

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

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Microbiologie



THESE

En vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat Es-Sciences
Option : Microbiologie

Thème

Etude taxonomique et diversité des bactéries nodulant
***Spartium junceum* (L.) de la région de Béjaïa**

Présentée par :

M^r RAMDANI Nacer

Devant le jury composé de :

M^{me} SMAIL-SAADOUN Noria	Professeur	UMM-Tizi-Ouzou	Présidente
M^r BENALLAOUA Said	Professeur	UAM-Béjaïa	Directeur
M^r OUELHADJ Akli	Professeur	UMM-Tizi-Ouzou	Examinatrice
M^r ABDERRAHMANI Ahmed	Professeur	USTHB-Alger	Examineur
M^r HOUALI Karim	Professeur	UMM-Tizi-Ouzou	Examineur
M^r BENCHABANE Messaoud	Professeur	USD-Blida 1	Examineur

Année universitaire 2020/2021

RÉSUMÉ

Vingt-trois souches bactériennes ont été isolées à partir de nodules racinaires de *Spartium junceum* (L.), poussant à l'état sauvage dans quatre sites géographiques différents de la région de Béjaïa (Nord-est d'Algérie). Pour clarifier leur position taxonomique et phylogénétique, les souches ont été analysées par une approche polyphasique combinant une caractérisation symbiotique (nodulation, efficacité), des techniques phénotypiques (morphologie, biochimie et physiologie, appuyée par une taxonomie numérique) et des techniques génotypiques (PCR/RFLP de l'ADNr 16S, séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, de deux gènes de ménage codant pour les protéines *glnII* et *recA* et d'un gène symbiotique, *nodC*).

Les tests d'infection des plantes ont révélé que toutes les souches étaient capables de former des nodules sur leur plante hôte d'origine, mais avec une capacité de nodulation et une efficacité symbiotique variables. Toutes les souches sont des rhizobia à croissance lente produisant des alcalis dans le milieu YEMA. Selon les résultats des tests phénotypiques, les souches ont été groupées en quatre principaux clusters dans un dendrogramme UPGMA, alors qu'elles ont été discriminées en 12 géotypes distincts par comparaison de leur profil PCR/RFLP de l'ADNr 16S.

Les analyses phylogénétiques du gène codant l'ARNr 16S et de deux gènes de ménage concaténés, *glnII* et *recA*, ont réparti les souches représentatives en deux clades majeurs au sein du genre *Bradyrhizobium*. Certaines de ces souches sont étroitement apparentées à *B. retamae* et *B. japonicum*, tandis que d'autres pourraient former de nouvelles espèces génomiques. Sur la base de l'analyse de la séquence du gène symbiotique (*nodC*), la majorité des souches a été placée dans le cluster symbiovar *retamae* à l'exception de la souche SjBA12 qui pourrait constituer un nouveau symbiovar au sein du genre *Bradyrhizobium*.

Mots clés : *Spartium junceum* (L.), *Bradyrhizobium* sp., Caractérisation Symbiotique et Phénotypique, PCR/RFLP, Phylogénie (ADNr 16S, *glnII*, *recA*, *nodC*).

ABSTRACT

Twenty-three bacterial strains were isolated from root nodules of *Spartium junceum* (L.), growing wild in four distinct geographic locations in Bejaia region (Northeastern Algeria). To clarify their taxonomic and phylogenetic position, the strains were analyzed using a polyphasic approach combining symbiotic characterization (nodulation, effectiveness), phenotypic techniques (morphology, biochemistry and physiology, supported by numerical taxonomy) and genotypic techniques (PCR/RFLP of 16S rDNA, sequencing of the 16S *rRNA* gene, two housekeeping genes, *glnII* and *recA*, and a symbiotic *nodC* gene).

Plant infection tests revealed that all strains were able to form nodules on their original host plant, but with variable nodulation ability and symbiotic effectiveness. All strains were slow-growing, alkali-producing rhizobia in YEMA medium. According to phenotypic test results, the strains were grouped in four main clusters in a UPGMA dendrogram, while they were discriminated into 12 distinct genotypes by comparison of their 16S rDNA PCR/RFLP profile.

Phylogenetic analyses of 16S *rRNA* genes and two concatenated housekeeping genes, *glnII* and *recA*, distributed the representative strains into two major clades within *Bradyrhizobium* genus. Some of these strains were closely related to *B. retamae* and *B. japonicum* whereas others could be form new genospecies. Based on analysis of the symbiotic gene sequence (*nodC*), the majority of strains were placed in the symbiovar *retamae* cluster except for SjBA12 strain which possibly constitutes a new symbiovar within the genus *Bradyrhizobium*.

Keywords: *Spartium junceum* (L.), *Bradyrhizobium* sp., Symbiotic and. Phenotypic Characterization, PCR/RFLP, Phylogeny (16S rDNA, *glnII*, *recA*, *nodC*).

Sommaire

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	i
LISTE DES FIGURES	ii
LISTE DES TABLEAUX	iv

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
------------------------------------	----------

Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE	4
1.1. Structure chimique de la nitrogénase	6
1.1.1. Composante I	8
1.1.2. Composante II	9
1.2. Caractéristiques de la nitrogénase	9
1.3. Mécanisme biochimique de la nitrogénase	11
1.4. Assimilation de l'azote fixé	13
1.5. Les gènes de la nitrogénase	14
1.6. Régulation génétique de la nitrogénase	17
1.7. Méthodes de mesure de l'activité nitrogénasique	17
1.7.1. Méthode directe par dilution isotopique	17
1.7.2. Méthode indirecte par réduction de l'acétylène	18
2. LA SYMBIOSE LEGUMINEUSES –RHIZOBIA	20
2.1. Les légumineuses	20
2.1.1. Généralités	20
2.1.2. Classification des légumineuses	21
2.1.3. Les légumineuses de la tribu des Genisteae	23
2.1.3.1. Présentation de la plante d'intérêt : <i>Spartium junceum</i> (L.)	24
2.1.3.2. Caractéristiques botaniques de l'espèce <i>Spartium junceum</i> (L.)	25
2.1.3.3. Importances écologiques et économiques de <i>Spartium junceum</i> (L.)	27
2.2. Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL)	29
2.2.1. Les concepts de base de la taxonomie des BNL	29
2.2.2. Les concepts actuels de la taxonomie et de la phylogénie des BNL	31

2.3. Mécanismes impliqués dans l'interaction symbiotique	34
2.3.1. Stratégie de nodulation Nod dépendante	34
2.3.1.1. <i>Etapas de la nodulation</i>	34
2.3.1.2. <i>Structure chimique des facteurs Nod</i>	40
2.3.1.3. <i>Bases moléculaires de la nodulation</i>	43
2.3.2. Autres stratégies de nodulation.....	45

Chapitre II. MATÉRIEL ET MÉTHODES
--

1. SITES D'ECHANTILLONNAGE	48
2. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS	49
2.1. Détermination de la texture	49
2.2. Dosage de l'azote total	50
2.3. Dosage du carbone total	50
2.4. Dosage du phosphore assimilable	50
2.5. Détermination du pH	51
2.6. Dosage du calcaire total	51
2.7. Mesure de la conductivité électrique (C_E)	51
3. ISOLEMENT DES BACTERIES A PARTIR DES NODULES	51
3. 1. Désinfection des nodules racinaires	51
3.2. Extraction des bactéries des nodules	52
3.3. Purification et conservation des bactéries	52
4. CARACTERISATION SYMBIOTIQUE DES BACTERIES	52
4.1. Test de nodulation et d'efficacité.....	52
4.1.1. Préparation des plantes axéniques	53
4.1.1.1. <i>Désinfection et germination des graines</i>	53
4.1.1.2. <i>Culture des plantes</i>	53
4.1.1.3. <i>Inoculation des plantes.</i>	53
4.2. Performance symbiotique des isolats bactériens	54
4.3. Traitement statistique des données	54

5. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BNL	55
5.1. Détermination des caractères morphologiques	55
5.1.1. Morphologie des colonies	55
5.1.2. Morphologie des cellules bactériennes	55
5.2. Etude de la croissance bactérienne	56
5.2.1. Préparation des inocula bactériens	56
5.2.2. Mesure de la croissance bactérienne	56
5.3. Détermination des caractères biochimiques	57
5.3.1. Test au bleu de bromothymol (BTB)	57
5.3.2. Mise en évidence de quelques enzymes	57
5.3.3. Etude nutritionnelle des bactéries	58
5.3.3.1. <i>Utilisation des substrats carbonés</i>	58
5.3.3.2. <i>Utilisation des acides aminés</i>	58
5.4. Détermination des caractères physiologiques	59
5.4.1. Effet de la température	59
5.4.2. Effet du pH	59
5.4.3. Effet de la salinité	59
5.4.4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques	59
5.5. Taxonomie numérique	60
6. CARACTERISATION GENOTYPIQUE DES BNL	60
6.1. Extraction de l'ADN génomique	60
6.2. Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait	61
6.3. Amplification de l'ADN par PCR	62
6.3.1. Réaction d'amplification de l'ADNr 16S	62
6.3.2. Électrophorèse sur gel d'agarose	63
6.4. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de l'ADNr 16S	64
6.4.1. Réaction de digestion enzymatique de l'ADNr 16S	64
6.4.2. Electrophorèse des produits de restriction	65
6.4.3. Analyses statistiques	66
6.5. Amplification des gènes de ménage (<i>recA</i> et <i>atpD</i>) et du gène (<i>nodC</i>)	66
6.5.1. Migration des produits PCR	67

6.5.2. Purification des produits PCR et séquençage	67
6.6. Analyses phylogénétiques	68

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS
--

1. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS	70
2. ISOLEMENT ET AUTHENTIFICATION DES BNL	72
3. CARACTERISATION SYMBIOTIQUES DES BNL	73
3.1. Nodulation	73
3.2. Propriétés symbiotiques	74
3.3. Conclusion	75
4. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BNL ET TAXONOMIE NUMERIQUE	77
4. 1. Morphologies culturales et cellulaires des BNL	77
4.1.1. Caractères culturaux	77
4.1.2. Morphologie cellulaire	78
4.2. Paramètres de croissance bactérienne	78
4. 3. Caractéristiques biochimiques des BNL	79
4. 3. 1. Mise en évidence de quelques enzymes	79
4. 3. 2. Utilisation des substrats carbonés	80
4. 3. 3. Utilisation des acides aminés	82
4. 4. Caractéristiques physiologiques des BNL	83
4.4.1. Effet de la température	83
4.4.2. Effet du pH	85
4.4.3. Effet de la salinité	86
4.4.4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques	89
4.5. Taxonomie numérique	90
4.6. Conclusion	93
5. CARACTERISATION GENOTYPIQUE DES BNL	94
5. 1. Amplification de l'ADNr 16S	94
5. 2. Analyse du polymorphisme de restriction de l'ADNr 16S	94
5. 3. Séquençage et phylogénie des bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.)	97
5.3.1. Phylogénie basée sur les séquences de l'ADNr 16S	97

5.3.2. Phylogénie basée sur les gènes de ménage (<i>glnII</i> et <i>recA</i>)	100
5.3.3. Phylogénie basée sur le gène (<i>nodC</i>)	107
5.4. Conclusion	109
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	110
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
ANNEXES	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACP : Analyse en Composante Principale	<i>nodC</i> : N-acétyl glucosaminyl transférase
ADNr 16S : ADN ribosomique 16S	NN : Nombre de Nodules
ARNr : Acide ribonucléique ribosomique	NT : Azote Total
<i>atpD</i> : ATP synthase sous-unité β	PMS : Poids de Matière Sèche
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool	<i>recA</i> : DNA recombinaise A
BNL : Bactéries Nodulant les Légumineuses	TBE : Tris Borate EDTA
BTB : Bleu de bromothymol	EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
CTAB : Cetyl Triméthyl Ammonium Bromide	LCOs : Lipo-Chito-Oligosaccharides
dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate	MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight
DO : Densité Optique	MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis
μS : microSiemens	<i>Nif</i> : Gène codant pour la nitrogénase
Da : Dalton	<i>Nod</i> : Gène de nodulation
EPS : Exopolysaccharides de Surface	pb : paire de bases
ES : Efficacité Symbiotique	PCR : Polymerase Chain Reaction
FNs : Facteurs Nod	PHB : Poly- β -Hydroxybutyrate
<i>glnII</i> : Glutamine synthétase II	pSym : plasmide Symbiotique
ITS : Internal Transcribed Spacer	ROS : Reactive Oxygen Species
LPS : Lipopolysaccharide de Surface	rpm : rotation par minute
LSD : Least Square Difference	UUSDA : United States Department of Agriculture
MLSA : Multi Locus Sequence Analysis	YEMA : Yeast Extract Mannitol Agar
NCBI : National Center for Biotechnology Information	YEMB : Yeast Extract Mannitol Broth

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Structure de la nitrogénase	8
Figure 2 : Mécanisme d'action de la nitrogénase	11
Figure 3 : Voies d'assimilation de l'azote	13
Figure 4 : Les 20 gènes <i>nif</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
Figure 5 : Répartition mondiale du <i>Spartium junceum</i> (L.)	25
Figure 6 : Différentes parties de la plante <i>Spartium junceum</i> (L.)	26
Figure 7 : Arbre phylogénétique non-enraciné de séquences d'ADNr 16S sélectionnées de α -, β - et γ -protéobactéries	33
Figure 8 : Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose Légumineuse Nod-dépendant	35
Figure 9 : Représentation schématique des nodules matures de légumineuses	38
Figure 10 : Structure générale des facteurs Nod produits par les rhizobia	40
Figure 11 : Les différentes stratégies de nodulation chez les symbiotes de légumineuses	46
Figure 12 : Localisation des sites d'échantillonnage des nodules, des gousses de <i>S. junceum</i> (L.) et des sols de la région de Béjaïa	48
Figure 13 : Nodules sur les racines de <i>S. junceum</i> (L.) observés sous une loupe binoculaire (Grossissement. X 8) lors du test de nodulation	74
Figure 14 : Assimilation des acides aminés par les bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.)	83
Figure 15 : Effet de la température d'incubation sur la croissance des BNL	84
Figure 16 : Effet du pH du milieu sur la croissance des BNL	85
Figure 17 : Effet de la salinité du milieu sur la croissance des BNL	86
Figure 18 : Dendrogramme obtenu par la méthode UPGMA montrant les similitudes basées sur les résultats des tests phénotypiques entre les bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.) dans la région de Béjaïa	91
Figure 19 : Electrophorèse des amplicons obtenus par PCR de l'ADNr 16S des bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.)	94
Figure 20 : Graphique des 2 premières dimensions de l'analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les données d'abondance du génotype ou profil RFLP en relation avec les facteurs de sol dans quatre sites d'échantillonnage	96
Figure 21 : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S	98
Figure 22a : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences du gène <i>glnII</i>	101

Figure 22b : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences du gène <i>recA</i>	102
Figure 22c : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences des gènes de ménage (<i>glnII</i> et <i>recA</i>) concaténés	103
Figure 23 : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences de trois gènes (ADNr 16S, <i>glnII</i> et <i>recA</i>) concaténés.....	105
Figure 24 : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences du gène <i>nodC</i>	108

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I : Espèces bactériennes pour lesquelles la nitrogénase a été purifiée	7
Tableau II : Principales caractéristiques des deux composantes de la nitrogénase	8
Tableau III: Produits et fonctions des gènes <i>nif</i>	15
Tableau IV : Variations de la structure des facteurs Nod	42
Tableau V : Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN cible	63
Tableau VI : Endonucléases de restriction utilisées et site de reconnaissance	65
Tableau VII: Séquences et positions des amorces utilisées	66
Tableau VIII: Les conditions de PCR de l'amplification des différents gènes utilisés	67
Tableau IX: Résultats des analyses physico-chimiques des sols	70
Tableau X : Résultats des tests d'authentification	72
Tableau XI: Propriétés symbiotiques des bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.)	76
Tableau XII : Paramètres de croissance des bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.)	79
Tableau XIII : Mise en évidence des enzymes chez les bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.)	80
Tableau XIV. Pourcentages d'assimilation de différentes sources de carbone par les bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.)	81
Tableau XV : Résultats de l'antibiorésistance des bactéries nodulant <i>S. junceum</i> (L.)	89
Tableau XVI: Profils de restriction du gène codant l'ARNr 16S amplifié par PCR	95

Introduction générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Face à l'ampleur et à l'étendue de la dégradation des écosystèmes naturels dont les manifestations sont l'accroissement des terres marginales et l'érosion des sols, des stratégies de lutte contre la désertification sont expérimentées dans des pays particulièrement affectés par ce phénomène, en vue de récupérer à plus grande échelle les terres fortement dégradées. Parmi les stratégies susceptibles de contribuer au succès de la préservation des sols, des ressources naturelles dans toute leur diversité et des écosystèmes, une des plus prometteuses est certainement celle qui consiste à revégétaliser les sites dégradés par des plantes dites pionnières ou cicatricielles, surtout les espèces natives et endémiques de la zone impactée (Jaffré et Pelletier, 1992 ; Henry *et al.*, 2017).

Les espèces de plantes pionnières encore mal exploitées, les légumineuses spontanées occupent une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Au-delà de cet aspect agronomique et économique, certaines espèces de légumineuses non cultivées et arbustives sont aussi d'un grand intérêt dans les écosystèmes naturels vu qu'elles sont responsables pour une partie substantielle de la conversion de l'azote atmosphérique en une forme assimilable par les autres organismes vivants.

Deux caractéristiques principales rendent les arbustes de légumineuses préférables aux arbres ou aux espèces herbacées pour la restauration des sols pauvres et la végétation des zones dégradées des régions méditerranéennes arides et semi-arides. Tout d'abord, ces arbustes sont adaptés au stress hydrique grâce à leurs systèmes racinaires étendus, leur fermeture des stomates, leur résistance aux feux de forêt et leurs feuilles sclérophylles (Valladares *et al.*, 2008 ; Moreia *et al.*, 2011). D'autre part, ces plantes, comme la plupart des légumineuses, établissent une symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote connues sous le nom de rhizobiums (ou rhizobia), fournissant ainsi une entrée nette d'azote sous forme organique dans

les écosystèmes. Cette dernière propriété permet à la plante non seulement subvenir en partie à son propre besoin en azote, mais aussi améliorer la qualité des sols tout en évitant leur érosion, faciliter l'implantation et le développement d'autres espèces végétales et promouvoir par la suite une dynamique d'établissement d'un écosystème plus stable et équilibré (Requena *et al.*, 2001 ; Rodríguez-Echeverría et Pérez-Fernandez, 2003 ; van Der Heijden *et al.* 2006, Cardinale *et al.*, 2010 ; Ahnia *et al.*, 2014).

Malgré qu'elle soit exposée à l'accélération de l'aridité des sols à cause de la dureté du climat, l'Algérie abrite une grande diversité biologique, permettant la coexistence de nombreuses espèces végétales, souvent adaptées à des conditions abiotiques extrêmes ainsi qu'à de fortes pressions biotiques. Parmi les espèces de plantes pionnières encore très peu explorées au plan de la diversité microbienne, *Spartium junceum* (L.) communément appelée Genêt d'Espagne, fait partie des légumineuses arbustives fixateurs d'azote. Cette plante est largement distribuée dans le pourtour méditerranéen et elle développe des adaptations morphologiques sur des sols pauvres et dégradés, qui par son puissant réseau racinaire peut empêcher l'érosion en immobilisant le sol. Cette légumineuse présente des nodules sur les racines ; ces nodules sont induits par des bactéries du sol appelées communément rhizobia, capables de transformer l'azote de l'air (N₂) en azote ammoniacal (NH₄) assimilable par la plante-hôte. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs nécessaires au développement de ces bactéries.

La capacité de *S. junceum* (L.) à fixer l'azote de l'air pourrait être un avantage adaptatif dans les écosystèmes où les sols sont pauvres en azote. Pour cela, il est fortement recommandé de rechercher les couples « légumineuse-rhizobia » les plus adaptés pour les introduire dans des sites pauvres en vue de les réhabiliter. Toutefois, l'étude de la diversité biologique des bactéries nodulant cette légumineuse demeure une nécessité pour toute sélection de couples

symbiotiques performants et plus adaptés aux conditions extrêmes du milieu précédant toute nouvelle introduction.

À notre connaissance, très peu de travaux ont été réalisés sur la symbiose rhizobia-*S. junceum* (L.) surtout dans les pays sud de la Méditerranée. La présente étude a pour objectif principal le renforcement des connaissances sur la diversité des bactéries nodulant la légumineuse, *S. junceum* (L.), ainsi que l'évaluation de l'efficacité symbiotique parmi les bactéries capables de noduler leur plante-hôte.

Pour atteindre cet objectif, nous avons constitué une collection de bactéries à partir de nodules de *S. junceum* (L.), poussant dans différents sites de la région de Béjaïa. Ces bactéries ont été caractérisées par une approche polyphasique combinant une caractérisation symbiotique, phénotypique et génotypique. Dans une première étape, les bactéries ont été caractérisées d'un point de vue phénotypique par une série de tests morphologiques, biochimiques et physiologiques. Cette caractérisation est ensuite appuyée par une taxonomie numérique, basée sur la classification ascendante hiérarchique (CAH), afin de bien distinguer le regroupement de nos souches. Dans une deuxième étape, les souches ont d'abord été caractérisées par PCR/RFLP du gène codant pour l'ARNr 16S. Les souches représentatives des génotypes obtenus par PCR/RFLP ont ensuite fait l'objet d'une caractérisation phylogénétique, en utilisant une approche multilocus (MLSA) basée sur l'étude des marqueurs de la diversité *i.e.* le gène codant pour l'ADNr 16S, de deux gènes de ménage (*glnII* et *recA*) et d'un gène de la symbiose (*nodC*).

Synthèse bibliographique

Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

Après l'eau, l'azote (N) est un élément essentiel pour toutes formes de vie. Il entre dans la composition de nombreuses substances essentielles impliquées dans l'activité et le fonctionnement des organismes vivants, comme les protéines, les enzymes, les acides nucléiques, la chlorophylle, l'ATP, les vitamines. En effet, par son action prépondérante dans le métabolisme cellulaire, il se comporte souvent comme facteur limitant essentiel pour la croissance des plantes dans de nombreux écosystèmes naturels et cultivés (Burén et Rubio, 2018). Cet élément est très abondant dans l'atmosphère terrestre qui contient en volume 79% d'azote sous forme gazeuse ou moléculaire (N_2), ce qui représente 4.10^{15} millions de tonnes (Havelka *et al.*, 1982 ; Houlton *et al.*, 2018). La plupart des végétaux, bien qu'autotrophes pour le carbone, n'ont pas accès à cette réserve d'azote pratiquement inépuisable, car il est chimiquement inerte et stable grâce à une triple liaison covalente liant les deux atomes d'azote (Cleland et Harpole, 2010). En plus, l'azote organique qui parvient au sol par l'intermédiaire de la matière organique, d'origine animale ou végétale, doit subir une minéralisation jusqu'à sa forme nitr²ique ou ammoniacale pour être assimilé par la plante. En conditions naturelles, la nutrition azotée des plantes dépend donc entièrement de l'activité des micro-organismes, qu'il s'agisse de la fixation biologique ou de la dégradation de la matière organique (Stougaard, 2000).

La fixation biologique de l'azote (FBA) ou diazotrophie, est un processus de conversion du diazote atmosphérique (N_2) en azote ammoniacal (NH_3), forme azotée utilisable dans la synthèse de composés bio-organiques par tout système vivant sur terre (Cheng, 2008). Elle est l'œuvre exclusive d'un nombre restreint de micro-organismes procaryotes (bactéries, cyanobactéries et archées), appelés fixateurs d'azote ou diazotrophes. Ces micro-organismes

fixent l'azote à l'aide d'un complexe enzymatique très conservé lors de l'évolution : la nitrogénase (N₂ase) qui catalyse la réaction suivante :



Cette réaction est irréversible, s'accompagne d'un dégagement de H₂ et requiert beaucoup d'énergie sous forme d'ATP, compte tenue de l'énergie de liaison liant les atomes d'azote (Igarashi et Seefeldt, 2003 ; Seefeldt *et al.*, 2004 ; Rees *et al.*, 2005 ; Oldroyd *et al.*, 2014).

L'azote atmosphérique peut être réduit par des fixateurs libres comme *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, ou par des fixateurs symbiotiques. Parmi les symbioses fixatrices d'azote les plus connues on peut citer :

- Les symbioses *Frankia*- plantes actinorhziennes où, les bactéries actinomycètes du genre *Frankia* infectent les racines de plantes appartenant à 25 genres et regroupées dans huit familles d'angiospermes (*Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Elaeagnaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae* et *Rosaceae*) (Pawlowski et Demchenko, 2012). Ces plantes forment des nodules au niveau des racines et dans lesquels, des filaments bactériens se développent à l'intérieur des cellules. Celles-ci se différencient en vésicules, sièges de la fixation de l'azote (Benson et Silvester, 1993 ; Chaia *et al.*, 2010).
- Les symbioses entre les cyanobactéries et les algues, les bryophytes, les ptéridophytes, les gymnospermes ou les angiospermes. C'est le cas de l'interaction symbiotique entre *Anabaena-Azolla* (Rai *et al.*, 2000). Les *Azolla* sont des petites fougères aquatiques largement réparties sur le globe, notamment dans les régions tropicales. Elles sont associées à la cyanobactérie *Anabaena azollae* qui assure la totalité de l'approvisionnement en azote. En Asie du Sud-est, *Azolla* est utilisée comme "engrais vert" dans les rizières (Bocchi et Malgioglio, 2010 ; Li *et al.*, 2018).

- Les symbioses rhizobia-légumineuses sont les plus étudiées : la plante hôte appartient à la famille des Fabacées, à l'exception de petits arbres tropicaux appartenant au genre

Parasponia (*Parasponia tomentosa* ou *P. andersonii*) de la famille des Ulmacées et les rhizobia différenciés en bactéroïdes, fixent l'azote dans un organe différencié de la plante, appelé nodule (Lafay *et al.*, 2006 ; Op den Camp *et al.*, 2012 ; van Velzen *et al.*, 2018).

La majorité des légumineuses sont nodulées au niveau de leurs racines (Allen et Allen, 1981 ; Young et Johnston, 1989). Toutefois, la double nodulation des tiges et des racines n'est rencontrée que chez quelques légumineuses tropicales qui appartiennent à quatre genres différents : *Sesbania*, *Aeschynomene*, *Discolobium* de la sous-famille des Papilionoideae et le genre *Neptunia* de la sous-famille des Mimosoideae. Toutes ces plantes poussent en saison des pluies, dans les sols temporairement inondés, dans les mares et marécages, aux bords des rivières, lacs et cours d'eau des régions tropicales (Dreyfus et Dommergues, 1981 ; Alazard, 1985 ; Becker *et al.*, 1988 ; Loureiro *et al.*, 1994 ; Martins *et al.*, 2015).

Parmi les processus biologiques fixateurs les plus efficaces sont les systèmes symbiotiques, qui réalisent un couplage entre la fixation de l'azote et la photosynthèse. D'un point de vue environnemental et agronomique, la symbiose légumineuse-rhizobia est la mieux connue et la plus importante. En effet, la quantité d'azote fixé par cette symbiose est très significative, puisqu'on considère que sur les 200 millions de tonnes d'azote réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique, 150 à 175 x 10⁶ tonnes seraient imputées à cette symbiose qui joue un rôle clé dans le cycle biologique de l'azote, l'agriculture et la restauration des sols dégradés (Havelka *et al.*, 1982 ; Raven *et al.*, 2000).

