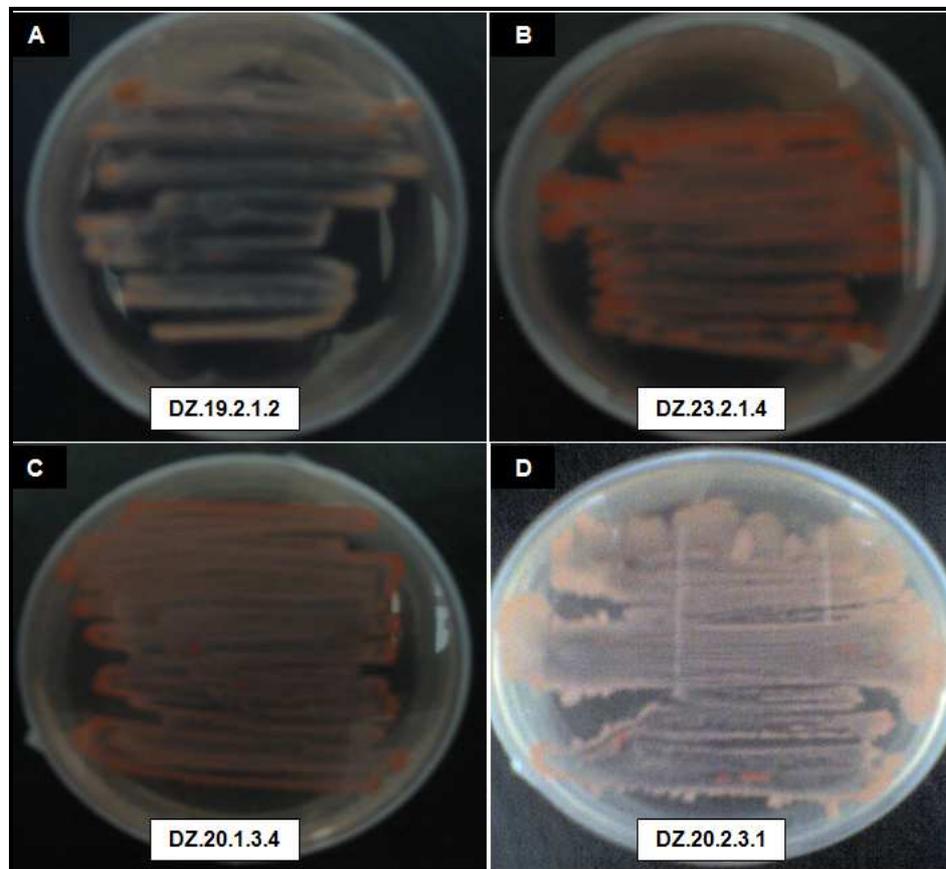


Figure 09: Typologie des isolats selon leurs aspects sur le milieu YEM. A: Type 1, B: Type 2, C: Type 3, D: Type 4.

III. Caractérisation physiologique des souches

III.1. Tolérance à la salinité

III.1.1. *Hedysarum coronarium*

Les souches de *H. coronarium* étudiées se sont avérées très tolérantes à des concentrations élevées en NaCl (Annexe 4). Leur croissance est identique à celle des témoins jusqu'à une concentration de 1000 mM NaCl. Au-delà de cette concentration, certaines souches ont moins poussées que leurs témoins et à partir de 1800 mM certaines d'entre elles n'ont pas poussées. Toutefois, 79,07% des souches peuvent tolérer, à des degrés différents, jusqu'à une concentration de 2000 mM NaCl (Fig. 10). Parmi ces souches, DZ.C.3.3.2, DZ.C.3.3.3, DZ.19.1.2.2, DZ.19.2.1.3 et DZ.22.1.3.2 ont révélées une croissance optimale.

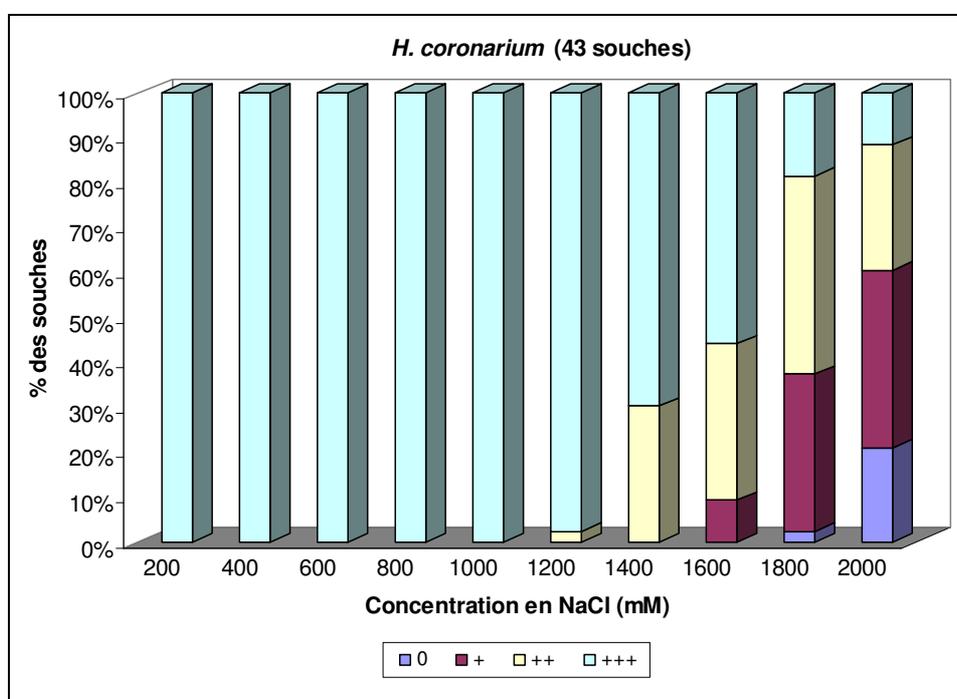


Figure 10: Comportement des souches nodulant *H. coronarium* à différentes concentrations de NaCl. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.1.2. *Hedysarum aculeolatum*

La figure 11 montre que, comme chez l'espèce précédente, tous les isolats de *H. aculeolatum* se comportent comme leurs témoins jusqu'à une concentration de 1000 mM de NaCl. Leur croissance commence à être inhibée à partir de 1600 mM de NaCl (Annexe 4). A 2000 mM NaCl, 36% seulement des souches étudiées ont pu croître, dont deux souches seulement (DZ.46.2.1.6, DZ.47.3.2.3) ont montré une croissance optimale.

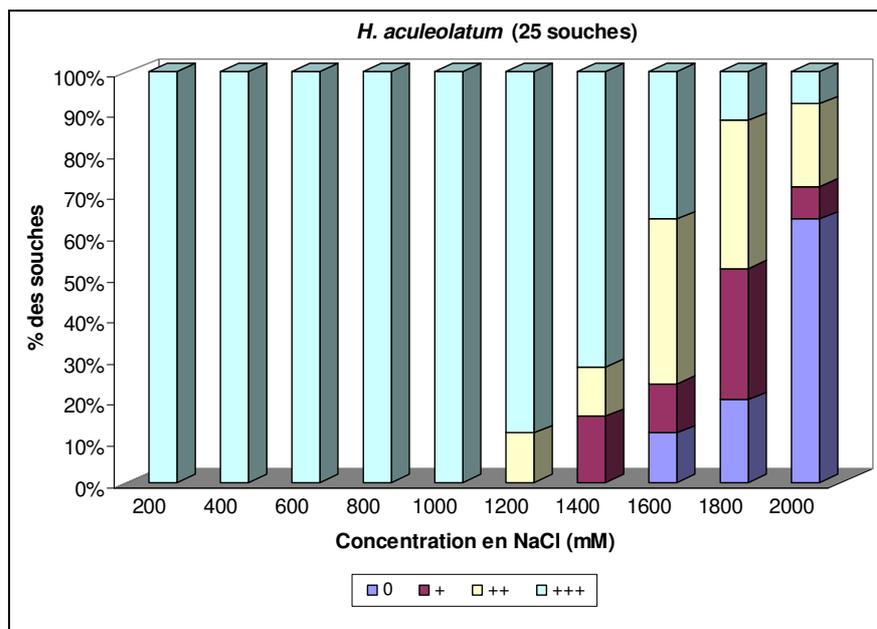


Figure 11: Comportement des souches nodulant *H. aculeolatum* à différentes concentrations de NaCl. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.1.3. *Hedysarum flexuosum*

Les résultats obtenus (Fig. 12) indiquent que l'ensemble des isolats étudiés tolère jusqu'à 1600 mM NaCl à l'exception de deux souches DZ.41.2.2.3 et DZ.45.2.2.1 qui n'ont pas pu croître à cette concentration. Cependant, huit souches étudiées croissent jusqu'à 2 M de NaCl (Annexe 4) dont seulement trois d'entre elles ont une croissance comparable à leurs témoins. Il s'agit des souches DZ.41.2.2.4, DZ.41.2.3.1 et DZ.42.2.1.1.

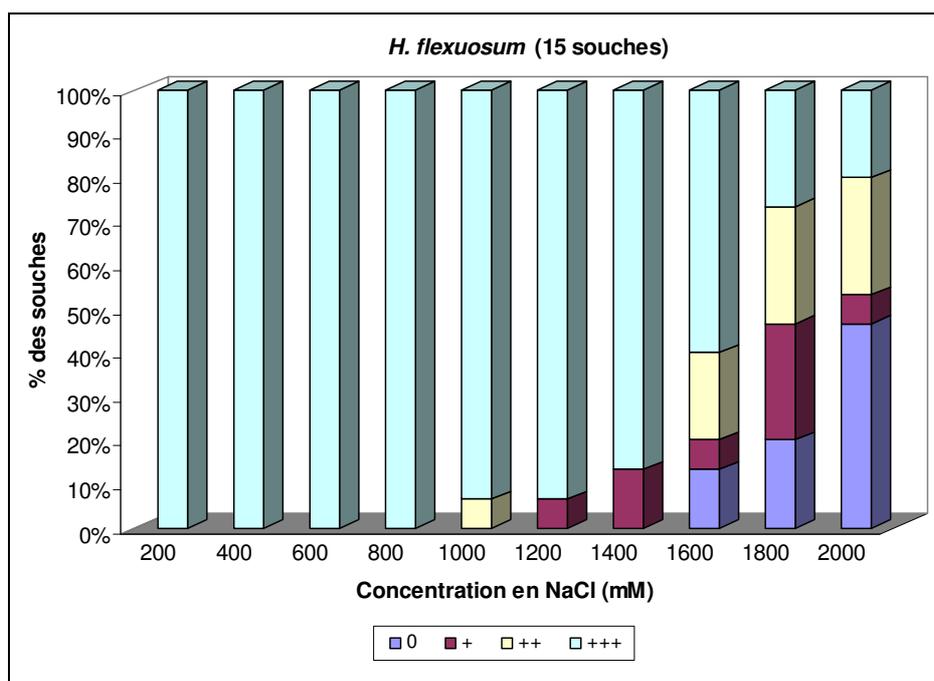


Figure 12: Comportement des souches nodulant *H. flexuosum* à différentes concentrations de NaCl. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.1.4. *Hedysarum capitatum*

L'étude de la croissance des souches isolées de nodules de *H. capitatum*, selon différentes concentrations de NaCl, a mis en évidence une très grande tolérance à la salinité (Annexe 4). Seule la souche DZ.A₂.2.2.2 n'a pas pu pousser en présence de 1800 mM NaCl, alors que les cinq autres souches testées croissent comme leurs témoins (Fig. 13). Par ailleurs, seules les souches DZ.19.1.2.3 et DZ.A₂.2.2.3 ont montré une croissance optimale à 2000 mM NaCl.

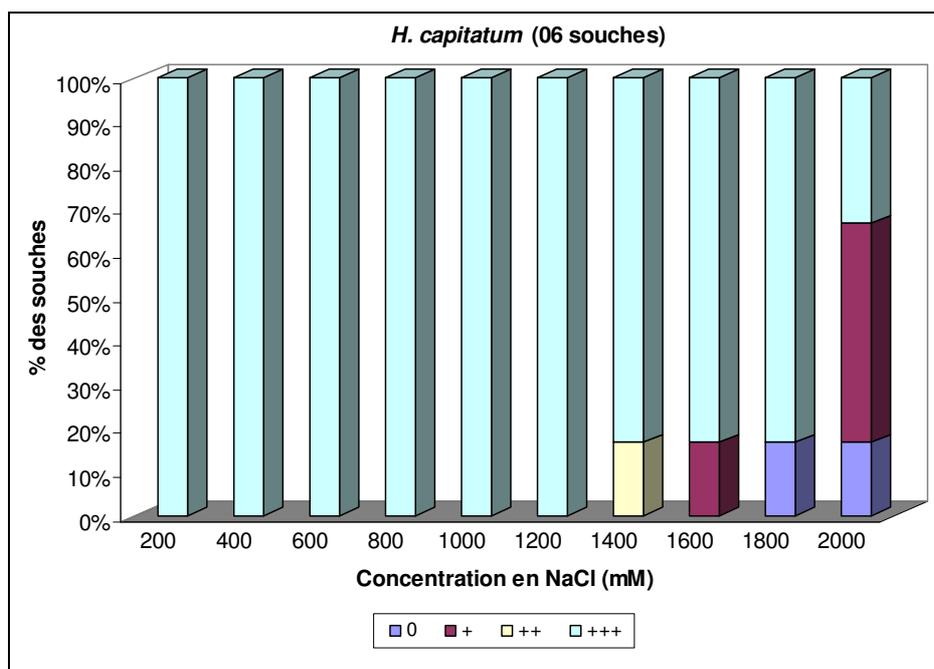


Figure 13: Comportement des souches nodulant *H. capitatum* à différentes concentrations de NaCl. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre *Hedysarum*

La mise en culture des souches des quatre espèces de *Hedysarum* sur milieu YEM à différentes concentrations de NaCl (Fig. 14) révèle une grande tolérance à la salinité. Le comportement des souches vis-à-vis du NaCl est variable selon les espèces hôtes du genre *Hedysarum* (Annexe 4). La figure 14 montre que la tolérance à la salinité diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration en sel quelle que soit l'espèce hôte. En effet, toutes les souches tolèrent le sel à une concentration de 1,4 M NaCl. Au-delà de cette concentration les souches isolées de *H. coronarium* et de *H. capitatum* sont plus tolérantes que celles isolées de *H. flexuosum* et de *H. aculeolatum*. Toutefois, 83,33%, 79,07% ; 53,33% et 36% des souches isolées respectivement de *H. capitatum*, de *H. coronarium*, de *H. flexuosum* et de *H. aculeolatum* peuvent tolérer jusqu'à une concentration de 2 M NaCl (Fig. 14). Il est à signaler qu'une diversité de comportement a été remarquée entre les souches issues de la même nodosité (diversité intra-nodulaire). La tolérance au sel qui caractérise les souches étudiées n'est pas en rapport avec le taux de salinité des sols d'origine, car une variabilité de

comportement entre les souches d'un même site a été enregistrée, à titre d'exemple la souche DZ.22.1.3.2 a montré une croissance identique à son témoin en présence de 2000 mM NaCl alors que la croissance de la souche DZ.22.3.2.3 isolée du même site a été affectée par la concentration de 1200 mM NaCl. Aussi certaines souches (DZ.48.2.1.2, DZ.48.2.1.4 et DZ.48.3.1.3) sont moins résistantes que d'autres malgré que leur site d'isolement présente la valeur la plus élevée de conductivité électrique (0,46ms).

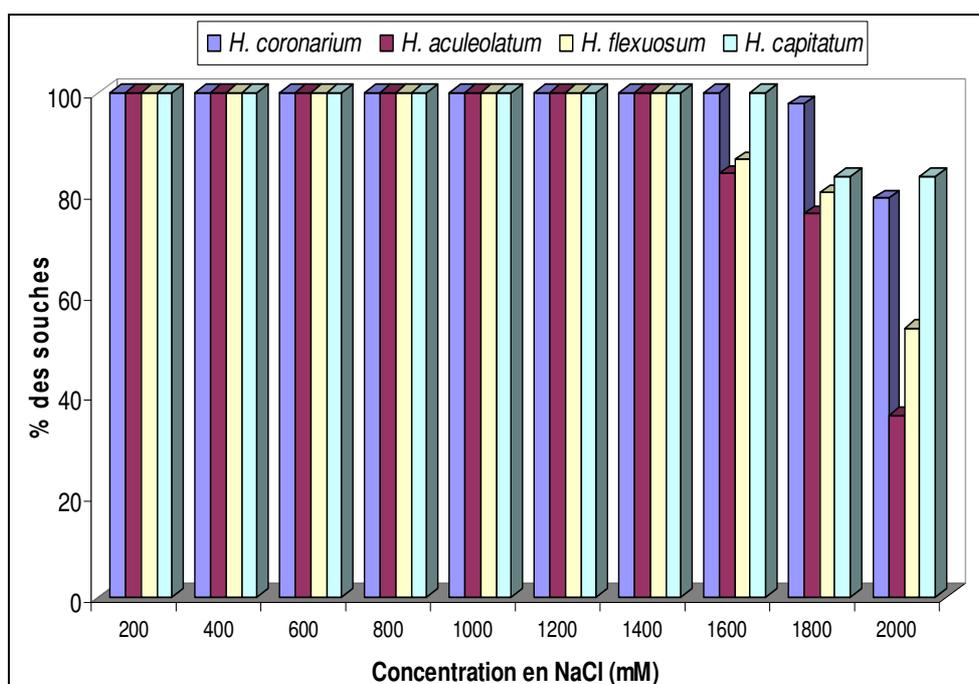


Figure 14: Comportement des souches des quatre espèces du genre *Hedysarum* à différentes concentrations de NaCl.

DISCUSSION

D'après nos résultats, 83,33%, 79,07%, 53,33% et 36% des souches isolées respectivement de *H. capitatum*, de *H. coronarium*, de *H. flexuosum* et de *H. aculeolatum* peuvent croître en présence de 2000 mM NaCl. Cette tolérance est plus importante chez les souches isolées de *H. coronarium* et de *H. capitatum* que celles isolées de *H. flexuosum* et de *H. aculeolatum*, ce qui est partiellement en accord avec les résultats de **Kishinevsky et al. (2003)** qui ont constaté que les isolats de *H. coronarium* et de *H. flexuosum* sont plus sensibles que ceux de *H. spinosissimum* à des concentrations comprises entre 171,12 et 342,23 mM NaCl en milieu YMA. **Tilak et al. (2005)** avaient aussi rapporté que les rhizobiums isolés des nodules des légumineuses telle que *Hedysarum* peuvent, en culture pure, tolérer une concentration de 500-800 mM NaCl. La variabilité du comportement des rhizobiums que nous avons observée chez *Hedysarum* par rapport au sel a été également décrite par **Elboutahiri et al. (2010)** sur 157 isolats de *Sinorhizobium meliloti* et 62 isolats de *Rhizobium sulae*.

Parmi les facteurs environnementaux, la salinité limite, d'une manière délétère, la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (**Ben Khaled et al., 2003**). Les deux composantes impliquées

dans la sensibilité de la symbiose au sel sont, d'une part, le développement et le fonctionnement des nodosités et, d'autre part, la croissance et l'aptitude des organes photosynthétiques à approvisionner les nodosités en photosynthétats (Saadallah *et al.*, 2001).

Selon la littérature, la plupart des bactéries se révèlent tolérantes au sel (Saadallah *et al.*, 2001), que se soit en culture pure (El Sheikh et Wood 1990; Reva *et al.*, 2002) ou dans le sol (Tilak *et al.*, 2005). Leur capacité à supporter le sel dépasse souvent celle des plantes hôtes (Saadallah *et al.*, 2001), elle varie considérablement d'une espèce à l'autre et d'un type de sel à l'autre (El Sheikh et Wood, 1989). Toutefois, pour la plupart des rhizobia la limite de tolérance au sel est de 1.5% (256,67 mM de NaCl) (Batzli *et al.*, 1992).

Au-delà, une grande osmotolérance chez les souches est observée par plusieurs auteurs, elle peut atteindre 10% (El Sheikh et Wood 1990 ; Zahran *et al.*, 1994).

La limite de tolérance à la salinité entre les rhizobia peut varier considérablement même entre les souches de la même espèce (Kassem *et al.*, 1985). Il a été rapporté que chez la même espèce *Rhizobium leguminosarum*, il existe des souches dont la croissance est inhibée par 150 mM NaCl (Rai, 1983) et d'autres qui supportent 350 mM NaCl (Breedveld *et al.*, 1993).

Certains auteurs (Jordan, 1984 ; El Sheikh et Wood, 1989 et 1990) ont montré qu'il existe une relation entre la rapidité de croissance et la résistance au sel: ceux à croissance rapide seraient plus tolérants au stress salin que ceux à croissance lente. Par contre, d'autres ont montré que la tolérance au sel n'est pas corrélée avec le taux de croissance (Zerhari *et al.*, 2000) mais à d'autres mécanismes physiologiques et biochimiques (Gouffi *et al.*, 1999). Au niveau de notre travail les souches sont toutes de croissance rapide ce qui n'a pas permis de voir s'il y a une corrélation ou non avec la vitesse de croissance.

La résistance des rhizobia à la salinité dépend aussi de la nature chimique des sels, les chlorures sont plus toxiques que les sulfates (El Sheikh et Wood, 1989).

L'adaptation des bactéries aux fortes concentrations en sel est due à leur faculté de synthèse et d'accumulation intracellulaire des osmolytes organiques protecteurs principalement les ion K^+ , glycine, betaine, proline, glutamate, divers glucides et N-acetylglutaminy-glutamine amide, afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (Boncompagni *et al.*, 1999 ; Gouffi *et al.*, 1999).

III.2. Tolérance au stress hydrique

III.2.1. *Hedysarum coronarium*

Tous les isolats ont montré une résistance plus ou moins importante envers les deux potentiels hydriques testés -0,5 et -1,5 MPa (Fig. 15, Annexe 4). Le nombre d'isolats ayant une croissance

comparable à celle du témoin est très restreint, 3 souches (DZ.21.2.2.1', DZ.21.2.2.3, DZ.22.1.3.2) pour un potentiel hydrique de -0,5MPa et une seule souche (DZ.21.2.2.3) pour -1,5MPa (Annexe 4). La plupart des souches ont révélé une croissance moyenne à faible par rapport à leurs témoins, sous -0,5 et -1,5 MP respectivement. La souche DZ.22.3.2.4 est la plus tolérante, elle a montré une croissance identique à son témoin sous les deux potentiels hydriques testés.

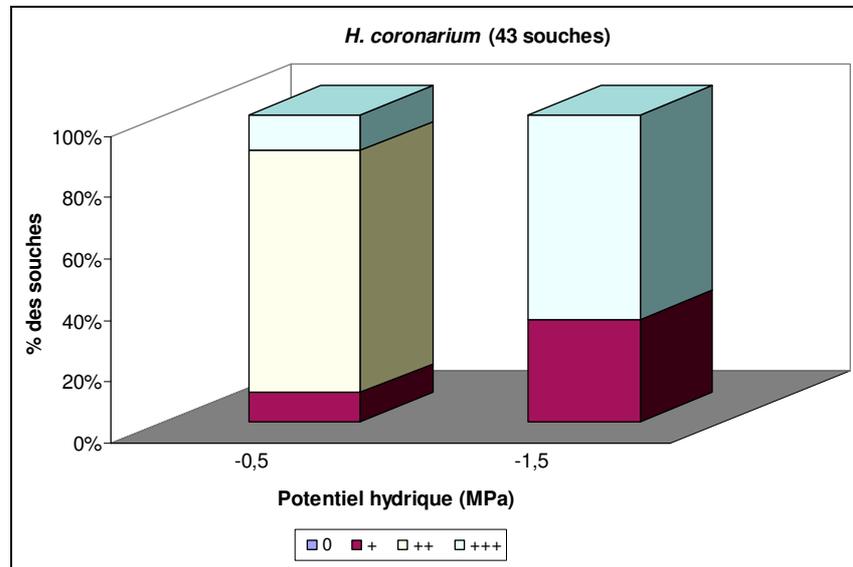


Figure 15: Comportement des souches nodulant *H. coronarium* à différents potentiels hydriques. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.2.2. *Hedysarum aculeolatum*

La totalité des souches a pu survivre sous les deux potentiels hydriques testés -0,5 et -1,5 MPa (Fig. 16, Annexe 4). La plupart des souches ont révélé une croissance moyenne, par rapport à leurs témoins, quel que soit le potentiel hydrique engendré. A l'exception de la souche DZ.46.2.1.1 qui présente une croissance comparable à son témoin sous un potentiel hydrique de -0,5 MPa, aucune souche n'a eu cette capacité quel que soit le potentiel hydrique appliqué (Fig. 16).

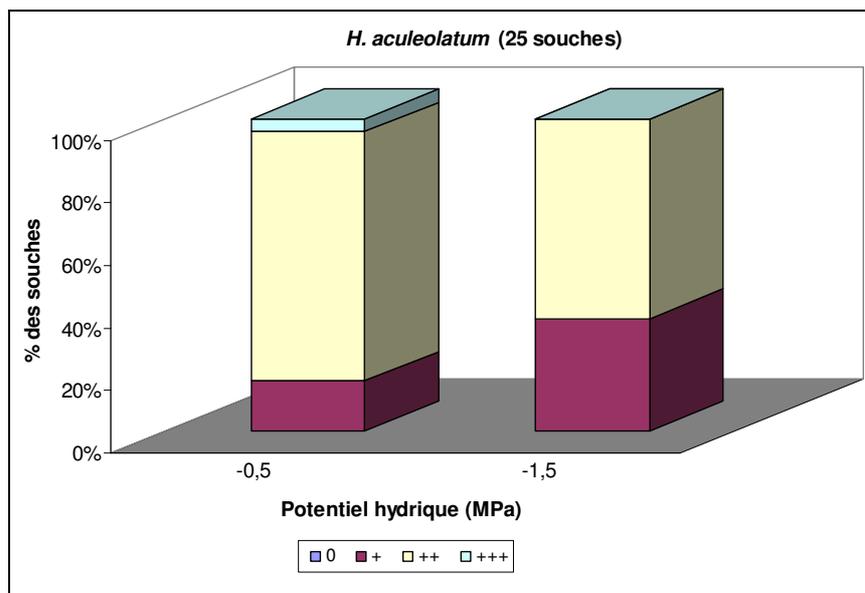


Figure 16: Tolérance des souches nodulant *H. aculeolatum* à différents potentiels hydriques. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.2.3. *Hedysarum flexuosum*

L'ensemble des isolats se sont avérés capables de croître sous -0,5 et -1,5MPa. La majorité des souches ont montré une croissance moyenne à faible par rapport à leurs témoins, sous un potentiel hydrique de -0,5MPa et -1,5MPa respectivement. Sous -1,5MPa seule la souche DZ.45.2.2.1 a montré une croissance moyenne, toutes les autres souches ont montré une faible croissance. Aucune souche n'a révélé une croissance comparable à son témoin ni sous un potentiel hydrique de -0,5MPa ni de -1,5MPa (Fig. 17, Annexe 4).

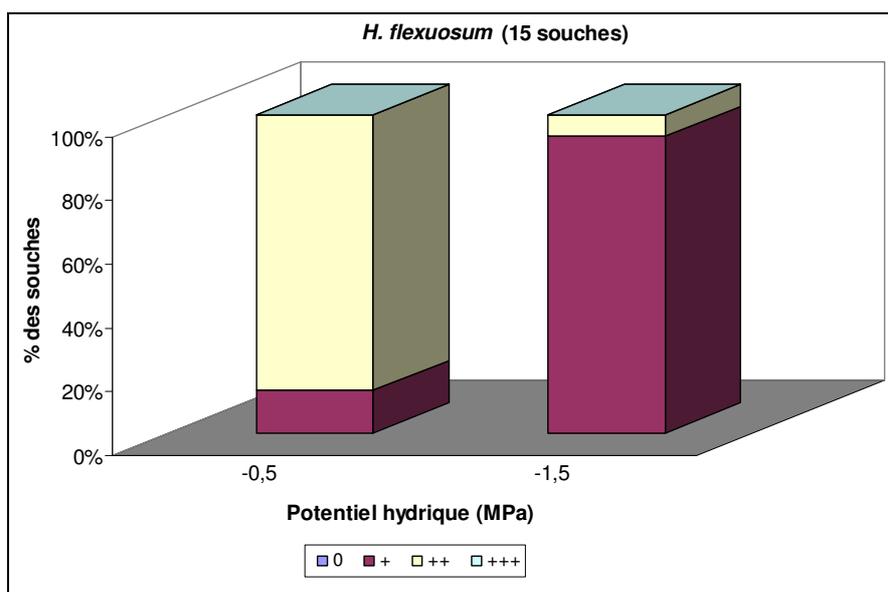


Figure 17: Comportement des souches nodulant *H. flexuosum* à différents potentiels hydriques. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.2.4. *Hedysarum capitatum*

Toutes les souches ont montré une capacité de croître quel que soit le potentiel hydrique auquel elles sont soumises. Pour un potentiel hydrique de $-0,5\text{MPa}$ la plupart des souches ont une croissance faible à moyenne par rapport leurs témoins, alors que pour la valeur de $-1,5\text{MPa}$ toutes les souches ont une faible croissance. Pour les deux valeurs de potentiels hydriques, aucune souche n'a pu croître comme son témoin (Fig. 18, Annexe 4).

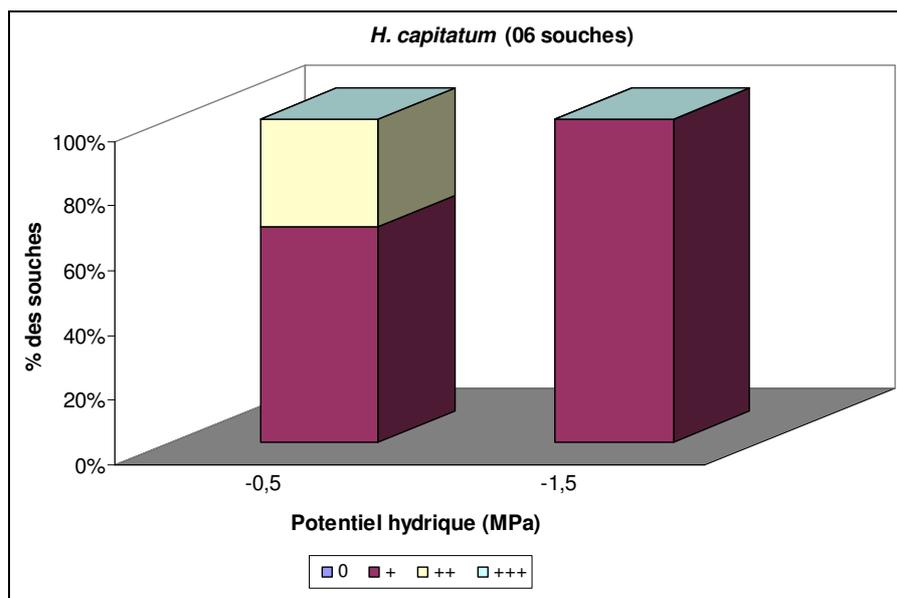


Figure 18: Comportement des souches nodulant *H. capitatum* à différents potentiels hydriques. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre *Hedysarum*

L'incubation des souches isolées des quatre espèces de *Hedysarum*, dans un milieu YM liquide de différents potentiels hydriques ($-0,5$ et $-1,5\text{MPa}$), a montré une certaine tolérance au stress et qui varie, d'une part, entre les souches de la même espèce hôte et, d'autre part, entre les souches des différentes espèces hôtes (Annexe 4). La figure 19 montre que la totalité de souches ont pu croître quelle que soit son espèce hôte et quel que soit le potentiel hydrique testé. Cependant, le nombre d'isolats ayant une croissance comparable à celle de leurs témoins est très restreint. Les souches isolées de *H. coronarium* et de *H. aculeolatum* se sont avérées plus tolérantes que celles isolées de *H. flexuosum* et de *H. capitatum*.

Une variabilité de tolérance entre les souches issues de la même nodosité (diversité intra-nodulaire) a été enregistrée en particulier chez celles isolées de *H. coronarium*. Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre l'étage bioclimatique et la tolérance des souches au stress hydrique.

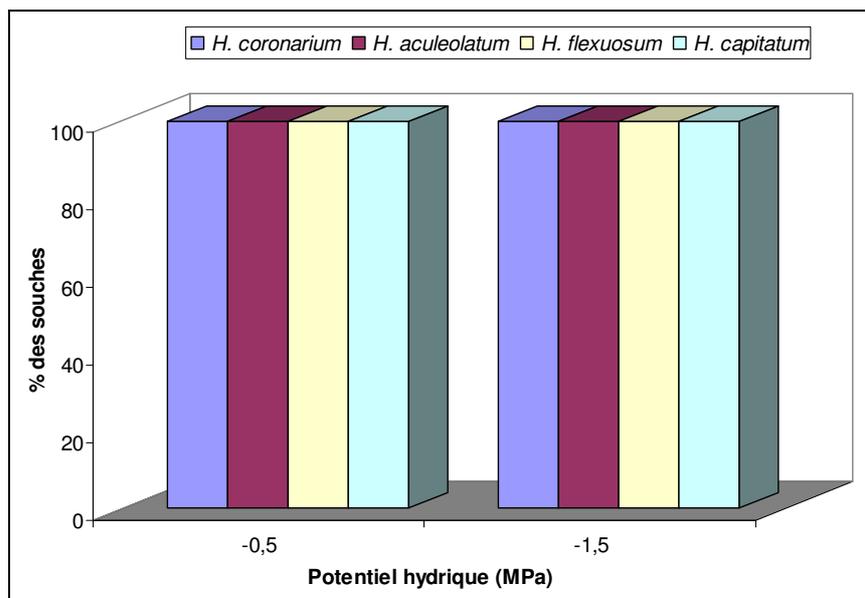


Figure 19: Comportement des souches du genre *Hedysarum* à différents potentiels hydriques.

DISCUSSION

D'une façon générale, les 89 souches étudiées se comportent indifféremment par rapport à leurs témoins quel que soit l'espèce hôte sous les deux potentiels hydriques testés (-0,5 et -1,5 MPa). Ces résultats rejoignent ceux mentionnés par **Elboutahiri et al. (2010)** sur *S. meliloti* et confirment que 82,16% (sur 157 isolats) des isolats ont toléré un potentiel hydrique de -1,5MPa. Le même auteur **Elboutahiri (2009)**, a enregistré une diversité de tolérance au sein de 62 isolats de *R. sulae* pour le même potentiel hydrique.

Le stress hydrique a des effets délétères sur la croissance et la survie des populations rhizobiennes dans le sol, sur le développement et le fonctionnement des nodosités et, donc, sur la capacité fixatrice de l'association symbiotique (**Yang et al., 2008**). Le manque d'humidité réduit la densité de population rhizobiale dans le sol (**Tate, 1995**). Les souches de rhizobia à croissance rapide sont plus sensibles au stress hydrique par rapport aux souches à croissance lente (**Bushby et Marshall, 1977**).

III.3. Tolérance à la température

III.3.1. *Hedysarum coronarium*

Toutes les souches présentent une croissance optimale à des températures allant de 24 à 36°C (Fig. 20, Annexe 4). A 40°C, 41,86% des souches se sont avérées incapables de croître alors que 32,56%, 11,63% et 13,95% ont montré une croissance faible, moyenne et optimale, respectivement.

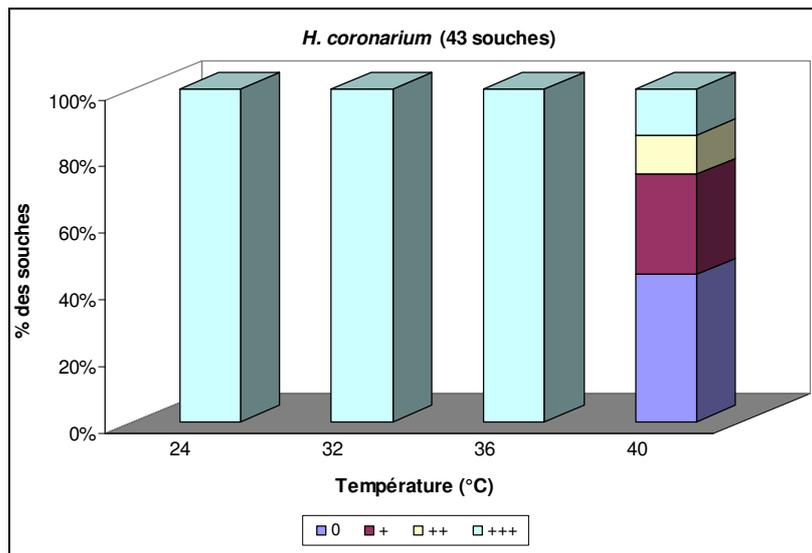


Figure 20: Comportement des souches nodulant *H. coronarium* à différentes températures. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.3.2. *Hedysarum aculeolatum*

Une certaine sensibilité des souches de cette espèce a été remarquée sous la température de 24°C. En effet, près de 25% des souches ont une croissance faible à moyenne sous cette dernière température. Toutes les souches présentent une croissance identique à leurs témoins pour les températures 32 et 36°C. La température de 40°C inhibe complètement la croissance de 20% des souches étudiées (Fig. 21, Annexe 4).

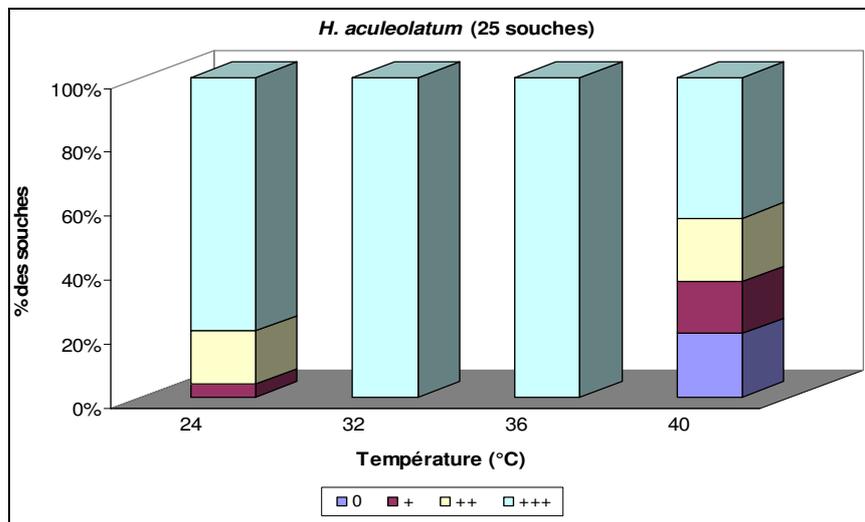


Figure 21: Comportement des souches nodulant *H. aculeolatum* à différentes températures. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.3.3. *Hedysarum flexuosum*

Tous les isolats étudiés se sont révélés capables de croître comme leurs témoins dans une gamme de température variant de 24 à 36°C, alors que pour une température de 40°C seulement 60% des souches ont cette caractéristique (Fig. 22, Annexe 4).

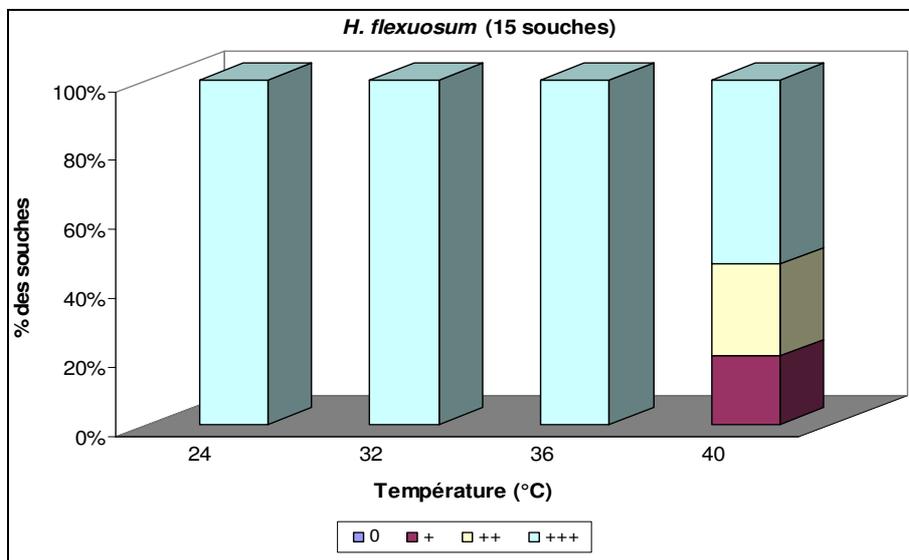


Figure 22: Comportement des souches nodulant *H. flexuosum* à différentes températures. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.3.4. *Hedysarum capitatum*

Les résultats obtenus indiquent que les températures allant de 24 à 36°C ne présentent aucun effet sur la croissance de la totalité des souches étudiées qui ont montré une croissance identique à leurs témoins. En revanche, la température de 40°C a diminué la croissance de 16,67% des souches (faible croissance) et a inhibé complètement la croissance de 50% des souches étudiées (Fig. 23, Annexe 4).