1.1. Structure chimique de la nitrogénase

La nitrogénase (N₂ase; EC 1.18.6.1) est une enzyme commune à tous les diazotrophes et représente environ 10% du poids total de leurs protéines solubles (Richter, 1993). Elle a été isolée et purifiée à partir de nombreuses espèces bactériennes fixatrices d'azote (Tableau I).

Toutes les nitrogénases connues jusqu'à présent ont des propriétés biochimiques très semblables, ce qui laissait supposer que ces enzymes sont très conservées tant au niveau

biochimique qu'au niveau des séquences nucléotidiques (Franche *et al.*, 2009). La forme conventionnelle la plus étudiée est celle contenant le molybdène (Mo-nitrogénase) en son centre actif. Deux autres nitrogénases alternatives sont aussi retrouvées soit le Mo est remplacé par du vanadium (V-nitrogénase), soit le Mo est substitué par du fer (Fe-nitrogénase) (Eady, 1996 ; Rehder, 2000 ; Seefeldt *et al.*, 2004 ; Rubio et Ludden, 2005 ; Smith *et al.*, 2013 ; Sippel et Einsle, 2017). Bien que chaque enzyme ait un hétérométal différent (Mo, V ou Fe), elles sont par ailleurs si similaires qu'elles doivent provenir d'un ancêtre commun (Fisher et Newton, 2002 ; Weiss *et al.*, 2016).

Tableau I : Espèces bactériennes pour lesquelles la nitrogénase a été purifiée (Postgate, 1982)

Micro-organismes	Codes	Références
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Cp	Carnahan <i>et al.</i> (1960)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Rr	Bullen, Burns et LeComte (1965)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Av	Bullen, Burns et LeComte (1965)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Bj	Koch, Evans et Russell (1967)
<i>Azotobacter chroococum</i>	Ac	Kelly (1968, 1969)
<i>Xanthomonas flavus</i> 301	Xf	Biggins et Postgate (1969)
<i>Anabaena cylindrica</i>	Anc	Stewart, Haystead, Pearson (1969)
<i>Chromatium vinosum</i>	Cv	Winter et Arnon (1970)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp	Eady <i>et al.</i> (1972)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dd	Sekiguchi et Nosoh (1973)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Al	Okon <i>et al.</i> (1977)
<i>Bacillus polymexa</i>	Bp	Emerich et Burris (1978)

De point de vue structure, la nitrogénase à molybdène est de loin la plus largement caractérisée. Cette enzyme est un complexe protéique formé de plusieurs sous-unités différentes regroupées en deux métalloprotéines distinctes (Howard et Rees, 1996 ; Rubio et Ludden, 2005 ; Cheng, 2008 ; Sippel *et al.*, 2018) (Figure 1). Les principales caractéristiques et les structures des deux composantes enzymatiques figurent dans le Tableau II.

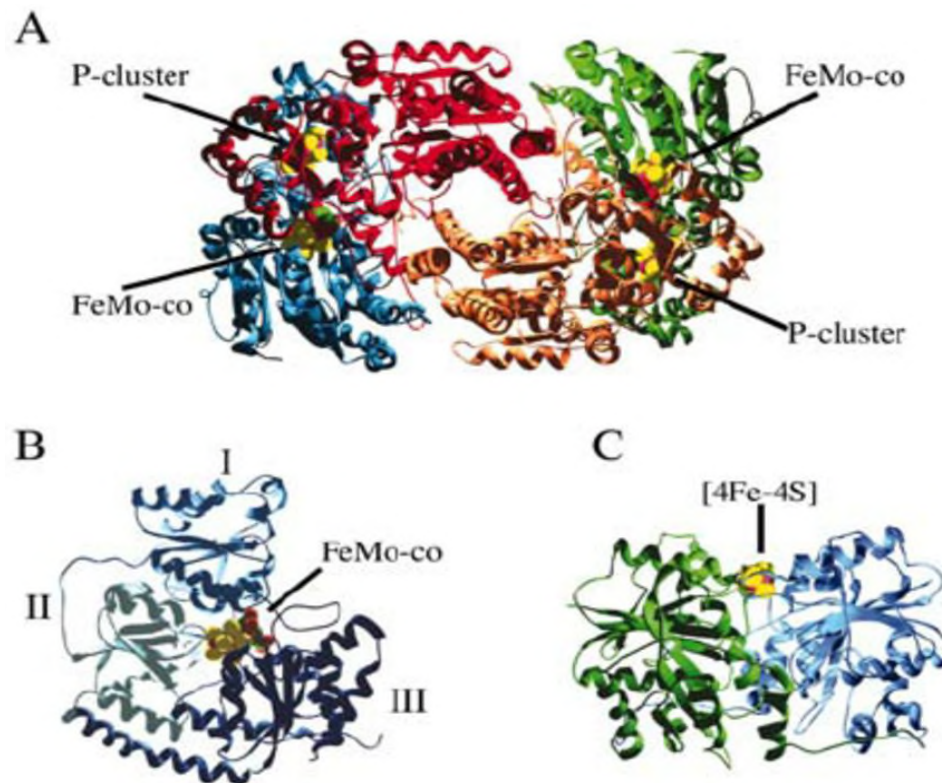


Figure 1 : Structure de la nitrogénase.

La composante I de la nitrogénase est un hétéro-tétramère constitué de deux sous-unités α représentées en bleu et vert et de deux sous-unités β représentées en rouge et orange (A). Le détail de la sous-unité α est donné (B). La composante II est un homo-dimère (C). D'après Rubio et Ludden (2005).

Tableau II : Principales caractéristiques des deux composantes de la nitrogénase (Hardy *et al.*, 1971 ; Smith *et al.*, 1987)

Caractéristiques	Composante I	Composante II
Composition	Fe, S, Mo	Fe, S
Poids moléculaire (Da)	220000-270000	55000-72600
Cristallisation	+	Non cristallisée
Inactivation par l'O ₂	+	+
Sensibilité au froid	+	+

1.1.1. Composante I

La dinitrogénase, appelée également Molybdoferroprotéine (Mo-Fe protéine) ou Azofermo, de poids moléculaire variable selon les micro-organismes (de 220000 à 270000 Da), représente la composante la plus large de la nitrogénase. Elle est formée de quatre sous-unités hétéro-tétramériques ($\alpha_2\beta_2$) codées par les gènes *nifD* et *nifK*, de forme

parallélépipédique constituées de 2 sous-unités α (~ 50000 Da) et de 2 sous-unités β (~ 55000 Da). Cette composante contient en plus de 2 atomes de molybdène, jusqu'à 32 atomes de fer et autant d'atomes de soufre, qui sont organisés soit en 2 centres [4Fe-4S], appelé P-cluster, pontés en structure cubique et reliant entre elles les sous-unités α et β , soit forment en compagnie des 2 atomes de molybdène, deux MoFe-cofacteurs [MoFe₇S₉C] identiques. Ces centres métalliques constituent le site de fixation et de réduction du substrat (Dixon et Kahn, 2004 ; Cheng, 2008 ; Kowalska et DeBeer, 2015 ; Burén *et al.*, 2020).

1.1.2. Composante II

Encore appelée Ferroprotéine (Fe-protéine), Azoferrodoxine ou dinitrogénase réductase, de poids moléculaire variable selon les micro-organismes (de 55000 à 72600 Da). C'est un homo-dimère composé de deux sous-unités γ ellipsoïdales identiques et codée par le gène *nifH*. Elle possède un seul centre [Fe₈S₇], reliant les deux sous-unités ensemble. Elle est considérée comme un transmetteur d'électrons ATP-dépendant à la dinitrogénase, à partir d'un donneur tel que la flavodoxine ou ferrédoxine (Dixon et Kahn, 2004 ; Cheng, 2008 ; Kowalska et DeBeer, 2015 ; Burén *et al.*, 2020).

1.2. Caractéristiques de la nitrogénase

Chacune des deux fractions de la nitrogénase considérées isolément est incapable de fixer l'azote atmosphérique. Mais quand elles sont combinées en présence de Mg-ATP, d'un donneur d'électrons et en anaérobiose stricte, toutes les propriétés de cette enzyme se manifestent. La cristallisation de la molybdoferroprotéine a été obtenue en 1970 par Burns et ses collaborateurs. Pour la ferroprotéine cette cristallisation est beaucoup plus délicate à cause de son extrême labilité. Les deux métalloprotéines qui composent la nitrogénase sont inactivées de manière irréversible par l'oxygène de l'air (O₂) vraisemblablement par oxydation des atomes de soufre présents dans les cofacteurs métalliques (Robson et Postgate, 1980 ; Dighe *et al.*, 2010). La nitrogénase nécessite donc une protection rigoureuse contre

cette inhibition. Pour cela, les systèmes diazotrophes ont développé au cours de l'évolution un certain nombre de stratégies pour protéger l'enzyme contre l'excès d'O₂ et les espèces d'oxygène actif (ROS). Pour les bactéries aérobies libres, comme *Azotobacter*, la protection de cette enzyme contre l'oxygène se produit principalement par le biais de deux mécanismes: (i) le quotient respiratoire des *Azotobacter* est de 80%, par conséquent une activité respiratoire intense empêche la diffusion de l'oxygène à l'intérieur de la cellule et (ii) la protection conformationnelle ou conversion réversible de l'enzyme en un état inactivé protégé, est le résultat de la capacité d'*Azotobacter* ou *Gluconacetobacter* à synthétiser une autre protéine FeS II qui entre en association avec le complexe nitrogénase et la protège des dommages causés par l'oxygène. Mais, au cours de cette association, le complexe ne peut manifester aucune activité nitrogénase (Robson et Postgate, 1980 ; Moshiri *et al.*, 1994 ; Ureta et Nordlund, 2002 ; Schlesier *et al.*, 2016 ; Burén et Rubio ; 2018). La fixation d'azote chez les bactéries micro-aérophiles comme *Azospirillum* se fait uniquement en présence d'une concentration en oxygène très faible. D'autre part, les souches d'*Azospirillum* peuvent produire des composés appelés caroténoïdes qui jouent un rôle primordial dans la protection de la nitrogénase contre l'effet inhibiteur de l'O₂ (Hartman *et al.*, 1983 ; Hartman et Hurek., 1988).

Dans la symbiose rhizobia-légumineuse, le système de protection est beaucoup plus complexe encore puisque l'association conduit à la synthèse de la leghémoglobine (Lb), pigment analogue à l'hémoglobine des mammifères. Ce pigment, ayant une forte affinité pour l'oxygène, l'absorbe et en assure le transfert jusqu'aux bactéroïdes où sa consommation par respiration permet de maintenir une pression partielle d'oxygène très faible (Ott *et al.*, 2005). En plus, la nodosité possède un environnement anoxique avec une pO₂ de moins de 1 µM au sein des cellules fixatrices (Minchin, 1997). Deux éléments, en particulier, participent à la mise en place de cet environnement. D'une part, la présence d'une barrière de diffusion des

gaz extérieurs comme l'O₂ dans le nodule permet de limiter l'entrée de l'oxygène à l'intérieur des symbiosomes. Cette barrière de diffusion à l'O₂, présente dans le cortex, est faite d'un épithélium avec une forte densité cellulaire et dont les espaces intercellulaires sont obstrués par des sécrétions de glycoprotéines (Batut et Boistard, 1994 ; Minchin *et al.*, 2008).

Chez les cyanobactéries hétérocystées, la formation de cellules spécialisées dans lesquelles le photosystème II responsable de la production d'oxygène est absent, et la possession d'une paroi épaisse permet à la nitrogénase d'être protégée de l'oxygène (Pienkos *et al.*, 1983). Toutefois, la fixation d'azote aérobie peut aussi avoir lieu chez les cyanobactéries homocystées tels que : *Synechococcus* spp. (Spiller et Shanmugan, 1987), *Oscillatoria* spp. (Khamees *et al.*, 1987) et *Gloeotheca* spp. (Berman-Frank *et al.*, 2003). Ce groupe de cyanobactérie est généralement trouvé sous forme d'un lot de filaments agrégés en faisceaux. Les filaments de la partie extérieure du faisceau ont une activité photosynthétique alors que ceux du centre ne reçoivent pas de lumière, et ne produisent donc pas d'oxygène, ce qui permet à leur nitrogénase de fonctionner (Berman-Frank *et al.*, 2003 ; Allen *et al.*, 2019).

1.3. Mécanisme biochimique de la nitrogénase

La réduction de l'azote moléculaire catalysée par la nitrogénase est schématisée par la figure 2.

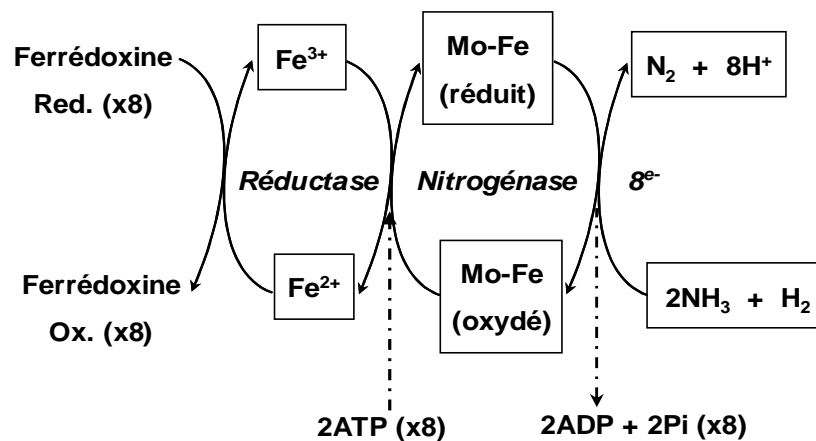


Figure 2 : Mécanisme d'action de la nitrogénase (Dixon et Wheeler, 1986).

Pour chaque électron fourni par l'intermédiaire de la réductase à la nitrogénase pour la réduction de l'azote, il y a consommation de 2 liaisons phosphates riches en énergie (2ATP). Une molécule de H₂ est formée en même temps que celle de l'ammoniac.

La réduction de N_2 se fait en plusieurs étapes. En effet, au cours de la catalyse, les électrons sont délivrés un par un de la protéine Fe à la protéine MoFe dans un processus impliquant l'association composant-protéine et la dissociation et l'hydrolyse d'au moins deux Mg-ATP pour chaque transfert d'électrons, alors que le site de liaison et de réduction du substrat est situé sur la protéine MoFe (Peters *et al.*, 1995 ; Seefeldt *et al.*, 2018).

Afin de fournir les électrons nécessaires à la réduction de l'azote moléculaire, la nitrogénase fonctionne avec des co-facteurs protéiques : la ferredoxine chez les bactéries symbiotiques (co-facteur à NAD ou NADP), ou flavodoxine chez les bactéries libres (co-facteur à FAD) (Peters et Szilagyi, 2006). Au niveau protéique, le mécanisme biochimique de base de la nitrogénase implique d'après Igarashi et Seefeldt (2003) :

(i) : la formation d'un complexe entre la Fe-protéine avec la MoFe protéine. La Fe-protéine réduite possède 2 Mg-ATP et est dans le stade d'oxydation +1 ;

(ii) : le changement de conformation pour la Fe-protéine associée avec l'hydrolyse des deux Mg-ATP causant un transfert d'électrons entre les deux protéines. Le cluster-P médierait le transfert d'électrons entre les deux protéines ;

(iii) : la dissociation de la protéine Fe accompagnée d'une nouvelle réduction (*via* les ferredoxines ou les flavodoxines) et l'échange d'ATP pour l'ADP ;

(iv) : la répétition de ce cycle jusqu'à ce qu'un nombre suffisant d'électrons et de protons aient été accumulés afin que les substrats disponibles puissent être réduits.

Pour la réduction de N_2 , le cofacteur FeMo doit accepter huit électrons durant la catalyse. Le cycle de la Fe-protéine doit être effectué au moins huit fois, car un seul électron est transféré durant l'association entre les deux protéines (Seefeldt *et al.*, 2009). En plus de la réduction du diazote, la nitrogénase catalyse la réduction des protons (H^+) en dihydrogène (H_2). Certaines bactéries utilisent une hydrogénase qui catalyse l'oxydation du H_2 en H_2O en produisant une

molécule d'ATP. Cette hydrogénase permet donc de recycler une partie du H₂ produit et de limiter les pertes d'énergie (Evans *et al.*, 1978 ; Robson et Postgate, 1980 ; Simpson, 1987).

1.4. Assimilation de l'azote fixé

Quelle que soit son origine, l'ion ammonium, indispensable à la vie des plantes, est rapidement incorporé dans des composés organiques, car son accumulation est toxique pour la cellule. Deux voies biochimiques permettent l'assimilation de l'azote fixé: la voie principale GS/GOGAT (glutamine synthétase/glutamate synthase) et la voie GDH (glutamate déshydrogénase) (Stewart *et al.*, 1980; Oaks et Hirel, 1985). D'autres enzymes telles que l'asparagine synthétase (AS) et l'aspartate amino-transférase (AAT), jouent également un rôle important dans l'assimilation du NH₄⁺ (Coruzzi, 2003 ; Duff *et al.*, 2011) (Figure 3).

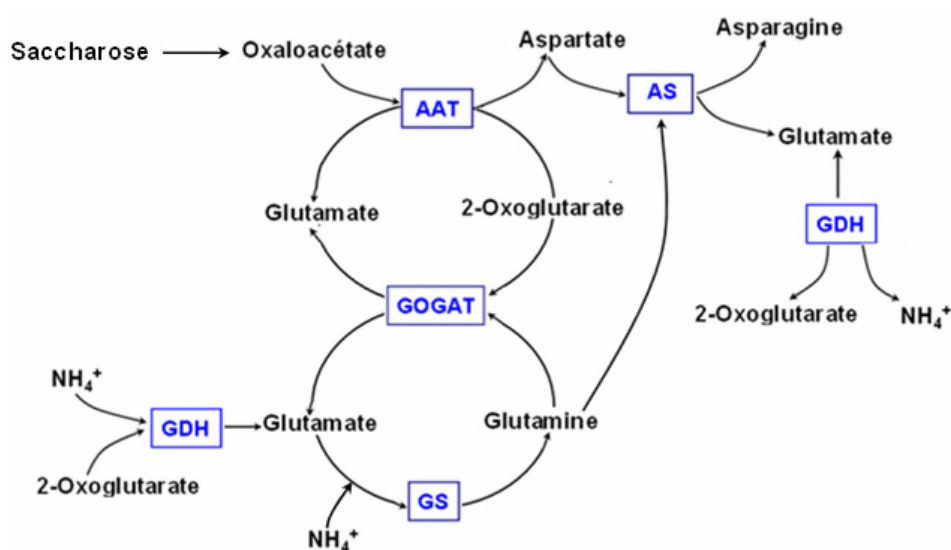


Figure 3 :.Voies d'assimilation de l'azote (d'après Coruzzi, 2003).

GS, glutamine synthétase; **GOGAT**, glutamate synthase; **AAT**, aspartateaminotransferase; **AS**, asparagine synthetase; **GDH**, glutamate deshydrogénase.

Il est généralement admis que l'assimilation de l'ammonium se fait principalement par la voie (GS/GOGAT). Dans cette voie, la Glutamine Synthétase (GS, EC 6.3.1.2) catalyse l'amination du glutamate en glutamine. Ensuite, la Glutamine OxoGlutamate Amino Transférase (GOGAT, EC 1.4.1.14), appelée aussi glutamate synthase, transfère le groupe amino (-NH₂) de la glutamine (formée par la GS) au 2 oxoglutarate (ou α-cétoglutarate) pour

former du glutamate. Deux molécules de glutamate sont ainsi formées, l'une servira à réalimenter le cycle GS/GOGAT pour la formation de la glutamine et l'autre va servir à la synthèse des autres acides aminés et molécules azotées *via*, notamment, des transaminations (Hirel et Lea, 2001; Miflin et Habash, 2002 ; Coruzzi, 2003).

La voie alternative du glutamate déshydrogénase (GDH, EC 1.4.1.2) produit de la glutamine à partir de NH_4^+ et le 2 oxoglutarate (sens anabolique) ainsi que la réaction inverse, c'est-à-dire la conversion du glutamate en ammonium et 2 oxoglutarate (sens catabolique). Elle n'est favorisée que lorsque la GOGAT est inactive en présence de concentration en ammonium relativement élevée (Lea *et al.*, 1990 ; Aubert *et al.*, 2001).

L'asparagine synthétase (AS, EC 6.3.5.4) catalyse en présence d'ATP le transfert de l'ammonium (ou du groupement amide de la glutamine) sur l'aspartate pour générer du glutamate et de l'asparagine (Sieciechowicz *et al.*, 1988 ; Duff *et al.*, 2011).

L'aspartate amino-transférase (AAT, EC 2.6.1.1), enzyme phosphate-dépendant, catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé du glutamate vers l'oxaloacétate pour former l'aspartate et l' α -cétoglutarate (Coruzzi, 2003).

1.5. Les gènes de la nitrogénase

La synthèse ainsi que l'activité de la nitrogénase sont sous contrôle génétique. En effet, la réduction enzymatique de l'azote moléculaire en ammoniac, requiert la présence de produits des gènes *nif* (pour ***n***itrogen ***f***ixation). L'analyse génétique, par complémentarité des mutants ponctuels et des mutants par insertion du bactériophage Mu, a permis de caractériser 20 gènes *nif* chez *Klebsiella pneumoniae* M5a1, utilisée initialement comme bactérie modèle pour étudier la biochimie, la physiologie et la génétique de la fixation d'azote (Roberts et Brill, 1981 ; Elmerich, 1993 ; Cheng, 2008). Ces études ont révélé un certain nombre de concepts de base communs à de nombreux diazotrophes, ce qui a contribué de manière significative à une meilleure compréhension de l'expression des gènes *nif* (Tableau III).

Tableau III: Produits et fonctions des gènes *nif*
(Burris, 1994 ; Batut et Boistard, 1994 ; Dai *et al.*, 2014 ; Burén *et al.*, 2020)

Les produits des gènes <i>nif</i>	Les fonctions des gènes <i>nif</i>
<i>nifH</i>	Nécessaire dans la biosynthèse de la Fe-protéine
<i>nifD</i>	Code pour la sous-unité α de la MoFe-protein
<i>nifK</i>	Code pour la sous-unité β de la MoFe-protein
<i>nifE, nifN</i>	Nécessaires pour la biosynthèse du cofacteur du molybdène de la FeMo-protéine
<i>nifX</i>	Protéine de transformation du cofacteur fer-molybdène
<i>nifA</i>	Protéine régulatrice spécifique. Activateur transcriptionnel
<i>nifB</i>	Nécessaire pour la biosynthèse du cofacteur de la FeMo-protéine
<i>nifQ</i>	Protéine de liaison aux ions molybdène
<i>nifS</i>	Code pour la cystéine désulfurase
<i>nifU</i>	Code pour la protéine d'assemblage de cluster [Fe-S]
<i>nifV</i>	Homocitrate synthase, impliqué dans la synthèse de FeMo-co
<i>nifW</i>	Protéine stabilisatrice/protectrice de la nitrogénase
<i>nifT</i>	Protéine de fixation de l'azote
<i>nifZ</i>	Protéine de synthèse du cofacteur fer-soufre
<i>nifF</i> : flavodoxine	Réducteur physiologique de la Fe protéine.
<i>nifJ</i> : pyruvate-flavodoxine-oxidoréductase	Couple l'oxydation du pyruvate à la réduction de la flavodoxine
<i>nifL</i>	Régulateur négatif. Agit comme anti-activateur NifA
<i>nifM</i>	Nécessaire pour la maturation et l'activation de la Fe.protéine
<i>nifY</i>	Stabilisation de la protéine apo-MoFe dans une conformation qui se prête à l'insertion du cofacteur FeMo.

Chez *K. pneumoniae*, ces gènes sont tous organisés en 8 unités de transcription (opérons) et regroupés dans une seule région de 24 kb dans le chromosome, entre l'opéron histidine et le gène *shi A* (Figure 4). Cette région entière a été séquencée très tôt par Arlnod *et al.* (1988), ce qui a considérablement facilité son étude de manière approfondie chez d'autres diazotrophes comme *Azotobacter* spp., bactéries photosynthétiques, cyanobactéries, *Azospirillum* spp., rhizobia et bactéries méthanogènes (Dean et Jacobson, 1992 ; Fisher, 1994).

Les trois gènes structuraux codant pour les protéines Mo-nitrogénase sont *nifD* et *nifK* pour les sous-unités MoFe-protéine et *nifH* pour la Fe-protéine (Franche *et al.*, 2009) (Tableau III). Des gènes homologues qui codent pour l'enzyme nitrogénase, en particulier les gènes structuraux (*nifHDK*), les gènes impliqués dans la formation de clusters fer-soufre (*nifUS*), les gènes de régulation (*nifLA*) et les gènes nécessaires à la biosynthèse du cofacteur fer-molybdène, FeMo-co (*nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifV*), se retrouvent dans tous les fixateurs, bien qu'avec une distribution différente (Dai *et al.*, 2014 ; Burén *et al.*, 2020).

Chez les rhizobia tempérés, comme *R. meliloti* et *R. leguminosarum*, ces gènes sont présents dans des mégaplasmides, appelés pSym (plasmide symbiotique), qui portent également l'information génétique pour la formation des nodosités. En revanche, dans le cas de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, qui ne contiennent pas de plasmides, les gènes *nif* sont chromosomiques (Fisher, 1994). Enfin, certains diazotrophes ont les gènes structuraux appelés *vnf* « pour vanadium *n*itrogen *f*ixation » pour les gènes de la V-N₂ase et *anf* « pour *a*lternative *n*itrogen *f*ixation » pour ceux de la Fe-N₂ase (Joeger *et al.*, 1989).