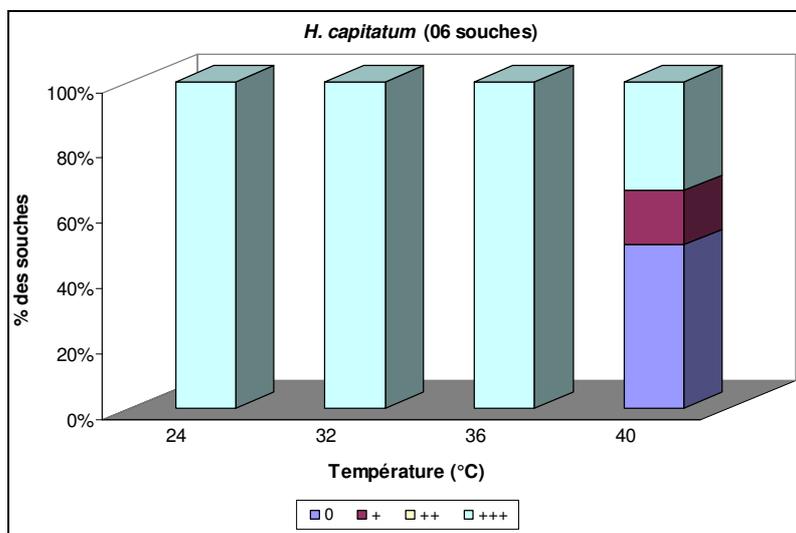


Figure 23: Comportement des souches nodulant *H. capitatum* à différentes températures. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre *Hedysarum*

L'étude de la tolérance des souches vis-à-vis des températures allant de 24 à 40°C a montré que le comportement de la totalité des souches à 32 et 36°C est identique à leurs témoins. A 24°C, la quasi-totalité des souches présentent une croissance optimale (identique à leurs témoins 28°C) à l'exception de *H. aculeolatum*. Autrement dit, les températures de 24, 32, et 36 ne sont pas un facteur limitant pour la croissance des rhizobiums du genre *Hedysarum*. .

Pour la température 40°C, les souches isolées de *H. coronarium* (41,86 % de souches ont été inhibées) se sont avérées les plus sensibles des quatre espèces. En effet, 33,33%, 20% et 0% de souches respectivement de *H. capitatum*, de *H. aculeolatum*, de *H. flexuosum* sont inhibées par la température 40°C (Fig. 24).

D'après les résultats enregistrés, il n'existe pas une corrélation entre les caractéristiques écologiques des sites d'origine des souches et leur comportement vis à vis des températures extrêmes car on a noté que les souches isolées des sites subhumides (21, 22, 23) peuvent supporter les températures élevées de 36 et 40°C au même degré que celles isolées des sites semi-arides (A₂).

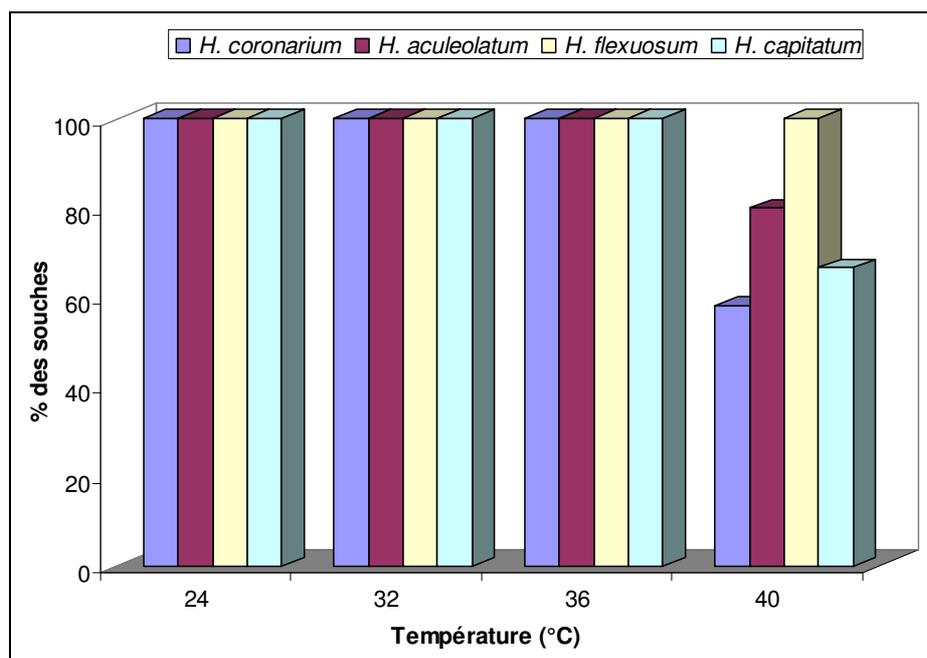


Figure 24: Comportement des souches du genre *Hedysarum* vis à vis des différentes températures.

DISCUSSION

D'après nos résultats 71,91% des souches peuvent croître à une température de 40°C.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Kishinevsky et al. (2003)** qui ont rapporté que 15/15, 4/4 et 9/18 des souches isolées des nodules de *H. coronarium*, de *H. flexuosum* et de *H. spinosissimum* se sont révélées capables de croître à 15 et à 37°C.

Elboutahiri et al. (2010) ont également montré que, sur 157 isolats de *Sinorhizobium meliloti*, 57,96% des isolats tolèrent une température de 40°C. Pour la même température, **Alemayehu (2009)** a trouvé que 11/ 12 (91,67%) des isolats nodulant la fève (*Vicia faba*) sont tolérants.

La température est l'un des facteurs les plus importants influençant la croissance et la survie des rhizobia dans le sol (**Nutman, 1975 ; Dart, 1977 ; Parker et al., 1977 ; Meghvansi, 2006**).

Bien que des différences de tolérance à la température entre les rhizobia sont établies, les données de la littérature considèrent que la fourchette situant entre 10°C et 37°C est relativement correcte pour la culture des rhizobia et que la température optimale de croissance de la plupart des souches varie entre 28 et 31°C; par conséquent, un grand nombre ne peuvent se développer au-delà de 37°C (**Graham, 1992 ; Gouffi et al., 1999**). Toutefois, il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles isolées dans l'environnement chaud et sec de la savane du sahel en Afrique et qui peuvent tolérer des températures au-delà de 40°C (**Karanja et Wood, 1988**). Ainsi, il a été rapporté que les bradyrhizobia sont plus thermotolérants que les souches à croissance rapide (**Robert et al., 1982**).

L'effet des basses températures sur les rhizobiums est moins rapporté par rapport aux températures élevées (**Lynch et Smith, 1993**).

L'exposition aux hautes températures retarde l'initiation nodulaire et affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (**Graham, 1992 ; Bordeleau et Prevost, 1994 ; Zahran, 1999**).

Dans les inoculums préparés, la survie des rhizobia peut être sévèrement affectée par les températures élevées de stockage (**Brockwell et Phillips, 1965**). A l'opposé, les basses températures extrêmes inhibent l'expression des gènes *nod* et donc l'infection et la nodulation et diminuent l'activité nitrogénasique (**Waughman, 1977 ; Zhang et al., 1996**).

La sélection des souches de rhizobiums thermotolérantes constitue un moyen prometteur pour surmonter le stress hydrique (**Nutman, 1975 ; Parker et al., 1977 ; Mpeperekki et al., 1997**).

La corrélation entre la tolérance des souches à la température et leur origine géographique n'a pas encore été bien élucidée. Plusieurs auteurs ont rapporté, comme dans notre travail, que la tolérance aux températures est complètement indépendante de la température du site d'isolement (**Mohamed et al., 2000 ; El-Hillali, 2006**). Alors que d'autres ont signalé l'existence d'une corrélation entre la thermotolérance des souches et la température du site d'isolement (**Wilkins, 1967 ; Dart et al., 1975**).

III.4. Tolérance aux pH

III.4.1. *Hedysarum coronarium*

Les résultats obtenus indiquent qu'à l'exception de la souche DZ.22.3.2.4 (pour un pH de 8), tous les autres isolats sont capables de pousser. Le pourcentage de souches ayant une croissance optimum est de 95,35% et 81,39% à pH 6 et 8 respectivement. 16,28% des souches ont une croissance moyenne à pH 8. Ce taux diminue à 6,98% à pH 6 (Fig. 25, Annexe 4).

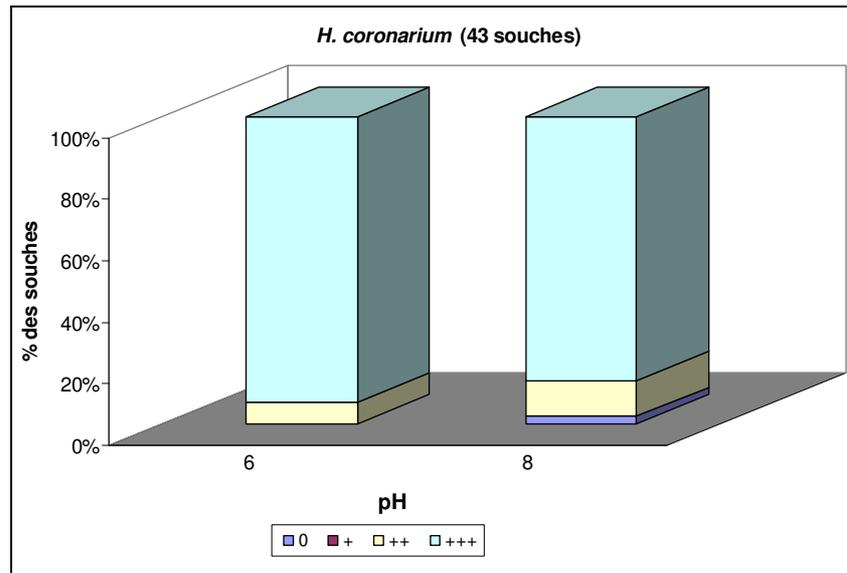


Figure 25: Comportement des souches nodulant *H. coronarium* à différents pH.

(0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.4.2. *Hedysarum aculeolatum*

Mise à part la souche DZ.48.2.1.4, inhibée sous un pH 8, l'ensemble des souches ont pu croître sous les différents pH testés. En effet, à pH 6, 8% et 92% des souches ont une croissance moyenne et optimale, respectivement, alors que pour le pH 8 et pour ces mêmes degrés de croissance, les valeurs enregistrées sont de 8% et 88% respectivement (Fig. 26, Annexe 4).

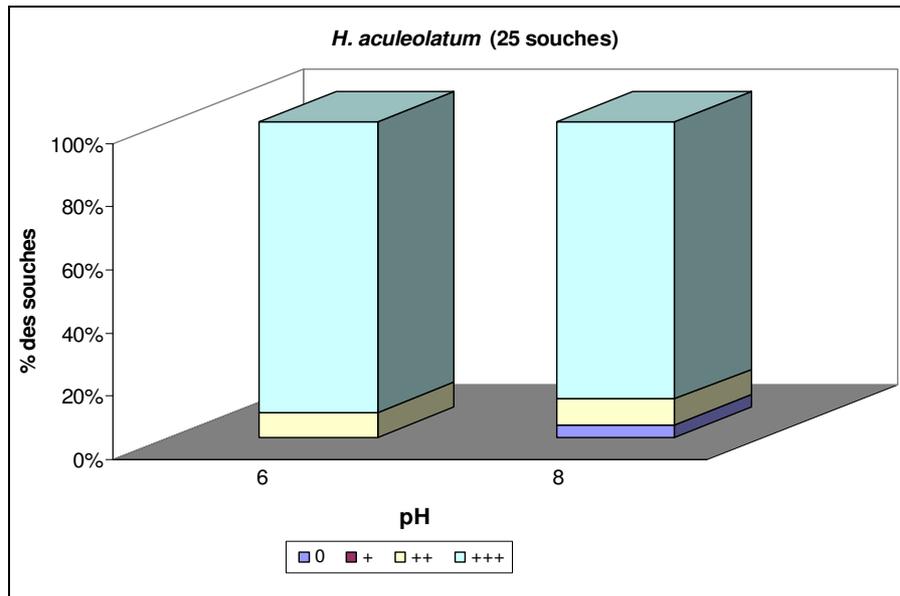


Figure 26: Comportement des souches nodulant *H. aculeolatum* à différents pH. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.4.3. *Hedysarum flexuosum*

Toutes les souches se comportent de la même manière vis-à-vis des variations du pH. Elles présentent une croissance optimale quelle que soit la valeur du pH testée (Fig. 27, Annexe 4).

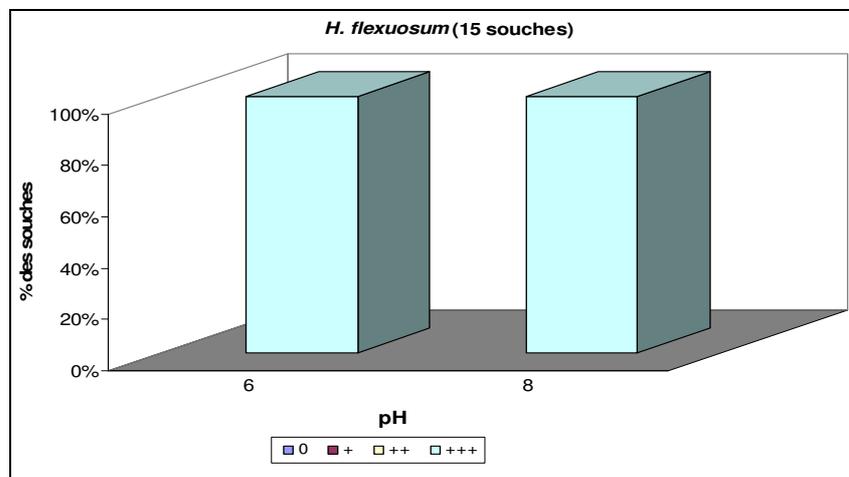


Figure 27: Comportement des souches nodulant *H. flexuosum* à différents pH. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

III.4.4. *Hedysarum capitatum*

Les résultats montrent que la variation du pH ne présente aucun effet sur la croissance des souches étudiées. En effet, l'ensemble des souches ont poussé comme leurs témoins (de manière optimale) à pH 6 comme à pH 8 (Fig. 28, Annexe 4).

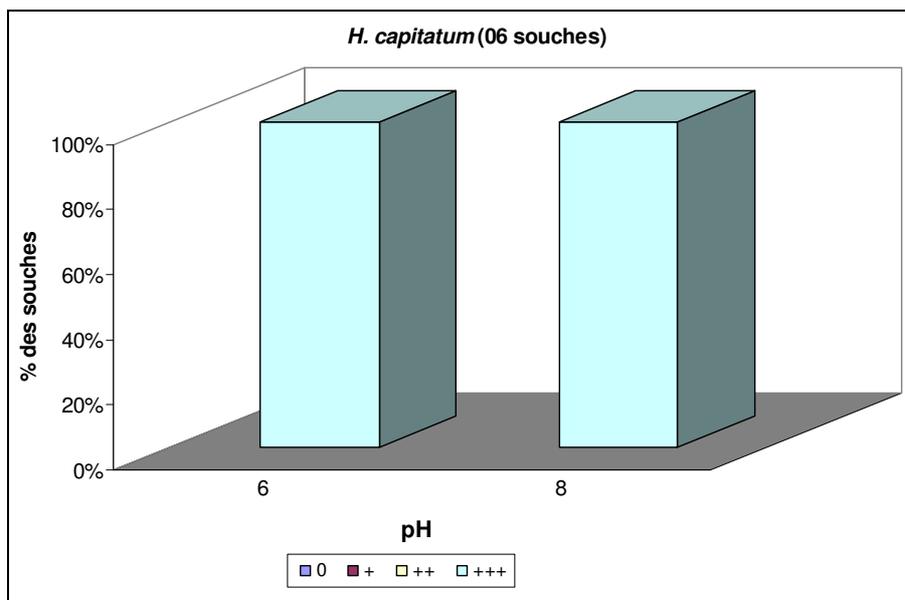


Figure 28: Comportement des souches nodulant *H. capitatum* à différents pH. (0 : pas de croissance des bactéries, + : faible croissance des bactéries, ++ : moyenne croissance des bactéries, +++ : croissance optimale).

Comparaison entre les isolats des 4 espèces du genre *Hedysarum*

Dans l'ensemble, tous les isolats se comportent de manière indifférente vis-à-vis du pH du milieu de culture (Fig. 29, Annexe 4) à l'exception des souches DZ.22.3.2.4 chez *H. coronarium* et DZ.48.2.1.4 chez *H. aculeolatum* qui n'ont pas poussé à un pH de 8. Les isolats de *H. flexuosum* et de *H. capitatum* sont plus tolérants que ceux de *H. coronarium* et de *H. aculeolatum*. Chez *H. coronarium* le pourcentage des isolats qui ont montré une croissance optimale est de 93,02% et 86,05% à un pH de 6 et 8, respectivement, alors qu'il est de 92% et 88% chez *H. aculeolatum* pour les mêmes pH. Ce pourcentage atteint le 100% chez *H. flexuosum* et chez *H. capitatum* quel que soit le pH du milieu (Fig. 29). Les pH alcalins sont moins tolérés que les pH acides, malgré que les valeurs du pH au KCl mesurées pour les différents sites d'origine des souches sont majoritairement alcalines ou neutres. Ceci indique que la tolérance des isolats aux pH ne présente pas de corrélation avec le pH des sols d'origine.

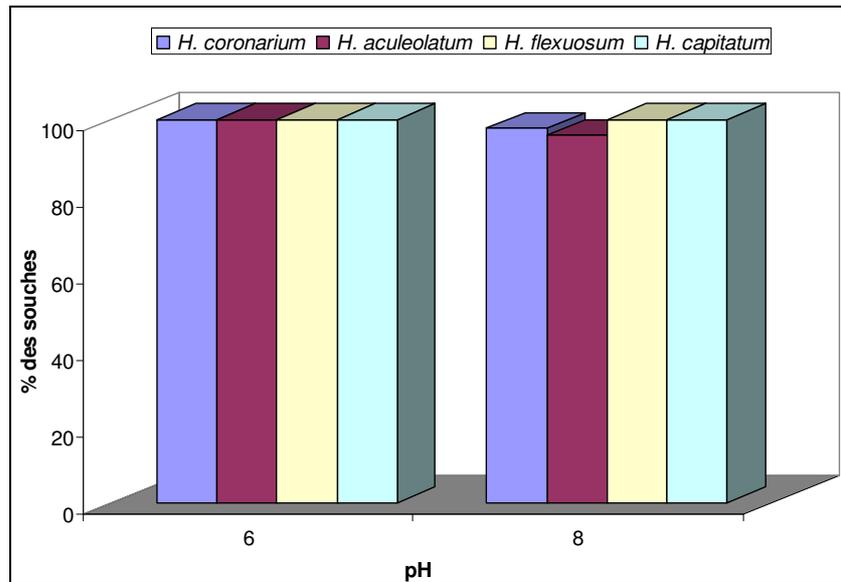


Figure 29: Comportement des souches du genre *Hedysarum* à différents pH.

L'absence de corrélation entre le comportement des souches et le pH des sols d'origine a été confirmée par le test du pouvoir acidifiant ou alcalinisant des isolats (Test du BTB) (Fig. 30) qui a révélé que 78,65% et 7,87% des isolats ont, respectivement, un pouvoir acidifiant et alcalinisant du milieu. Le reste (13,48%) est considéré comme neutre vis-à-vis le pH du milieu (Fig. 31).