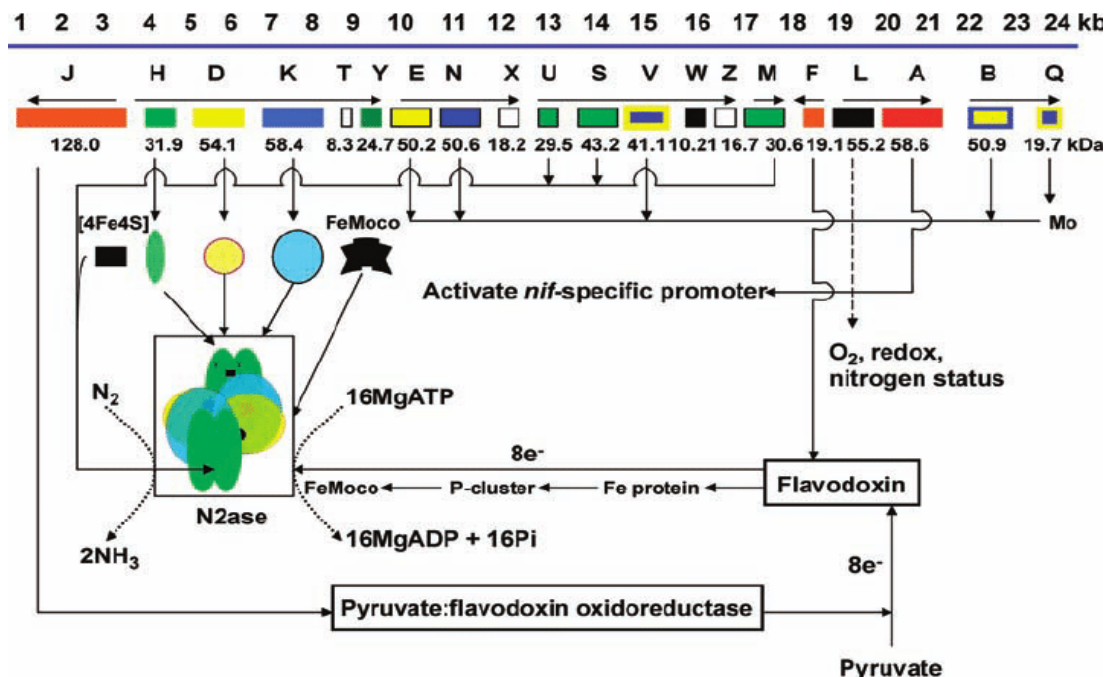


Figure 4: Les 20 gènes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* (Cheng, 2008)

1.6. Régulation génétique de la nitrogénase

L'expression des gènes codant pour la nitrogénase est hautement régulée à plusieurs niveaux, allant de la transcription jusqu'aux modifications post-traductionnelles des protéines (Zehr *et al.*, 2003; Dixon et Kahn, 2004). Chez *Klebsiella pneumoniae*, l'expression des gènes *nif* est régulée au niveau transcriptionnel par les produits de quatre gènes, à savoir les gènes *ntrC* (glnG), *ntrA* (glnF), *nifA* et *nifL* (Drummond *et al.*, 1983 ; He *et al.*, 1998). Les gènes régulateurs *nifL* et *nifA* constituent un seul opéron qui est activé par le produit de *ntrA* et *ntrC*, tandis que le produit de *nifA* conjointement avec celui de *ntrA* active tous les autres opérons *nif* (Dixon et Kahn, 2004). En revanche, le produit du gène *nifL* agit comme un répresseur pour les gènes *nif* en présence d'oxygène ou d'un excès d'azote fixé (Hill *et al.*, 1981 ; Jack *et al.*, 1999).

1.7. Méthodes de mesure de l'activité nitrogénasique

Diverses méthodes sont disponibles pour mesurer les taux de fixation d'azote ou l'activité nitrogénasique. La mesure peut se faire selon deux approches distinctes : mesure directe ou indirecte.

1.7.1. Méthode directe par dilution isotopique

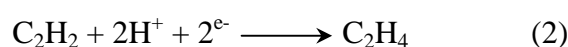
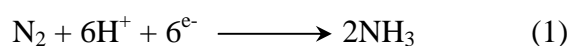
La fixation d'azote peut être mesurée directement à partir d'un enrichissement isotopique en azote ^{15}N . Cette méthode consiste à placer le système fixateur d'azote (micro-organisme ou plante) dans un micro-environnement enrichi en azote atmosphérique marqué (^{15}N) et à mesurer au bout d'un certain temps le ^{15}N dans le système l'azote fixé (Vose *et al.*, 1981). Une digestion est effectuée par la méthode de Kjeldahl et l'azote isotopique qui en ressort est analysé par spectrométrie de masse (Danso, 1995). C'est une méthode de mesure directe, mais ayant des limites d'ordre pratique. Elle est destructive, lourde et nécessite beaucoup de manipulations. De plus, elle exige l'utilisation de ^{15}N ayant un excès atomique élevé pour contrôler l'effet de dilution. L'azote marqué doit avoir environ 30 à 40% d'excès isotopique

(Vose *et al.*, 1981). Elle est surtout utilisée pour les études au laboratoire, mais pas au champ (Rennie et Rennie, 1983 ; Danso, 1995).

1.7.2. Méthode indirecte par réduction de l'acétylène

C'est une méthode basée sur le principe de la réduction de l'acétylène en éthylène pour mesurer de façon indirecte la fixation d'azote. En plus de N₂ et des protons (H⁺), la nitrogénase a la propriété de réduire un grand nombre d'analogues structuraux de l'azote moléculaire, surtout ceux comportant des liaisons triples. Parmi ceux-ci se retrouvent : acétylène (H-C≡C-H), cyanure d'hydrogène (H-C≡C-N), isocyanure de méthyl (C≡N-CH₃), oxyde nitreux (N≡NO).

Dilworth (1966) d'une part et Schöllhorn et Burris (1976) d'autre part, en travaillant sur des extraits acellulaires de *Clostridium pasteurianum*, ont mis en évidence l'inhibition de la fixation de l'azote par l'acétylène. Elle est totale en présence de 8% d'acétylène dans l'atmosphère. Tous les électrons fournis à l'enzyme sont utilisés pour transformer l'acétylène en éthylène. Ces mêmes auteurs ont établi la nature compétitive de l'inhibition. En outre, Dilworth (1966) découvrit que l'acétylène était réduit en éthylène par une réaction analogue à la réduction de N₂ en 2NH₃.



La non-spécificité de la nitrogénase vis-à-vis de son substrat naturel a conduit plusieurs chercheurs à mesurer son activité par la méthode ARA (Activité Réductrice d'Acétylène, de l'anglais Acetylene Reduction Assay) (Hardy *et al.*, 1968 ; Desperrier *et al.*, 1984).

La procédure expérimentale consiste à mettre le système fixateur en incubation dans un milieu contenant de l'acétylène pendant une période de temps variant de quelques minutes à plusieurs heures. L'éthylène produit au bout d'un certain temps est mesuré aisément par chromatographie en phase gazeuse. La quantité d'éthylène produite peut servir directement

comme mesure de l'activité de la nitrogénase ou de l'activité fixatrice d'azote. L'éthylène est converti en quantité d'azote fixé en utilisant un facteur de conversion calculé à partir des réactions chimiques (Danso, 1995). En effet, la réduction de C_2H_2 correspond au transfert de deux électrons par molécule de C_2H_2 réduite (équation 2), alors qu'il en faut 6 pour réduire une molécule de N_2 (équation 1). Le rapport molaire théorique " N_2/C_2H_2 " est de 3, mais la vérification expérimentale de cette valeur montre qu'elle n'est pas constante, et peut varier de 2.7 à 4.2 (Hardy *et al.*, 1968).

La méthode ARA est devenue actuellement la méthode la plus utilisée pour mesurer l'activité fixatrice d'azote, car elle est simple, rapide et non-destructive. De plus, elle est 10^3 fois plus sensible que la méthode isotopique, qui nécessite un appareillage plus coûteux et des manipulations beaucoup plus longues. Elle est aussi 10^6 fois plus sensible que la méthode de Kjeldahl (dosage chimique de l'azote total après digestion).

2. LA SYMBIOSE LEGUMINEUSES – RHIZOBIA

2.1. Les légumineuses

2.1.1. Généralités

Les Légumineuses (*Leguminosae*) ou Fabacées (*Fabaceae*), avec 35 tribus et plus de 19500 espèces réparties sur environ 765 genres forment, après les Astéracées et les Orchidées, la troisième plus grande famille par ordre d'importance chez des Angiospermes (ou plantes à fleurs) en terme de richesse spécifique (Azani *et al.*, 2017). En termes d'importance économique et agricole, les Fabacées occupent la seconde place après les Poacées. (Polhill et Raven, 1981 ; Polhill, 1994 ; Botineau, 2010; Lewis *et al.*, 2013 ; Koenen *et al.*, 2020). Cette famille compte le plus grand nombre d'espèces utiles à l'Homme, qu'elles soient alimentaires, ornementales, industrielles ou médicinales. Elles représentant 27% de la production agricole mondiale et contribuant à 33% des besoins alimentaires en azote des protéines alimentaires des humains (Graham et Vance, 2003). D'un point de vue biogéographique, les légumineuses ont une distribution cosmopolite dans les zones tropicales, subtropicales et tempérées. Elles couvrent d'immenses étendues et présentent une très grande diversité morphologique d'habitat et écologique, ce qui explique leur adaptation remarquable aux conditions pédo-climatiques les plus diverses (Rundel, 1989). On y trouve des arbres, la plupart exotique, des arbustes voire des plantes aquatiques, xérophytes et grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles (Wojciechowski *et al.*, 2004).

Morphologiquement, les espèces appartenant aux Fabacées sont caractérisées par des fleurs généralement hermaphrodites régulières ou irrégulières et elles présentent un point commun : leur fruit en forme de gousse, connu sous le nom de légume (Guignard et Dupont, 2004). L'une des propriétés importantes des légumineuses réside dans leur capacité à former des associations avec des bactéries du sol communément appelées rhizobia ou Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL) (Moulin, 2002 ; Zakhia *et al.*, 2004). Ces associations

"dites symbioses" aboutissent à la formation de petits organes particuliers, appelés nodules ou nodosités, sur les racines des plantes et parfois sur les tiges des plantes aquatiques. Dans les cellules de ces nodules, les bactéries transforment l'azote gazeux de l'air (N_2) en une forme combinée (Ammoniac: NH_3) directement assimilable par la plante. En contrepartie, la plante fournit les composés organiques, issus de la photosynthèse, nécessaires au métabolisme bactérien et à la réaction de fixation de l'azote (Wang *et al.*, 2012 ; Walker *et al.*, 2020).

2.1.2. Classification des légumineuses

La super-famille des légumineuses appartient à l'ordre des Fabales, sous-classe des Rosidés de la classe des Dicotylédones, sous embranchement des Anthophytes (Angiospermes), embranchement des Spermaphytes du règne végétal (Guignard, 2001). Selon le système de classification phylogénétique en vigueur APG II (Soltis et Soltis, 2013), basé sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles distinctes, les Caesalpinioideae (3%), les Mimosoideae (13%) et les Papilionoideae ou Faboideae (84%) (Polhill et Raven, 1981 ; De Faria *et al.*, 1989 ; Polhill, 1994 ; Yahara *et al.*, 2013 et Cardoso *et al.*, 2013). Des études phylogénétiques ont montré que les Papilionoideae et les Mimosoideae étaient monophylétiques alors que les Caesalpinioideae seraient paraphylétiques (Käss et Wink, 1996 ; Doyle *et al.*, 1997 ; Kajita *et al.*, 2001 ; Wojciechowski *et al.*, 2004 ; Lavin *et al.*, 2005 ; Bruneau *et al.*, 2008).

- Les espèces de la sous-famille des Papilionoideae, aussi connue sous le nom de Faboideae, constituent le groupe de végétaux supérieurs le plus abondant et le plus diversifié de la biosphère avec 764 genres, 28 tribus et environ 14000 espèces dont 8000-9000 herbacées et 4000-5000 ligneuses (Doyle and Luckow, 2003 ; Sprent, 2009). Elles sont cosmopolites et présentent l'aire de répartition la plus large chez les légumineuses, allant des tropiques à l'Arctique et des habitats terrestres secs à inondés (Schrire *et al.*, 2005). Leur fleur zygomorphe (irrégulière), prenant la forme d'un papillon facilement reconnaissable grâce à

ses 5 pétales caractéristiques : l'étendard (pétale large dressé au sommet), les ailes (pétales latéraux) et la carène (pétales inférieurs soudés). Cette sous-famille fournit à elle seule le grand nombre d'espèces cultivées (soja, arachide, pois chiche, luzernes, trèfles...).

- Les Mimosoideae sont la plus petite des sous-familles en termes de genres, mais renferment plus d'espèces que les Caesalpinioideae. Elles se composent de 3 tribus (*Acacieae*, *Ingeae*, *Mimoseae*), 78 genres et environ 3270 espèces (Sprent, 2009). Elles comprennent essentiellement des arbres et arbustes de milieux tropicaux et subtropicaux, voire tempérés chauds qui se caractérisent par leurs feuilles bipennées très composées et leurs petites fleurs régulières à symétrie radiale (actinomorphes), les étamines sont prépondérantes et les pétales réduits (Watson et Dallwitz, 1999 ; Lewis *et al.*, 2005).

- Les membres des Caesalpinioideae sont regroupés en 4 tribus (*Caesalpinieae*, *Cassieae*, *Cercideae* et *Detarieae*), comprenant 171 genres et environ 2250 espèces (Lewis *et al.*, 2005 ; Sprent, 2009). Ils sont majoritairement des arbres tropicaux ou subtropicaux même si certaines espèces se retrouvent en Amérique et Europe du Nord. Leurs feuilles sont généralement composées, pennées ou parfois bipennées et leurs fleurs sont légèrement irrégulières (zygomorphes) (Watson et Dallwitz, 1999), avec cinq pétales non assemblés en étendard, ailes et carène (Polhill et Raven., 1981 ; Sutherland et Sprent, 1993 ; Doyle, 1994).

Depuis 2017, une nouvelle classification des Fabacées est alors rapportée par The Legume Phylogeny Working Group. Cette classification, basée sur le gène *matK*, distingue six sous-familles : Caesalpinioideae (incluant le clade des Mimosoideae) avec 148 genres et environ 4400 espèces, Cercidoideae avec 12 genres et 335 espèces, Detarioideae avec 84 genres et 760 espèces, Dialioideae avec 17 genres et 85 espèces, Duparquetioideae avec 1 genre et une espèce, et Papilionoideae qui constitue la plus grande et la plus diversifiée avec 503 genres pour près de 14 000 espèces (Azani, *et al.*, 2017).

Les travaux d'Allen et Allen (1981) et de De Faria *et al.*, (1989) ont permis de mettre en évidence les relations existantes entre la présence ou l'absence de nodulation et le niveau d'évolution des espèces dans les différentes sous-familles. Bien que seulement 20% des légumineuses connues aient été examinées pour la nodulation, il ressort néanmoins que celle-ci est peu fréquente chez les Caesalpinoideae (30% des espèces examinées) et très fréquentes dans les deux autres sous-familles (90% des Mimosoideae et 97% des Papilionoideae) (De Faria *et al.*, 1989 ; Doyle et Luckow, 2003). Ces résultats conforteraient l'hypothèse que les Mimosoideae et les Papilionoideae auraient évolué séparément à partir des Caesalpinoideae, considérées comme étant la sous-famille la plus primitive des Fabacées. Il semblerait que la nodulation soit apparue à une étape tardive dans l'évolution de ce groupe (Young et Johnston, 1989 ; Sprent et Raven, 1992 ; Doyle, 1994 ; Cannon *et al.*, 2010).

2.1.3. Les légumineuses de la tribu des Genisteeae

Au sein des légumineuses Papilionoideae, les Genisteeae (Adans.) Benth., apparues il y a environ 30 millions d'années (Käss et Wink, 1995) et telles que définies par Polhill (1976) et réorganisées par Bisby (1981), représentent une tribu diversifiée comprenant environ 25 genres et 618 espèces (Stępkowski, 2018). Certaines études ont montré que cette tribu apparaît comme étant un groupe monophylétique, incluant les genres *Genista*, *Laburum*, *Lupinus*, *Ulex*, *Retama* et *Spartium* (Käss et Wink 1997 ; Crips *et al.* 2000 ; Pardo *et al.*, 2004).

Les Genisteeae sont principalement des arbustes ligneux qui sont essentiellement distribués en Europe et en Afrique du Nord, et la région méditerranéenne est considérée comme leur principal centre de diversification (Cristofolini et Feoli-Chiapella, 1984 ; Ainouche *et al.*, 2003). Cette tribu s'étend aussi aux îles Canaries, au nord de l'Europe et aux Amériques (pour le genre *Lupinus*). Elles représentent une grande signification écologiques dans les pays méditerranéens, car elles colonisent les forêts dégradées et caractérisent les paysages des

régions en déforestation (Pardo *et al.*, 2008 ; Lograda *et al.*, 2009). Les traits communs parmi les espèces de Genisteeae incluent : croissance xéromorphique, feuilles simples ou réduites ou, si les feuilles sont composées, elles ont peu de folioles, structure végétative et inflorescences contractées, fleurs élaborées, anthères dimorphes et graines produisant une extension du lobe hilare radicule (Crisp *et al.*, 2000).

2.1.3.1. Présentation de la plante d'étude : *Spartium junceum* (L.)

Spartium junceum (L.), nommé par les anglophones 'Spanish broom' ou 'Genêt d'Espagne', et en Algérie connu sous le nom de 'Tertak' ou 'Kessaba', appartient à la sous-famille cosmopolite des Papilionoideae et elle est la seule espèce de Fabacées du genre *Spartium* dans la tribu des Genisteeae (Stępkowski *et al.*, 2018).

Selon la base de données mondiale ILDIS sur les légumineuses 2010. (<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameCache=Spartium%20junceum&PTRefFk=8500000>), la classification du *S. junceum* (L.) suit le taxon suivant:

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliolipsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	Fabales (Bromhead)
Famille	<i>Fabaceae</i> (Lindl.)
Sous-famille	<i>Papilionoideae</i> (<i>Faboideae</i>)
Genre	<i>Spartium</i>
Espèce	<i>Spartium junceum</i> L.

Cette légumineuse est rencontrée dans les zones sèches et arides du pourtour méditerranéen dont la France méridionale, la Corse incluse, l'Europe méridionale, les îles Canaries, l'Afrique du Nord dont l'Algérie et dans les zones argileuses dans le Tell au Maroc et Asie occidentale (Angelini *et al.*, 2000 ; Travlos *et al.*, 2007 ; Katović *et al.*, 2011). Elle a été introduite dans de nombreux pays comme plante de jardin ou ornementale, souvent utilisée pour lutter contre l'érosion des sols (Bossard *et al.*, 2000) (Figure 5). Elle est

considérée comme une mauvaise herbe environnementale, quelque peu envahissante et se propage de manière agressive dans les régions arides aux sols pauvres, secs et rocheux (Zouhar, 2005 ; CAL-IPC, 2006).

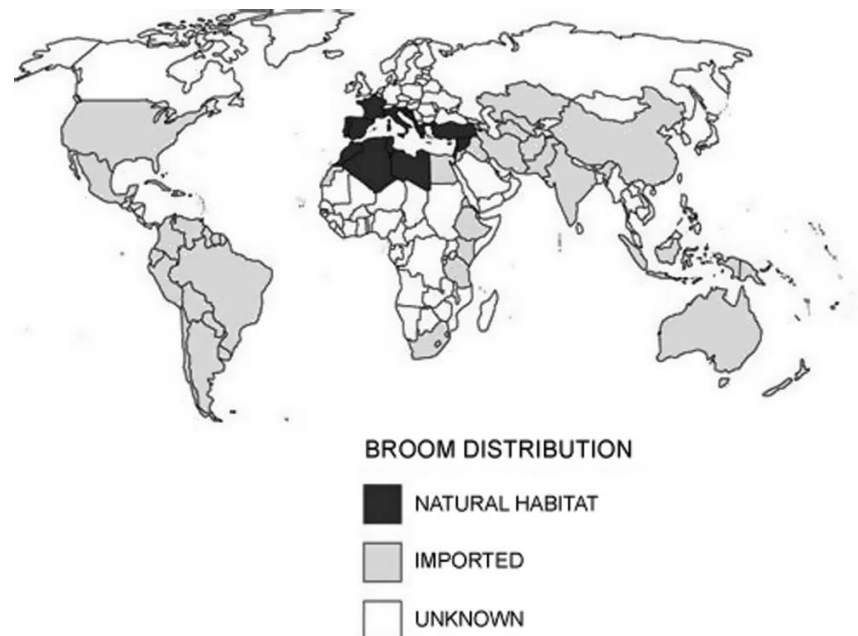


Figure 5 : Répartition mondiale du *Spartium junceum* (L.) (Katović *et al.*, 2011)

S. junceum (L.) se trouve le plus souvent dans les zones perturbées, comme le long des routes, sur les pentes en érosion et sur les berges (Busquets *et al.*, 2010 ; Preti et Giadrossich, 2009 ; Sanhueza et Zalba, 2012). Elle pousse le plus souvent dans les sols profonds, peu fertiles, très secs et rocheux de préférence bien drainés (Preti et Giadrossich, 2009 ; Sanhueza et Zalba 2012). Elle a une bonne tolérance aux sols chargés en sels et alcalis (Angelini *et al.*, 2013). Elle a également une caractéristique particulière de plantes xérophiiles et s'adapte parfaitement à la sécheresse et tolère le gel et des températures allant de 12 à 15°C, offrant une longévité et une viabilité exceptionnelles (Zouhar, 2005).

2.1.3.2. Caractéristiques botaniques de l'espèce *Spartium junceum* (L.)

Le Genêt d'Espagne est un arbrisseau, non épineux à souche ligneuse de 1 à 3 mètres qui peut atteindre parfois 4 à 5m (Katović *et al.*, 2011) (Figure 6). Cet arbuste a des racines

pivotantes ramifiées très profondes qui sont difficiles à enlever. Ses rameaux flexibles sont effilés et cylindriques (jonciformes), compressibles, finement striés, très glabres d'un vert glauque bleuâtre à vert plus foncé. Ses feuilles sont simples d'un vert bleuté, oblongues-lancéolées, entières, glabres en dessus, à poils appliqués en dessous et sont présents juste quelques semaines au printemps. Les fleurs (de 1 à 2 cm de diamètre) de couleur jaune vif qui dure plusieurs mois (du printemps à l'été). Elles sont grandes, odorantes et en grappes terminales. Elles sont hermaphrodites au calice membraneux formé d'une lèvre oblique refendue à 4 à 5 petites dents, corolle à 5 pétales, en bas deux étroits soudés formant la carène, deux latéraux nommés ailes, dressées en partie haute l'étendard, pétale large ovale arrondi et recurvé, 10 étamines retroussées au filet soudé en tube, un style dressé recurvé.

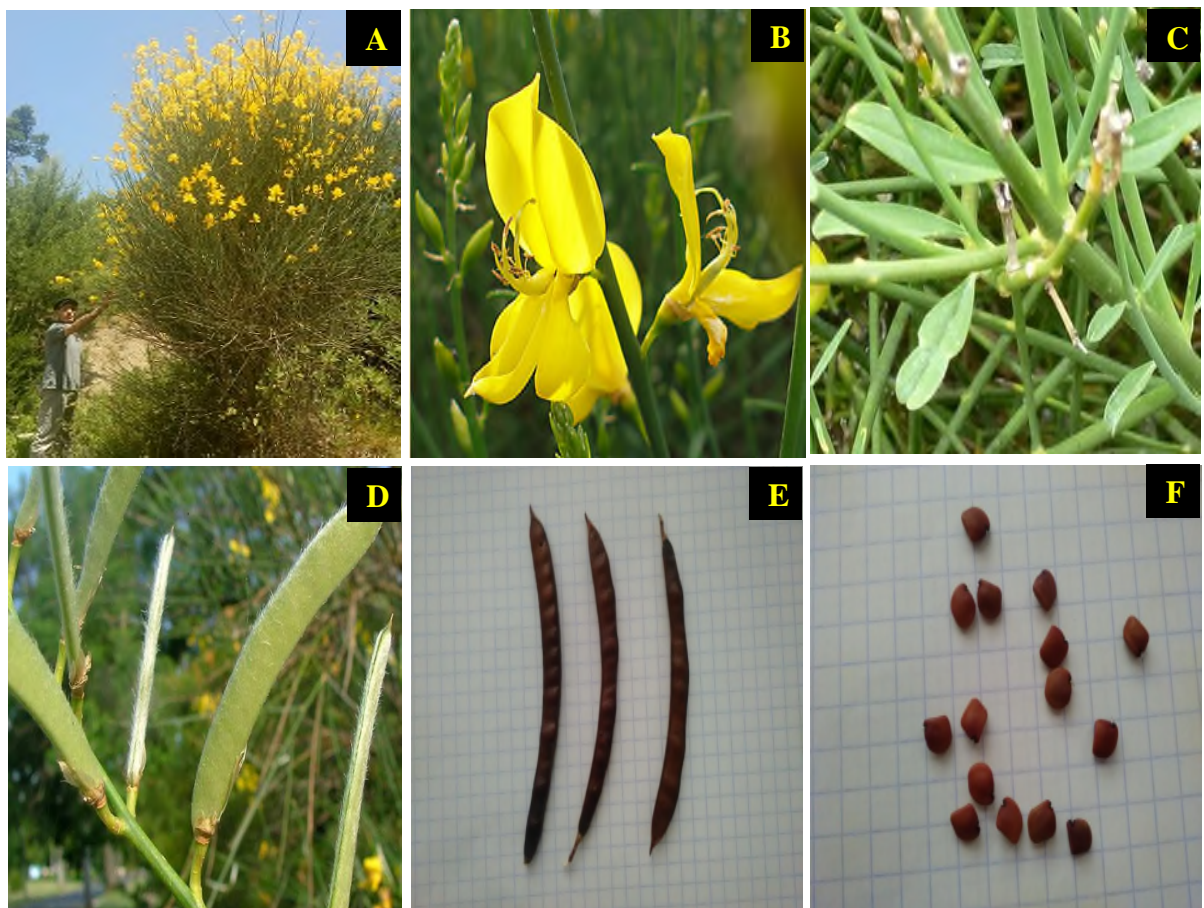


Figure 6 : Différentes parties de la plante *Spartium junceum* (L.)
(A : plante entière, B : fleurs, C : tiges, D : gosses vertes, E : gosses mûres, F : graines).

En été, la plante perd ses petites feuilles et assume une photosynthèse limitée, ce qui lui évite une évaporation excessive (Katović *et al.*, 2011). Elle porte de longues gousses atteignant jusqu'à 10 centimètres de long, presque glabres, aplaties, déhiscentes, oblongues, dressées d'un vert à reflets brillants, car elles sont légèrement velues virant progressivement au noir. À maturité, au moindre frôlement, elles s'ouvrent en projetant des graines réniformes (10 à 18) de couleur noire qui peuvent germer facilement sans traitement et produiront de 7000 à 10000 graines par plante et par saison (Wagner *et al.*, 1999 ; Zouhar, 2005).

2.1.3.3. Importances écologiques et économiques de *Spartium junceum* (L.)

S. junceum (L.) est l'une des espèces de légumineuses, qui malgré n'a pas la faveur d'être utilisée comme source d'alimentation puisque elle porte une certaine toxicité au niveau des fleurs et des graines (Barboni *et al.*, 1994 ; Colombo *et al.*, 2010), elle a néanmoins des intérêts économiques et écologiques, à savoir : la production de parfums et colorants à partir des fleurs, des paniers à partir des tiges et des matières textiles à partir des fibres (Kovačević *et al.*, 2012 ; Bischof et Kovačević, 2013). Ces mêmes fibres végétales, aujourd'hui sont utilisées dans les biocomposites du fait qu'elles présentent une résistance exceptionnelle (Kovačević *et al.*, 2017). De telles fibres couvrent également un large éventail d'applications dans l'industrie automobile, notamment dans le développement des intérieurs de voitures (tapis, garnitures sur la porte intérieure, housse pour la roue de secours) (Kovačević *et al.*, 2019). Mais le plus attirant de cette espèce est sa contribution à la protection de l'environnement et à la lutte contre la dégradation des écosystèmes. En effet, c'est une espèce pionnière très utilisée dans les stratégies de restauration pour récupérer les écosystèmes perturbés ou désertifiés, fixer les pentes érodées et instables ainsi que les talus routiers et autoroutiers (Herrera *et al.*, 1993 ; Barea *et al.*, 1996). Cette légumineuse arbustive est capable d'établir des symbioses fixatrices d'azote atmosphérique avec des rhizobia (Quatrini *et al.*, 2002 ; Cardinale *et al.*, 2008 ; Parker, 2014 ; Ramdani *et al.*, 2020) et contribue ainsi à

faire entrer l'azote atmosphérique sous forme organique dans les écosystèmes (Jackson *et al.*, 2008). Cette biofertilisation permet, d'une part, d'améliorer et restituer la fertilité des sols appauvris et promouvoir par la suite une dynamique d'établissement d'un écosystème plus stable en favorisant l'installation et la croissance d'autres plantes (Castro *et al.*, 2002 ; Gómez-Aparicio, 2009 ; Cardinale *et al.*, 2010 ; Alday *et al.* 2014). D'autre part, cette légumineuse offre des possibilités pour l'agronomie et la foresterie par son usage comme plante « pionnière » capable de coloniser des sols pauvres et érodés, jouant ainsi un rôle dans la préservation des écosystèmes, la stabilisation et la régénération des sols (Scippa *et al.*, 2006 ; Preti et Giadrossich, 2009) et dans la lutte contre l'érosion et la désertification des sols (Castro *et al.*, 2004 ; Bautista *et al.*, 2007).