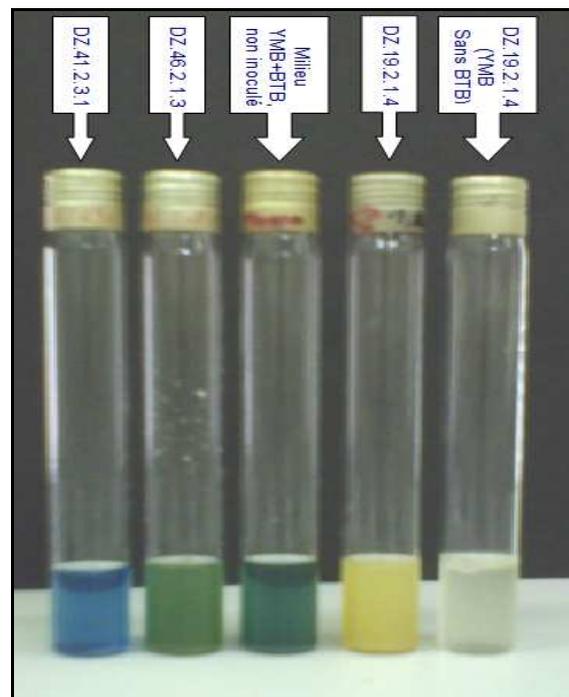


Figure 30: Variation des couleurs selon le pouvoir acidifiant ou alcalinisant des souches (test BTB).

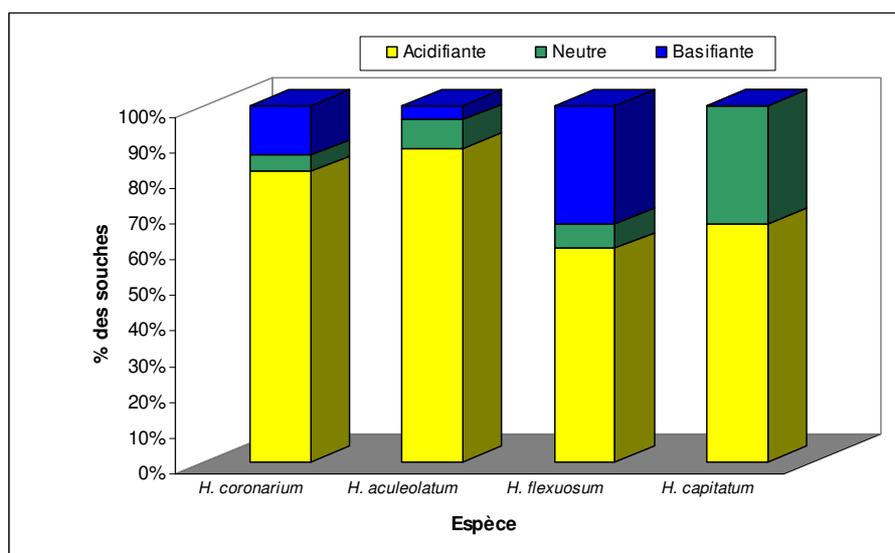


Figure 31: Réaction des souches du genre *Hedysarum* dans le milieu YMB+BTB.

DISCUSSION

De manière générale, les résultats obtenus concordent parfaitement avec ceux de **Kishinevsky et al. (2003)**, qui ont constaté que 15, 4 et 18 souches isolées, respectivement, de *H. coronarium*, de *H. flexuosum* et de *H. spinosissimum* (collectés de différents pays: Tunisie, Maroc, Espagne, Italie et Israël) ont pu tolérer des pH de 7 et 8. De même, **Elboutahiri (2009)** a trouvé que 62 isolats (100%) nodulant l'espèce fourragère *H. coronarium* tolèrent les pH alcalins 9 et 9,5. **Alemayehu (2009)** a également rapporté que le pH 8 est moins toléré que le pH 6 par 12 isolats nodulant la fève.

La plasticité des isolats vis-à-vis du pH, est en parfaite accord avec les rapports selon lesquels les *Rhizobiaceae* tolèrent parfaitement les pH allant de 4.5 à 9 (**Graham, 1964 ; Jordan, 1984**) dont le pH optimum est de 6 à 7 (**Slamen 1952** cité par **Mensah et al., 2006**). Néanmoins, ils diffèrent significativement dans leur tolérance au pH, en particulier pour les pH acides (**Glenn et Dilworth, 1994**). Cette différence a été signalée même entre les souches d'une espèce donnée (**Glenn et Dilworth, 1994 ; Zahran, 1999**).

Dans la symbiose Rhizobium-Légumineuse, le degré de tolérance au pH dépend des souches bactériennes et de l'espèce hôte impliquée (**Correa et Berneix, 1994**).

L'acidité est, généralement, plus néfaste que ne l'est l'alcalinité (**Coventry et Evans, 1989**). Elle présente un facteur important qui affecte la fixation symbiotique de l'azote (**Pankhurst et al., 1982**) par ses effets nuisibles sur la survie et la persistance des rhizobia dans le sol (**O'Hara et al., 1994 ; Bayoumi et al., 1995 ; Ibekwe et al., 1997**).

Les rhizobiums sont plus sensibles aux pH acides que leurs plantes hôtes (**Correa et Berneix, 1994**).

L'échec de nodulation des légumineuses est généralement rapporté dans les sols acides, particulièrement ceux d'un pH inférieur à 5 (**Raza *et al.*, 2001 ; Appunu et Dhar, 2006**).

Très peu d'études ont été réalisées sur les effets du pH élevé (alcalins) sur la croissance rhizobienne, sur la nodulation et/ou sur la croissance des légumineuses (**Bordeleau et Prevost, 1994**). La corrélation entre le comportement des bactéries vis-à-vis du pH du milieu de culture et celui de leur sol d'origine est controversée chez plusieurs auteurs. Néanmoins, aucune généralisation ne peut être faite concernant la relation entre la tolérance au pH extrême et le pH du sol d'origine (**Lowendorf *et al.*, 1981**).

Dans notre cas, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la tolérance des souches aux pH du milieu de culture et les valeurs du pH du milieu d'origine. Un résultat similaire a été obtenu par **Graham (1998)** qui a rapporté que les souches isolées des sols acides ne sont pas toutes tolérantes à l'acidité.

IV. Caractérisation moléculaire des souches

IV.1. *Hedysarum coronarium*

Les données sur la variabilité génétique des 43 souches étudiées ont été utilisées pour produire une matrice de similarité basée sur le coefficient de Jaccard. Ces données ont ensuite été employées pour produire un dendrogramme révélant les relations génétiques au sein des souches selon la méthode d'agrégation UPGMA. Le dendrogramme obtenu (Fig. 32) distinguait 5 groupes dont les souches de chacun sont identiques à 100%. Ces groupes sont :

- G1: DZ.19.1.3.2 , DZ.20.1.3.2 ;
- G2: DZ.21.1.1.2T , DZ.20.1.3.1 ;
- G3: DZ.22.3.2.3 , DZ.23.1.2.2 ;
- G4: DZ.21.2.2.4 , DZ.22.1.3.2 , DZ.23.2.1.5 ;
- G5: DZ.19.2.1.2 , DZ.19.2.1.1 ;

Le reste des souches (32 souches) constitué de souches distinctes qui avaient un coefficient de similarité plus ou moins important. Ceci révèle l'importance de la diversité génétique au sein des souches étudiées. Cette diversité est observée même entre les souches issues d'un même nodule (variabilité intra-nodulaire). En effet, ces dernières peuvent être :

- ❖ similaire à 100% : DZ.19.2.1.1 avec DZ.19.2.1.1 ;
- ❖ similaire à des degrés importants : DZ.22.3.2.1 avec DZ.22.3.2.2 à 67% ;
- ❖ similaire à des degrés très faible : DZ.19.1.3.1 avec DZ.19.1.3.2.

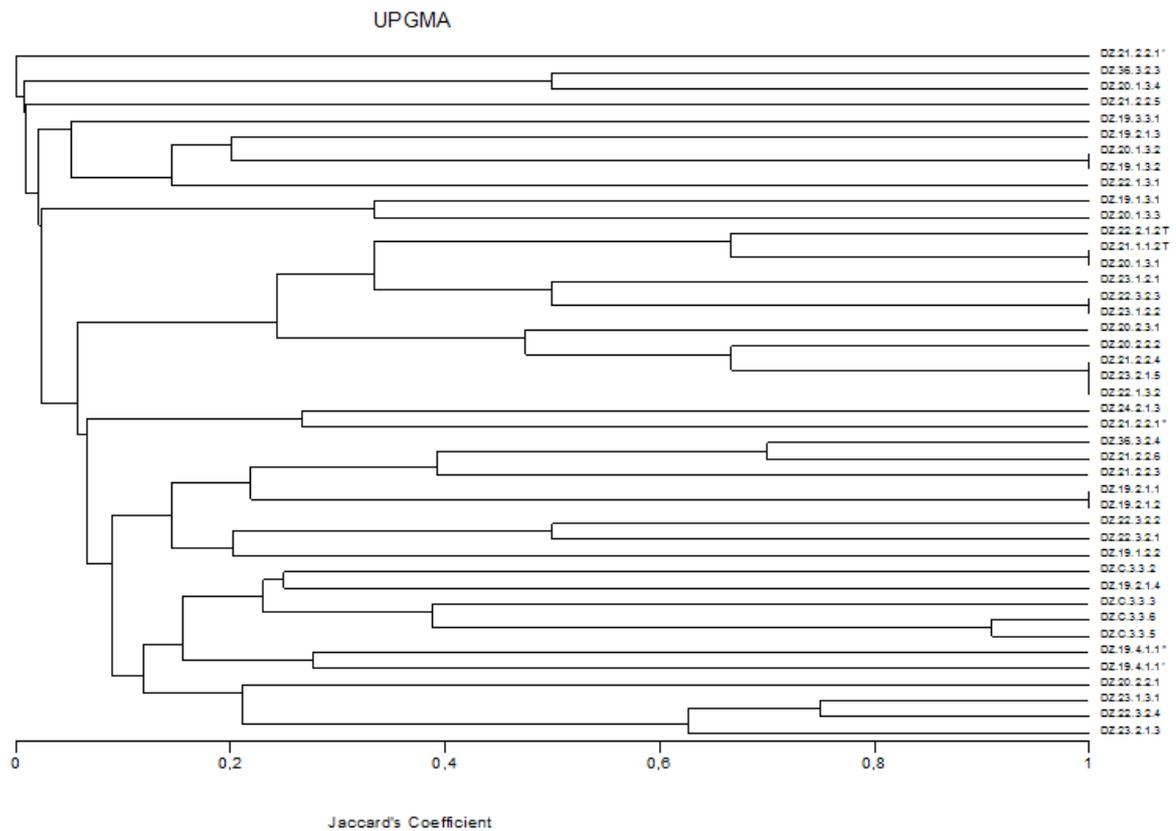


Figure 32: Dendrogramme de distance génétique des souches de *H. coronairum* à partir des données de Box-PCR par la méthode UPGMA (coefficient de Jaccard).

IV.2. *Hedysarum aculeolatum*

Le dendrogramme tracé à partir des données de gels d'électrophorèse en utilisant le coefficient de Jaccard et la méthode de regroupement UPGMA (Fig. 33) montre que trois souches (DZ.47.1.1.3 avec DZ.47.1.1.4 et DZ.47.1.1.5) sur les 25 ont été classées dans un clone unique, tandis que les 22 autres sont différentes. Elles présentent un coefficient de similarité plus ou moins important. Toutefois, le typage moléculaire par Box-PCR nous a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs souches génétiquement distinctes au sein d'un même nodule, c'est le cas par exemple des souches DZ.46.2.1.1, DZ.46.2.1.2, DZ.46.2.1.3, DZ.46.2.1.4, DZ.46.2.1.5 ou encore des souches DZ.48.3.3.1, DZ.48.3.3.2, DZ.48.3.3.3. Une grande variabilité est remarquée pour ce groupe de souche, puisque la plupart des souches présente un indice de similarité inférieur à 0.4.

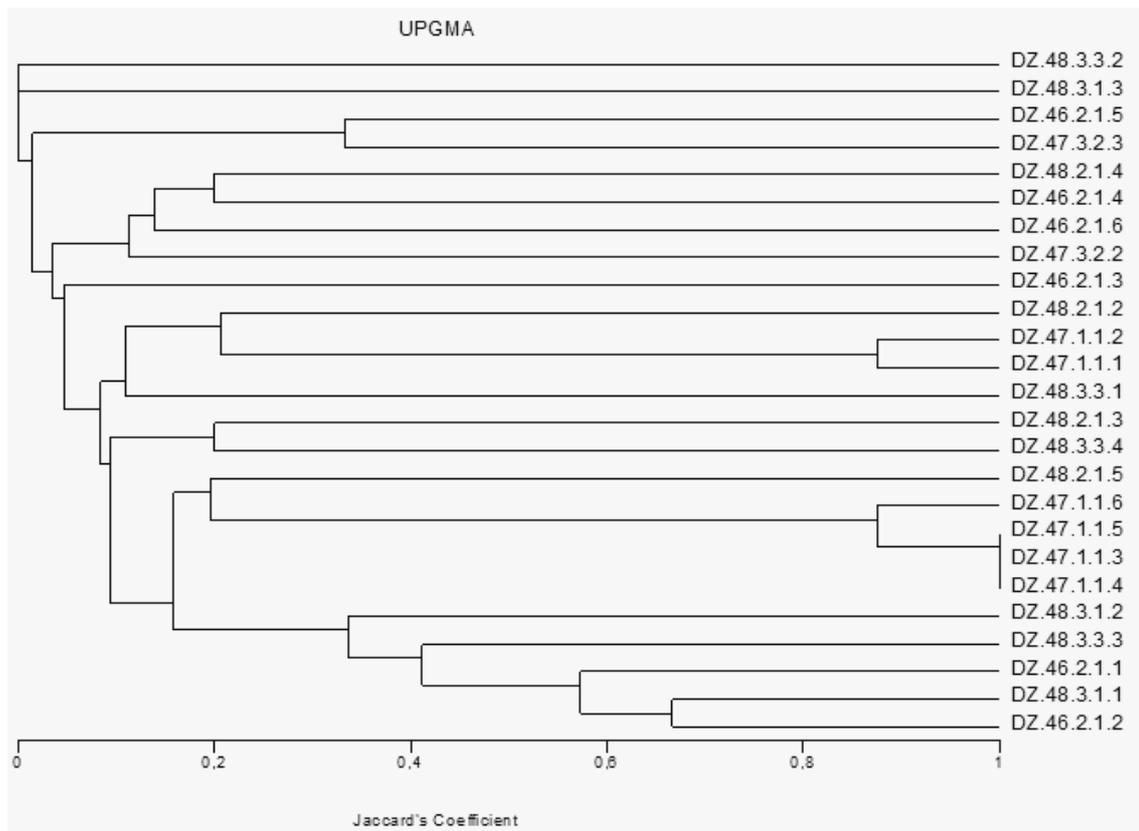


Figure 33: Dendrogramme de distance génétique des souches de *H. aculaolatum* à partir des données de Box-PCR par la méthode UPGMA (coefficient de Jaccard).

IV.3. *Hedysarum flexuosum*

Les données moléculaires (Box-PCR) obtenues de différents gels ont été représentées sous forme de dendrogramme suivant le coefficient de Jaccard et la méthode de classification UPGMA (Fig. 34). L'analyse du dendrogramme à un niveau 52% de similarité (choisi arbitrairement) a permis la discrimination de 3 clusters et 7 linéages indépendants. A un niveau plus bas de similarité génétique (20%) on obtient cinq clusters et deux linéages indépendants composés individuellement par les souches DZ.41.2.2.2 et DZ.41.2.2.4. Il est à signaler qu'une diversité génétique a été observée au sein des souches isolées d'un même nodule, à titre d'exemple nous citons les souches DZ.41.2.2.2, DZ.41.2.2.4, DZ.41.2.2.3 et les souches DZ.42.2.1.1, DZ.42.2.1.2.

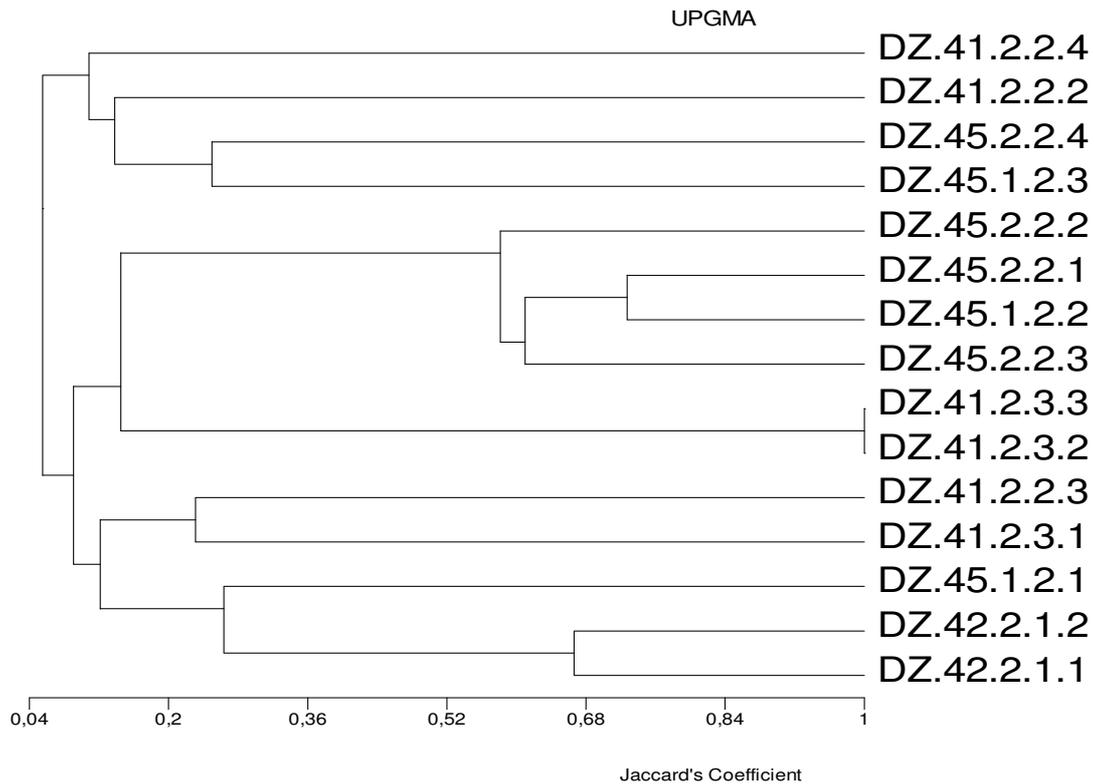


Figure 34: Dendrogramme de distance génétique des souches de *H. flexuosum* à partir des données de Box-PCR par la méthode UPGMA (coefficient de Jaccard).

IV.4. *Hedysarum capitatum*

La classification hiérarchique des souches étudiées illustrée par le dendrogramme de la figure 35 établi selon le coefficient de Jaccard et la méthode de clustering hiérarchique agglomératif UPGMA montre l'existence d'un seul clone composé de trois souches qui sont DZ.19.1.2.3 DZ.A2.2.2.3 et DZ.A2.2.2.4. Le reste des souches forment des lignées indépendantes. En se situant arbitrairement à un niveau de 20% de similarité génétique (80% de désaccord) les souches se trouvent en deux clusters bien délimités avec un lignée indépendante représenté par la souche DZ.A2.2.2.2.

Une diversité génétique plus ou moins importante entre les souches isolées d'un même nodule (DZ.A2.2.2.1, DZ.A2.2.2, DZ.A2.2.3, DZ.A2.2.2.4) a été mise en évidence

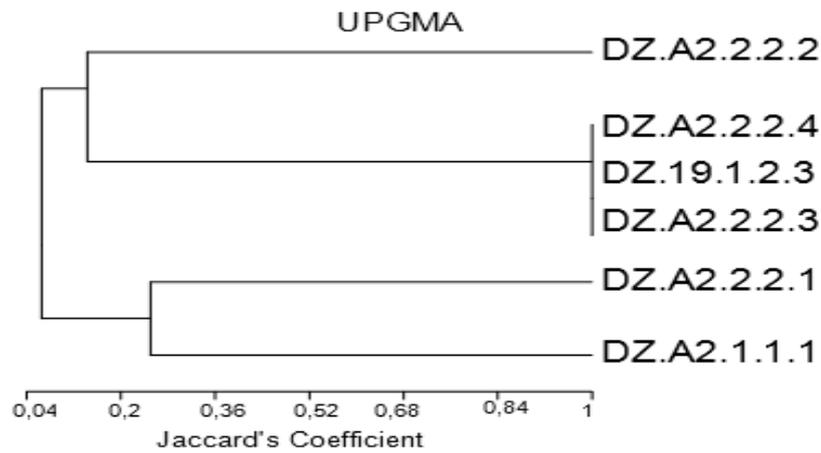


Figure 35: Dendrogramme de distance génétique des souches de *H. capitatum* à partir des données de Box-PCR par la méthode UPGMA (coefficient de Jaccard).