2.2. Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL)

Beijerinck (1888) fut le premier à isoler une bactérie à partir des nodules racinaires, qu'il appela *Bacillus radicolica*. Par la suite, Frank en 1889 l'a dénommée *Rhizobium leguminosarum* (Kahindi, 1997 ; Terefework, 2002).

Rhizobia (rhizobiums) est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les légumineuses et de fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Moulin (2002) a proposé de substituer au terme « rhizobia » qui est un terme dérivé du nom de genre *Rhizobium*, le terme BNL ou Bactéries Nodulant les Légumineuses (Zakhia et al., 2004). En effet, il a été admis que les BNL appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* qui comportent en outre les genres : *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* ; parmi lesquels, seul un nombre limité de genres ont la capacité d'induire la formation des nodules et d'établir avec les légumineuses, et même certaines non-légumineuses (Ulmaceae du genre *Parasponia*) une association symbiotique qui se traduit généralement par la possibilité pour ces végétaux d'assurer leur nutrition azotée aux dépens de l'azote moléculaire (Giraud, 2007). Ces bactéries se présentent à l'état libre sous forme de bâtonnets à Gram négatif, relativement courts et arrondis à leurs extrémités, de taille moyenne (1.2 à 3 µm de long), non sporulantes et mobiles à l'état jeune par 1 à 6 flagelles. Elles sont aérobies strictes à tendance micro-aérophile, hétérotrophes et diazotrophes (fixatrices d'azote atmosphérique) (Jordan, 1984 ; MacLean et al., 2007).

2.2.1. Les concepts de base de la taxonomie des BNL

À l'état libre dans le sol, les rhizobia ne fixent pas l'azote atmosphérique et ils sont difficilement identifiables, car ils ne présentent aucune caractéristique culturelle, morphologique, physiologique ou biochimique permettant de les distinguer des autres bactéries (van Rhijn et Vanderleyden, 1995 ; Zakhia et de Lajudie, 2006). Seule la propriété d'infecter et d'induire chez les légumineuses la formation de nodosités racinaires et parfois

caulinaires, demeure un critère essentiel et absolu pour leur reconnaissance. Ainsi, la classification intra-générique des bactéries nodulant les légumineuses au niveau de l'espèce est basée en premier lieu sur les types de plantes hôtes ; c'est-à-dire une spécificité d'hôtes pour la formation des nodules (infectivité) (Broughton et Perret, 1999 ; Sawada *et al.*, 2003). En effet, une souche de rhizobia ne peut pas infecter et noduler indifféremment n'importe quel genre ou espèce de légumineuse. Des essais systématiques ont ainsi permis de définir des groupes dits d'inoculation croisée, dans lesquels on a rangé toutes les souches de rhizobia capables de noduler un ensemble donné de légumineuses et incapables d'induire la nodulation en dehors de ce groupe de plantes. De ce concept, est également établie la notion de groupe d'efficacité des souches qui fixent d'importantes quantités d'azote en association avec diverses espèces de plantes nodulées. Les plus connus de ces groupes d'inoculation croisée ont été élevés au rang d'espèces qui sont classées suivant leur vitesse de croissance *in vitro* sur le milieu YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth) (Zakhia et de Lajudie, 2001).

Dans la huitième édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan et Gibbons, 1974) et jusqu'aux débuts des années 1980, toutes les bactéries fixatrices d'azote isolées des légumineuses étaient classées en un seul genre *Rhizobium* avec six espèces : *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. lupini* et *R. japonicum* (Zakhia et de Lajudie, 2001) :

- *R. leguminosarum*, espèce regroupant toutes les souches de *Rhizobium* capables de contracter une symbiose avec les légumineuses des genres *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus* et *Vicia*;
- *R. trifolii*, espèce regroupant toutes les souches de *Rhizobium* capables de contracter une symbiose avec les légumineuses du genre *Trifolium* ;
- *R. meliloti*, espèce regroupant toutes les souches de *Rhizobium* capables d'établir la symbiose avec les légumineuses des genres *Melilotus*, *Medicago* et *Trigonella* ;

- *R. phaseoli*, espèce regroupant toutes les souches de *Rhizobium* capables de contracter une symbiose avec les légumineuses du genre *Phaseolus* ;
- *R. lupini*, espèce regroupant toutes les souches de *Rhizobium* capables d'induire la symbiose avec les légumineuses du genre *Lupinus* ;
- *R. japonicum*, espèce regroupant toutes les souches de *Rhizobium* capables d'induire la symbiose avec les légumineuses du genre *Glycine max.*

Sur la base de la vitesse de croissance *in vitro* sur le milieu YMB, les rhizobia ont été ensuite reclassés dans deux groupes (Jordan, 1982):

- **Groupe de rhizobia à croissance rapide** (Fast growing rhizobia), représenté par le genre *Rhizobium* dont le temps de génération est de 2 à 3 heures en milieu YMB et comporte *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. lupini*.

- **Groupe de rhizobia à croissance lente** (Slow growing rhizobia), représenté par le genre *Bradyrhizobium*, dont le temps de génération est supérieur à 6 heures en milieu YMB. Ce genre ne comprenait que trois espèces définies : *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982 et 1984), *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall et al., 1992) et *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu et al., 1995).

La séparation des rhizobia en deux groupes, en fonction de leurs vitesses de croissance, est confirmée par de nombreuses études utilisant la sérologie, la composition en polysaccharides extracellulaires, les besoins nutritionnels, le métabolisme, les pourcentages en nucléotides, l'hybridation ADN/ADN et l'analyse des ARN (Zakhia et de Lajudie, 2006).

2.2.2. Les concepts actuels de la taxonomie et de la phylogénie des BNL

On a longtemps considéré que les rhizobia, classées en biovars, étaient capables de ne noduler qu'un spectre limité d'hôtes. Toutefois, leur classification (taxonomie) actuelle, même si elle demeure essentiellement basée sur le concept de groupe d'inoculation croisée, a connu

ces dernières années de profonds remaniements grâce à l'essor de nouveaux outils moléculaires d'analyse de la biodiversité et l'isolement de nouvelles espèces de rhizobia associées aux légumineuses non-prises en compte auparavant. Ainsi, le concept d'inoculation croisée a montré ses limites et il a graduellement perdu sa fiabilité comme critère de classification car :

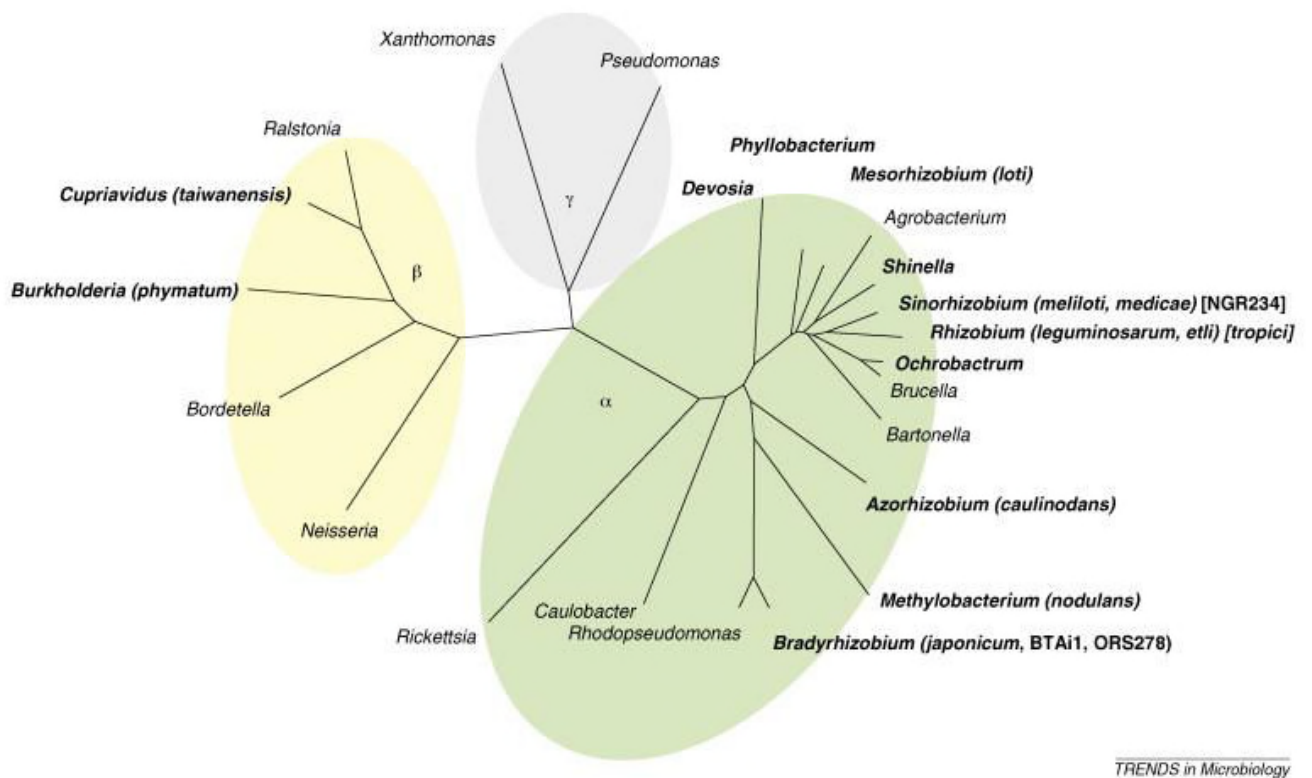
- il peut y avoir des transgressions de rhizobia d'un groupe d'inoculation croisée à un autre. En effet, une même BNL est capable de noduler un spectre d'hôtes plus ou moins large (Hernandez-Lucas *et al.*, 1995). C'est le cas notamment de la souche *Rhizobium* sp. NGR 234, isolée de *Lablab purpimus*, capable de noduler plus de 100 genres de légumineuses ainsi que la non- légumineuse *Parasponia* sp. (Pueppke et Broughton, 1999 ; Denison, 2000).

- il existe une hétérogénéité au sein d'un groupe. En fait, les techniques de taxonomie moléculaire ont permis de montrer qu'une même plante pouvait être nodulée par différentes espèces de rhizobia (Elkan, 1992 ; Sturz *et al.*, 1997).

L'abandon du spectre d'hôte, comme critère important pris en compte pour la définition des espèces et l'essor des méthodes modernes de biologie moléculaire ont ouvert de nouvelles voies pour les sciences de l'évolution et notamment celle des bactéries. Ces méthodes ont permis la publication des premiers arbres universels racinés avec les trois domaines, Archées, Bactéries et Eucaryotes (Woese *et al.*, 1990).

L'introduction de la taxonomie numérique, le développement d'algorithmes informatiques et l'analyse moléculaire de séquences multiloci (MLSA) de gènes de ménage tels que : ADNr 16S, *atpD* (ATP synthase), *recA* (recombinase A), *rpoB* (RNA polymérase), *glnI/glnA* (glutamine synthetase I), *glnII* (glutamine synthetase II), *thrC* (thréonine synthase), ont permis de distinguer de nouveaux genres et de décrire de nouvelles espèces de bactéries capables de noduler les légumineuses, et de réviser la phylogénie des BNL (Zakhia et de Lajudie, 2001 ; Berrada et Fikri-Benbrahim, 2014 ; Mousavi *et al.*, 2014 ; Mousavi *et al.*,

2015). Ainsi, sur la base du séquençage de l'ADNr 16S, plus de 200 espèces, réparties sur 18 genres sont récemment définis dans les classes α et β - Protéobacteria (de Lajudie *et al.*, 2019) (Figure 7). A l'intérieur d'autres genres bactériens d' α -Proteobacteria, des espèces nommées Alpha-rhizobia comme *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Aminobacter*, *Microvirga*, *Shinella* et *Phyllobacterium* sont aussi capables de former une symbiose avec des légumineuses (Willems, 2006; Maynaud *et al.*, 2012; Dwivedi *et al.*, 2015 ; Lindström et Mousavi, 2020). Le peu des γ -Proteobacteria décrites sont des bactéries associées aux nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004); alors que les légumineuses nodulées par les α - et β -Proteobacteria présentent une grande diversité (Balachandar *et al.*, 2007 ; Dwivedi *et al.*, 2015).



TRENDS in Microbiology

Figure 7 : Arbre phylogénétique non-enraciné de séquences d'ADNr 16S sélectionnées de α -, β - et γ -protéobactéries (d'après Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Les genres en caractères gras contiennent des rhizobia. Les souches ou espèces rhizobiennes dont les génomes ont été complètement séquencés sont indiquées entre parenthèses. Les séquences de génomes publiés sont celles de *C. taiwanensis*, *M. loti*, *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *A. caulinodans*, *Sinorhizobium* sp. strain NGR234, *B. japonicum* et *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 et ORS278.

2.3. Mécanismes impliqués dans l'interaction symbiotique

La symbiose entre les rhizobia et les plantes supérieures de la famille des légumineuses est le résultat d'interactions complexes, impliquant deux processus étroitement contrôlés par la plante : une infection bactérienne et la formation d'un nouvel organe, le nodule, dans lequel l'azote atmosphérique est réduit (Limpens et Bisseling, 2003).

2.3.1. Stratégie de nodulation Nod-dépendante

2.3.1.1. Etapes de la nodulation

L'interaction symbiotique se déroule à travers une série d'étapes de développement dont les modalités peuvent varier selon l'association considérée (Oldroyd, 2013). En général, les différentes phases du développement d'un nodule fixateur d'azote sont analogues chez la plupart des légumineuses tempérées et dont les grandes étapes sont détaillées ci-dessous et représentées dans la figure (Figure 8) :

a-Phase d'adsorption et de reconnaissance (pré-infection)

C'est la phase de chimiotactisme et d'attachement des rhizobia aux racines de l'hôte. Les rhizobia sont présentes dans le sol à l'état libre où elles se multiplient, mais ne peuvent fixer l'azote que lors d'associations symbiotiques avec une plante-hôte compatible. Elles sont attirées vers la rhizosphère des légumineuses par les composés organiques présents dans les exsudats racinaires. Ces composés, constitués d'acides aminés et organiques, de vitamines, d'hydrates de carbone, de bétaines et de composés phénoliques dont les flavonoïdes, peuvent servir aux bactéries soit d'attractants (chimiotactisme) soit de source de nutriment et d'énergie. En réponse à des signaux chimiques émis par la plante, les bactéries mobiles (rhizobia), colonisent les racines par l'intermédiaire des poils absorbants (Caetano-Anollés *et al.*, 1988 ; Kape *et al.*, 1991). Cette adhésion, qui se produit entre la plante-hôte et le microorganisme, est due à la présence dans les parois de chaque partenaire de composés spécifiques. Chez les bactéries ce sont des polysides appelés lipo-chito-oligosaccharides (LCOs) et chez la plante

supérieure, des glycoprotéines végétales appelées lectines (Dazzo *et al.* 1986 ; Diaz *et al.* 1989 ; Spaink et Carlson, 1996 ; Schultze et Kondorosi, 1998).

Les flavonoïdes, aussi bien que les bétaines et les acides erythronique et tetronique, constituent les premiers signaux de reconnaissance et de spécificité entre les deux partenaires de la symbiose (Gibson *et al.*, 2008 ; Mönchgesang *et al.*, 2016). Ils se fixent sur des facteurs de régulation issus de l'expression des gènes *nodD* des bactéries, qui codent pour des protéines régulatrices NodD en réponse aux inducteurs végétaux. L'activation de ces protéines conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (*nod*, *noe* et *nol*), qui codent des enzymes catalysant la synthèse de facteurs Nod (FNs), responsables de la reconnaissance de la plante-hôte et du déclenchement d'une succession d'événements provoquant dédifférenciation et division cellulaire conduisant à l'organogenèse et à la formation d'un nouvel organe racinaire, le nodule, au sein duquel les bactéries fixent l'azote atmosphérique au bénéfice de la plante hôte (Dénarié et Truchet, 1979 ; Dénarié *et al.*, 1996 ; Peters, 1997 ; Walker *et al.*, 2020).

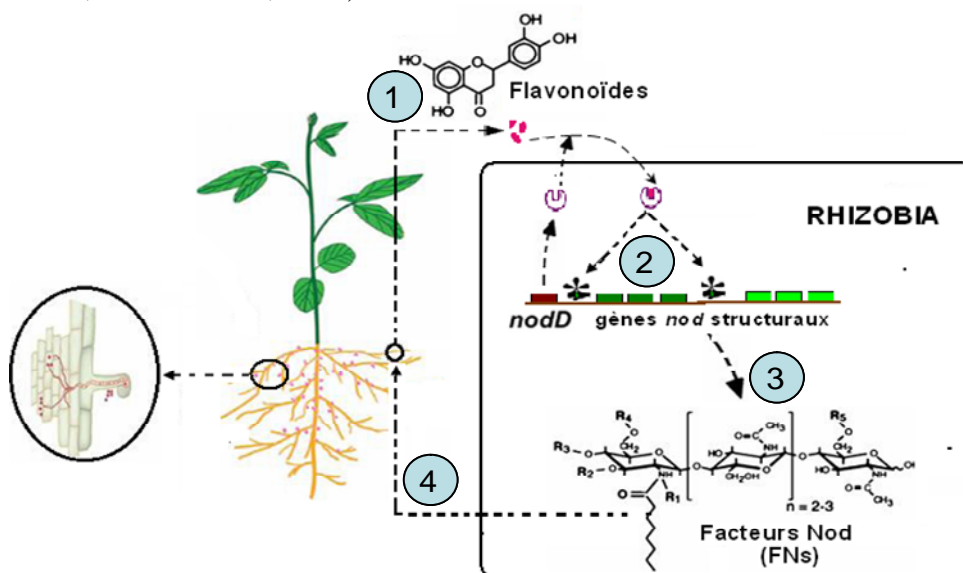


Figure 8 : Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose Légumineuse Nod-dépendant (Partiellement adapté de Lindström *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes produits par la plante hôte (1) induisent l'expression des gènes *nod* de rhizobia (2). Cela conduit à la production des facteurs Nod (3) qui vont eux-mêmes en retour induire la réponse de la plante et l'initiation de la colonisation par la bactérie (4).

Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire.

b- Phase d'infection ou de pénétration des BNL

Ce processus de déformation des poils racinaires, appelé phénotype **Had** (Hair deformation), est attribué à l'action localisée d'auxines végétales, plus particulièrement à l'acide indole acétique (AIA), qui est issu de l'oxydation par les rhizobia du tryptophane exsudé par les racines des légumineuses (Hirsch *et al.*, 1989 ; Hirsch, 1992 ; Wasson *et al.*, 2006).

Les flavonoïdes sont des molécules du métabolisme secondaire issues de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Leur synthèse a lieu dans la plupart des organes des plantes et ont des rôles variés comme par exemple la pigmentation des fleurs (anthocyanines), la défense en réponse aux pathogènes (phytoalexines), la germination du tube pollinique ou la signalisation symbiotique. Molécules composées de trois cycles aromatiques, il en a été découvert plus de 8000 (Tohge *et al.*, 2017). Elles sont classées suivant l'arrangement des cycles aromatiques qui les composent et des substitutions qu'ils portent. Les principales classes de flavonoïdes sont les Chalcone, Flavanone, Flava-3-ol, Flavone, Isoflavone, Flavonol et Anthocyanine (Taylor et Grotewold, 2005).

c- Invasion du cytoplasme des cellules corticales par les BNL

Les bactéries pénètrent dans les cellules hôtes par une invagination de la membrane plasmique des cellules du poil absorbant, soit à travers des lésions formées après hydrolyse des parois cellulaires par des pectinases et/ou des cellulases bactériennes, soit à travers les points de blessures ou de brèches occasionnées par des éléments extérieurs sur la paroi de l'épiderme du poil racinaire (Vance, 1983 ; Sprent et Raven, 1992). Simultanément, la plante-hôte met en place de nouvelles structures pariétales sous forme d'une structure tubulaire. Les bactéries en se multipliant, s'entourent d'une gaine cellulosique d'origine végétale, envahissent ce tube en donnant un cordon d'infection qui progresse jusqu'aux cellules du cortex racinaire où il se ramifie (Foucher et Kondorosi, 2000).

d- Division des cellules du cortex et formation d'un primordium nodulaire

Les bactéries sont libérées à l'intérieur des cellules corticales et induisent une reprise des mitoses et une dédifférenciation de certaines cellules de l'hôte en zone centrale (cortex) contenant les bactéries et en zone vasculaire périphérique (méristème nodulaire) ne renfermant pas de bactéries (Newcomb, 1981). Il se constitue ainsi une zone particulièrement favorable à une initiation méristématique dont l'activité va donner naissance à un primordium nodulaire ou pré-nodule (Brewin, 1991 ; van Rhijn et Vanderleyden, 1995 ; Cullimore et al., 2001). L'infection d'une cellule par le cordon d'infection est précédée d'un réarrangement du cytosquelette, d'un déplacement du noyau vers le centre de la cellule et de la formation d'une structure similaire à un phragmoplaste (van Brussel et al., 1992 ; Perret et al., 2000). De plus, il a été observé au cours de cette phase d'infection des variations de flux de Ca^{2+} , de protons, de pH, la dépolarisation de la membrane plasmique ainsi que la dépolymérisation de microfilaments (Ehrhardt et al., 1992 ; Allen et al., 1994).

e- Phase de développement du nodule et maturation des bactéries

Le cordon infectieux croît en direction du nodule primordium à l'intérieur duquel sont relarguées les bactéries. Il va se présenter sous la forme d'une excroissance du système racinaire et constitue le siège de la symbiose, le nodule, qui peut être souterrain (cas de la plupart des légumineuses) ou aérien (cas de *Sesbania rostrata*). À l'intérieur de cette structure, chaque bactérie, une fois libérée dans le cortex, est entourée d'une membrane de séquestration issue de l'hôte, appelée membrane pér bactéroïde et l'ensemble forme ce que l'on appelle le symbiosome (Udvardi et Day 1997 ; Ferguson et al., 2010).

Il existe deux types morphologiques de nodules en fonction de la forme et de l'activité méristématique : nodules indéterminés ou nodules déterminés. Ils sont formés généralement sur les racines des plantes comme c'est le cas chez les deux légumineuses modèles *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* (Hirsch, 1992 ; Pawlowski et al., 1996 ; Gibson et al., 2008 ;

Dupont *et al.*, 2012) et parfois sur les tiges comme dans le cas de l'interaction *Sesbania rostrata*-*Azorhizobium caulinodans* (Fernandez-Lopez *et al.*, 1998). Une illustration de ces différents types de nodules est présentée dans la figure 9.

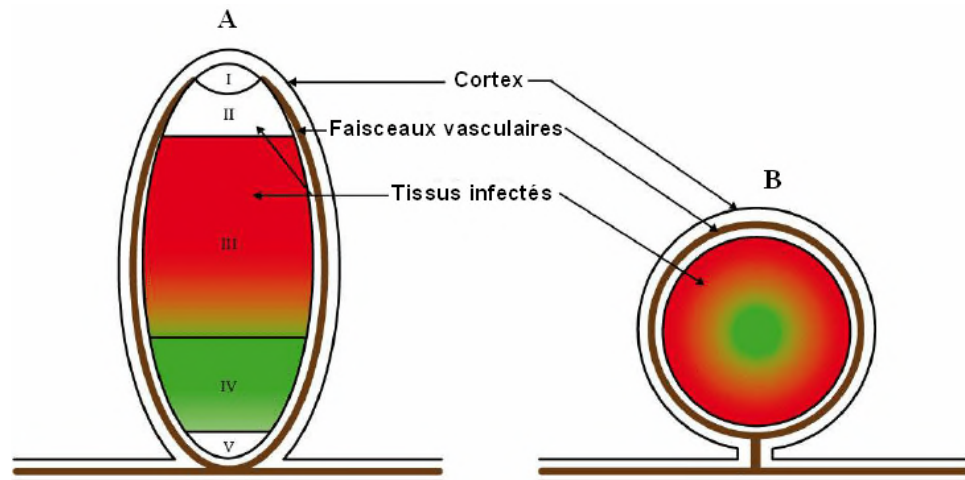


Figure 9 : Représentation schématique des nodules matures de légumineuses

(A) : Nodule de type indéterminé, (B) : Nodule de type déterminé.

I, zone méristématique; II, zone d'infection; III, zone de fixation d'azote; IV, zone de sénescence; V, zone saprophyte. (Dupont *et al.*, 2012)

Lors de la formation des nodosités de type déterminé (B), l'activité mitotique du cortex externe est éphémère, ce qui donne aux nodules leur forme sphérique ou arrondie dépourvue de méristème permanent (non persistant). Ces nodules sont surtout observés chez les légumineuses tropicales et sub-tropicales, comme le soja (*Glycine max*), l'arachide (*Arachis hypogea*), la pongamia (*Pongamia pinnata*) et l'haricot (*Phaseolus vulgaris*), mais comprennent également d'autres espèces tempérées telles que le lotier (*Lotus japonicus*) (Ferguson *et al.*, 2010). La zone centrale des nodules matures est globalement constituée d'une zone de fixation d'azote (zone III), c'est-à-dire de cellules au même stade de différenciation, plus ou moins infectées par les bactéroïdes fixateurs d'azote et d'une zone de sénescence (zone IV). Au cours de la sénescence, les nodules en décomposition libèrent des bactéroïdes dont la plupart peuvent revenir à un mode de vie libre et saprophyte (Dupont *et al.*, 2012).