IV.5. Comparaison entre les isolats des 4 espèces et discussion des résultats obtenus

L'analyse des empreintes génomiques PCR/Box (Fig. 36) en utilisant la méthode d'UPGMA (Unweighted Pair Group Methode with Arithmetic Average) a abouti à la construction d'un dendrogramme (Fig. 37), qui révèle parfaitement l'existence d'un niveau significatif du polymorphisme moléculaire entre les 89 souches étudiées. En effet, à l'exception de 21 souches qui présentent 100% de similarité et regroupées dans 9 groupes différents, tous les autres isolats (68 isolats) constituent des souches distinctes. Les 9 groupes sont :

- G1: DZ.20.1.3.3, DZ.48.3.1.3 ;
- G2: DZ.19.1.3.2, DZ.20.1.3.2 ;
- G3: DZ.21.2.2.4, DZ.22.1.3.2, DZ.23.2.1.5 ;
- G4: DZ.20.1.3.1, DZ.21.1.1.2T ;
- G5: DZ.23.1.2.2, DZ.22.3.2.3 ;
- G6: DZ.19.2.1.2, DZ.19.2.1.1 ;
- G7: DZ.A2.2.2.4, DZ.19.1.2.3 Ca , DZ.A2.2.2.3 ;
- G8: DZ.47.1.1.4, DZ.47.1.1.5, DZ.47.1.1.3 ;
- G9: DZ.41.2.3.2, DZ.41.2.3.3.

Dans chaque site de collecte et pour chaque espèce de *Hedysarum*, les souches isolées semblent être génétiquement distinctes. La diversité moléculaire des souches est très importante même au sein des souches isolées d'un même nodule car 77 profils ont été identifiés avec les 89 souches typées (Fig. 36).

Le typage moléculaire par PCR/Box nous a permis de mettre en évidence, et pour la première fois, l'existence de plusieurs souches génétiquement distinctes au sein d'un même nodule chez les quatre espèces de *Hedysarum* étudiées. En effet, les souches isolées d'un même nodule peuvent être :

- similaire à 100% : DZ.19.2.1.1 avec DZ.19.2.1.1 chez *H. coronarium* ; DZ.47.1.1.3 avec DZ.47.1.1.4 et DZ.47.1.1.5 chez *H. aculeolatum*, DZ.41.2.3.2 avec DZ.41.2.3.3 chez *H. flexuosum* et DZ.A₂.2.2.3 avec DZ.A₂.2.2.4 chez *H. capitatum* ;
- similaire à des degrés importants : DZ.22.3.2.1 avec DZ.22.3.2.2 à 67% chez *H. coronarium* ; DZ.46.2.1.1 avec DZ.46.2.1.2 à 73% chez *H. aculeolatum* ; DZ.42.2.1.1 avec DZ.42.2.1.2 à 80% chez *H. flexuosum* et DZ.A₂.2.2.1 avec DZ.A₂.2.2.2 à 34% chez *H. capitatum*),
- similaire à des degrés très faible : DZ.19.1.3.1 avec DZ.19.1.3.2 chez *H. coronarium*.

Une observation analogue a été rapportée par **El-Hillali et al. (2002)** chez 14 isolats issus d'une même nodosité du lupin jaune (*Lupinus luteus*).

Ainsi, en se basant arbitrairement sur deux niveaux de similarité génétique 70 % et 50 %, la majorité des souches se trouvent sur des lignées indépendants. A un niveau de similitude plus bas (20%), on obtient 19 petits clusters et 17 lignées indépendants ce qui indique l'existence d'un grand degré de divergence génétique entre les souches. Le niveau de variabilité diminue considérablement à 10% de similarité où nous obtenons 06 clusters (Fig. 37), à savoir :

Cluster 1 : comporte 03 souches (DZ.19.1.3.1, DZ.20.1.3.3 isolées de *H. coronarium* et DZ.48.3.1.3 isolée de *H. aculeolatum*). Aucune de ces souches ne présente une croissance optimale (comparable à celle du témoin) en présence de 1600 mM NaCl ni à 40°C.

Cluster 2 : constitué de 07 souches isolées de *H. coronarium* et de *H. aculeolatum*. Les souches de ce cluster supportent mieux les différentes concentrations de NaCl et la température de 40°C que les souches du premier cluster.

Cluster 3 : comme les deux clusters précédents les 05 souches constituant ce cluster sont ainsi isolées de *H. coronarium* et de *H. aculeolatum*. Toutes ces souches ont pu croître, mais à des degrés différents, en présence de 2000 mM NaCl dans le milieu de culture et à une température de 40°C.

Cluster 4 : Le cluster 4 est formé par 34 souches appartenant aux quatre espèces de *Hedysarum* étudiées, dont la majorité (22 isolats) sont isolées de *H. coronarium*. La moitié des souches présente une croissance comparable à celle du témoin (optimale) en condition de salinité (1600 mM de NaCl). Ce cluster est caractérisé par la présence de 50% des souches ayant montré une croissance identique à leurs témoins sous un potentiel hydrique de -0,5MPa.

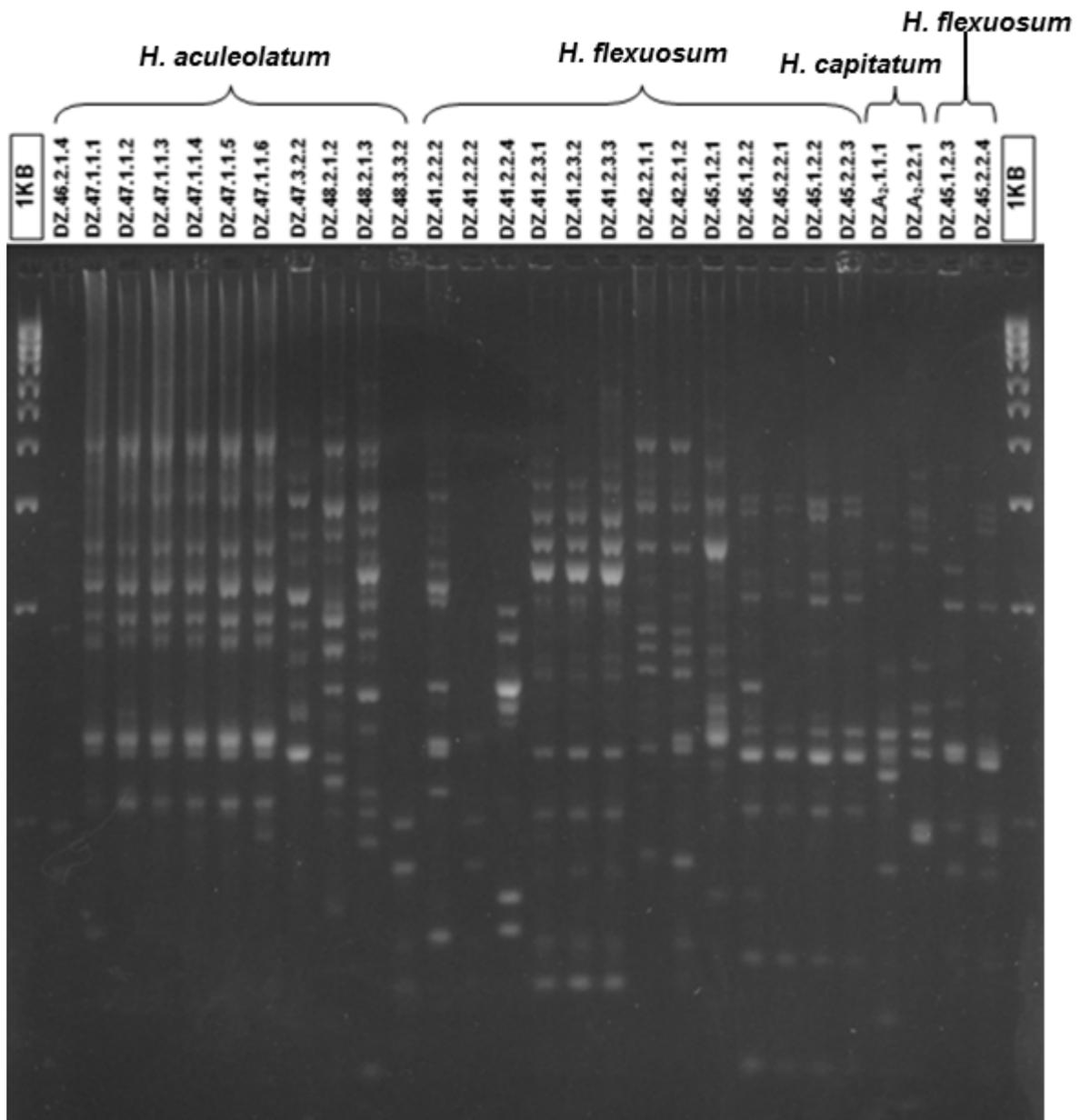


Figure 36: Profil électrophorétique obtenu par l'approche Box-PCR chez les souches étudiées.

Cluster 5 : isolées de *H. aculeolatum* et de *H. flexuosum*, les 07 souches de ce cluster ont pu croître à 40°C. Elles ont ainsi une croissance moyenne sous un potentiel hydrique de -0,5MPa.

Cluster 6 : renferme 33 souches, isolées des quatre espèces étudiées, dont la majorité ont une croissance comparable à celle de leurs témoins (optimale) en présence de 1400 mM NaCl dans le milieu de culture. Les souches de ce cluster sont les plus affectées par la plus forte concentration de NaCl (2000 mM). Ainsi, ce cluster contient la moitié des souches (14) ayant une croissance optimale à 40°C.

Le haut degré de divergence génétique des souches n'a pas permis de mettre en évidence un polymorphisme moléculaire délimitant les symbiotes appartenant à une espèce donnée ou à un site de collecte bien déterminé. Aucune relation n'a été trouvée entre l'origine géographique des souches et leurs profils moléculaires obtenus. La même constatation a été rapportée dans d'autres travaux; **Moza et al. (1988)**, travaillant sur 45 souches nodulant le Sulla (*H. coronarium* L.), ont observé une grande diversité des profils plasmidiques sans aucune relation avec l'origine géographique des souches. Il faut noter que les marqueurs moléculaire utilisés rep-PCR dont les Box-PCR en font partie ne sont pas informatifs sur la taxonomie des souches de rhizobium mais permettent l'étude et l'appréciation de la diversité existante, telle que nous l'avons présentée.

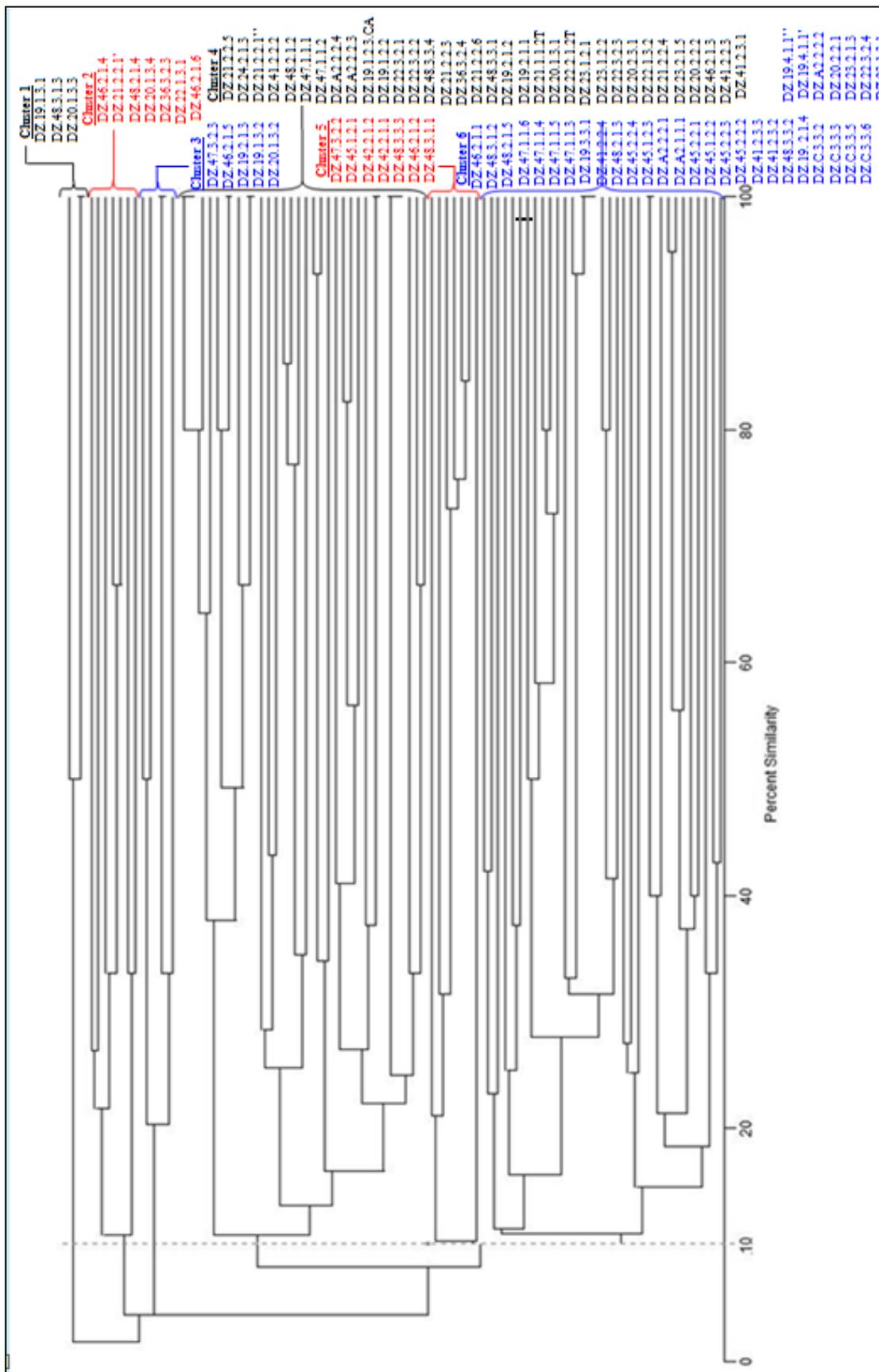


Figure 37: Dendrogramme de distance génétique établi à partir des données Box-PCR par la méthode UPGMA (pourcentage de similarité).

CONCLUSION

GENERALE

ET

PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons constitué une collection algérienne de 431 souches locales de rhizobiums nodulant quatre espèces du genre *Hedysarum* (*H. coronarium* ; *H. flexuosum* ; *H. aculeolatum* et *H. capitatum*) en Algérie et provenant de différentes régions géographiques du pays.

Bien que les espèces de *Hedysarum* aient bénéficié d'un intérêt important dans l'étude de leur écologie et leur caractérisation génétique et physiologique, leurs rhizobiums n'ont pas connu le même sort, pour cela ce travail vient en complément aux travaux antérieurs réalisés sur les espèces végétales.

De la collection totale, une sous-collection de 89 souches a été retenue pour la certitude de leur appartenance aux nodules collectés (absence de développement de bactéries chez le témoin). Une étude de la biodiversité naturelle de la sous-collection retenue a été réalisée par une caractérisation physiologique et une autre moléculaire.

La caractérisation physiologique des souches de notre collection de Rhizobium a permis la mise en évidence d'une grande plasticité de tolérance à la salinité, au stress hydrique, à la température et au pH pour l'ensemble des souches malgré leur provenance de régions très différentes et très éloignées. La plupart des souches ont un pouvoir acidifiant du milieu de culture. Cette diversité physiologique peut être doublement exploitée: d'une part pour la sélection des souches candidats hautement tolérantes aux différents stress abiotiques pour leurs intégrations dans les programmes d'amélioration génétique afin d'assurer une symbiose efficace et ainsi une bonne production agricole, et, d'autre part, dans la connaissance et l'identification des souches de rhizobia.

La caractérisation moléculaire des souches via l'approche Box-PCR a pu fournir plus d'informations sur la variabilité spécifique des souches. L'analyse des empreintes génomiques obtenues a révélé un niveau significatif du polymorphisme moléculaire entre les 89 souches étudiées. L'amorce Box-PCR utilisé génère 90 différentes bandes dont 80 sont polymorphes. Le dendrogramme obtenu en utilisant la méthode de regroupement UPGMA (Unweighted Pair Group Methode with Arithmetic Average) et le pourcentage de similitude structure les 89 souches étudiées en 6 groupes électrophorétique ou clusters à un niveau de similarité de 10%. Ainsi, seulement 21 souches regroupées dans 9 groupes ont une similarité de 100%.

Dans la présente étude, deux constatations ont été relevées :

- Une grande variabilité entre les souches issues de la même nodosité (diversité intra-nodulaire) a été remarquée:
 - pour la tolérance aux différents stress abiotiques appliqués surtout pour la salinité et plus particulièrement chez les souches isolées de *H. coronarium*.
 - pour la caractérisation moléculaire.

- L'absence d'une corrélation claire entre les données écologiques du milieu d'origine des isolats et les caractéristiques physiologiques et/ou les profils moléculaire obtenus.

De part l'aspect scientifique de ce travail, il est à noter que l'ensemble des caractérisations physiologique et moléculaire ont été faite en Algérie ce qui ouvre des perspective pour l'étude de la diversité de plus de rhizobium en Algérie.

Les résultats obtenus constituent un apport scientifique important et ouvrent de multiples nouvelles perspectives :

1. L'élargissement de cette collection de rhizobiums en y intégrant d'autres zones du pays non étudiées ;
2. Compléter la caractérisation des isolats en introduisant de nouveaux tests physiologiques (utilisation des sources de carbone, FAME ou analyse des acides gras cellulaires...) et moléculaire (homologies ADN/ADN, le séquençage de l'ADNr 16S...);
3. Etudier la tolérance des souches aux stress abiotiques en symbiose tout en procédant à leur inoculation aux plantes hôtes. Cela permettra de repérer les souches les plus tolérantes afin de les intégrer dans les programmes d'amélioration de production agricole ;
4. Comparer les résultats obtenus à ceux des autres laboratoires ou d'autre pays en particulier méditerranéens afin de construire une base de donnée détaillée sur les souches candidates et intéressantes (propriétés physiologique, biochimique, moléculaire, arbre phylogénétique...).