Les nodosités de type indéterminé (A) possèdent une structure plus complexe que les nodosités de type déterminé. Elles se forment chez des espèces issues des régions tempérées, telles que la luzerne cultivée (*Medicago sativa*), le pois (*Pisum sativum*), le trèfle (*Trifolium repens*) et la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*). Elles sont formées à partir du cortex interne, généralement par les plantes utilisant la voie formant des cordons d'infection intracellulaires (Boogerd et van Rossum, 1997 ; Timmers *et al.*, 2005 ; Schumpp et Deakin, 2010). Du fait de la présence d'un méristème persistant à leur extrémité apicale, les nodosités indéterminées possèdent une forme allongée et cylindrique (Boogerd et van Rossum, 1997 ; Crespi et Galvez, 2000). Le nodule mature de ce type se différencie en cinq zones histologiques, établies d'après la structure des bactéries qu'elles renferment : la zone méristématique (I) exempt de bactéries, la zone d'infection (II) dans laquelle les cellules post-mitotiques entrent dans le programme de différenciation des nodules et où les cordons d'infection pénètrent dans les cellules végétales et libèrent les rhizobia, la zone de fixation (III) dans laquelle les bactéroïdes sont capables de fixer N₂, la zone de sénescence (IV) proximale radiculaire observée dans les nodules plus anciens, où les bactéroïdes ainsi que les cellules végétales sont dégradés et la zone saprophytique (V) (Vasse *et al.*, 1990 ; Dupont *et al.*, 2012).

f- Fixation de l'azote par les bactéroïdes

Les bactéries se multiplient activement et subissent des transformations morphologiques et physiologiques donnant des cellules irrégulières, plus volumineuses que les cellules végétatives appelées bactéroïdes (Sutton, 1981). Le maintien de ces bactéroïdes est influencé par des peptides du type NCRs (Nodules-specific Cystein-Rich). Les NCRs sont des peptides de défense extrêmement abondants dans les nodules de certaines légumineuses pouvant avoir un rôle positif ou négatif sur la vie intracellulaire des bactéroïdes (Czernic *et al.*, 2015 ; Arnold *et al.*, 2018 ; Walker *et al.*, 2020). C'est sous cette forme de bactéroïdes que les

rhizobia sont capables de synthétiser la nitrogénase et produisent conjointement avec la plante-hôte la leghémoglobine, une homoprotéine dont la partie protéique (globine) est synthétisée par la plante et la partie non-protéique (hème) secrétée par les bactéroïdes (Dénarié et Truchet, 1979, Dilworth, 1980). Cette hémoprotéine joue un rôle important dans la symbiose, car elle protège la nitrogénase des effets néfastes de l'oxygène tout en assurant aux bactéroïdes une oxygénation suffisante (Appleby, 1984 ; Guldner *et al.*, 2004).

2.3.1.2. Structure chimique des facteurs Nod

La structure des facteurs de nodulation (FNs) a été établie pour la première fois par Lerouge et ses collaborateurs en 1990 chez *Rhizobium meliloti*. Par la suite, cette structure a été élucidée chez d'autres rhizobia isolées de différentes légumineuses. Ce sont des lipo-chito-oligosaccharides (LCOs) constitués d'un squelette de base composé de 3 à 6 unités de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons β -(1 \rightarrow 4), et une chaîne d'acide gras fixée sur la fonction amine de la glucosamine terminale non-réductrice du squelette de chitine. Ces oligomères, de faible poids moléculaire, sont substitués par des groupes chimiques divers (fucose, carbamate, méthyle, arabinose, mannose, sulfate et acétate) présents sur les glucosamines situées aux deux extrémités (Downie et Walker, 1999 ; Spaink, 2000 ; Perret *et al.*, 2000 ; Downie, 2010) (Figure 11 et Tableau IV).

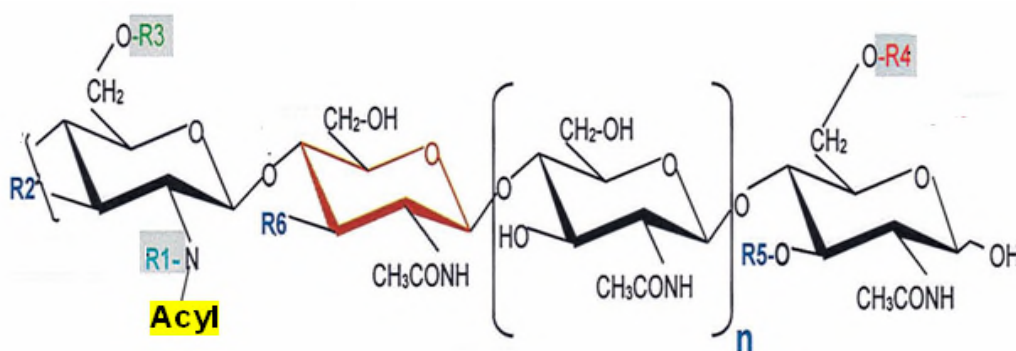


Figure 10 : Structure générale des facteurs Nod produits par les rhizobia (Perret *et al.*, 2000). La présence de substituants numérotés R1-R6 est variable au sein des souches de rhizobia.

La longueur et la saturation de la chaîne de l'acide gras ainsi que les différents substituants greffés sur le squelette du LCOs jouent un rôle-clé dans le spectre d'hôte des bactéries et constituent donc un deuxième signal déterminant la spécificité de reconnaissance entre les partenaires de la symbiose (Perret *et al.*, 2000).

Par ailleurs, il a été démontré que les extraits purifiés de facteurs Nod peuvent déclencher, spécifiquement chez les plantes-hôtes, et à de faibles concentrations (jusqu'à 10^{-12} M), des réactions similaires à celles qui sont observées après infection avec des bactéries entières : déformations des poils absorbants, division de cellules corticales racinaires et, dans certains cas, formation des nodosités vides de bactéries (Dénarié *et al.*, 1996 ; Downie, 2010).

Tableau IV : Variations de la structure des facteurs Nod (Perret et al., 2000).

Strains	Acyl	R1	R2	R3	R4	R5	R6	n
<i>A. caulinodans</i> ORS 571	C _{18:1} , C _{16:0}	Me	OH	Cb, H	Fuc, H	Ara, H	OH	1,2
<i>B. elkanii</i> USDA61	C _{18:1}	Me, H	Cb, H	Ac, H	MeFuc	H	OH	1,2
<i>B. japonicum</i> USDA110	C _{16:0} , C _{16:1} , C _{18:1}	H	OH	H	MeFuc	H	OH	2
<i>Rhizobium</i> sp. strain GRH2	C _{16:0} , C _{18:0} , C _{18:1} , C _{20:1}	Me, H	OH	H	S, H	H	OH	1, 2, 3
<i>Rhizobium</i> sp. strain ORS1645	C _{18:0} , C _{18:1}	Me	Cb ^c	Cb ^c	S, H	H	OH	2
<i>Rhizobium</i> sp. strain NGR234	C _{16:1} , C _{18:0} , C _{18:0}	Me	Cb, OH	Cb, H	MeFuc, AcMeFu, SMeFuc	H	OH	2
<i>R. etli</i> CFN42	C _{18:1}	Me	Cb, OH	H	AcFuc	H	OH	2
<i>R. etli</i> CE43	C _{18:0} , C _{18:1}	Me	Cb, OH	H	AcFuc	H	OH	2
<i>R. fredii</i> USDA191 ^b	C _{18:1} , C _{18:0} , C _{16:1}	H	H	H	Fuc, MeFuc	H	H	0, 1, 2
<i>R. fredii</i> USDA257	C _{18:1}	H	OH	H	Fuc, MeFuc	H	OH	0, 1, 2
<i>R. galegae</i>	C _{18:1} , C _{18:2} , C _{18:3} , C _{20:2} , C _{20:3}	H	OH	Cb	H	H	Ac	1
<i>R. huakuii</i> ^d	C _{18:4}	H	OH	H	S	H	OH	2
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843	C _{16:0} , C _{16:1} , C _{18:0} , C _{18:1} , C _{18:2} , C _{20:3}	H	OH	H, Ac	H	H	OH	0, 1, 2
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii LPR5045	C _{18:0} , C _{18:1} , C _{20:3} , C _{20:4}	H	OH	Ac	H	H	OH	2
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii RBI5560	C _{18:1} , C _{18:4}	H	OH	Ac	H	H	OH	1,2
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae TOM	C _{18:1} , C _{18:4}	H	OH	Ac	Ac	H	OH	1, 2
<i>R. loti</i> NZP2213	C _{16:0} , C _{16:1} , C _{18:0} , C _{18:1} , C _{20:0} , C _{20:1} , C _{22:1}	H	Cb	H	Fuc, AcFuc	H	Fuc	-1, 0, 1, 2
<i>R. loti</i> NZP2037	C _{18:0} , C _{18:1} , C _{16:1} , C _{16:2} , C _{16:3}	Me	Cb	Cb	AcFuc	H	OH	2
<i>R. meliloti</i> RCR2011	C _{16:1} , C _{16:2} , C _{16:3}	H	OH	H, Ac	S	H	OH	1, 2
<i>R. tropici</i> CFN299	C _{18:1}	Me	OH	H	S, H	H	OH	2
<i>S. saheli</i> ORS611	C _{16:0} , C _{18:1}	Me	Cb ^c	Cb ^c	Fuc, H	Ara, H	OH	2
<i>S. teranga</i> bv. acaciae ORS1602	C _{16:0} , C _{18:0} , C _{18:1}	Me	Cb ^c	Cb ^c	S, H	H	OH	2

^a Abréviations: **Ac**, acétyle; **Ara**, arabinosyle; **Cb**, carbamoylé; **Fuc**, fucosyl; **H**, hydrogène; **Me**, méthyle; **S**, sulfate; **MeFuc**, méthylfucose; **AcMeFuc**, méthylfucose acétylé; **SMeFuc**, méthylfucose sulfaté.

^b Dans l'USDA191, une fraction mineure de la *N*-acétylglucosamine marquée en brun est remplacée par un glucose.

^c Le groupe carbamoylé est sur R2 ou R3.

^d Les facteurs Nod de *R. huakuii* sont partiellement glycolylés à la position C-2 de l'extrémité réductrice.

2.3.1.3. Bases moléculaires de la nodulation

L'induction de nodules fixateurs d'azote chez une légumineuse est un phénomène contrôlé par une régulation hôte-spécifique de l'expression des gènes de nodulation des deux partenaires de la symbiose. Lors des étapes précoces de la symbiose, les substances émises par la légumineuse induisent chez les rhizobia, l'activation ou la répression de l'expression des gènes de nodulation. Plusieurs études ont permis d'identifier ces gènes chez les rhizobia. Ils sont classés en trois catégories, selon qu'ils soient communs à tous les rhizobia, spécifiques d'une espèce donnée ou des gènes régulateurs (Dénarié *et al.*, 1996 ; Long, 2001 ; Wais *et al.*, 2002 ; Downie, 2010).

✓ les gènes *nod* communs (*nod ABC*), aussi appelés gènes structuraux, sont présents chez les différentes espèces de rhizobia, à l'exception de certains *Bradyrhizobium* (Giraud *et al.*, 2007 ; Miché *et al.*, 2010). Ils sont nécessaires à la synthèse du squelette *N*-acétylglucosamine et à la fixation du fragment lipidique à l'extrémité non-réductrice des FNs. Ces gènes sont très conservés et interchangeables entre les espèces de rhizobia sans généralement affecter la gamme de légumineuses nodulées (Dénarié *et al.*, 1996 ; Wais *et al.*, 2002 ; Downie, 2010). La mutation d'un seul des gènes *nodABC* entraîne la perte de la capacité de la bactérie à déformer les poils absorbants (phénotype *Nod*⁻) ou à initier la division des cellules corticales de la plante. Le gène *nodC* code une β -(1→4)-*N*-acétyl-D-glucosaminyl transférase dont le rôle est de former le tétramère ou le pentamère de chitine à partir du précurseur UDP-GlcNAc. Le sucre terminal non-réducteur de l'oligomère de chitine est ensuite *N*-dé-acétylé par le produit du gène *nodB* (de-*N*-acétylase) et acylé à la même position par l'activité du gène *NodA* (*N*-acétyl transférase). Le produit de ces trois enzymes est une molécule lipo-chito-oligosaccharidique (LCOs) (Cleyet-Marel *et al.*, 1996).

✓ la gamme d'hôtes d'un rhizobia donné est déterminée par les gènes *hsn* (host specific nodulation gene) spécifiques de nodulation de la plante-hôte et de la structure exacte des FNs résultants. Ces gènes contribuent à la poursuite de la modification des extrémités réductrices et non-réductrices du squelette lipo-chito-oligosaccharidique des FNs. Ils ne sont pas nécessairement présents chez tous les rhizobia et ils sont non interchangeables (Sharma *et al.*, 1993). Dans le cas de *Sinorhizobium meliloti*, six gènes *nod* spécifiques à l'hôte (*nodL*, *nodE*, *nodF*, *nodP*, *nodQ* et *nodH*) sont responsables des substitutions trouvées sur ses FNs. La mutation d'un de ces gènes peut modifier le spectre d'hôte de la souche. Ainsi par exemple, des mutants de *R. meliloti* affectés sur le gène *nodH* n'ont plus le pouvoir de noduler leur hôte homologue, la luzerne (Nod⁻), mais peuvent alors noduler la vesce, un hôte hétérologue (Horvath *et al.*, 1987). Une acétyl transférase, codée par le gène *nodL*, contrôle l'ajout du groupement acétyle à l'extrémité non- réductrice du lipo-chito-oligosaccharide (Spaink *et al.*, 1991). Les gènes *nodE* et *nodF* codent une protéine de transport des acides gras et une β -kétol synthase respectivement, qui sont impliquées dans la biosynthèse de l'acide gras palmitoléique insaturé (C16 : 2). Après production de l'intermédiaire réactionnel du donneur de groupement sulfate par l'action des enzymes NodP et NodQ, la sulfotransférase NodH ajoute le groupement *O*-sulfate sur le sucre réducteur (Dénarié *et al.*, 1996).

✓ l'expression des gènes *nod* communs et des gènes *hsn* spécifiques est contrôlée par des gènes régulateurs appelés gènes *nodD*. Ces derniers sont présents en nombre de copies variables chez les *Rhizobiaceae* (Mulligan et Long, 1989). Bien que certaines espèces de rhizobia ne portent qu'une seule copie de *nodD*, de nombreuses espèces portent deux ou trois copies de *nodD* similaires mais non identiques (Rodriguez-Quinones *et al.*, 1987 ; Appelbaum *et al.*, 1988). *R. meliloti* possède trois exemplaires de *nodD*, désignés *nodD1*, *nodD2* et *nodD3*, ce qui constitue un avantage pour l'augmentation de

l'interaction avec la plante-hôte (Mulligan et Long, 1989 ; Schlaman *et al.*, 1992). Les protéines NodD, présentes chez les rhizobia, sont des facteurs de transcription de la famille LysR (Fisher *et al.*, 1988) ; elles activent la transcription des gènes de nodulation (*nod*, *noe* et *nol*) en se liant à des séquences d'ADN appelées *nod box*, situées en amont des gènes *nod*. Les protéines NodD n'exercent toutefois leur rôle d'activateurs transcriptionnels qu'en présence de flavonoïdes, présents dans les exsudats racinaires des plantes hôtes (Peters *et al.*, 1986 ; Long, 1989 ; Walker *et al.*, 2020).

2.3.2. Autres stratégies de nodulation

Depuis longtemps, la capacité à déclencher la formation de nodules a été identifiée chez la plupart des espèces de rhizobia au sein des α - et β -Protéobactéries. Ces bactéries utilisent la stratégie des facteurs Nod (FNs), produits sous le contrôle des gènes de nodulation bactérien qui sont activés par les flavonoïdes végétaux (Perret *et al.*, 2000 ; Oldroyd, 2013). Cependant, depuis la découverte que certaines souches photosynthétiques de *Bradyrhizobium*, dans lesquelles les gènes *nodABC* n'ont pas été détectés et sont capables de noduler certaines espèces d'*Aeschynomene* (*A. sensitiva* et *A. indica* par exemple) (Giraud *et al.*, 2007 ; Chaintreuil *et al.*, 2013 ; Fabre *et al.*, 2015), laisse indiquer l'existence d'autres stratégies supplémentaires aboutissant à la nodulation (Masson-Boivin et Sachs, 2018).

Un exemple de stratégie alternative fait intervenir les systèmes de sécrétion de type III, de type IV et de type VI (aussi appelés T3SS, T4SS, T6SS) chez les rhizobia (Figure 10). Ces systèmes initialement identifiés chez les agents pathogènes, animaux et végétaux, permettent la sécrétion de molécules effectrices à l'intérieur des cellules hôtes qui suppriment le système de réponse de défense des plantes et favorisent l'infection (Hueck, 1998 ; Hubber *et al.*, 2004 ; Bartsev *et al.*, 2004 ; Nelson et Sadowsky, 2015 ; Ryu, 2015 ; Bernal *et al.*, 2018). Ils sont largement présents dans les rhizobia, où ils sont généralement contrôlés par les protéines régulatrices NodD, suggérant que ces systèmes ont été sélectionnés par les rhizobia Nod-

dépendant à des fins symbiotiques au cours de l'évolution (Sugawara *et al.*, 2013 ; Okazaki *et al.*, 2016).

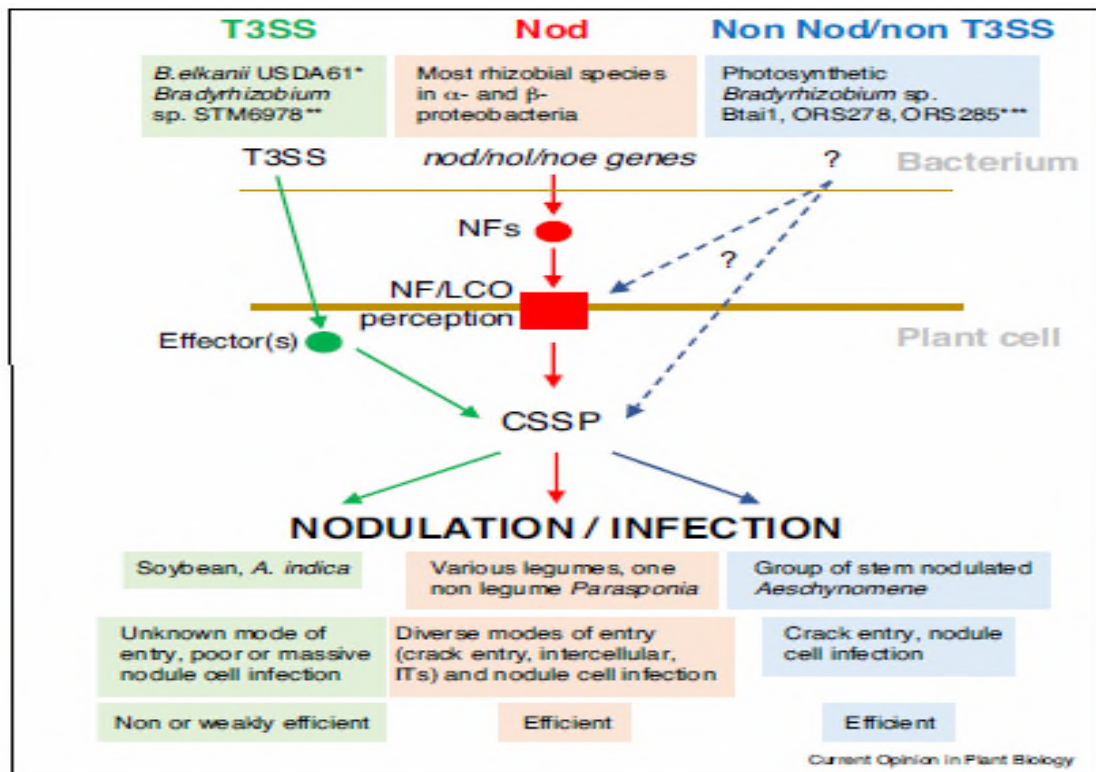


Figure 11 : Les différentes stratégies de nodulation chez les symbiotes de légumineuses (Masson-Boivin et Sachs, 2018).

En vert, la stratégie faisant intervenir le T3SS et des effecteurs bactériens. **En rouge**, la stratégie commune utilisant les facteurs Nod. **En bleu**, la stratégie non-Nod/non-T3SS.
CSSP : Common Symbiotic Signaling Pathway (voie commune de signalisation de la symbiose).
A : *Aeschynomene*. **IT** : Infected Thread (Cordon d'infection).

Certaines souches de rhizobia, telles que *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 et *Bradyrhizobium* sp. STM6978, sont capables de libérer dans la plante des effecteurs bactériens *via* leur système T3SS. En absence de facteurs Nod, ces effecteurs sont capables d'activer la voie de signalisation symbiotique commune (CSSP : Common Symbiotic Signaling Pathway) et d'établir une symbiose fixatrice d'azote (Okazaki *et al.*, 2013, 2016). Une autre stratégie, génétiquement non caractérisée, a permis de mettre en place une symbiose fixatrice d'azote sans faire intervenir les facteurs Nod, ni les fonctions du T3SS, mais elle emprunte la voie de signalisation commune (CSSP).

Depuis cette découverte, *Aeschynomene evenia* est apparu comme une nouvelle légumineuse modèle pour l'étude et la compréhension des mécanismes moléculaires d'un processus symbiotique alternatif indépendant des facteurs Nod (Chaintreuil *et al.*, [2016](#)).

Matériel et Méthodes

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

1. SITES D'ÉCHANTILLONNAGE

L'étude a été menée sur les bactéries isolées à partir des nodules racinaires de *S. junceum* (L.) collectés *in natura*. Après une prospection réalisée à travers les différents espaces géomorphologiques de la région de Béjaia (Nord-est d'Algérie), quatre (04) sites ont été retenus pour l'échantillonnage du matériel végétal (nodules, gousses et graines) et des sols. Il s'agit d'Adekar ($36^{\circ}43'25.10''\text{N}$; $4^{\circ}34'54.56''\text{E}$, 718 m d'altitude), de Barbacha ($36^{\circ}43'33.29''\text{N}$; $4^{\circ}58'21.76''\text{E}$, 721 m d'altitude), de Semaoune ($36^{\circ}37'35.32''\text{N}$; $4^{\circ}49'26.20''\text{E}$, 200 m d'altitude) et de Sidi-Aïch ($36^{\circ}35'33.80''\text{N}$; $4^{\circ}40'11.80''\text{E}$, 111 m d'altitude) (Figure 12). Le choix de ces stations est motivé essentiellement par les critères suivants : l'aire de répartition et l'abondance de cette légumineuse. La région de Béjaia fait partie de l'étage bioclimatique humide et bénéficie d'un climat tempéré, caractéristique des zones méditerranéennes. Elle se caractérise par des étés chauds et secs et des hivers doux et humides. Elle est parmi les régions les plus arrosées d'Algérie. Pendant l'année, la température moyenne est de 16.9°C et les précipitations annuelles sont en moyenne de 739 mm. Sur les hauteurs (Adekar, Barbacha), le climat est beaucoup plus rude, avec parfois des températures négatives et une neige abondante l'hiver et des étés chauds.

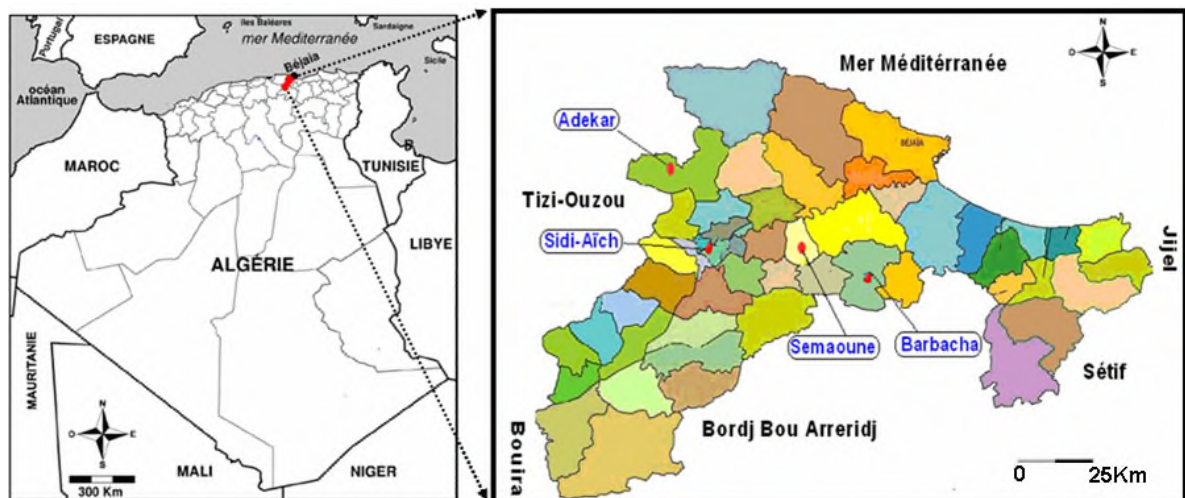


Figure 12 : Localisation des sites d'échantillonnage des nodules, des gousses de *S. junceum* (L.) et des sols de la région de Béjaia.

Les racines de *S. junceum* (L.) ont été retirées délicatement du sol selon la technique de Vincent (1970), elles sont ensuite débarrassées manuellement de l'excès de sol lié. Des fragments de racines de 2 à 3 cm de long, contenant des nodules frais non endommagés sont placés dans des tubes contenant un agent dessiccateur (granulés du CaCl_2) surmonté du coton, puis transportés au laboratoire. Dans chaque site, des échantillons de sols ont été recueillis à proximité immédiate de la plante à une profondeur de 0-25 cm. Ils sont ensuite recueillis dans des sachets en plastique et acheminés au laboratoire pour analyse. Enfin, les gousses mûres contenant les graines de *S. junceum* (L.) ont également été prélevées directement sur les sites d'échantillonnage en période d'été et conservées à 4°C.

2. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS

Les sols prélevés des stations d'étude sont séchés à l'air libre, broyés et passés à travers un tamis à mailles rondes de 2 mm de diamètre. Les fractions fines de terre obtenues ont subi des analyses physico-chimiques dans le but de déterminer leurs principales propriétés pédologiques. Les analyses des sols sont effectuées selon les techniques pédologiques utilisées au Centre d'Etudes Phyto-sociologique et Ecologiques Louis Emberger, France.

2.1. Détermination de la texture

La texture des sols est déterminée par la méthode internationale modifiée par l'emploi de la pipette de Robinson. Après destruction de la matière organique par l'eau oxygénée (20V) et dispersion des ions flocculant par le pyrophosphate de sodium (40g/l), les différentes particules classées selon l'échelle d'Atteberg ont été prélevées au cours de la sédimentation selon la loi de Stokes. Ainsi, les particules les plus fines : les argiles ($\varnothing < 2\mu\text{m}$) et les limons fins ($2\mu\text{m} < \varnothing < 50\mu\text{m}$) sont prélevés par la pipette de Robinson. Les particules de diamètre $> 50\mu\text{m}$ sont récupérées après élimination des fractions fines par siphonage puis séchées à l'étuve à 105°C. Les limons grossiers ($50\mu\text{m} < \varnothing < 200\mu\text{m}$), les sables fins ($200\mu\text{m} < \varnothing < 500\mu\text{m}$) et les sables

grossiers ($500\mu\text{m} < \varnothing < 2\text{mm}$) sont séparés par tamisage et la classe texturale des sols est déterminée par le triangle de texture conçu par USDA (1954).

2.2. Dosage de l'azote total

L'azote total du sol est dosé par la méthode Kjeldahl. L'azote organique du sol est transformé en azote ammoniacal sous l'action de l'acide sulfurique concentré, à chaud et en présence d'un mélange catalyseur renfermant du sélénium. Dans ces conditions, l'azote organique se trouve sous forme de sulfate d'ammonium. Celui-ci est neutralisé par NaOH (40%), puis distillé grâce à l'appareil de type VELD (UDK 142). L'ammonium libéré par entraînement à la vapeur d'eau est recueilli dans une solution d'acide borique (H_3BO_3 à 4%) et titré à froid à l'aide d'une solution d' H_2SO_4 (N/50) en présence de l'indicateur de Tashiro.