Nous pouvons conclure que la population de Rhizobium nodulant spontanément les espèces du genre *Hedysarum* en Algérie paraît très diversifiée et mérite d'être étudiée et valorisée. Cette diversité devrait être exploitée dans les programmes d'amélioration de production agricole qui constitue l'épine dorsale de toute sécurité alimentaire du pays. L'élargissement de la collection à d'autres espèces et à différents sites écologiques et géographiques pourrait apporter d'autres informations et enrichir ainsi la base de données actuelle. Nous devons particulièrement protéger et sauvegarder la collection vivante obtenue pour que ce travail ait un sens particulièrement dans le futur.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aarons S. R. & Graham P.H. (1991):** Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity. *Plant Soil*. 134(1): 145-151.
2. **Abdelguerfi-Berrekia R. (1985):** Contribution à l'étude du genre *Hedysarum* L. en Algérie. Thèse Magister. INA, Alger. 131p.
3. **Abdelguerfi-Berrekia R. & Abdelguerfi A. (1986):** Valorisation des ressources phytogénétiques locales d'intérêt fourrager dans l'aménagement des zones de montagnes. *Ann. Inst. Nat. Agron.* El-Harrach. 10(1): 1-11.
4. **Abdelguerfi A. & Abdelguerfi-Berrekia R. (1987):** Réflexions sur la valorisation de quelques espèces fourragères adaptées aux zones arides et semi-arides. *Ann. Ins. Nat. Agron.* El-Harrach. 11(2):1-10.
5. **Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N. & Guittonneau G.C. (1991):** Répartition des espèces spontanées du genre *Hedysarum* selon certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages*. 126:187-207.
6. **Abdelguerfi A. (2002):** Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral : Distribution et variabilité chez les légumineuses Spontanées (*Medicago*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Hedysarum* et *Onobrychis*) en Algérie. Thèse Doctorat d'Etat. INA, Alger. 433p et Annexes.
7. **Abdelguerfi A. & Laouar M. (2002):** Les espèces fourragères et pastorales : leurs Utilisation au Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed: FAO-RNE. 146p.
8. **Abdelguerfi-Laouar M., Belarbi N., Mebarkia A. & Abdelguerfi A. (2002):** Etude du comportement de quelques populations algériennes de *Hedysarum coronarium* dans la région de Sétif. *Recherche agronomique INRAA*. 10: 35-44.
9. **Abdelguerfi-Laouar M. (2005):** Diversité éco-génétique chez les fabacées et leurs symbiotes : Cas de la section des Intertextae du genre *Medicago* L. Thèse Doctorat. INA, Alger. 186p et annexes.
10. **Abdelkefi A. & Marrakchi M. (2000):** Les ressources phyto-genetiques fourrageres et pastorales: de l'erosion a la conservation. *Cah. Opti. Médi.* 45: 15-27.
11. **Achouak W., Christen R., Barakat M., Martel M.H. & Heulin T. (1999):** *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49(2): 787-794.
12. **Alemayehu W. (2009):** The Effect of indigenous root-nodulating bacteria on nodulation and growth of faba bean (*Vicia Faba*) in the low-input agricultural systems of tigray highlands, northern Ethiopia. *MTJS*. 1 (2):30-43.
13. **Allen E. K. & Allen O.N. (1981):** The leguminosae: A source book of characteristics, uses and nodulation. Ed: Madison. 812p.
14. **Amarger N., Macheret V. & Laguerre G. (1997):** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(4): 996-1006.
15. **Appunu C. & Dhar B. (2006):** Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. *African J. Biotech.* 5(10): 842-845,
16. **Aubert G. (1978):** Méthode d'analyse des sols. C.R.D.P. Marseille. 191p.
17. **Ba S., Willems A., de Lajudie P., Roche P., Jeder H., Quatrini P., Neyra M., Ferro M., Promé J.C., Gillis M., Boivin-Masson C & Lorquin J. (2002):** Symbiotic and Taxonomic Diversity of Rhizobia Isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. *Syst. Appl. Microbiol.* 25(1): 130-145.
18. **Baatout H. (1991):** Le complexe d'espèces *Hedysarum spinosissimum* L. dans le bassin méditerranéen occidental : analyse de la structure génétique des populations, conséquences au niveau de la systématique des deux sous-espèces *capitatum* et *euspinosissimum* dans le genre *Hedysarum*. Thèse d'Etat. Univ. Paris-Sud, Orsay, France.
19. **Banet G., Wininger S., Badani H., Ben-Dor B., Friedman Y. & Kapulnik Y. (1996):** Toxic and osmotic effects of salinity on growth and nodulation of *Medicago sativa*. *Symbiosis*. 21(3): 209-222.
20. **Barnett Y., Catt P. C., Jenjareontham R. & Mann K. (1993):** Fast-growing root nodule bacteria from Australian *Acacia* spp. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Ed: Palacios R., Mora J., and Newyon W.E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p 594.
21. **Batzli J.M.C., Graves W.R. & Berkum P.V. (1992):** Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7): 2137-2143.
22. **Bayoumi H.E.A., Biro B., Balazsy S. and Kecskes M. (1995):** Effects of some environmental factors on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains. *Acta Microbiol. Immunol. Hungr.* 42(1): 61-69.
23. **Ben Fadhel N., Boussaid M. & Marrakchi M. (1997):** Polymorphisme des populations Nord Africaines de l'*Hedysarum flexuosum*. *El Awamia*. 96:77-99.
24. **Ben Khaled L., Morte G.A., Honrubia M. & Oihabi A. (2003):** Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. *Agronomie*. 23(7): 553-560.
25. **Benata H., Ourarhi M., Boukhatem N., Berrichi A., Hanaa A., Muresu R., Squartini A. & El-Idrissi M.M. (2008):** Diversity of bacteria that nodulate *Prosopis juliflora* in the eastern area of Morocco. *Syst. Appl. Microbiol.* 31(5): 378-386.
26. **Benguedouar A & Squartini A. (2005):** Caractérisation d'une nouvelle espèce de *Rhizobium* nodulant la légumineuse fourragère *Hedysarum coronarium*. 1^{er} Colloque Euroméditerranéen de Biologie Végétale et Environnement, Annaba, 28-30 novembre 2005.

27. **Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A. & Squartini A. (2004):** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(4): 462-468.
28. **Berge O., Lodhi A., Brandelet G., Santaella C., Roncato M.A., Christen R., Heulin T & Achouak W. (2009):** *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(2): 367-372.
29. **Blondeau R. (1980):** Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Vuibert université biologie, Paris. 101p.
30. **Bogusz D. & Franche C. (1985):** La fixation biologique de l'azote : l'ORSTOM et les recherches fondamentales. 13p.
31. **Boivin C., Lortet G., Lorquin J., Ba S., Ferro M., de Lajudie P., Promè J.C., Dreyfus B. & Mear N. (1998):** Utilisation des facteurs Nod pour la caractérisation symbiotique des rhizobiums : application aux souches d'Acacia et de Sesbania du Sénégal. *In: L'acacia au Sénégal.* Ed: ORSTOM. pp: 377-386.
32. **Boivin C. & Giraud E. (1999):** Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Toward a polyphasic approach using Nod factors and *nod* genes. *In: Highlights of Nitrogen Fixation Research.* Ed: Martínez-Romero E. et Hernández, New York. pp: 295-299.
33. **Boncompagni E., Ostrerás M., Poggi M. & Le Rudulier D. (1999):** Occurrence of choline and glycine betaine uptake metabolism in rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5): 2072- 2077.
34. **Bordeleau L.M. & Prévost D. (1994):** Nodulation and nitrogen fixation under extreme environments. *Plant and Soil.* 161(1): 115-135.
35. **Boussaid M., Ben Fadhel N., Trifi-Farah N., Abdelkefi A. & Marrakchi M. (1995):** Les espèces méditerranéennes du genre *Hedysarum* L. *In: Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon.* Ed: BRG/INRA, France. pp: 115-130.
36. **Bouzar H. & Jones J.B. (2001):** *Agrobacterium larrymoorei* sp.nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamini*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(3): 1023-1026.
37. **Breedveld M.W., Dijikema C., Zevenhuizen L.P.T.M. & Zehender A.J.B. (1993):** Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *J. Gen. Microbiol.* 139(12): 3157-3163.
38. **Brockwell J. & Phillips L.J. (1965):** Survival at high temperatures of *Rhizobium meliloti* in peat inoculant on lucerne seed. *Aust. J. Sci.* 27:332-333.
39. **Broughton W.J. & Perret X. (1999):** Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2(4):305-311.
40. **Broughton W.J., Jabbouri S. & Perret X. (2000):** Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* 182(20): 5641-5652.
41. **Bullitta P. & Sulas L. (1998):** Le possibilità di utilizzazione della sulla con il pascolamento e il suo inserimento nei sistemi pascolivi sardi. I. Georgofli, Quaderni. 1: 53-71.
42. **Burns R.C. & Hardy R.W.F. (1975):** Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 21: 1-189.
43. **Burton J.C. (1979):** *Rhizobium* species. *In: Microbial Technology.* 2nd ed., vol. I. Ed: Peppler H. J. and Perlman D., Academic Press, New York. pp: 29-58.
44. **Bushby H.V.A. & Marshall K. C. (1977):** Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. *Soil Biol. Biochem.* 9(3):143-147.
45. **Cabrera E. & Ruiz-Argüeso T. (1979):** Diversidad de poblaciones nativas de rizobios de zulla (*Hedysarum coronarium* L.). VIII Congreso Nacional de Microbiología, Madrid, Spain, 28-30 September 1979.
46. **Carlson R.W., Price N. & Stacey G. (1994):** The biosynthesis of Rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Plant-Microbe Interact.* 7(6): 684-695.
47. **Casella S., Gault R.R., Reynolds K.C., Dyson J.R. & Brockwell J. (1984):** Nodulation studies on legumes exotic to Australia: *Hedysarum coronarium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22(1): 37-45.
48. **Chabot R., Antoun H., Kloepper J.W. & Beauchamp C. J. (1996):** Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8): 2767-2772.
49. **Chen W.X., Yan G.H. & Li J.L. (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.* 38(4):392-397.
50. **Chen W.X., Li G.S., Qi Y.L., Wang E.T, Yuan H.L. & Li J.L. (1991):** *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(2): 275-280.
51. **Chen H., Richardson A.E. & Rolfe B.G. (1993a):** Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(6): 1798-1804.
52. **Chen H., Gartner E. & Rolfe B.G. (1993b):** Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(4): 1058-1064.
53. **Chen W.X., Wang E.T., Wang S.Y., Li Y.G., Chen X.Q. & Li Y. (1995):** Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(1): 153-159.
54. **Chen W.X., Tan Z.Y., Gao J.L., Li Y. & Wang E.T. (1997):** *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(3): 870-873.

55. **Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M. & Vandamme P. (2001):** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(5): 1729-1735.
56. **Chen W.M., James E.K., Coenye T., Chou J.H., Barrios E., de Faria S.M., Elliott G.N., Sheu, Shih-Yi, Sprent J.I., Vandamme P. (2006):** *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56(8): 1847-1851.
57. **Chen W.M., de Faria S.M., James E.K., Elliott G.N., Lin K.Y., Chou J.H., Sheu S.Y., Cnockaert M., Janet J.I. & Vandamme P. (2007):** *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(5): 1055-1059.
58. **Chen W.M., de Faria S.M., Chou J.H., James E.K., Elliott G.N., Sprent J.I., Bontemps C., Young J.P. & Vandamme P. (2008):** *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(9): 2174-2179.
59. **Chi F., Schi S.H., Cheng H.P., Jing Y.X., Yanni Y.G. & Dazzo F.B. (2005):** Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11): 7271-7278.
60. **Choi B.H., Ohashi H. (2003):** Generic criteria and infrageneric system for *Hedysarum* and related genera (*Papilionoideae-Leguminosae*). *Taxon.* 52(3): 567-576.
61. **Cooper J.E. (1982):** Acid production, acid tolerance and growth rate of *Lotus* rhizobia in laboratory media. *Soil. Biol. Biochem.* 14(2): 127-131.
62. **Correa O.S & Barneix A.J. (1994):** Acid tolerance of *Lotus tenuis-Rhizobium loti* in laboratory media. *Lotus Newsletter.* 25: 10-11.
63. **Coventry D.R. & Evans J. (1989):** Symbiotic nitrogen fixation and soil activity. In: Soil acidity and plant growth. Ed: Robson A.D., Academic press, Sydney. pp: 103-107.
64. **Dangeard P.A. 1926:** Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses. Le Botaniste. Paris. Série 16. 270 p.
65. **Dart P.J., Day J., Islam R. and Dobereiner J. (1975):** Symbiosis in tropical grain legumes: some effects of temperature and the composition of the rooting medium. *Int. Biol. Programme.* 7:361-384.
66. **Dart P. (1977):** Infection and development of leguminous nodules. In: A treatise on dinitrogen fixation. Section III. Biology. Ed: Hardy R.W.F. and Silver W.S., New York. pp: 367-472.
67. **Davet P. (1996):** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed: INRA, Paris. 383p.
68. **De Bruijn J.F. (1992):** Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7): 2180- 2187.
69. **De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B., Kersters K. & Gillis M. (1994):** Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4):715-733.
70. **De Lajudie P., Boivin C., Dupuy N., Gillis M., Ndiaye A., Dreyfus B. & Neyra M. (1998a):** Acacia: nodulation et rhizobiums associés. In: L'acacia au Sénégal. Ed: ORSTOM. pp: 359-375.
71. **De Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreira A., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M.D., Lindström K., Dreyfus B. & Gillis M. (1998b):** Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48(2): 369-382.
72. **De Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M. D., Kersters K., and Gillis M. (1998c):** *Allorhizobium undicola* gen. Nov. sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48(4): 1277-1290.
73. **De Ley J. & Rassel A. (1965):** DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 41(1): 85-91.
74. **Deaker R., Roughley R.J. & Kennedy I.R. (2004):** Legume seed inoculation technology. *Soil Biology and Biochemistry.* 36(8): 1275-1288.
75. **Delgado M.J., Garrido J.M., Ligerio F. & Lluch C. (1993):** Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiol. Plant.* 89(4): 824-829.
76. **Delgado M.J., Bedmar E.J. & Downie J.A., (1998):** Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv. Microb. Physiol.* 40:191-231.
77. **Dénarie J., Debelle F. & Prome J.C. (1996):** Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Bioch.* 65: 503-535.
78. **Dénarié J. (2000):** Les dialogues moléculaires des symbioses. Les conférences du CNAM.13p.
79. **Drevon J.J. (1992):** Importance et place des différents systèmes fixateurs d'azote atmosphérique. In: [Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse/rhizobium](#). Ed: ONUAA, Rome. pp: 9-13.
80. **Dreyfus B., Garcia J.L. & Gillis M. (1988):** Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38(1): 89-98.

81. **Dua R.P. (1992):** Differential response of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to salinity. *J. Agric. Sci.* 119(3): 367-371.
82. **Duchaufour P.H. (1970):** Précis de pédologie. Ed: Masson & Cie, Paris.481p.
83. **Duchaufour P.H. (1979):** Constituants et propriétés du sol. Ed: Masson. 457p.
84. **Dupuy, N., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Vandenbruaene, L., Maestrojuan, G., qestrojuqn, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, MD., et Gillis, M. (1994):** Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(3): 461-473.
85. **El Sheikh E.A.E. & Wood M. (1989):** Response of chickpea and soybean Rhizobia to salt: osmotic and specific ion effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* 21(7): 889-985.
86. **El Sheikh E. A. E. & Wood M. (1990):** Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean Rhizobia. *Soil. Biol. Biochem.* 22(3): 343- 347.
87. **Elboutahiri N. (2009) :** Etude phénotypique et génotypique d'une collection de *Sinorhizobium meliloti* et de *Rhizobium sulae*. Thèse Doctorat. Résumé. <http://hdl.handle.net/123456789/3635>
88. **Elboutahiri N., Thami-Alami I. and Udupa S.M. (2010):** Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*.10: 1-13.
89. **El-Hilali I., Brhada F., Thami-Alami I. & Filali-Maltouf A. (2002):** Étude de la variabilité moléculaire et phénotypique de rhizobia isolés de la même nodosité de *Lupinus luteus*. Symposium Franco Maghrébin: Applications Biotechnologiques de la Fixation de l'Azote. Hammamet, Tunisie, 15-18 Dec 2002. pp: 59-62.
90. **El-Hilali I. (2006):** La symbiose rhizobium-lupin : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse Doctorat. Univ. Mohammed V, Rabat. 231p.
91. **Elkan G. H. (1992):** Taxonomy of the rhizobia. *Can. J. Microbiol.* 38(6): 446-450.
92. **Escuredo P.R., Minchin F.R., Gogorcena Y., Iturbe-Ormaetxe I., Klucas R.V. & Becana M. (1996):** Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiol.* 110(4): 1187-1195.
93. **Fischer H.M. (1994):** Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58(3): 352-386.
94. **Frank B. 1889:** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 7:332-346.
95. **Franssen H.J., Vun I., Yang W.C. & Bisseling T. (1992):** Developmental aspects to the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 19(1): 89-107.
96. **Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W. J., Rosenthal A. & Perret X. (1997):** Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. *Nature.* 387(6631): 394-401.
97. **Fujihara S. & Yoneyama T (1993):** Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(4): 1104-1109.
98. **Gao J.L., Turner S.L., Kan F.L., Wang E.T., Tan Z.Y., Qiu Y.H., Gu J., Terefework Z., Young J.P.W., Lindström K. & Chen W.X. (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(6):2003-2012.
99. **Garcia-Fraile P., Rivas R., Willems A., Peix A., Martens M., Martínez-Molina E., Mateos P.F., Velázquez E. (2007):** *Rhizobium cellulosityticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(4): 844-848.
100. **Garrett R.H. & Grisham C.M. (2000):** Biochimie. Ed: de Boeck. 1254p
101. **Georgiev G.I. & Atkins C.A. (1993):** Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis.* 15(3): 239-255.
102. **Ghosh W. & Roy P. (2006):** *Mesorhizobium thioangeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56(1): 91-97.
103. **Glatzle A., Schulte-Batenbrock T. & Brockwell J. (1986):** Symbiotic incompatibility between two forage species of *Hedysarum* grown in Morocco, and their homologous rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 37(1):39-43.
104. **Glenn A.R. & Dilworth M.J. (1994):** Periplasmic proteins of *Rhizobium*: variation with growth conditions and the use in strain identification. *FEMS Microbiol. Lett.* 123: 1-10.
105. **Godfroy O. (2008):** Etudes génétique et moléculaire de deux gènes de *Medicago truncatula*, *DMI3* et *RPG*, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires. Thèse Doctorat. Univ. Toulouse. 232p.
106. **Goormachtig S., Capoen W. & Holsters M. (2004):** Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends in Plant Sci.* 9 (11): 518-522.
107. **Gouffi K., Pica N., Pichereau V. & Blanco C. (1999):** Disaccharides as a new class of non accumulating osmoprotectants for *Sinorhisobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4): 1491-1500.
108. **Govers F., Nap J.P., Van Kammen A. & Bisseling T. (1987):** Nodulins in the developing root nodule. *Plant physiol. and biochem.* 25(3):309-322.

109. **Graham P.H. (1964):** The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* 35(3): 511-517.
110. **Graham P.H. (1992):** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38(6): 475-484.
111. **Graham P.H. (1998):** Symbiotic nitrogen fixation. In: Principles and applications of soil microbiology. Ed: Sylvia D., Prentice Hall. pp: 325-347.
112. **Gu C.T., Wang E.T., Tian C.F., Han T.X., Chen W.F., Sui X.H. & Chen W.X. (2008):** *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(6): 1364-1368.
113. **Guan S.H., Chen W.F., Wang E.T., Lu Y.L., Yan X.R., Zhang X.X. & Chen W.X. (2008):** *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(11): 2646-2653.
114. **Haddadj A. (2002):** La symbiose à *Rhizobium* chez la lentille: Evaluation du potentiel des sols d'Algérie. Thèse Magister. INA, Alger. 126p.
115. **Halbleib C.M. & Ludden P.M. (2000):** Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* 130(5):1081-1084.
116. **Han T.X., Han L.L., Wu L.J., Chen W.F., Sui X.H., Gu J.G., Wang E.T. & Chen W.X. (2008a):** *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.
117. **Han T.X., Wang E.T., Wu L.J., Chen W.F., Gu J.G., Gu C.T., Tian C.F. & Chen W.X. (2008b):** *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(7): 1693-1699.
118. **Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Figier J., Marrakchi M., Boussaid M. & Trifi-Farah N. (2002):** Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. *Plant Genetic Resources Newsletter.* 130: 65-72.
119. **Hernandez-Lucas I., Segovia L., Martínez-Romero E. & Pueppke S.G. (1995):** Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(7): 2775-2779.
120. **Hill S. (1992):** Physiology of fixation in free-living heterotrophs. In: Biological Nitrogen Fixation. Ed: Stacy G., Burris R.H. et Evans H.G., New York. pp: 163-257.
121. **Hirsch A.M., Lum M.R. & Downie J.A. (2001):** What makes the Rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127(4):1484-1492.
122. **Hopkins W.G. (2003):** Physiologie végétale. Ed: DeBoek, Paris. 532p.
123. **Hulton C.S.J., Higgins C.F. & Sharp P.M. (1991):** ERIC sequences: a novel family of repetitive elements I the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5(4): 825-834.
124. **Hungria M. & Vargas M.A.T. (2000):** Environmental factors affecting Nitrogen fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research.* 65(2-3): 151-164.
125. **Hunter W.J., Kuykendall L.D. & Manter D.K. (2007):** *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite-reducing α -Proteobacteria isolated from a bioreactor. *Curr. Microbiol.* 55(5): 455-460.
126. **Ibekwe A.M., Angle J.S., Chaney R.L. and van Berkum P. (1997):** Enumeration and nitrogen fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soils with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agric. Ecosyst. Environ.* 61(2-3): 103-111.
127. **Issolah R., Benhizia H. & Khalfallah N. (2006):** Karyotype variation within some natural populations of *sulla* (*Hedysarum coronarium* L., Fabaceae) in Algeria. *Genet. Res. Cro. Evol.* 53(8)1653-1664
128. **Jarvis B.D.W., Pankhurst C.E. & Patel J.J. (1982):** *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32(3): 378-380.
129. **Jordan D.C. (1982):** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32(1): 136-139.
130. **Jordan D.C. (1984):** Family III *Rhizobiaceae*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. 9^{ème} édition. Ed: Krieg N.R. et Holt J.C., Baltimore 1: 234-244.
131. **Kahn M.L., McDermott T.R. & Udvardi M.K. (1998):** Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. In: *Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Ed: Spaink H.P., Hooykaas P.J. et Kondorosi A., London. pp: 641-685.
132. **Kamal G., Benata H., Ourarhi M., Abdelmoumen H., Paul R. & El-Idrissi M.M. (2009):** Diversité des rhizobia qui nodulent quelques légumineuses de la région orientale du Maroc. Symposium international "Agriculture durable en région Méditerranéenne (AGDUMED)", 14-16 Mai 2009, Rabat, Maroc. pp: 376-377.

133. **Karanja, N. K. & Wood M. (1988):** Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high temperature and antibiotic resistance. *Plant Soil*. 112(1): 15-22.
134. **Kassem M., Capellano A., and A. M. Gounot. (1985):** Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEN J.* 1: 63-65.
135. **Kheffache R. (1988):** Etude de la variabilité morphologique et enzymatique de *Hedysarum aculeatum* Munby en relation avec le milieu écologique en Algérie. Thèse Magister. Univ. Sci. Technol. Houari Boumédiène, Alger. 143p.
136. **Kheffache R. & Combes D. (1992):** Variabilité morphologique d'*Hedysarum aculeolatum* Munby en relation avec le sol. *In* : Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes. Coll. Int. En hommage à J. Pernès, 8-10 janvier 1992, Paris, France.
137. **Kijne J.W. (1975):** The fine structure of pea root nodules. 2. Senescence and disintegration of the bacteroid tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 7(1):17-21.
138. **Kishinevsky B.D., Nandasena K.G., Yates R.J., Nemas C. & Howieson J.G. (2003):** Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarum* species: *H. spinosissimum*, *H. coronarium* and *H. flexuosum*. *Plant and Soil*. 251(1): 143-153.
139. **Konate I. (2007):** Diversité phénotypique et moléculaire du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des bactéries endophytes qui lui sont associées. Thèse Doctorat. Univ. Mohammed V, Rabat. 196p.
140. **Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E. & Udell S.E. (1992):** Genetic diversity in *bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *bradyrhizobium elkanii* sp nov. *Can. J. Microbiol.* 38(6): 501-505.
141. **Laguerre G., van Berkum P., Amarger N. & Prévost D. (1997):** Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12): 4748-4758.
142. **Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P. & Amarger N. (2001):** Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*. 147(4):981-993
143. **Lapeyronie A. (1982):** Les productions fourragères méditerranéennes. Ed: Maisonneuve et Larousse, Paris. Tome 1. 425p.
144. **Legocki R.P. & Verma D.P.S. (1980):** Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Cell*. 20(1): 153-163.
145. **Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.C. & Denarié J. (1990):** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 344 (6268): 781-784.
146. **Lin D.X., Wang E.T, Tang H., Han T.X., He Y.R., Guan S.H & Chen W.X. (2008):** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(6):1409-1413.
147. **Lin D.X., Chen W.F., Wang F.Q., Hu D., Wang E.T., Sui X.H. & Chen W.X. (2009):** *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(8): 1919-1923.
148. **Lindström K. (1989):** *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39(3): 365-367.
149. **Lindström K., Terefework Z., Suominen L. & Lortet G. (2002):** Signalling and development of *Rhizobium*-legume symbioses. *Biology and environment*. 102B (1): 61-64.
150. **Lloret L., Ormeño-Orrillo E., Rincón R., Martínez-Romero J., Rogel-Hernández M.A. & Martínez-Romero E. (2007):** *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in *Mexico*. *Syst. Appl. Microbiol.* 30 (4): 280-290.
151. **Lodwig E.M., Hosie A.H., Bourdes A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J.A. & Poole P.S. (2003):** Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature*. 17(6933):722-726.
152. **Lortet G., Mear N., Lorquin J., Dreyfus B., de Lajudie P., Rosenberg C., Boivin C. (1996):** Nod factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga* and *Rhizobium* sp. strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9(8):736-747.
153. **Louati-Namouchi I., Louati M., Chriki A. (2000):** Mating system and multiple paternity in *Hedysarum coronarium* L. (Fabaceae). *Agronomie*. 20(6): 655-663.
154. **Lowendorf H.S., Baya A.M. and Alexander M. (1981):** Survival of *Rhizobium meliloti* for inoculation of alfalfa acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47(5): 935-938.
155. **Lupski J.R. & Weinstock K.H. (1992):** Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174(4): 4525-4529.
156. **Lynch D.H. & Smith D.L. (1993):** Soybean (*Glycine max*) nodulation and N₂-fixation as affected by exposure to low root-zone temperature. *Plant Physiol.* 88(2): 212-220.

157. **Mantelin S., Fischer-Le S.M., Zakhia F., Bena G., Bonneau S., Jeder H., de Lajudie P & Cleyet-Marel J.C. (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 (4): 827-839.
158. **Martínez-Romero E., Segovia L., Martins Mercante F., Franco A.A., Graham P. & Pardo M.A. (1991):** *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(3): 417-426.
159. **Matiru V.N. & Dakora F.D. (2004):** Potential use of rhizobial bacteria as promoter of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotech.* 3(1): 1-7.
160. **McDermott T.R. & Graham P.H. (1989):** *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(10): 2493-2498.
161. **Meghvansi M.K. (2006):** Isolation, Identification and Effectiveness of Rhizobial strains and Arbuscular Mycorrhizal (AM) fungi of soybean cultivars grown in Bundi and Udaipur, Rajasthan. Ph. D. Thesis. Maharshi Dayanand Saraswati University, Ajmer, India.
162. **Mellor R.B. & Wiemken A. (1988):** Peribacteroid organelles as organ-specific forms of lysosomes. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Ed: Bothe H., de Bruijn F.J. et Newton W.E. New York. p 528.
163. **Mengel K. & Kirkeby E.A. (1982):** Principals of plant nutrition. IPI. Worlban-Berne Switzerland. 655p
164. **Mensah J.K., Esumeh F., Iyamu M. and Omoifo C. (2006):** Effects of different salt concentrations and pH on growth of *Rhizobium* sp. and a *Cowpea-Rhizobium* association. *American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci.* 1(3): 198-202.
165. **Mercado-Blanco J. & Toro N. (1996):** Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *MPMI.* 9(7): 535-545.
166. **Michiels J., Verreth C. & Vanderleyden (1994):** Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(4): 1206-1212.
167. **Mittal S. (2004):** Diversity and taxonomy of speudomonads from wheat rhizosphere. Ph. D. Thesis, G. B. Plant Univ. of Agriculture and technol., Pantnagar.
168. **Mohamed S.H., Smouni A., Neyra M., Kharchaf D. & Filali-Matouf A. (2000):** Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant and Soil.* 224(2): 171-183.
169. **Moreira F.M.S., Cruz L., de Faria S.M., Marsh T., Martínez-Romero E., de Oliveira P.F., Pitard M.R., Peter J. & Young W. (2006):** *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) *Pers. Syst. Appl. Microbiol.* 29(3): 197-206.
170. **Moschetti G., Peluso A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O. & Defez R. (2005):** Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 28(7): 619-631
171. **Moulin L., Munive A., Dreyfus B. & Boivin-Masson C. (2001):** Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. *Nature.* 411(6840): 948-950.
172. **Mozo T., Cabrera E. & Ruiz-Argueso T. (1988):** Diversity of plasmid profiles and conservation of symbiotic nitrogen fixation genes in newly isolated rhizobium strains nodulating Sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 54(5): 1262-1267.
173. **Mpeperekí S., Makonese F. & Wollum A.G. (1997):** Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulation *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis.* 22(3): 275-292.
174. **Mutch L.A., Tamimi S.M. & Young J.P.W. (2003):** Genotypic characterisation of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: a comparison with UK isolates. *Soil Biology and Biochemistry.* 35(5): 709-714.
175. **Myлона P., Pawlowski K. & Bisseling T. (1995):** Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell.* 7(7): 869-885.
176. **Nick G. (1998):** Polyphasic taxonomy of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Ph. D. Thesis. University of Helsinki, Finland.
177. **Nick G., de Lajudie P., Eardly B.D., Suomalainen S., Paulin L., Zhang X., Gillis M. & Lindström K. (1999):** *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49(4): 1359-1368.
178. **Norris D. P. (1965):** *Rhizobium* relationships in legumes. Proc. 9th Int. Grassl. Congr. Sao Paulo. 2: 1087-1092.
179. **Nour S M, Fernandez M P, Normand P and Cleyet-Marel J-C (1994):** *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(3): 511-522.
180. **Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Normand P. & Fernandez M.P. (1995):** Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(4): 640-648.
181. **Nutman P.S. (1975):** Rhizobium in the soil. In: Soil microbiology. Ed: Walker N., New York. pp: 111-131.
182. **O'Hara G.W. & Glenn A.R. (1994):** The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 161(4): 286-292.

183. **Ogasawara M., Suzuki T., Mutoh I., Annapurna K., Arora N.K., Nishimura Y. & Maheshwari D.K. (2003):** *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. isolated from tropical legumes, *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. *Symbiosis*. 34(1):53-68.
184. **Olsen G., Woese J.C. & Overbeek R. (1994):** The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176(1): 1-6.
185. **Pankhurst C.E., Scott D.B. and Ronson C.W. (1982):** Correlation between rifampicin-resistance of slow-growing *Rhizobium* strains and their ability to express nitrogenase activity in culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 15(2): 137-139.
186. **Parker C.A., Trinick M.J. and Chatel D.L. (1977):** Rhizobia as soil and rhizosphere inhabitants. In: A treatise on dinitrogen fixation, Section IV: Agronomy and ecology. Ed: Hardy R.W.F. and Gibson A.H., New York. pp: 311- 352.
187. **Parker M. A. (2002):** *Bradyrhizobia* from wild *Phaseolus*, *Desmodium* and *Macroptilium* species in northern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4): 2044-2048.
188. **Paul E.A. & Clark F.E. (1989):** Soil microbiology and biochemistry. Academic press, San Diego. 275p.
189. **Pelmont J. (2005):** Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. Ed: EDP Sciences. 798 p.
190. **Pena-Cabriaes J.J. & Castellanos J.Z. (1993):** Effects of water stress on nitrogen fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil.* 152(1): 151-155.
191. **Peng G., Yuan Q., Li H., Zhang W., Tan, Z. (2008):** *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(9): 2158-2163.
192. **Perret X., Staehelin C. & Broughton W.J. (2000):** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(1): 180-201.
193. **Perry J.J., Staley J.T. & Lory S. (2004):** Microbiologie. Cours et question de révision. Ed: Dunod, Paris. 891p.
194. **Piha M.I. & Munnus D.N. (1987):** Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant Soil.* 98(2): 183-194.
195. **Prescott L.M., Harley J.P. & Klein D.A. (2003):** Microbiologie. Ed : DeBoek et Larcier, Paris. 1137p.
196. **Prin Y., Galiana A., Ducouso M., Dupuy N., de Lajudie P. & Neyra M. (1993):** Les rhizobiums d'Acacia : Biodiversité et taxonomie. *Bois et Forêts des Tropiques.* 238(4): 5-20.
197. **Pueppke S. G. & Broughton W.J. (1999):** *Rhizobium* sp. NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host-ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12(4): 293-318
198. **Quan Z.X., Bae H.S., Baek J.H., Chen W.F., Im W.T. & Lee S.T. (2005):** *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(6): 2543-2549.
199. **Qubit (1999):** General introduction. In: Nitrogen fixation package, Instructions manual. Qubit systems inc. Palo Alto, USA. pp: 1-7.
200. **Quezel P. & Santa S. (1962):** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed: CNRS, Paris. 565p.
201. **Rai R. (1983):** The salt tolerance of *Rhizobium* strains and lentil genotypes and the effect of salinity on the aspects of symbiotic N-fixation. *J. Agric. Sci.* 100(1): 81-86.
202. **Ramirez-Bahena M.H., Garcia-Fraile P., Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J.M., Mateos P.F., Martínez-Molina E. & Velázquez E. (2008):** Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(11): 2484-2490.
203. **Raven P.H., Evert R.F. & Eichhorn S.E. (2003):** Biologie végétale. Ed: DeBoeck. 968p.
204. **Raza S., Jornsgard B., Abou-Taleb H. and Christiansen J.L. (2001):** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 32(6): 379-383.
205. **Reddy P.M. & Ladha J.K. (1995):** In nitrogen fixation: Fundamentals and applications. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. pp: 629- 633.
206. **Renier A. (2008):** Approche pluridisciplinaire de la symbiose *Methylobacterium nodulans*/*Crotalaria podocarpa*. Thèse Doctorat. Univ. Montpellier II. 202p.
207. **Restuccia G. (1976):** I contributi della ricerca al miglioramento della tecnica colturale della sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in Italia. *Tecnica Agricola.* 28:1-15.
208. **Reva O.N., Smirnov V.V., Petterson B. & Priest F.G. (2002):** *Bacillus endophyticus* sp. nov. Isolated from the inter tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(1): 101- 107.
209. **Richardson A.E., Simpson R.J., Djordjevic M.A. & Rolfe B.C. (1988):** Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* is affected by low pH and by Ca and Al ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(10): 2541- 2548.

210. **Rinaudo G., Orenga S., Fernandez M.P., Meugnier H. & Bardin R. (1991):** DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem- and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(1): 114-120.
211. **Rivas R., Willems A., Subba-Rao N., Mateos P.F., Dazzo F.B., Martínez-Molina E., Gillis M. & Velázquez E. (2003):** Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.* 26(1): 47-53.
212. **Rivas R., Willems A., Palomo J.L., Garcia-Benavides P., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Gillis M. & Velázquez E. (2004):** *Bradyrhizobium betae* sp. nov. isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(1): 1271-1275.
213. **Robert F.M., Molina J.A.E. & Schmidt E.L. (1982):** Properties of *Rhizobium leguminosarum* isolated from various regions of Morocco. *Ann. Microbiol.* 133(3): 461-470.
214. **Rolfe B.G. & Gresshoff P.M. (1988):** Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 39: 297-319.
215. **Rome S., Fernandez M.P., Brunel B., Normand P. & Cleyet-Marel J.C. (1996):** *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual Medicago spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(4): 972-980.
216. **Roy R.N., Finck A., Blair G.J. & Tandon H.L.S. (2006):** Plant nutrition for food security. A guide for integrated nutrient management. Ed: FAO, Rome. 368p.
217. **Saadallah K., Drevon J.J. & Abdely C. (2001):** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie.* 21(6-7): 627-634.
218. **Sabry S.R.S., Saleh A.S., Batchelor C.A., Jone J., Jotham J., Webster G., Kothari S.L., Davey M.R. & Cocking E.C. (1997):** Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 264(1380): 341- 346.
219. **Sadowsky M.J. (2005):** Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. *In: Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment.* Eds: Werner D., Newton W.E., Springer, the Netherlands. pp: 89-112.
220. **Santos M.A., Vargas A.T. & Hungria M. (1999):** Characterization of soybean *Bradyrhizobium* strains adapted to the Brazilian savannas. *FEMS Microbiol.* 30(3): 261-272.
221. **Schauser L., Roussis A., Stiler J. & Stougaard J. (1999):** A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature.* 402(6758):191-195
222. **Scheres B., Van De Wiel C., Zalensky A., Horvath B., Spaink H., Van Eck H., Zwartkruls F., Wolters A.M., Gloudemans T., Van Kammen A. & Bisseling T. (1990):** The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the Pea-Rhizobium interaction. *Cell.* 60(2): 281-294.
223. **Scholla M.H. & Elkan G.H. (1984):** *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34(4):484-486.
224. **Schroeter J. (1886):** Schizomycetes. In *Kryptogamenflora von Sclesien, Bd. 3, Heft 3, Pilze.* Ed: Cohn. pp: 1-814.
225. **Schubert K.R. & Bolland M.J. (1984):** The cellular and intracellular organization of the reaction of ureïde biogenesis in nodules of tropical legumes. *In: Advances in nitrogen fixation research.* Ed: Veeger C. et Newton W.E., Martinus Nijhoff Publisher, the Netherlands. pp: 445-451.
226. **Schubert K.R & Bolland M.J. (1990):** The ureides. *In: The Biochemistry of plants, a comprehensive treatise.* 16: 197-282.
227. **Schultze M. & Kondorosi A. (1998):** Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32: 33-57.
228. **Segovia L., Young J.P.W. & Martínez-Romero E. (1993):** Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (2): 374-377
229. **Serraj R., Sinclair T.R. & Purcell L.C. (1999):** Symbiotic nitrogen fixation response to drought. *J. Exper. Bot.* 50(331): 143-155.
230. **Sharples G.J. & Lloyd R.G. (1990):** A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucl. Acid Research.* 18(22): 6503-6508.
231. **Skerman V.B.D., Mc Gowan V. & Sneath P.H.A. (1980):** Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-240.
232. **Smith R. J. & Gallon J.R. (1993):** Nitrogen fixation. *Plant Biochemistry and Molecular Biology.* pp: 129-153.
233. **Spaink H.P. (1995):** The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the Ins and Outs of sympathogenesis. *Annu. Rev. Phytopatho.* 33: 345-368.
234. **Spaink H.P. (2000):** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 257-288.
235. **Sprent J.I. (1971):** Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. *Plant and Soil.* 169(1): 225-228.
236. **Sprent J.I. & Zahran H.H. (1988):** Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. *In: Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture.* Ed: Beck D.P. et Materon L.A., the Netherland. pp: 145-151.

237. **Sprent J. (1993):** Evolution since Knoxville: were nitrogen-fixing organisms wise to inhabit land plants? In: New Horizons in Nitrogen Fixation. Ed: Palacios R., Mora J., and Newyon W.E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p 594.
238. **Sprent J.I. (1995):** Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem.* 27(4-5): 401-407.
239. **Squartini A., Struffi P., Döring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velázquez E., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Dazzo F.B., Casella S. & Nuti M.P. (2002):** *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(4): 1267-1276.
240. **Streeter J. (1993):** Translocation - a key factor limiting the efficiency of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Plantarum.* 87(4): 616-623.
241. **Sulas L., Re G.A., Ledda L. & Caredda S. (1997):** The effect of utilization frequency on the forage production of sulla (*Hedysarum coronarium* L. *Italian Journal of Agronomy.* 2: 89-94.
242. **Sunuta S., Seema D. & Kumari S. (1995):** Studies on nodule functioning and hydrogen peroxide scavenging enzymes under salt stress in chickpea nodules. *Plant Physiol. Biochem.* 33(5): 561-566.
243. **Svistonoff S. (2003):** Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse Doctorat. Univ. Montpellier II. 67p.
244. **Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C. & Dreyfus B. (2001):** Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183(1): 214-220.
245. **Tan Z.Y., Kan F.L., Peng G.X., Wang E.T., Reinholdt-Hurek B. & Chen W.X. (2001):** *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(3): 909-914.
246. **Tate R.L. (1995):** Soil microbiology (Symbiotic nitrogen fixation). John Wiley and Sons, New York. pp: 307-333.
247. **Tian C.F., Wang E.T., Wu L.J., Han T.X., Chen W.F., Gu C.T., Gu J.G. & Chen W.X. (2008):** *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(12): 2871-2875.
248. **Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., de R., Saxena A.K., Nautiyal C.S., Mittal S., Tripathi A.K. & Johri B.N. (2005):** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89(1): 136-150.
249. **Toledo I, Lloret L and Martínez-Romero E (2003):** *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 26(1): 54-64.
250. **Trifi-Farah N., Chatti W.S., Marrakchi M. & Pernes J. (1989):** Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium* L. en Tunisie. *Agronomie.* 9(6): 591-598.
251. **Trifi-Farah N. & Marrakchi M. (2000):** Genetic variability of *Hedysarum coronarium* L. using molecular markers. *Cah. Opti. Médit.* 45: 85-89
252. **Trifi-Farah N., Marghali S., Ghariani S. & Marrakchi M. (2004):** *Hedysarum coronarium* : Caractérisation moléculaire, distribution et conservation en milieux méditerranéens. *Cah. Opt. Médit.* 62: 141-144.
253. **Trinchant J.C., Drevon J.J., Rigaud J. (1997):** Fixation symbiotique de l'azote. In: Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Ed: INRA, Paris. pp: 133- 147.
254. **Triplett E.W. & Sadowsky M.J. (1992):** Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 399-428.
255. **Trujillo M.E., Willems A., Abril A., Planchuelo A.M., Rivas R., Ludenā D., Mateos P.F., Martínez-Molina E. & Velázquez E. (2005):** Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3): 1318-1327.
256. **Van Berkum P., Beyene D., Bao G., Campbell T.A. & Eardly B.D. (1998):** *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48(1): 13-22.
257. **Van Berkum P. & Eardly B.D. (2002):** The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3): 1132-1136.
258. **Valverde A., Velázquez E., Fernández-Santos F., Vizcaíno N., Rivas R., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Igual J.M. & Willems A. (2005):** *Phyllobacterium trifolii* sp nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(5): 1985-1989
259. **Valverde A., Igual J.M., Peix A., Cervantes E. & Velázquez E. (2006):** *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56(11): 2631-2637.
260. **Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. & Swings J. (1996):** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60(2): 407-438.
261. **Vance C.P., Johnson L.E.B., Stade S. & Groat R.G. (1982):** Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) root nodules: morphogenesis and the effect of forage harvest on structure and function. *Can. J. Bot.* 60(4): 505-518.