2.3. Dosage du carbone total

Le dosage de la matière organique du sol est effectué selon la méthode Anne modifiée (1945). Le carbone de la matière organique du sol est oxydé à chaud en CO_2 par un mélange de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (8%) et de H_2SO_4 concentré. L'excès de bichromate est dosé à froid par une solution de sel de Mohr (0,2N) en présence de NaF et de diphénylamine. Le taux de matière organique (MO) est déterminé en multipliant le pourcentage du carbone organique (C%) par un facteur de 1.72 ($\text{MO}\% = \text{C}\% \times 1.72$).

2.4. Dosage du phosphore assimilable

Le phosphore (P) assimilable des sols est dosé selon la méthode Olsen (Jackson, 1958). L'extraction du P est réalisée avec une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO_3 , 0.5M et à pH 8.5) dans un rapport prise d'essai/volume d'extraction ($m/v = 1/20$). Le dosage du P extrait est basé sur la formation et la réduction d'un complexe phospho-molybdique formé sous l'effet de la chaleur qui, en présence du chlorure stanneux (SnCl_2), développe une coloration bleue susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde $\lambda = 660 \text{ nm}$.

2.5. Détermination du pH

La mesure de l'acidité des sols est effectuée sur une suspension aqueuse dont le rapport sol/solution = 1/2.5, soit dans l'eau (pH_{eau} ou acidité actuelle), soit dans des solutions normales de KCl (pH_{KCl} ou acidité potentielle), à l'aide d'un pH-mètre à lecture directe préalablement étalonné.

2.6. Dosage du calcaire total

Les teneurs des sols en calcaire total (CaCO_3) sont déterminées par la méthode gazométrique. Les carbonates de calcium (CaCO_3) sont décomposés par l'HCl (dilué au 1/2), les volumes du CO_2 dégagé sont recueillis dans un tube gradué et mesurés à l'aide d'un calcimètre de Bernard, préalablement étalonné par l'attaque à l'HCl de quantités connues de CaCO_3 pur. Ainsi, les volumes de CO_2 dégagé sont proportionnels aux quantités de carbonates de calcium présents dans le sol.

2.7. Mesure de la conductivité électrique (C_E)

La conductivité électrique (C_E) d'un sol nous renseigne sur sa teneur globale en sels dissouts. Elle est mesurée sur un extrait aqueux dont le rapport sol/eau = 1/5 au moyen d'un conductimètre et exprimée en $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ à 25°C.

3. ISOLEMENT DES BACTERIES A PARTIR DES NODULES

Pour l'extraction, l'isolement, la purification et la conservation des souches bactériennes, les méthodes adoptées sont celles préconisées par Vincent (1970) et par Somasegaran et Hoben (1994).

3. 1. Désinfection des nodules racinaires

Au laboratoire, les nodules secs sont détachés des racines à l'aide d'un scalpel de leur point d'attache, ensuite réhydratés pendant une nuit à l'eau distillée puis séchés avec du papier filtre. Ils ont été désinfectés superficiellement par immersion dans un bain d'éthanol à 75° pendant 30 secondes, suivie d'un bain d' HgCl_2 acidifié à 0.1% pendant 3 minutes. Les

nodules ont été ensuite rincés abondamment avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace de mercure pouvant compromettre la croissance des bactéries.

3.2. Extraction des bactéries des nodules

Sitôt désinfecté, chaque nodule est écrasé en conditions d'asepsie dans un tube Eppendorf contenant 50µl d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl) à l'aide d'un piston pellet bleu en polypropylène stérile (Merck Eurolab). Le broyat nodulaire obtenu est alors ensemencé par stries sur boîtes de Pétri contenant le milieu Yeast Extract Mannitol Agar (YEMA) additionné de rouge Congo (0.0125%) (Annexe I) (Vincent, 1970). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant plusieurs jours pour permettre la croissance des rhizobia à croissance lente.

3.3. Purification et conservation des bactéries

Les colonies bactériennes présumées appartenir aux rhizobia, ayant absorbé peu ou pas de rouge Congo et reconnaissables par leur aspect gommeux et translucide, sont isolées et purifiées par repiquages successifs sur le milieu YEMA. La pureté des colonies est vérifiée également par observation au microscope photonique des cellules bactériennes à l'état frais et après coloration de Gram. Au terme de cette purification, les souches bactériennes sont conservées à 4°C dans des tubes à essai contenant le milieu YEMA incliné, additionné de 3g/l de CaCO₃ (utilisé comme un agent neutralisant l'acidité du milieu) et à -80°C dans des tubes de cryoconservation stériles contenant du glycérol à 20%.

4. CARACTERISATION SYMBIOTIQUE DES BACTERIES

4.1. Test de nodulation et d'efficacité

La capacité d'infecter les racines de certaines légumineuses et d'y provoquer l'apparition de nodules reste le seul critère de base pour vérifier l'appartenance d'une souche aux BNL ou rhizobia (Vincent, 1970 ; Beck *et al.*, 1993). Ainsi, la capacité infective de nos isolats a été évaluée par la présence de nodules observables sur les racines de *S. junceum* (L.) (Somasegaran et Hoben, 1994).

4.1.1. Préparation des plantes axéniques

4.1.1.1. Désinfection et germination des graines

Pour lever l'inhibition tégumentaire, les graines de *S. junceum* (L.) sont scarifiées à l'aide du papier verre, puis traitées à l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) pendant 30 minutes, ensuite rincées abondamment à l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace d'acide. Au dernier lavage, les graines sont laissées gonfler pendant 3 heures afin d'éliminer celles qui flottent jugées mauvaises, seules les semences saines sont déposées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée stérile à 1% (*m/v*) et mises à germer à 25°C à l'obscurité jusqu'à l'apparition des radicules.

4.1.1.2. Culture des plantes

Les plantules dont la longueur des radicules atteint 2 à 3 cm sont transférées stérilement dans des flacons sérum de 250 ml contenant le milieu Fahraeus semi-solide (0,8%) stérile (Fåhraeus, 1957), à raison d'une plantule/flacon. Les dispositifs de germination sont bouchés au coton cardé et la partie inférieure des flacons est recouverte avec du papier aluminium afin d'assurer l'obscurité nécessaire au développement des racines.

4.1.1.3. Inoculation des plantes

Trois jours après transfert, les flacons contenant les plantes sont inoculés avec 1ml d'une suspension bactérienne renfermant environ 10⁸ bactéries/ml de chacune des souches utilisées. Ces inocula proviennent de la centrifugation (5000 tours/min, pendant 10 minutes) de cultures en phase exponentielle de croissance sur milieu YEMB. Les cellules bactériennes sont lavées et remises en suspension dans de l'eau physiologique (0.9%) et leur magnitude numérique est évaluée sous un microscope à l'aide d'une chambre de comptage de type Malassez (profondeur 0.01 mm).

Les dispositifs de germination ainsi préparés sont placés dans une chambre de culture à une température de 25°C le jour et 18°C la nuit, avec une photopériode de 16/8 heures

jour/nuit et une humidité relative de 60 à 70%. Deux témoins de plantes non inoculées ont été préparés : l'un recevant 10 mM de KNO₃ comme témoin positif et le second en tant que témoin négatif avec seulement le milieu Fahraeus exempt d'azote.

4.2. Performance symbiotique des isolats bactériens

Après douze semaines de culture, les plantes ont été retirées des flacons en prenant soin de ne pas endommager leur système racinaire. Ensuite, les parties aériennes (tiges et feuilles) des plantes sont séparées des racines au niveau du nœud cotylédonaire. Les racines sont lavées à l'eau courante et examinées pour détecter la présence de nodules. S'ils sont présents, les nodules sont dénombrés (NN).

Les parties aériennes des plantes ayant contracté la nodulation sont séchées dans une étuve à 65°C et leurs poids de matière sèche (PMS) ont été déterminés par pesée. Les parties aériennes sèches du végétal ont été réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur à billes et leurs teneurs en azote total (NT) sont déterminées par la méthode de Kjeldahl (Bremmen et Mulvaney, 1982).

La performance symbiotique des isolats bactériens ayant induit la nodulation chez leur plante hôte d'origine, par rapport au témoin positif, a été évaluée en calculant le pourcentage d'efficacité symbiotique (%ES) défini par Beck et al. (1993) comme :
$$\%ES = \frac{PSPI}{PSPFNI} \times 100.$$

Avec : *PSPI*, poids secs des plantes inoculées et *PSPFNI*, poids secs des plantes fertilisées et non inoculées. Ainsi, les isolats ont été évalués très efficaces (ES > 80%), efficaces (50-80%), moins efficaces (35-50%) ou inefficaces pour ES <35%.

4.3. Traitement statistique des données

Le dispositif expérimental adopté était en blocs aléatoires complets. Les valeurs des paramètres de croissance : PMS (poids de matière sèche des parties aériennes) et NT (azote total des parties aériennes) et celles liées à la nodulation NN (Nombre de Nodules/plante) représentent les moyennes de trois répétitions. L'analyse des données a été réalisée par

ANOVA à un seul facteur à l'aide du logiciel XLSTAT 2016, version 2.0. Le test de Tuckey HSD a été utilisé pour la comparaison des moyennes lorsque l'analyse de variance révèle des différences significatives entre les traitements, au seuil de probabilité de 5%. Les relations entre les différents paramètres analysés ont été déterminées par l'analyse des coefficients de corrélation de Pearson.

5. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BNL

Les souches authentifiées par le test de nodulation ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique par une série de tests morphologiques, biochimiques et physiologiques selon les recommandations du IBP (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994) et la méthodologie préconisée par l'American Society for Microbiology (Smibert et Krieg, 1984).

5.1. Détermination des caractères morphologiques

5.1.1. Morphologie des colonies

Les caractéristiques morphologiques des colonies sont étudiées à travers la forme, la taille, le contour, l'aspect, la couleur, l'opacité, la pigmentation, l'élévation et la mucoïdité. Cette description est déterminée sur des colonies obtenues sur le milieu YEMA après 7 jours d'incubation à 28°C.

5.1.2. Morphologie des cellules bactériennes

La forme, la taille, la mobilité et la présence des granules de poly- β -hydroxybutyrate (PHB) ont été déterminées par observation au microscope photonique à l'état frais d'une suspension bactérienne obtenue sur le milieu YEMB. La coloration de Gram est celle préconisée par Vincent (1970). Elle consiste à traiter les bactéries par une solution de cristal violet, suivi d'un mordantage au lugol et d'un rinçage à l'eau distillée. Les cellules bactériennes sont ensuite contrastées par une solution aqueuse de safranine.

5.2. Etude de la croissance bactérienne

5.2.1. Préparation des inocula bactériens

Les pré-cultures des bactéries sont réalisées à partir des colonies âgées de 7 jours dans 5ml de milieu YEMB, incubées sous agitation à 28°C (170 rpm/min). Pour amplifier la culture, 1ml de chaque pré-culture est introduit dans 30 ml de milieu YEMB réparti en erlenmeyer de 100 ml. Après une incubation de 7 jours à 28°C sous agitation, les cultures sont centrifugées à 4500 tours/min pendant 20 minutes. Les culots ainsi recueillis sont lavés deux fois avec de l'eau physiologique stérile (KCl, 0.9%) afin d'éliminer toute trace du milieu. Les culots sont suspendus dans 20 ml d'eau physiologique stérile. Un dénombrement direct des bactéries en suspension est réalisé à l'aide d'une cellule de comptage de type Malassez (profondeur 0.01 mm). Ces suspensions bactériennes sont ensuite ajustées de façon à obtenir une densité finale de 10^6 cellules/ml.

5.2.2. Mesure de la croissance bactérienne

L'étude de la croissance des bactéries est suivie dans le milieu YEMB, renfermant du mannitol comme seule source de carbone et d'énergie. Le milieu est réparti à raison de 100 ml par erlenmeyer de 250 ml. Il est ensuite inoculé par des suspensions bactériennes ajustées à une densité optique de 0.1 ($\lambda = 600$ nm), puis incubé sous agitation à 28°C. La croissance bactérienne est évaluée par la mesure de DO à 600nm sur des prélèvements effectués chaque 6 heures.

Les paramètres de croissance de nos souches, à savoir : le temps de génération (**G**) et le taux de croissance(**μ**) sont calculés selon les équations suivantes :

$$G = \frac{\log DO_f - \log DO_i}{t_f - t_i} \quad \text{et} \quad \mu = \frac{0,693}{G}$$

Avec :

G : Temps de Génération (h) ; **μ** : Taux de Croissance (h^{-1}) ; **DO_f** : Densité Optique finale ; **DO_i** : Densité Optique initiale ; **t_f - t_i** : Intervalle de temps.

5.3. Détermination des caractères biochimiques

5.3.1. Test au bleu de bromothymol (BTB)

Ce test permet de vérifier la capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YEMA et de distinguer les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) de celles à croissance rapide (genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...) (Jordan, 1984). Il est réalisé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu YEMA additionné de bleu de bromothymol à une concentration de 0.0025% (*m/v*). Les boîtesensemencées par les souches bactériennes ont été mises en incubation à 28°C pendant 5 à 7 jours. Le virage du milieu au jaune indique l'acidification du milieu, caractéristique des bactéries à croissance rapide ; alors que le virage du milieu au bleu indique l'alcalinisation du milieu, caractéristique des bactéries à croissance lente.

5.3.2. Mise en évidence de quelques enzymes

L'activité de la catalase est mise en évidence selon la technique classique de Kovacs qui emploie l'eau oxygénée à 11 volumes, tandis que celle de l'oxydase est recherchée à l'aide d'un papier réactif imprégné d'oxalate N-diméthylparaphénylènediamine sur des colonies bactériennes obtenues sur le milieu YEMA. La β -galactosidase est révélée par l'emploi de disques imprégnés d'orthophényl- β -D-galactopyranoside. L'enzyme nitrate réductase est recherchée sur le milieu bouillon nitraté à l'aide de réactif de Griess-Ilosvay. L'addition de poudre de zinc au milieu permet également de détecter la présence de nitrite réductase, responsable de la réduction des nitrites. La recherche de l'uréase est effectuée sur milieu "urée-indole" après incubation de 5 à 7 jours à 28°C. Le virage du milieu au rose-rouge révèle la présence de l'uréase.

5.3.3. Etude nutritionnelle des BNL

5.3.3.1. Utilisation des substrats carbonés

L'utilisation des sucres comme source de carbone et d'énergie par les bactéries est effectuée dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu YEMB modifié. L'extrait de levure est remplacé par NH₄Cl (0.2%) et le mannitol est substitué à chaque fois par l'un des sucres suivants : D-rhamnose, L-arabinose, D-mannose, D-sorbose, D-galactose, D-saccharose, D-maltose, D-cellobiose, D-raffinose, dextrine, salicine, D-tréhalose, L-xylose, inositol, adonitol, lactose, acide succinique, acide lactique, acétate de potassium, D-fructose, D-glucose, mannitol, glycérol, sorbitol, acide citrique, acide fumarique, acide malique et l'amidon. Les solutions de sucres sont stérilisées par microfiltration ($\varnothing=0.22\mu\text{m}$) et ajoutées aseptiquement au milieu pour atteindre une concentration finale de 1%. Les tubes ainsi préparés sont inoculés par 10⁶ bactéries et sont ensuite incubés à 28°C sous agitations pendant 7 jours. La croissance des bactéries est évaluée par lecture de DO à 600 nm. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque sucre testé.

5.3.3.2. Utilisation des acides aminés

L'utilisation des acides aminés comme source d'azote par les bactéries est effectuée dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu YEMB modifié par l'élimination de l'extrait de levure. Ce milieu renferme du mannitol comme source de carbone et d'énergie et l'un des acides aminés suivants : L-valine, L-leucine, L-histidine, glycine bêtaïne, L-alanine, L-acide aspartique, L-isoleucine, L-sérine, L-tryptophane, L-acide glutamique et L-Proline. Les solutions d'acides aminés sont stérilisées par microfiltration ($\varnothing=0.22\mu\text{m}$) et ajoutées aseptiquement au milieu pour atteindre une concentration finale de 0.1%. Les tubes ainsi préparés sont inoculés par 10⁶ bactéries et sont ensuite incubés à 28°C sous agitations pendant 7 jours. La croissance des bactéries est évaluée par lecture de DO à 600 nm. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque acide aminé testé.

5.4. Détermination des caractères physiologiques

5.4.1. Effet de la température

L'effet de la température d'incubation sur la croissance des bactéries est évalué en tubes à essai contenant 10 ml du milieu YEMB, inoculés par une suspension bactérienne renfermant 10^6 bactéries et incubés sous agitation à : 20 ; 25 ; 30 ; 35 ; 40 ; 45 et 50°C. Après 7 jours d'incubation, la croissance bactérienne est estimée au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm.

5.4.2. Effet du pH

L'effet de pH sur la croissance des bactéries a été étudié dans des tubes à essai contenant 10ml du milieu YEMB ajusté à des pH allant de 4 jusqu'à 10 avec du KOH (1N) ou du HCl (1N). Les tubes ont été inoculés par 10^6 bactéries. Les lectures d'absorbance sont réalisées au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm, après 7 jours d'incubation à 28°C.

5.4.3. Effet de la salinité

L'effet du NaCl sur la croissance des bactéries est déterminé par ensemencement avec une suspension bactérienne renfermant 10^6 bactéries dans une série de tubes contenant 10 ml de milieu YEMB, additionné de quantités croissantes de NaCl : 0 ; 0.5 ; 1 ; 1.5 ; 2 ; 2.5 et 3%. La croissance bactérienne est estimée au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm, après 7 jours d'incubation à 28°C.

5.4.4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée comme moyen d'identification des rhizobia (Vincent, 1970, Beck et *al.*, 1993). Elle a été évaluée par la méthode standard de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2014). Les antibiogrammes sont réalisés sur le milieu YEMA par étalement, à l'aide des écouvillons stériles, de suspensions bactériennes renfermant 10^6 bactéries sur toute la surface du milieu. Après élimination de l'excès du milieu,

les disques d'antibiotiques de charge connue sont déposés aseptiquement à la surface du milieu et les résultats sont notés après 7 jours d'incubation à 28°C. Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition, mesurés à l'aide d'un pied à coulisse, sont interprétées selon les valeurs-limites établies par Ladha et So (1994). Ainsi, les zones d'inhibition supérieures à 10 mm ont été considérées comme indiquant une sensibilité de la souche aux antibiotiques.

5.5. Taxonomie numérique

Pour évaluer le degré de regroupement des souches entre elles, les résultats de tous les caractères phénotypiques ont été soumis à une analyse numérique. Cette dernière est basée sur le principe de la Classification Ascendante Hiérarchique(CAH), qui permet de calculer les distances de similarité. Les données sont introduites sous forme de matrice binaire (en lignes les individus et en colonnes les variables), puis traitées avec le logiciel XL-STAT (2016, version 2.0). Les variables sont codées "0" pour négatif ou absence du caractère et "1" pour positif ou présence du caractère. Les caractères en communs entre les souches ont été exclus, car ils ne sont pas discriminants et les résultats obtenus sont représentés sous forme de dendrogramme.

6. CARACTERISATION GENOTYPIQUE DES BNL

La caractérisation génotypique des bactéries a été réalisée dans un premier temps par PCR/RFLP du gène codant l'ARNr 16S. Ensuite, les souches représentatives des génotypes RFLP obtenus ont fait l'objet d'une analyse phylogénétique des séquences de l'ADNr 16S, de deux gènes de ménage (*glnII* et *recA*) et d'un gène symbiotique (*nodC*).

6.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN de chaque souche, nécessaire à l'amplification par PCR, a été extrait selon le protocole utilisant le détergent CTAB (Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide) décrit par Wilson (1997). Les souches bactériennes ont été cultivées dans 10 ml de milieu YEMB et

incubées sous agitation (170 tr/min) pendant 7 jours à 28°C. Des culots cellulaires ont été obtenus par 10 minutes de centrifugation à 8500xg. Après élimination des surnageants, les culots ont été repris dans 567 µl de tampon TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8), 30 µl de SDS à 10% et 3 µl de protéinase K (20 mg/ml). Le tout est mélangé doucement par inversion des tubes durant quelques minutes. Après incubation à 37°C pendant 30 min, 100 µl de NaCl (5M) sont additionnés à ce mélange, suivi d'une agitation par vortex pour éliminer les protéines dénaturées et les polysaccharides. Par la suite, 80 µl de solution de CTAB/NaCl (10% de bromure d'hexadécyltriméthylammonium, 4% de NaCl) sont ajoutés et les tubes sont incubés pendant 10 min à 65°C dans un bain-marie, puis placés dans de la glace. Un mélange Phénol-Chloroforme-alcool Isoamylique (25:24:1) est ajouté volume à volume dans les tubes eppendorfs qui sont, par la suite, centrifugés à 20000xg pendant 10 min à 4°C. La phase aqueuse (supérieure) obtenue est transférée dans un tube frais, lavée avec le mélange Chloroforme-alcool Isoamylique (24:1 vol/vol), puis centrifugée à 20000xg pendant 10 min à 4°C. Le surnageant obtenu est transféré dans un tube frais et additionné de 0,6 volume d'isopropanol froid (-20°C). Après cette précipitation de l'ADN, une centrifugation est réalisée pendant 5 minutes dans une microcentrifugeuse. Le culot d'ADN obtenu est lavé deux fois avec de l'éthanol froid à 70 % et une fois avec de l'éthanol à 95%, puis de nouveau centrifugé. Le surnageant est retiré et le culot contenant l'ADN précipité est séché à l'air libre sous une hôte à température ambiante, puis repris dans 50 µl du tampon TE.

6.2. Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait

La concentration d'ADN extrait a été estimée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) à une longueur d'onde de 260 nm. À cette longueur d'onde, une unité de DO est équivalente à une concentration de 50µg d'ADN par ml. La pureté de l'extrait est évaluée par le rapport DO_{260}/DO_{280} . Pour un ADN de bonne qualité, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2.

Pour les réactions de PCR, l'échantillon d'ADN de chaque souche a été dilué dans le tampon TE à une concentration finale de 40 ng/μl puis stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

6.3. Amplification de l'ADN par PCR

L'amplification d'un gène cible suivie de l'analyse des séquences obtenues est la méthode généralement utilisée pour les études phylogénétiques. La PCR (ou Réaction en Chaîne par Polymérase) a pour objectif essentiel d'amplifier un fragment du génome des bactéries présentes dans chaque échantillon afin d'avoir suffisamment du matériel pour les étapes ultérieures d'identification d'espèce. Elle repose sur le principe suivant : la première étape, la dénaturation, se réalise à haute température et permet de séparer l'ADN double-brin en 2 brins simples complémentaires. La deuxième étape, l'hybridation, permet aux amorces d'aller se « coller » à un endroit spécifique sur les brins d'ADN. Enfin, l'étape d'élongation, permet à la Taq polymérase de prolonger les brins d'ADN à partir de la fin des amorces. Le processus est répété entre 30 et 40 fois, chaque répétition permettant théoriquement de multiplier par 2 le nombre de brins d'ADN dans l'échantillon (Mullis *et al.*, 1986).

6.3.1. Réaction d'amplification de l'ADNr 16S

Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (≈1500 pb) est amplifié par PCR à partir des ADNs génomiques extraits précédemment, en utilisant les couples d'amorces 41F (5'-ATTGAACGCTTGGCG-3'), 1488R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3') et les conditions définies par Herrera-Cervera *et al.* (1999).

La réaction d'amplification est réalisée dans des tubes PCR de 100 μl contenant (en concentrations finales) : 0.2 mM de chaque dNTPs (Roche), du tampon de réaction 1X additionné du MgCl₂ (2.5 mM), 0.4 μM de chaque amorce sens et anti sens (Sigma), 0.05 U de Taq polymerase (Invitrogen), de l'eau Milli-Q stérile et 80ng d'ADN matrice dans un volume final de 50 μl (Tableau V). Un témoin négatif exempt d'ADN a systématiquement été inclus dans chaque série de réactions pour vérifier la stérilité des différents réactifs utilisés.

Les amplifications ont été effectuées sur un thermocycleur automatique 1605 Air Thermo-Cycler (Idaho Technology Falls, Idaho) dans les conditions suivantes : dénaturation 94°C pendant 2 min, suivi de 10 Cycles : 94°C pendant 40 s, 60°C pendant 1 min, 72°C pendant 2 min et de 25 Cycles : 94°C pendant 40 s, 50°C pendant 1 min, 72°C pendant 2 min et d'une extension finale 72°C pendant 3 min.

Tableau V : Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN cible

Réactifs	Concentration Stock	Volume Utilisé (µl)	Concentration Finale
Tampon additionné de MgCl ₂	10X	5	1X
dNTPs	10 mM	1	0.2 mM
Amorce Forward	10 µM	2	0,4 µM
Amorce Reverse	10 µM	2	0,4 µM
Taq polymérase	2.5U	1	0.05U
Eau Milli-Q stérile	/	37	/
ADN	40ng/µl	2	80ng
Volume final	/	50 µl	/

6.3.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de contrôler l'efficacité de la PCR, 3µl du produit d'amplification de chaque souche sont mélangés à 2 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol 0.025%, glycérol 3%, EDTA 1mM), puis déposés sur un gel d'agarose 1% (*m/v*). La migration est effectuée dans le tampon de TAE 1X (20 mM Tris-HCl, 4 mM acétate de sodium, 1 mM disodium EDTA [pH 7.4]), sous un voltage constant de 80 V pendant une heure. Les gels obtenus sont colorés avec une solution de BET (0.5 µg/ml) pendant 30 min. Les bandes d'ADN amplifiées sont visualisées et photographiées sous UV à l'aide d'un transilluminateur équipé d'un appareil photo. La taille des fragments a été estimée par comparaison sur le gel de la mobilité électrophorétique par rapport à marqueur ADN commercial (Smart Ladder, Eurogentec, MW170002).

6.4. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de l'ADNr 16S

L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) est un outil pour étudier les structures des communautés microbiennes. Elle est basée sur l'amplification par PCR de la région cible (ADNr 16S, *nifH*, *nodC*, etc.) à partir d'un échantillon d'ADN, suivie de la digestion du produit amplifié avec différentes enzymes de restriction. Les fragments ainsi obtenus sont détectés par leur séparation par électrophorèse sur gel d'agarose ou par électrophorèse sur gel d'acrylamide non-dénaturant. Ainsi, le fragment d'ADN cible donne, pour chaque enzyme de restriction, un profil de restriction type. Ce fragment sera caractérisé par la combinaison de profils types obtenus pour plusieurs endonucléases.

Un groupe PCR/RFLP (ou génotype) comprendra des souches dont les fragments amplifiés auront les mêmes combinaisons de profils types. Cette technique a été utilisée avec succès pour étudier la diversité des rhizobia en étudiant la diversité des gènes de l'ADNr 16S (Willems et Collins, 1993 ; Laguerre *et al.*, 1994b ; Nour *et al.*, 1995 ; Jebara *et al.*, 2001 ; Zribi *et al.*, 2004 ; Ramdani *et al.*, 2020), de *nifH* (Widmer *et al.*, 1999 ; Poly *et al.*, 2001), du *nodA* (Haukka *et al.*, 1998), du *nodC* (Sarita *et al.*, 2005 ; Belhadi *et al.*, 2018) et *nodD* (Zézé *et al.*, 2001).