262. **Vance C.P. (1996):** Enhanced agricultural sustainability through biological nitrogen fixation. *In: Biological nitrogen fixation for ecology and sustainable agriculture. Proceedings of the NATO advanced research Workshop held in Poznan, Poland, September 10-14, 1996.* pp. 179-186.
263. **Vance C.P. (2005):** Root-Bacteria Interactions: Symbiotic N₂ Fixation. *In: Plant roots the hidden half.* Ed: Gnanamanickam S.S., Springer, The Netherlands. pp: 839-868.
264. **Vargas C., Wu G., Delgado M.J, Poole R.K. & Downie J.A. (1996):** Identification of symbiosis-specific c-type cytochromes and a putative oxidase in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Microbiol.* 142(1): 41-46.
265. **Velázquez E., Igual J.M., Willems A., Fernández M.P., Muñoz E., Mateos P.F., Abril A., Toro N., Normand P., Cervantes E., Gillis M. & Martínez-Molina E. (2001):** Description of *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (3): 1011-1021.
266. **Vermis K., Coenye T., Li Puma J.J., Mahenthiralingam E., Nelis H.J. & Vandamme P. (2004):** Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(3): 689-691.
267. **Versalovic J., Koeuth T. & Lupski J.R. (1991):** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Ac. Res.* 19(24): 6823- 6831.
268. **Verslovic J., Schneider M., de Bruijn F.J. & Lupski J.R. (1994):** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5(1): 25-40.
269. **Versalovic J. & Lupski J.R. (1998):** Interspersed repetitive sequence in bacterial genomes. *In: Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis.* Ed: de Bruijn F.J., Lupski J.R. and Weinstock G.M., Chapman & Hall, New York. pp: 437-454.
270. **Vidal C., Chantreuil C., Berge O., Mauré L., Escarré J., Béna G., Brunel B & Cleyet-Marel J.D., (2009) :** *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalcolous soil in Languedoc, France. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(4): 850-855.
271. **Villax J. (1963) :** La culture des plantes fourragères dans les régions méditerranéennes occidentales. INRA, Rabat. 358p.
272. **Vincent J.M. & Humphrey B.A. (1970):** Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 63(3): 379-382.
273. **Vincent J.M. (1981):** Genus *Rhizobium*. *In: The prokaryotes.* Ed: Starr M.P., Stolp H., Balows A. et Schlege H.G., SpringerVerlag, New York. pp: 97-128.
274. **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: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(2): 569-575.
275. **Wani S.P., Rupela O.P. & Lec K.K. (1995):** Sustainable agriculture in the semi-arid tropic through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil.* 174(1-2): 29-49.
276. **Wang E.T., Van Berkum P., Beyene D., Sui X.H., Dorado O., Chen W.X & Martínez-Romero E. (1998):** *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationships with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48(3): 687-699.
277. **Wang L.X., Antonio R.M., los Santos A.G., Martínez-Romero J., Cevallos M.A. & Martínez-Romero E. (1999a):** *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49(4): 1479-1491.
278. **Wang E.T, van Berkum P., Sui X.H., Beyene D., Chen W.X. & Martínez-Romero E. (1999b):** Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49(1): 51-65.
279. **Wang E., Tan Z.Y., Willems A., Fernández-Lopez M., Reinhold-Hurek B. & Martínez-Romero E. (2002):** *Sinorhizobium morelense*, sp. nov. a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(5): 1687-1693.
280. **Wang F.Q., Wang E.T., Liu J., Chen Q., Sui X.H., Chen W.F. & Chen W.X. (2007):** *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(6): 1192-1199.
281. **Waughman G.J. (1977):** The effect of temperature on nitrogenase activity. *J. Exper. Bot.* 28(4): 949-960.
282. **Wei G.H., Wang E.T., Tan Z.Y., Zhu M.E. & Chen W.X. (2002):** *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(6): 2231-2239.
283. **Wei G.H., Tan Z.Y., Zhu M.E., Wang E.T., Han S.Z. & Chen W.X. (2003):** Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(5): 1575-1583.
284. **Weiwei W., Zhenghai H., Guilan G. & Yang Yusuo Y. (2002):** Studies on the characteristics related to symbiotic nitrogen fixation of legumes in Xinjiang region. 12th ISCO Conference, Beijing. pp: 428-434.

285. **Wilkins J. (1967)**: The effects of high temperatures on certain root-nodule bacteria. *Aust. J. Agric. Res.* 18(2): 299-304.
286. **Willems A., M. Fernández-Lopez, E. Minos-Adelantado, P. De Vos, E. Martínez-Romero, N. Y. Toro, and M. Gillis. (2003)**: Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *adhaerens* Cassida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* com.nov. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(4): 1207-1217.
287. **Willems A. (2006)**: The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and soil.* 287(1-2):3-14.
288. **Woese C. R. (1987)**: Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51(2): 221- 271.
289. **Xu L.M., Ge C., Cui Z., Li J. & Fan H. (1995)**: *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(4): 706-711.
290. **Yagoubi N. & Chriki A. (2004)**: Mating system of *Hedysarum spinosissimum* L., ssp. *capitatum* Desf, Asch et Gr. (Leguminosae, Fabaceae). *Cah. Opt. Médi.* 62: 61-63.
291. **Yang J., Kloepper J.W. and Ryu C.M. (2008)**: Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Sci.* 14(1): 1-4.
292. **Yao Z.Y., Kan F.L., Wang E.T., Wei G.H. & Chen W.X.. (2002)**: Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 52(6): 2219-2230.
293. **Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A. & Sawada H. (2001)**: *A revision of Rhizobium Frank (1889): with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of Agrobacterium Conn. 1942 and Allorhizobium undicola De Lajudie et al. 1998 as new combinations: Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. vitis.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(1):89-103.
294. **Zahran H.H., Räsänen L.A., Karsisto K. and Lindström K. (1994)**: Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World. J. Microbiol. Biotech.* 10(1): 100-105.
295. **Zahran H.H. (1999)**: Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(4): 968-989.
296. **Zahran H.H. (2001)**: Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology.* 91(2-3): 143-153.
297. **Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J-C., Gillis M., Dreyfus B. & de Lajudie P. (2004)**: Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(3): 380-395.
298. **Zakhia F. & de Lajudie P. (2006)**: La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques- application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol.* 52(3): 169-181.
299. **Zerhari K., Aurag J., Khbaya B., Kharchaf D. & Filali-Maltouf A. (2000)**: Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* 30(5): 351-357.
300. **Zhang F., Charles T.C., Pan B. & Smith D.L. (1996)**: Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum nod* genes at low temperatures. *Soil Biol. Biochem.* 28(12): 1579-1583.
301. **Zhu Z.L., Liu C.Q. & Jiang B.F. (1984)**: Mineralization of organic nitrogen, phosphorus, and sulfur in some paddy soils of China in organic matter and rice. IRRI, Philippines. pp: 259-272.
302. **Zurdo-Piñero J.L., Rivas R., Trujillo M.E., Vizcaino N., Carrasco J.A., Chamber M., Palomares A., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Velazquez E. (2007)**: *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(4): 784-788.

ANNEXES

Annexe 1: Milieux de culture

➤ Le milieu Yeast Extract Mannitol Agar (YEM)

Ingrédient	Quantité pour 1L
Mannitol	10 g
Glutamate	0,5 g
Extrait de levure	3 g
Agar	15 g
NaCl	0,05 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,1 g
Rouge Congo	5 ml
FeCl ₃	3 ml
CaCl ₂	1 ml

Le pH est ajusté à 7 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20mn.

➤ Le milieu YMB (liquide)

Ingrédient	Quantité pour 1L
Mannitol	10 g
Glutamate	0,5 g
Extrait de levure	3 g
NaCl	0,05 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,1 g
Rouge Congo	5 ml
FeCl ₃	3 ml
CaCl ₂	1 ml

Le pH est ajusté à 7 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20mn.

➤ Le milieu Tryptone Yeast Extract (TY)

Ingrédient	Quantité pour 1L
Tryptone	5g
Extrait de levure	3g
Agar	15g
Solution CaCl ₂	6 ml

Le pH est ajusté à 7,2 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20mn.
La solution de CaCl₂ (6 mM) est ajoutée après l'autoclavage du milieu.

➤ **Le milieu TY à 80%**

Ingrédient	Quantité pour 1L
Tryptone	5g
Extrait de levure	3g
Agar	12g
Solution CaCl ₂	6 ml

Le pH est ajusté à 7,2 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20mn.
La solution de CaCl₂ (0.6mM) est ajoutée après l'autoclavage du milieu.

➤ **Le milieu TY liquide**

Ingrédient	Quantité pour 1L
Tryptone	5g
Extrait de levure	3g
Solution CaCl ₂	6 ml

Le pH est ajusté à 7,28 et la stérilisation est réalisée à 120°C pendant 20mn.
La solution de CaCl₂ (0.6mM) est ajoutée après l'autoclavage du milieu.

Annexe 2 : Préparation du bleu de bromothymol [0,0025% (w/v)]

La solution : dissoudre 0,5g de BTB dans 100ml d'éthanol.

Ajoutez 5ml de la solution dans 1 litre de YEM préalablement stérilisé, la concentration finale du BTB dans le milieu sera de 25ppm.

Annexe 3 : Composition d'un gel d'agarose horizontal 1.5%

- 3,8g d'agarose
- 250ml TBE 0,5x concentré
- 10µl BET

Annexe 4: Résultats de caractérisation physiologique des souches.

+++ : croissance optimum (identique au témoin) ; ++ : croissance moyenne; + : faible croissance ; 0 : pas de croissance.

Espèce	Souche	NaCl (mM)										Pression osmotique (MPa)		Température (°c)				p	
		200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000	00,5	01,5	24	32	36	40		6
<i>H. coronarium</i>	DZ.19.1.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	0	++ +	
	DZ.19.1.3.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	+++	+++	+++	+	++ +
	DZ.19.1.3.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++	++ +
	DZ.19.2.1.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+	+++	+++	+++	++	++ +
	DZ.19.2.1.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	0	++ +
	DZ.19.2.1.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+	++ +
	DZ.19.2.1.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+	+++	+++	+++	+	++ +
	DZ.19.3.3.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	++	+	+++	+++	+++	+	++ +
	DZ.19.4.1.1'	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	++	+	+++	+++	+++	0	++ +
	DZ.19.4.1.1''	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++	+	+++	+++	+++	0	++ +
	DZ.20.1.3.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	++	+	+++	+++	+++	0	++ +
	DZ.20.1.3.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+	++ +
	DZ.20.1.3.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	0	++	+	+++	+++	+++	0	++ +
	DZ.20.1.3.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	0	++ +
	DZ.20.2.2.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	0	++	+	+++	+++	+++	+	++ +
	DZ.20.2.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	+++	+++	0	++ +
	DZ.20.2.3.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+++	+++	+++	+	++ +
	DZ.21.1.1 2T	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	0	0	++	+	+++	+++	+++	++	++ +
	DZ.21.2.2.1'	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+	++ +
	DZ.21.2.2.1''	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	0	++ +
DZ.21.2.2.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++ +	
DZ.21.2.2.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+++	+++	+++	+	++ +	
DZ.21.2.2.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	0	++ +	
DZ.21.2.2.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++	++	+++	+++	+++	+	++ +	

DZ.22.1.3.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	0	++ +
DZ.22.1.3.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	++ +
DZ.22.2.1.2T	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++	++ +
DZ.22.3.2.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	++	+	++	+++	+++	+++	0	++ +
DZ.22.3.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	+	++	+++	+++	+++	0	++
DZ.22.3.2.3	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++ +
DZ.22.3.2.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	++ +
DZ.23.1.2.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++ +
DZ.23.1.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	++	+	++	+++	+++	+++	0	++ +
DZ.23.1.3.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	0	++	++	++	+++	+++	+++	+	++ +
DZ.23.2.1.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++ +
DZ.23.2.1.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+	++	+++	+++	+++	+	++
DZ.24.2.1.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	++	+	++	+++	+++	+++	+	++ +
DZ.36.3.2.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	++ +
DZ.36.3.2.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	0	++	++	++	+++	+++	+++	++	++ +
DZ.C.3.3.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+	++
DZ.C.3.3.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	0	++ +
DZ.C.3.3.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	0	++ +
DZ.C.3.3.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	0	++ +

H. flexuo sum	DZ.41.2.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.41.2.2.3	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	0	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.41.2.2.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.41.2.3.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++

<i>H. aculeolatum</i>	DZ.41.2.3.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++
	DZ.41.2.3.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.42.2.1.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.42.2.1.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	0	0	++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++
	DZ.45.1.2.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	0	++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++
	DZ.45.1.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	0	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++
	DZ.45.1.2.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++
	DZ.45.2.2.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	0	0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.45.2.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.45.2.2.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.45.2.2.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.46.2.1.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	0	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++
	DZ.46.2.1.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	0	0	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++
	DZ.46.2.1.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	0	+	+	++	+++	+++	0	+++	+++
	DZ.46.2.1.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	0	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++
	DZ.46.2.1.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	DZ.46.2.1.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	DZ.47.1.1.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.47.1.1.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.47.1.1.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	0	0	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	++
	DZ.47.1.1.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	DZ.47.1.1.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.47.1.1.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.47.3.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.47.3.2.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	0	+++	+++
	DZ.48.2.1.2	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	0	++	++	+++	+++	+++	0	+++	+++
	DZ.48.2.1.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++

	DZ.48.2.1.4	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	++	++	+	+++	+++	0	+++	0
	DZ.48.2.1.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	0	0	++	++	+++	+++	+++	+	++	+++
	DZ.48.3.1.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
	DZ.48.3.1.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	0	++	+	+++	+++	+++	0	+++	+++
	DZ.48.3.1.3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	0	+	+	+++	+++	+++	+	+++	+++
	DZ.48.3.3.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.48.3.3.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	0	0	0	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.48.3.3.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.48.3.3.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	+	+	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>H. capitatum</i>	DZ.19.1.2.3 Ca	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	0	+++	+++
	DZ.A ₂ -1.1.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+++	+++	0	+++	+++
	DZ.A ₂ -2.2.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+++	+++	0	+++	+++
	DZ.A ₂ -2.2.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.A ₂ -2.2.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++
	DZ.A ₂ -2.2.4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	+++	+	+++

Hedysarum L.,

(*H. capitatum* *H. flexuosum* *H. aculeolatum* *H. coronarium*) *Hedysarum* L.,

431

89

(YEM)

°28

3 1

89

Rhizobium

1,5- 0,5)

(°40 24)

:

(NaCl ملي مولار 2000

200)

(

(8 6)

Box

rep-PCR

UPGMA

89

.%10

Hedysarum L.,

: _____

Caractérisation physiologique et moléculaire d'une collection de rhizobiums nodulant quatre espèces du genre *Hedysarum* L., en Algérie.

RESUME

Ce travail a été réalisé afin de créer une collection algérienne de souches de rhizobiums isolées des nodosités de quatre espèces du genre *Hedysarum* (*H. coronarium*, *H. aculeolatum*, *H. flexuosum* et *H. capitatum*) issues de différentes régions du pays. Parmi les 431 souches constituant la collection créée, 89 souches ont été choisies pour subir une étude de diversité physiologique et génétique. La culture sur milieu YEM des souches a abouti à l'apparition de colonies circulaires de 1 à 3 mm de diamètre d'un aspect gommeux translucide ou crémeux qui ont pu être visibles en 1 à 2 jours d'incubation à 28°C. Ainsi, le test d'authentification, effectué en pots contenant un sol stérile, a induit la formation de nodosités hétérogènes dans leur forme et leur nombre chez les 89 souches étudiées. Ceci confirme que nous sommes en présence de rhizobiums à croissance rapide. La caractérisation physiologique des souches via quatre tests physiologiques qui sont : la tolérance aux stress hydriques (-0,5 à -1,5 MPa) et salin (200 à 2000mM NaCl), aux températures (24 à 40°C) et aux pH (6 et 8), a pu mettre en évidence une grande tolérance parmi les souches examinées en particulier pour la tolérance à la salinité. La majorité des souches acidifient le milieu en présence de BTB. Afin de finaliser ce travail, nous avons choisi les amorces Box comme technique d'empreinte génétique pour la caractérisation génétique des souches. L'analyse des profils moléculaires obtenus en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) et le pourcentage de similitude a abouti à la construction d'un dendrogramme, qui révèle parfaitement l'existence d'un niveau significatif du polymorphisme moléculaire entre les 89 souches étudiées, avec leur structuration en 06 clusters différents à un niveau de similarité génétique de 10%. Une grande variabilité entre les souches issues de la même nodosité (diversité intra-nodulaire) a été mise en évidence pour les deux types de caractérisation réalisés. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les données écologiques du milieu d'origine des isolats et les caractéristiques physiologiques et/ou les profils moléculaires obtenus.

Mots clés : *Rhizobium* sp, *Hedysarum* L., Algérie, caractérisation physiologique, caractérisation moléculaire, diversité.

Physiological and molecular characterizations of a collection of rhizobia can nodulating four species of the genus *Hedysarum* L., in Algeria.

ABSTRACT

This work has been done to create a collection of Algerian rhizobial strains from nodules of four species of the genus *Hedysarum* (*H. coronarium*, *H. aculeolatum*, *H. flexuosum* and *H. capitatum*) collected from different regions of the country. Among the 431 strains constituent's the formed collection, eighty nine strains were chosen to perform a study of their physiological and genetic diversity. The culture of strains in YMA medium has led to the emergence of circular colonies, 1 to 3 mm in diameter with a creamy or translucent gummy appearance within 1 to 2 days at 28°C. Thus, the authentication test, carried out in pots containing sterile soil, induced the formation of nodules heterogeneous in their form and their number among the 89 strains studied. This confirms that we are dealing with rhizobia rapid growth. Physiological characterization of strains via four physiological tests which are: tolerance to water (-0.5 to -1.5 MPa) and saline stress (200 to 2000 mm NaCl), to temperatures (24 to 40 ° C) and to pH (6 and 8), was able to demonstrate a greater tolerance among the strains examined in particular for tolerance to salinity. Thus, the majority of strains acidify the medium in the presence of BTB. To complete this work, we chose the primers Box as DNA fingerprinting technique for the genetic characterization of strains. Analysis of molecular profiles obtained using the UPGMA method (Unweighted Pair Group Methode with Arithmetic Average) and the percentage of similarity has led to the construction of a dendrogram, which perfectly reveals the existence of a significant level of molecular polymorphism among the 89 strains studied, with their structure in 06 different clusters at a level of genetic similarity of 10%. A large variability between strains from the same nodule (intra-nodular diversity) has been demonstrated for both types of characterization made. Thus, no correlation was found between the data of ecological environment of origin of strains and physiological characteristics and / or the molecular profiles obtained.

Key Words: *Rhizobium* sp, *Hedysarum* L., Algeria, physiological characterisation molecular characterisation, diversity.