6.4.1. Réaction de digestion enzymatique de l'ADNr 16S

L'étude du polymorphisme de restriction (RFLP) des produits amplifiés de l'ADN codant pour l'ADNr 16S de nos souches a été réalisée à l'aide de quatre endonucléases suivantes : *AluI*, *DdeI*, *HaeIII* et *Sau96I*, reconnaissant les sites de restriction spécifiques donnés dans le tableau VI.

Les produits de l'amplification ont été digérés séparément par ces quatre endonucléases suivant les recommandations du fabricant (New England Biolabs inc.). Le volume réactionnel est de 10 µl, soit 5 µl de produit de PCR; 1 µl de tampon 10X, 0.5 µl d'enzyme (2.5 U) et de

3.5 µl d'eau Milli-Q stérile. La digestion enzymatique est réalisée par incubation à 37°C pendant deux heures puis les enzymes sont inactivées par incubation à 80°C pendant 20 minutes.

Tableau VI : Endonucléases de restriction utilisées et site de reconnaissance. (Le site de coupure associé est indiqué par des flèches)

Enzymes	Sites de restriction
<i>AluI</i>	5'..AG↓CT..3' 3'..TC↑GA..5'
<i>DdeI</i>	5'..C↓TNAG..3' 3'..GANT↑C..5'
<i>HaeIII</i>	5'..GG↓CC..3' 3'..CC↑GG..5'
<i>Sau96I</i>	5'..G↓GNCC..3' 3'..CCNG↑G..5'

6.4.2. Electrophorèse des produits de restriction

La totalité du produit de digestion de chaque réaction est mélangée avec 5 µl de bleu de charge et déposée sur un gel horizontal d'agarose (3%). La migration des fragments de restriction a été réalisée dans du tampon TBE 1X (89 mM Tris-borate, 89 mM acide borique, 2 mM EDTA ; pH 8) pendant 3 heures à une tension de 80 volts. La coloration et la visualisation des fragments de restriction obtenus sont effectuées dans les mêmes conditions que pour l'analyse des produits PCR de l'ADNr 16S. Un marqueur de poids moléculaire "Ladder 100" (100 bp DNA Ladder, Invitrogen) est mis à migrer parallèlement pour servir d'échelle moléculaire aux produits digérés. Les profils des bandes ainsi obtenus sont analysés visuellement en répertoriant pour chaque profil la présence ou l'absence des fragments de restriction. Ainsi, selon la nomenclature définie par Laguerre *et al.* (1994a), une lettre est attribuée à chaque profil obtenu pour chacune des enzymes. Les profils RFLP obtenus par les quatre enzymes permettent, par leur combinaison, d'établir des groupes d'isolats sur la base de PCR/RFLP type ou génotype.

6.4.3. Analyses statistiques

Afin de rechercher d'éventuelles relations entre les distributions des génotypes (PCR/RFLP type) au sein des isolats bactériens et les variables édaphiques, les données RFLP sont soumises à une analyse en composantes principales (ACP). Cette analyse a été effectuée sur une matrice de données constituée de neuf variables (données physico-chimiques des sols) et de 23 isolats bactériens, regroupés en génotypes, répartis à travers les quatre sites de prélèvement. Le logiciel statistique XLSTAT 2016 (version 2.0) a été utilisé pour le traitement des données.

6.5. Amplification des gènes de ménage (*recA* et *atpD*) et du gène (*nodC*)

En se basant sur les combinaisons des génotypes obtenus par PCR/RFLP du gène codant l'ARNr 16S, un représentant de chaque génotype répertorié est retenu pour l'analyse phylogénétique basée sur les séquences de l'ADNr 16S, de deux gènes de ménage (*glnII* et *recA*) et d'un gène symbiotique (*nodC*).

Les gènes *glnII* (\approx 900 pb) et *recA* (\approx 500 pb) ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique à l'aide des couples d'amorces spécifiques adaptées d'après Turner et Young (2000) et Zhang *et al.* (2008) respectivement ; alors que le gène *nodC* (\approx 700 pb), codant pour une N-acétylglucosaminyltransférase, a été amplifié en utilisant les amorces définies par Sarita *et al.* (2005) (Tableau VII).

Tableau VII : Séquences et positions des amorces utilisées

Gènes	Amorces	Séquences	Références
<i>glnII</i>	GSII-1	5'-AACGCAGATCAAGGAATTCG-3'	Turner et Young (2000)
	GSII-4	5'-GCGAACGATCTGGTAGGGGT-3'	
<i>recA</i>	<i>recA</i> 41F	5'-TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG-3'	Zhang <i>et al.</i> (2008)
	<i>recA</i> 640R	5'-ACATSACRCCGATCTTCATGC-3'	
<i>nodC</i>	540F	5'-TGATYGAYATGGARTAYTGGCT-3'	Sarita <i>et al.</i> (2005)
	1160R	5'-CGYGACARCCARTCGCTRTTG-3'	

A : Adénine ; C : Cytosine ; G : Guanine ; T : Thymine ; M : A+C ; R : A+G ; S : G+C ; Y : C+T

Pour chaque réaction d'amplification, le volume de 50 µl contient le même mélange réactionnel adopté pour l'amplification de l'ADNr 16S à l'exception des amorces. Les réactions d'amplification des gènes ont été réalisées dans un thermocycleur 1605 Air Thermo-Cycler (Idaho Technology Falls, Idaho) suivants les cycles thermiques répertoriés dans le tableau (VIII). Enfin, tous les amplicons obtenus sont placés à 4°C jusqu'à utilisation.

Tableau VIII : Les conditions de PCR de l'amplification des différents gènes utilisés

<i>glnII</i> (Turner et Young, 2000)	<i>recA</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2008)	<i>nodC</i> (Sarita <i>et al.</i> , 2005)
95°C 1 min 30 sec	95°C 1 min 30 sec	95°C 3 min
95°C 45 sec	95°C 45 sec	94°C 1 min
55°C 45 sec } 30 cycles	55°C 45 sec } 30 cycles	55°C 1 min } 30 cycles
72°C 2 min } 30 cycles	72°C 2 min } 30 cycles	72°C 2 min } 30 cycles
72°C 7 min	72°C 7 min	72°C 7 min
12°C ∞	12°C ∞	12°C ∞

6.5. 1. Migration des produits PCR

Les produits de PCR obtenus ont été visualisés sur des gels d'agarose à 1% selon le protocole décrit dans le chapitre 6.3.2 (page 63) pour l'amplification de l'ADNr 16S. Pour chaque série de gel, était également déposé un témoin négatif contenant 2 µl d'eau Milli-Q stérile au lieu de l'ADN génomique ainsi que 5 µl d'un marqueur de poids moléculaire connu (Smart Ladder, Eurogentec, MW170002), parallèlement avec les échantillons à analyser.

6.5.2. Purification des produits de PCR et séquençage

Les produits de PCR des gènes étudiés ont été purifiés sur colonne à l'aide du kit NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, Germany) en suivant les instructions fournies par le constructeur. Les produits amplifiés ont été déposés dans la colonne et centrifugés 15 minutes à 3000xg, puis après ajout de 20 µl d'eau ultra pure (Millipore) et 60 µl d'isopropanol absolu, de nouveau centrifugés 2 minutes à 3000xg. La purification a été suivie d'un lavage à l'isopropanol 70%, d'une centrifugation de 10 minutes à 3000xg, puis d'un séchage et d'une mise en solution dans 20 µl de formamide (Applied Biosystems). Les produits purifiés ont

ensuite été dosés par spectrophotométrie UV à l'aide d'un Nanodrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) par mesure de la DO à 260 nm.

Le séquençage a été réalisé sur les deux brins de chaque ADN par la plateforme DTAMB-Biofidal (Université Lyon 1, Villeurbanne, France) suivant la méthode des terminateurs en chaîne en utilisant le Kit ABI PRISM BigDye™ Terminator (Applied Biosystems) et les amorces (sens et anti-sens) utilisées précédemment pour l'amplification de l'ARNr 16S, *glnII*, *recA* et *nodC*.

6.6. Analyses phylogénétiques

Une fois les résultats du séquençage disponibles, le chromatogramme de chaque séquence a été étudié. Les séquences partielles d'ADNr 16S, des gènes de ménage (*glnII* et *recA*) et du gène *nodC* obtenues avec les deux amorces (forward et reverse) sont alors assemblées afin de former une séquence consensus (ou contig), puis vérifiées et corrigées manuellement si nécessaire à l'aide du programme ChromasPro version 1.42.

Les séquences de nos souches sont préalablement comparées à celles disponibles dans les bases de données en ligne via l'outil BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), faisant appel à la base de données du NCBI (Altschul *et al.*, 1990), afin de permettre de caractériser les souches auxquelles appartiennent les ADNs extraits, et ainsi, de leur désigner une assignation taxonomique.

Les séquences de nos isolats ainsi que celles dites de référence, obtenues à partir de la banque de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), ont alors été incluses dans l'analyse et l'ensemble des séquences a été aligné à l'aide du logiciel ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Le calcul des matrices de distances a été réalisé grâce au logiciel MEGA version 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), en utilisant l'indice de Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980) comme modèle évolutif. La construction des arbres phylogénétiques a été réalisée avec la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) à partir des alignements

des séquences des gènes étudiés. Le support statistique des arbres a été calculé par des analyses bootstrap utilisant 1000 répétitions. Toutes les positions contenant des "gaps" et des données manquantes ont été éliminées.

Les séquences des gènes obtenues dans ce travail sont disponibles dans la base de données Genbank / EMBL / DDBJ sous les numéros d'accès consignés dans le tableau S1 (Annexe II).

Résultats et discussion

Chapitre III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. ANALYSES PHYSICO-CIMIQUES DES SOLS

Les résultats des différentes analyses physico-chimiques des sols à partir desquels les nodules de *S. junceum* (L.) ont été prélevés figurent dans le tableau IX.

Tableau IX: Résultats des analyses physico-chimiques des sols

Sites	Paramètres analysés									
	Texture	A (%)	L (%)	S (%)	pH (H ₂ O)	C _{org.} (%)	N _t (%)	P (ppm)	C _E (μS/cm ⁻¹)	CaCO ₃ (%)
Adekar	S.L.	2.0	36.3	61.7	6.9	0.9	0.07	0.45	145	7.86
Barbacha	S.L.	3.1	25.7	71.2	7.1	1.6	0.36	0.13	123	2.23
Semaoune	L.A.S.	30.1	13.4	56.7	8.5	1.8	0.11	0.20	212	33.74
Sidi-Aïch	L.A.S.	31.9	14.3	53.8	8.4	1.5	0.14	0.40	245	19.68

C_{Org.}: Cabone Organique, N_t: Azote Total, P: Phosphore disponible, C_E: Conductivité Electrique, CaCO₃: Calcaire Total; S.L.: Sablo-Limoneux; L.A.S.: Limono-Argilo-Sableux.

D'après le triangle de texture USDA, les sols d'Adekar et de Barbacha sont de type sablo-limoneux, avec des teneurs élevées en sables respectivement de 61.7% et 71.2% et en limons respectivement de 36.3% et 25.7%. Ils sont fragiles, car ils sont pauvres en argiles et la présence des limons en grande quantité dans ces sols, peut provoquer le phénomène de battance et ils ont une tendance à former une croûte sous l'effet de la pluie. Toutefois, la présence de sables en excès permet une bonne aération, ce qui favoriserait un bon développement des plantes. Les sols de Semaoune et de Sidi-Aïch ont une texture limono-argilo-sableuse, avec des teneurs élevées en sables (56.7% et 53.8%, respectivement) et en argiles (30.1% et 31.9%, respectivement). Ces sols sont caractérisés par une capacité de rétention en eau relativement élevée et une structure cohérente et bien développée, ce qui facilite l'aération des sols et l'enracinement des plantes.

En tenant compte de l'échelle de classification établie par Gaucher (1968), il apparaît que les sols de Sidi-Aïch et de Semaoune, avec des valeurs de pH_{eau} respectivement de 8.4 et 8.5, sont alcalins ; alors que ceux d'Adekar et de Barbacha sont neutres ($pH_{\text{eau}} = 6.9$ et 7.1 respectivement).

Le calcaire total est présent en proportions relativement importantes dans le sol de Sidi-Aïch (19.68%) et très importantes dans le sol de Semaoune (33.74%), alors qu'il est faiblement représenté dans les sols d'Adekar (7.86%) et de Barbacha (2.23%). La richesse du sol de Semaoune en carbonates de calcium augmente sa perméabilité et son réchauffement rapide et peut bloquer certains éléments minéraux qui deviennent alors non disponibles pour les plantes.

Les valeurs de conductivité électrique (C_E) de tous les sols étaient inférieures à l'échelle de salinité établie par l'USSL (United States Salinity Laboratory, Richards 1954), ceci signifie que les sols ne sont pas salins (Gaucher et Burdin, 1975 ; Durand, 1983).

L'analyse chimique a révélé que tous les sols étaient relativement pauvres en éléments minéraux. En effet, le carbone organique ($C_{\text{Org.}}$) est faiblement représenté dans l'ensemble des sols étudiés ; sa teneur est comprise entre 0.9% et 1.8%, alors que Soltner (1988) considère que pour les sols des zones méditerranéennes, la teneur en carbone organique doit être de l'ordre de 5 à 10%. Comparativement au sol de Barbacha, l'azote total (N_t) est faiblement représenté dans les sols d'Adekar, de Semaoune et de Sidi-Aïch, ce qui traduit une mauvaise minéralisation de la matière organique. Enfin, les valeurs obtenues pour le phosphore (P) assimilable sont inférieures à 50 ppm, ceci signifie que les différents sols sont très pauvres en phosphore. Ce dernier est connu pour être facilement adsorbé sur les argiles et la matière organique du sol. Il peut également être facilement précipité sous forme de phosphate de calcium non disponible dans les sols alcalins ($pH > 7.0$) ou acides ($pH < 6,4$) (Soltner, 1988).

2. ISOLEMENT ET AUTHENTIFICATION DES BNL

Quatre-vingt-trois (83) souches bactériennes ont été isolées et purifiées à partir des nodules prélevés sur les racines de *S. junceum* (L.), poussant à l'état naturel dans 4 sites différents de la région de Béjaïa (Nord-est d'Algérie). Le nombre d'isolats bactériens issus de chaque site de collecte est récapitulé dans le tableau X.

Tous les isolats ont fait l'objet du test d'authentification et les résultats obtenus montrent que seules 23 souches bactériennes ont pu induire la formation de nodules sur le système racinaire de leur plante hôte d'origine. Ces isolats peuvent donc être considérés comme des bactéries nodulant les légumineuses (BNL).

Il est important de signaler que les premières nodosités sont apparues 4 semaines après inoculation et qu'au-delà de la 10^{ème} semaine, aucun nouveau nodule n'apparaît.

Tableau X : Résultats des tests d'authentification

Sites	Nombre d'isolats bactériens	Nombre de bactéries Nod ⁺	Code des bactéries Nod ⁺
Adekar	17	5	SjAD3, SjAD5, SjAD6, SjAD13, SjAD16
Barbacha	26	6	SjBA4, SjBA7, SjBA9, SjBA12, SjBA21, SjBA24
Semaoune	13	4	SjSM1, SjSM4, SjSM8, SjSM11
Sidi-Aïch	27	8	SjSA4, SjSA10, SjSA11, SjSA14, SjSA16, SjSA19, SjSA23, SjSA26
Total	83	23	

Il ressort de ces résultats que 60 souches sur 83 ne sont pas infectives sur leur plante-hôte d'origine. Ces isolats correspondraient à :

- des souches non-rhizobiennes dont les colonies ont un aspect similaire à celles des souches de rhizobia (non-absorption du rouge Congo et aspect mucoïdal) et qui auraient échappés à la procédure de stérilisation superficielle du nodule. En général, ce sont des bactéries de la rhizosphère, regroupées sous le nom de Rhizobactéries qui Favorisent la

Croissance des Plantes (RFCP). Elles appartiennent à différents groupes taxonomiques de bactéries, fréquemment identifiées comme des *Pseudomonas fluorescens*, des *Bacillus*, des *Azospirillum*, des *Azotobacter*, des *Klebsiella*, des *Enterobacter* et des *Serratia* spp. (Beauchamp, 1993 ; Korir *et al.*, 2017) ;

- des souches dites endophytes non-symbiotiques, qui empruntent généralement le cordon d'infection lors de la pénétration dans la racine de la plante hôte d'une souche de rhizobia compétente. Ces souches sont très diversifiées et ne peuvent pas induire la nodulation lorsqu'elles sont ré-inoculées à la plante hôte d'origine, car elles ne possèdent pas le système génétique requis pour la symbiose (Brundu *et al.*, 2004 ; Benhizia *et al.*, 2004 ; Pandya *et al.*, 2015) ;
- des souches non-rhizobiennes ayant acquis temporairement les gènes requis pour la nodulation par transfert vertical et qui les auraient perdus lors de la procédure d'isolement et de purification. C'est souvent le cas des représentants du genre *Agrobacterium* qui sont très fréquemment isolés de nodosités de légumineuses (Martinez-Romero, 1994 ; Mhamdi *et al.*, 2005 ; Mrabet *et al.*, 2006).

3. CARACTERISATION SYMBIOTIQUE DES BNL

3.1. Nodulation

Les nodules observés sur le système racinaire des plantes de *S. junceum* (L.), examinés après 12 semaines de culture, se présentent sous la forme de lobes beaucoup plus allongés que large, avec des variations sur le plan de la taille et de la couleur (Figure 13). Selon la classification établie par plusieurs auteurs, ils seraient de type indéterminé (Corby, 1981 ; Corby, 1988 ; Crespi et Galvez, 2000 ; Sprent, 2001).

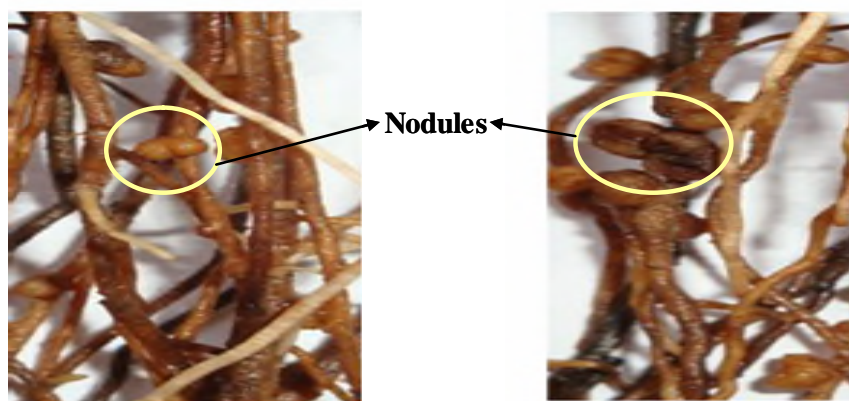


Figure 13 : Nodules sur les racines de *S. junceum* (L.) observés sous une loupe binoculaire (Grossissement. X 8) lors du test de nodulation.

3.2. Propriétés symbiotiques

Les nodules produits par la majorité des souches (91.3%) étaient rose-rouges à marrons et les plantes semblaient saines avec une couleur vert foncé, contrairement à la couleur jaune des plantes du témoin négatif. Les nodules induits par les souches SjSA19 et SjSA4 (8.7%) étaient petits, blancs à légèrement roses et les plantes étaient jaune-vert et rabougries, suggérant une faible efficacité en terme de fixation de N_2 .

D'autre part, l'effet de l'inoculation sur la croissance et la nutrition azotée de la plante hôte varie significativement en fonction des différentes souches bactériennes. Les résultats obtenus (Tableau XI) montrent que dans la majorité des cas, l'inoculation a amélioré favorablement le nombre de nodules (**NN**), les poids de matière sèche (**PMS**) et les teneurs en azote total (**NT**) des parties aériennes des jeunes plantes de *S. junceum* (L.). La souche SjAD16 a montré la meilleure capacité de nodulation et a induit le nombre de nodules le plus important avec en moyenne 27.3 nodules/plante, suivie par la souche SjBA7 avec une valeur moyenne de 25.6 nodules/plante, contre seulement 9.6 et 9.3 nodules/plante induits respectivement par les souches SjSA4 et SjSA19. Par ailleurs, quelle que soit la souche testée, les teneurs en azote total, accumulées dans les parties aériennes, sont significativement plus importantes chez les

plantes inoculées par rapport aux plantes témoins non inoculées et non fertilisées. La souche SjAD16 a été la plus efficace, avec 3.51% d'azote total.

De même, l'inoculation a induit des effets très positifs sur les poids de matière sèche des parties aériennes par rapport au témoin négatif. Les valeurs maximales de **PMS** ont été obtenues dans des plantes inoculées avec les souches SjAD16, SjBA7, SjSA10 et SjSA16. Enfin, sur la base de l'efficacité symbiotique (**ES**), les souches ont été classées en deux groupes : le groupe I comprenait 43.5% des souches qui se sont révélées très efficaces et le groupe II avec 56.5% des souches efficaces.

3.3. Conclusion

Les résultats obtenus dans la présente étude sont en accord avec les données de la littérature qui ont rapporté que *Bradyrhizobium* sp. forme une symbiose fixatrice d'azote efficace avec *S. junceum* (L.) (Cardinale *et al.*, 2008), *Glycine max* (L.) Merrill (Chen *et al.*, 2002 ; Argaw, 2015) et *Vigna unguiculata* (Sarr *et al.*, 2009).

Tableau XI: Propriétés symbiotiques des bactéries nodulant *S. junceum* (L.)

Souches	NN	NT	PMS	ES
SjAD3	14.0 ^{def (*)}	1.95 ^{efg}	1.38 ^{de}	72.02 ^{b-e}
SjAD5	20.0 ^{a-e}	1.79 ^{e-h}	1.71 ^{ab}	89.19 ^{a-d}
SjAD6	14.6 ^{c-f}	1.91 ^{efg}	1.70 ^{ab}	88.77 ^{a-d}
SjAD13	21.6 ^{a-d}	1.98 ^{efg}	1.75 ^{ab}	90.91 ^{a-d}
SjAD16	27.3 ^a	3.51 ^{ab}	1.87 ^a	97.58 ^{ab}
SjBA4	21.3 ^{a-e}	1.98 ^{efg}	1.39 ^{de}	72.34 ^{a-e}
SjBA7	25.6 ^a	2.07 ^{ef}	1.83 ^a	94.82 ^{ab}
SjBA9	15.3 ^{c-f}	1.46 ^{fgh}	1.24 ^{def}	64.72 ^{de}
SjBA12	15.3 ^{c-f}	1.90 ^{efg}	1.25 ^{def}	65.14 ^{cde}
SjBA21	23.6 ^{abc}	1.93 ^{efg}	1.46 ^{bcd}	76.22 ^{a-e}
SjBA24	20.6 ^{a-e}	2.20 ^{de}	1.69 ^{abc}	88.22 ^{a-d}
SjSM1	25.3 ^{ab}	2.83 ^{cd}	1.71 ^{ab}	89.16 ^{a-d}
SjSM4	22.0 ^{a-d}	1.76 ^{e-h}	1.40 ^{cde}	72.70 ^{a-e}
SjSM8	12.3 ^{ef}	1.73 ^{e-h}	1.14 ^{ef}	59.67 ^e
SjSM11	15.3 ^{c-f}	1.42 ^{gh}	1.25 ^{def}	65.01 ^{cde}
SjSA4	9.6 ^f	1.22 ^h	1.07 ^f	55.57 ^e
SjSA10	21.3 ^{a-e}	2.99 ^{bc}	1.79 ^a	92.67 ^{abc}
SjSA11	14.6 ^{c-f}	1.75 ^{e-h}	1.38 ^{de}	72.24 ^{a-e}
SjSA14	13.0 ^{def}	1.57 ^{e-h}	1.24 ^{def}	64.42 ^{de}
SjSA16	21.0 ^{a-e}	2.17 ^e	1.76 ^a	91.75 ^{a-d}
SjSA19	9.3 ^f	1.19 ^h	1.13 ^{ef}	58.31 ^e
SjSA23	16.3 ^{b-f}	1.98 ^{efg}	1.40 ^{cde}	73.19 ^{a-e}
SjSA26	20.6 ^{a-e}	2.00 ^{efg}	1.72 ^{ab}	89.69 ^{a-d}
Témoin positif	0.00 ^g	3.89 ^a	1.94 ^a	100.00 ^a
Témoin négative	0.00 ^g	0.44 ⁱ	0.40 ^g	21.16 ^f

(*) Représente la valeur moyenne de 3 répétitions.

Les valeurs d'une même colonne, suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au niveau de probabilité de 5% tel que déterminé par le test de Tukey HSD.

ES: Efficience Symbiotique (%); **PMS:** Poids de Matière Sèche des parties aériennes (g/plante); **NN:** Nombre de Nodules/plante; **NT:** Azote Total des parties aériennes (%).

En outre, des corrélations positives ont été notées entre tous les paramètres symbiotiques mesurés. En effet, l'analyse des résultats (Tableau S2, Annexe III) a montré que l'augmentation du poids de matière sèche des parties aériennes des plantes était significativement corrélée avec le nombre de nodules ($r = 0.371$, $P = 0.001$) et les teneurs des parties aériennes des plantes en azote total ($r = 0.755$, $P < 0.0001$). De même, l'efficacité symbiotique était positivement corrélée avec le nombre de nodules ($r = 0.355$, $P = 0.002$) et les teneurs en azote total des parties aériennes des plantes ($r = 0.758$, $P < 0.0001$), et fortement corrélée avec le poids de matière sèche ($r = 0.906$, $P < 0.0001$).

Les corrélations positives entre les paramètres mentionnés ci-dessus dénotent que les nodosités induites (NN) par les BNL pourraient contribuer dans l'augmentation de la biomasse (PMS) et la teneur en NT des plantes de *S. junceum* (L.).

À la lumière des résultats obtenus, l'étude des propriétés symbiotiques des souches bactériennes nous a permis d'identifier la souche SjAD16 comme étant une candidate potentielle pour la production d'inoculum rhizobien destiné à la bactérisation des cultures de *S. junceum* (L.). Ainsi, le couple " SjAD16-*S. junceum* (L.)" pourrait être utilisé dans des applications environnementales telles que la restauration de sols dégradés et/ou pauvres et assurer par conséquent un bon développement d'autres espèces végétales.

4. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BNL ET TAXONOMIE NUMERIQUE

Les 23 bactéries ayant montré une capacité à former des nodules sur leur plante-hôte (*S. junceum* L.) ont subi une caractérisation phénotypique, basée sur les tests morphologiques, biochimiques et physiologiques afin d'étudier leur diversité.

4. 1. Morphologies culturales et cellulaires des BNL

4.1.1. Caractères culturaux

La majorité des bactéries forment sur le milieu YEMA-RC des colonies visibles après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C, ceci indique d'après Moreira et *al.*, (1993) que celles-ci sont à

croissance lente. Ces colonies sont circulaires ou punctiformes, à bord régulier, à élévation convexe et de tailles variables ($0.5 < \varnothing < 1.8$ mm). Elles sont moins gommeuses, légèrement bombées et d'aspect lisse, avec une texture translucide. Ces colonies prennent une coloration blanche à rose très claire due à une légère absorption du rouge Congo par les polysaccharides, contrairement aux bactéries contaminantes qui l'absorbent fortement.

4.1.2. Morphologie cellulaire

L'observation microscopique à l'état frais des différentes suspensions bactériennes a montré que toutes les souches ont une forme bâtonnet relativement courts et arrondis à leur extrémité. Elles sont mobiles et présentent un aspect réfringent qui résulte de la production de granules de poly β - hydroxybutyrate (PHB). Elles sont toutes à Gram négatif et aucune d'entre elles ne renferment d'endospore ou de capsule.

4.2. Paramètres de croissance bactérienne

La croissance bactérienne s'accompagne par une alcalinisation du milieu YEMA additionné de bleu de bromothymol qui se traduit par le virage du milieu au bleu foncé, caractéristique des bactéries à croissance lente. Cette observation a été confirmée par l'analyse des caractéristiques de la croissance bactérienne sur milieu le YEMB liquide. En effet, toutes les souches ont un temps de générations (G) supérieur à 8 heures (Tableau XII). La souche SjSM1 possède un temps de génération de 8.47h et un taux de croissance (μ) de 0.118 h^{-1} ; la souche SjSA10 est caractérisée par un temps de génération de 22.2h et un taux de croissance de 0.031 h^{-1} .

Les résultats relatifs au temps d'apparition des colonies sur le milieu YEMA (5 à 7 jours) et au temps de génération déterminé sur le milieu YEMB ($G > 8\text{h}$), appuyés par les caractéristiques morphologiques cellulaires et culturelles des souches étudiées, se sont montrées plus en accord avec les descriptions communément admises par les Rhizobiologistes

pour les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* (Vincent, 1970 ; Jordan, 1982 et 1984 ; Elkan 1992 ; Odee *et al.* 1997).

Tableau XII : Paramètres de croissance des bactéries nodulant *S. junceum* (L.)

Souches	Temps de génération (h)	Taux de croissance (h⁻¹)
SjAD3	16.92	0.059
SjAD5	21.66	0.032
SjAD6	20.83	0.048
SjAD13	17.43	0.057
SjAD16	16.23	0.062
SjBA4	17.26	0.058
SjBA7	20.78	0.033
SjBA9	21.56	0.032
SjBA12	16.72	0.060
SjBA21	22.13	0.031
SjBA24	15.74	0.064
SjSM1	8.47	0.118
SjSM4	9.18	0.109
SjSM8	11.63	0.086
SjSM11	11.44	0.087
SjSA4	14.64	0.047
SjSA10	22.20	0.031
SjSA11	17.86	0.056
SjSA14	15.83	0.063
SjSA16	15.74	0.044
SjSA19	12.14	0.082
SjSA23	13.28	0.075
SjSA26	10.65	0.094

4. 3. Caractéristiques biochimiques des BNL

4. 3. 1. Mise en évidence de quelques enzymes

Les résultats du tableau XIII montrent que les activités catalase et oxydase sont retrouvées chez toutes les souches étudiées, alors que l'activité nitrate réductase n'est retrouvée que chez 56.52% des souches. L'uréase, quant à elle, est présente chez 73.91% des souches. Enfin, la β -galactosidase est présente chez toutes les souches excepté SjAD5 et SjSA11.

Tableau XIII : Mise en évidence des enzymes chez les bactéries nodulant *S. junceum* (L.)

Souches	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase	β -galactosidase	Uréase
SjAD3	+	+	+	+	+
SjAD5	+	+	+	-	-
SjAD6	+	+	-	+	+
SjAD13	+	+	-	+	+
SjAD16	+	+	+	+	-
SjBA4	+	+	-	+	+
SjBA7	+	+	+	+	+
SjBA9	+	+	-	+	+
SjBA12	+	+	+	+	+
SjBA21	+	+	+	+	+
SjBA24	+	+	+	+	-
SjSM1	+	+	+	+	-
SjSM4	+	+	+	+	+
SjSM8	+	+	+	+	-
SjSM11	+	+	+	+	+
SjSA4	+	+	-	+	+
SjSA10	+	+	-	+	+
SjSA11	+	+	+	-	-
SjSA14	+	+	+	+	+
SjSA16	+	+	-	+	+
SjSA19	+	+	-	+	+
SjSA23	+	+	-	+	+
SjSA26	+	+	-	+	+

(+) : présent

(-) : absent

4. 3. 2. Utilisation des substrats carbonés

Les résultats consignés dans le tableau XIV montrent que les souches assimilent une large gamme de substrats carbonés, avec une préférence aux polyalcools, acides organiques et quelques monosaccharides. Toutefois, le degré d'utilisation de ces substrats varie d'une souche à l'autre. Le glucose, le fructose, le mannitol, le glycérol, le sorbitol, l'acétate de potassium, l'acide lactique, l'acide citrique, l'acide fumarique et l'acide malique sont assimilés par toutes les souches. Par contre, le rhamnose, le sorbose, le sucrose, le raffinose, les dextrines et la salicine sont les moins utilisés. On peut noter également qu'aucune souche n'a pu utiliser l'amidon comme source de carbone et d'énergie.

Tableau XIV. Pourcentages d'assimilation de différentes sources de carbone par les bactéries nodulant *S. junceum* (L.)

<u>SUCRES</u>		
<u>Pentoses</u>		
- D-Arabinose	91.30%	}
- D-Rhamnose	56.52%	
- L-Xylose	82.60%	
<u>Hexoses</u>		
- D-Glucose	100%	} Monosaccharides
- D-Fructose	100%	
- D-Galactose	82.60%	
- D-Mannose	73.91%	
- D-Galactose	82.60%	
- L-Sorbose	39.13%	
- Sucrose	56.52%	} Disaccharides
- Maltose	73.91%	
- Cellobiose	69.56%	
- Lactose	82.60%	
- Tréhalose	91.30%	
- Raffinose	56.52%	} Trisaccharides
- Dextrine	39.13%	} Oligo-saccharides
- Amidon	0.00%	} Polysaccharides
- Salicine	39.13%	} Hétérosides
- Adonitol	91.30%	} Polyalcools
- Glycérol	100%	
- Inositol	91.30%	
- Mannitol	100%	
- Sorbitol	100%	
<u>ACIDES ORGANIQUES</u>		
- Acétate de potassium	100%	
- Acide succinique	91.30%	
- Acide lactique	100%	
- Acide citrique	100%	
- Acide fumarique	100%	
- Acide malique	100%	

Nos résultats sont en accord avec ceux de Jordan (1984) qui a montré que la croissance des *Bradyrhizobium* est beaucoup plus importante lorsque la source de carbone du milieu est constituée des polyalcools et de certains hexoses ; alors qu'elle est faible lorsque la source de

carbone du milieu est constituée de di et trisaccharides. Par ailleurs, les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques (TCA), notamment, ceux qui sont fortement oxydés dans les suspensions cellulaires comme : le malate, le fumarate et le citrate, lorsqu'ils sont métabolisés permettent une bonne croissance des *Bradyrhizobium* (Stowers, 1985).

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs confirmant l'existence d'une variabilité dans la nutrition carbonée chez les rhizobia. Ainsi, les souches à croissance rapide possèdent une préférence pour les hexoses, les pentoses, les polyols, les acides organiques, les bi et disaccharides. Les souches à croissance lente utilisent rarement les monosaccharides et une utilisation variable des bi et trisaccharides (Jordan, 1984 ; Stowers, 1985 ; van Rossum *et al.*, 1995) ; par contre, elles transportent et oxydent les acides organiques (Keele *et al.*, 1970 ; Stowers et Elkan, 1984).

Il est bien établi que le cycle des acides tricarboxyliques est opérationnel chez les deux espèces de rhizobia à croissance rapide et lente (El-Din, 1992). En effet, les acides dicarboxyliques en C4, métabolisés à travers ce cycle, peuvent donc jouer à la fois le rôle de substrats énergétiques pour la fixation d'azote, en fournissant de l'ATP nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase chez les rhizobia, et aussi être les précurseurs de la biosynthèse de l'hème, molécule responsable de la coloration rosâtre des nodules (Avisar et Nadler, 1978 ; Ronson *et al.*, 1981 ; Finan *et al.*, 1983).

4. 3. 3. Utilisation des acides aminés comme source d'azote

Les résultats de la figure (14) montrent que l'assimilation des acides aminés comme seule source d'azote est variable d'une souche à l'autre. En effet, le tryptophane, le glutamate, la proline et l'aspartate sont les acides aminés les mieux assimilés par toutes les souches; tandis que la valine, la leucine et l'histidine ne sont assimilées que par 39.1% des souches testées. Pour les autres acides aminés, une variabilité de réponse a été observée. En effet, l'isoleucine est assimilée par 82.6% des souches; alors que la sérine, l'alanine et la glycine-bétaïne sont les

acides aminés les moins assimilés avec des pourcentages de 56.52%, 69.56% et 73.91% respectivement.

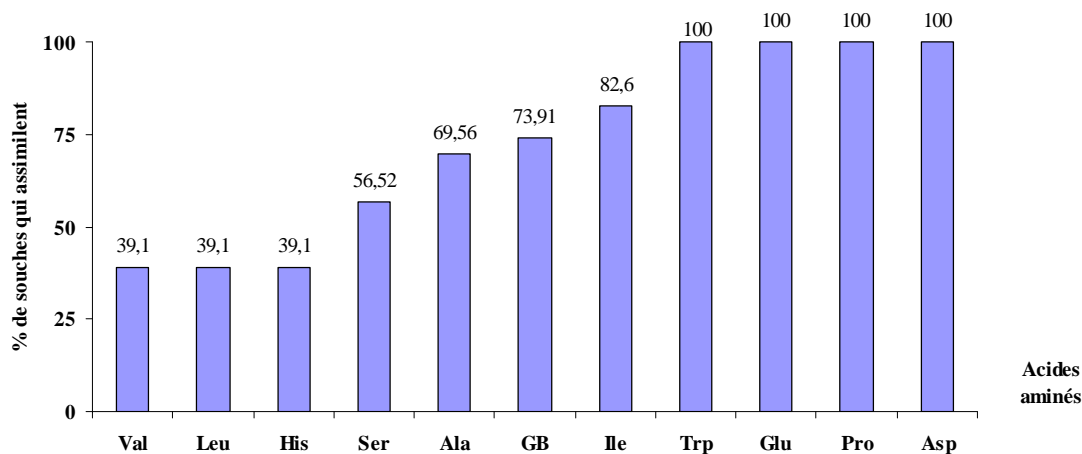


Figure 14 : Assimilation des acides aminés par les bactéries nodulant *S. junceum* (L.)

4. 4. Caractéristiques physiologiques des BNL

4.4.1. Effet de la température

Les résultats de la figure 15 montrent que les souches testées présentent une croissance entre 20°C et 40°C, avec des températures optimales de croissance allant de 25°C à 30°C. Il y a lieu de remarquer que la croissance de certaines souches amorce une chute à partir de 35°C. Enfin, une croissance très faible a été observée à 40°C pour toutes les souches.

Les résultats obtenus indiquent que ces souches sont des mésophiles du fait qu'elles poussent bien entre 25 et 30°C. En effet, la plupart des rhizobia se développe très bien entre 28° et 31°C et sont généralement incapables de se multiplier à 37°C et en dessous de 10°C (Jordan, 1984 ; Graham, 1992).

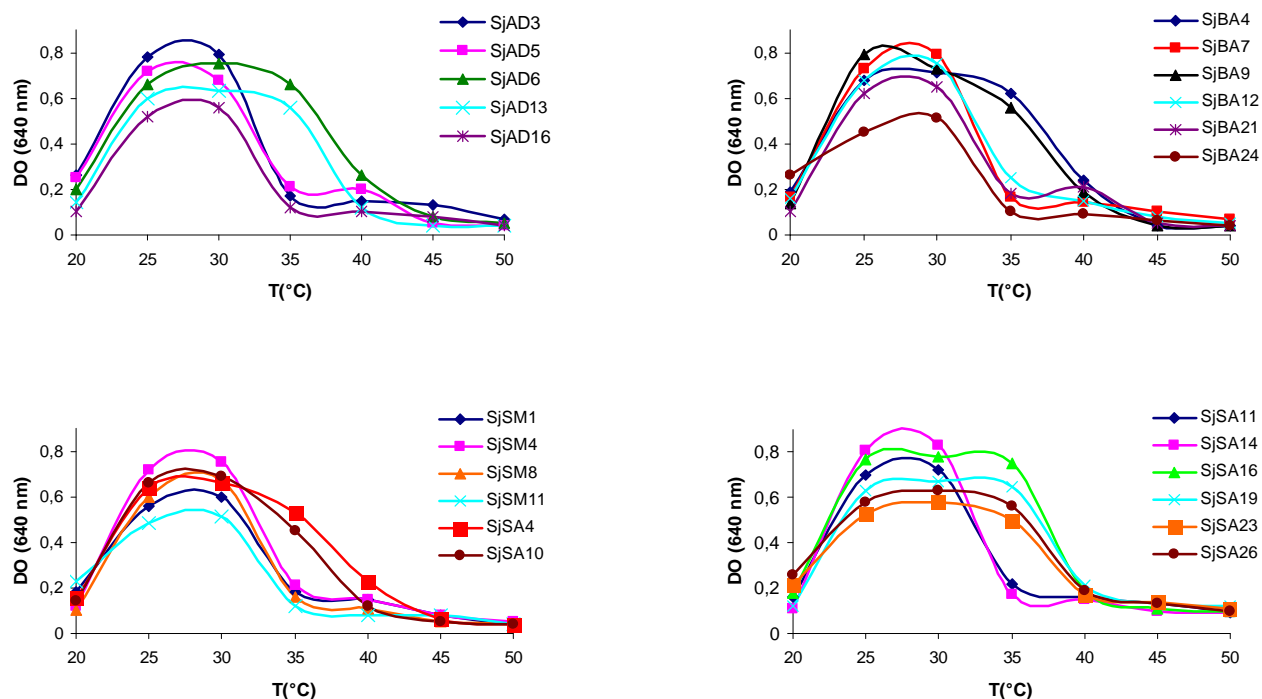


Figure 15 : Effet de la température d'incubation sur la croissance des BNL

Il a été également rapporté que les *Bradyrhizobium* sont plus thermotolérantes que les rhizobia à croissance rapide (Robert et al., 1982). Cependant, les souches tolérantes aux températures élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermotolérance est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räsänen et Lindström, 1999). D'autre part, il a été rapporté que les températures élevées peuvent également avoir un impact sur la persistance des rhizobia dans l'inoculum durant son stockage, leur survie dans le sol ainsi que durant la nodulation et la fixation d'azote (Graham, 1992). En effet, les températures élevées affectent la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (Zahran, 1999). À l'opposé, les températures basses inhibent l'expression des gènes *nod* et donc l'infection et la nodulation (Zhang et al., 1996).

4.4.2. Effet du pH

La croissance des souches testées est relativement sensible aux variations de pH du milieu (Figure 16). L'optimum de croissance de la plupart des souches testées se situe entre pH6 et pH7 et aucune d'entre elles n'a pu se développer aux pH inférieurs à 5 ou supérieurs à 9. Cependant, on remarque que 73.91% des souches étudiées se sont montrées plus tolérantes au pH acide (pH5) que les pH alcalins et que 30.43% des souches étaient capables de se développer à des pH alcalins (pH8 et pH9).

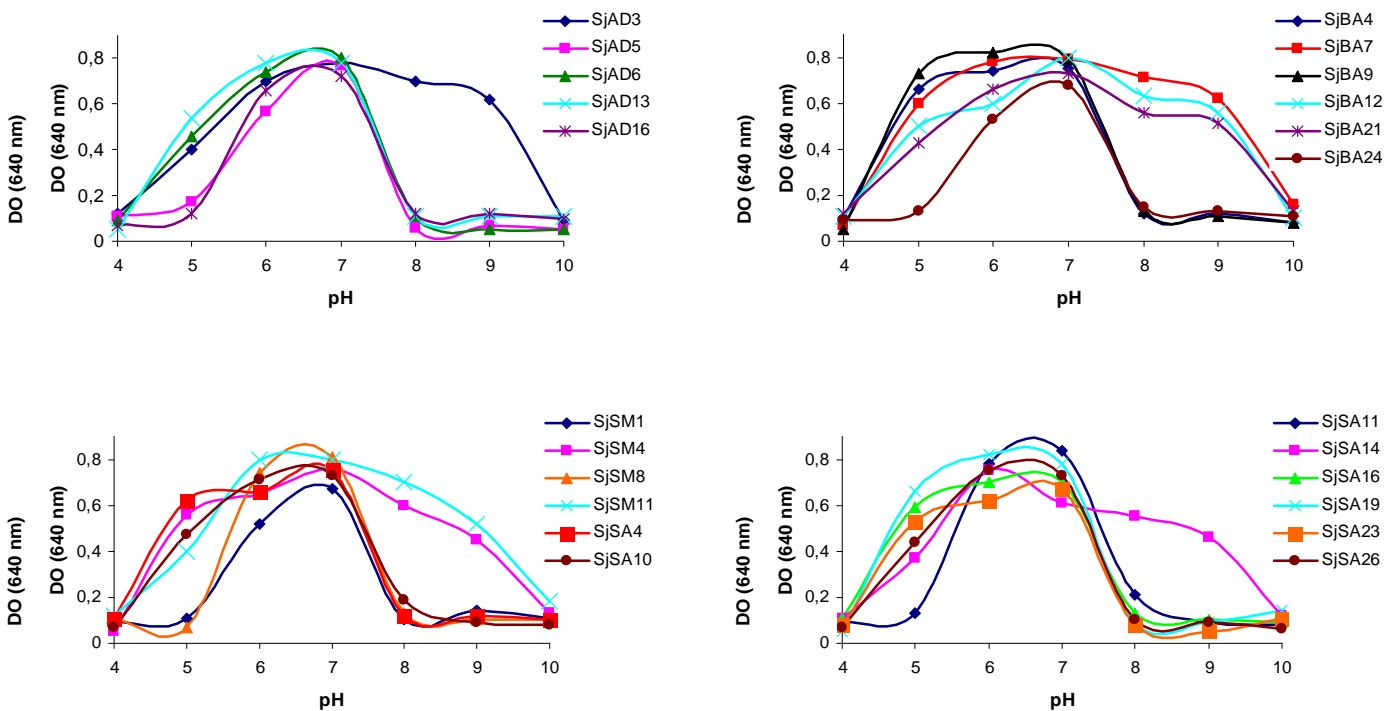


Figure 16 : Effet du pH du milieu sur la croissance des BNL

D'une façon générale, ces résultats montrent que nos souches présentent un spectre classique de tolérance au pH, puisqu'elles sont capables de pousser aussi bien à des pH acides qu'alcalins. En effet, certains auteurs ont rapporté que les souches à croissance lente (*Bradyrhizobium*) ont pu tolérer des pH élevés de l'ordre de 10 alors qu'elles sont sensibles aux pH acides (Yadav et Vyas, 1971 et 1973 ; Jordan, 1984). Toutefois, d'autres auteurs ont rapporté que des bactéries nodulant *Lupinus angustifolius* ont un pH optimal de croissance plus bas (pH \leq 5) que la plupart des autres espèces Bradyrhizobiennes (Graham et Parker,

1964). Il semble que la tolérance au pH acide chez les rhizobia dépend de leur capacité à maintenir un pH intracellulaire (pHi) entre 7.2 et 7.5, même à un pH externe acide (Hungria et Vargas, 2000). D'autre part, plusieurs travaux ont indiqué que le niveau de tolérance des souches au pH du milieu de culture n'est pas corrélé avec le pH du sol d'isolement d'origine (Wood et Cooper, 1988 ; Mohamed *et al.*, 2000).

Il a été établi que l'acidité élevée du sol influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale ce qui affecte d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité des rhizobia et engendre par conséquent une diminution de la nodulation ; alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour les rhizobia que pour la plante hôte (Bordeleau et Prévost, 1994).

4.4.3. Effet de la salinité

Les résultats illustrés dans la figure 17 montrent que les bactéries nodulant *S. junceum* (L.) sont variables dans leur réponse aux différentes concentrations de NaCl testées.

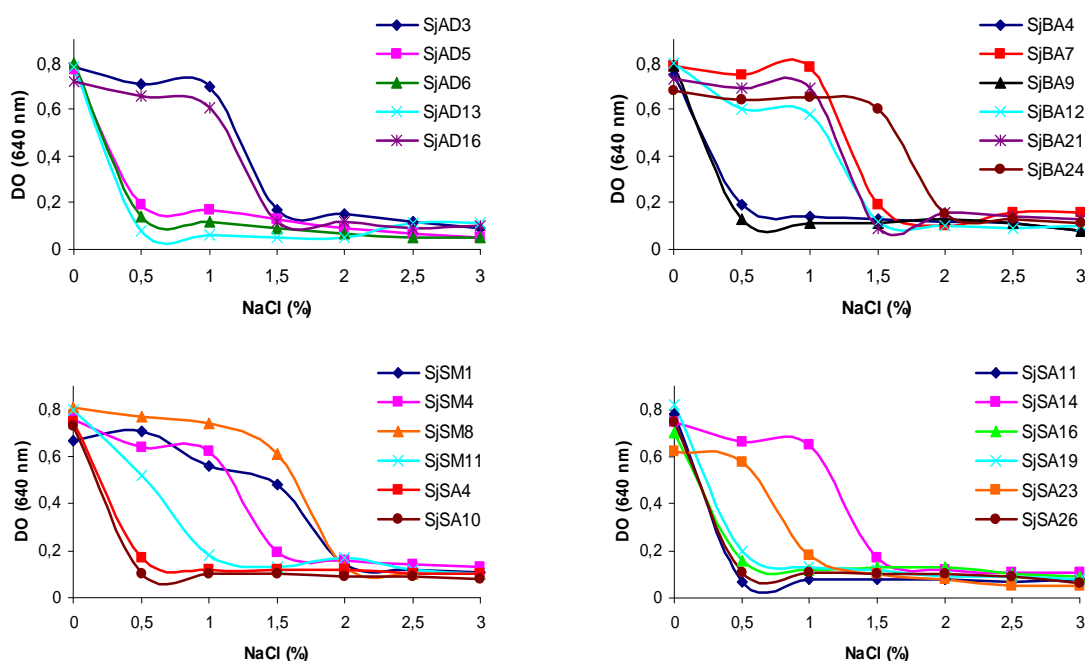


Figure 17 : Effet de la salinité du milieu sur la croissance des BNL

En effet, 43.47% de souches sont capables de croître dans les milieux dont les teneurs en NaCl sont inférieures ou égales à 1% (≈ 170.6 mM). Parmi elles, 3 souches (SjBA24, SjSM1 et SjSM8) semblent tolérer des concentrations en NaCl allant jusqu'à 1.5% (≈ 255.9 mM). À l'opposé, 47.82% des souches se sont montrées les plus affectées par la salinité ; leur croissance diminue fortement lorsque l'on augmente la teneur en NaCl au-delà de 0.5% (≈ 85.3 mM). Enfin, la croissance de la majorité des souches est inhibée quand la concentration en sel dans le milieu de culture s'élève au-dessus de 1.5% de NaCl ($\approx 341,2$ mM).

Il apparaît donc des résultats obtenus que les souches de rhizobia isolées des nodules de *S. junceum* (L.) ne soient pas osmotolérantes, ce qui n'est pas surprenant du fait qu'elles proviennent toutes des sols non-salins. Toutefois, elles présentent une variabilité relative aux différentes concentrations de NaCl testées. Dans les conditions de notre expérience, 11 souches ont été plus sensibles au sel (seuil de tolérance inférieur à 0.5% de NaCl, soit ≈ 85.3 mM), alors que 3 souches tolèrent le NaCl apporté à des doses supérieures à 1% de NaCl (≈ 170.6 mM).

Nos résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs qui ont montré que la croissance de la plupart des souches de *Bradyrhizobium* (*B. cytisi*, *B. refens*, *B. japonicum*, *B. canariense*, *B. arachidis*, *B. lablabi*, *B. retamae*) est affectée à partir d'une concentration de 100 mM de NaCl (Jordan. 1982 ; Vinuesa et al., 2005b ; Chang et al., 2011 ; Chahboune et al., 2012 ; Guerrouj et al., 2013). D'autre part, il a été établi que les bactéries ayant une croissance rapide s'avèrent plus tolérantes à la salinité que celles ayant une croissance lente (Zahran, 1999). De plus, la sensibilité des rhizobia au stress salin varie considérablement d'une espèce à une autre (Vriezen et al., 2007) et d'une souche à l'autre au sein d'une même espèce (Elsheikh et al., 1989). En effet, certaines souches sont inhibées en culture pure à des concentrations en sel de 100 mM ($\approx 0.58\%$ de NaCl) (Yelton et al., 1983 ; Boncompagni et al., 1999) ; alors que d'autres tolèrent des concentrations supérieures à 400 mM ($\approx 2.34\%$ de

NaCl) (Singleton *et al.*, 1983). D'autres études ont montré que des souches isolées d'*Hedysarum*, *Acacia*, *Prosopis* et *leucaena* résistaient à des concentrations de 500 mM (Zhang *et al.*, 1991). Merabet *et al.* (2006) ont pour leur part isolé des bactéries nodulant *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* pouvant tolérer 800 mM de NaCl. Certaines souches ont été rapportées pour leur capacité à croître à des concentrations élevées en sel allant jusqu'à 1.2 M de NaCl, notamment les rhizobia isolés de lupin (Raza *et al.*, 2001).

D'autres études ont montré que la salinité affecte la multiplication et la survie des rhizobia dans le sol et la rhizosphère (Alexander, 1984). Elle inhibe le processus d'établissement de l'infection rhizobienne, entraînant une diminution du nombre de nodules et réduit leur contenu en leghémoglobine (Delgado *et al.*, 1994). La salinité diminue également l'activité de la nitrogénase (Delgado *et al.*, 1993), altère la diffusion intra-nodulaire de l'oxygène (Serraj *et al.*, 1994) et modifie le statut ionique (Serraj *et al.*, 1998). En effet, une augmentation de l'osmolarité du milieu externe entraîne un efflux rapide d'eau vers le milieu extracellulaire qui a pour conséquence une diminution ou une augmentation de la pression osmotique du milieu environnant, une variation de la concentration cytoplasmique en solutés et un changement du volume cellulaire et de la pression de turgescence (Csonka, 1989). En réponse au stress osmotique, les rhizobia, comme tous les êtres vivants, ont développé au cours de l'évolution des stratégies d'adaptation fort élaborées leur permettant de résister et de survivre à ce phénomène (Le Rudulier et Bernard, 1986 ; Zahran, 1999). Ainsi, les bactéries répondent naturellement au stress hyperosmotique par l'accumulation des composés, appelés solutés compatibles, dans leur cytoplasme afin d'éviter les fuites hydriques et de rétablir la balance osmotique (Smith *et al.*, 1994 ; Bosdari *et al.*, 2002). Ces solutés appelés également osmolytes ou osmoprotecteurs sont essentiellement des ions inorganiques, des sucres solubles, des acides aminés et organiques, des polyols, des composés à ammonium quaternaire et des composés tertiaires de sulfonium. Ils sont soit synthétisés *de novo* soit prélevés dans le milieu

(Galinski, 1995 ; Welsh, 2000). En plus de leur effet sur l'osmolarité, ces solutés compatibles auraient un effet stabilisateur sur les macromolécules plus particulièrement les enzymes, autorisant ainsi une protection contre le stress osmotique (Talibart *et al.*, 1994 ; McNeil *et al.*, 1999).

4.4.4. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

Les résultats des antibiogrammes consignés dans le Tableau XV montrent que toutes les souches sont résistantes à la kanamycine, mais sensibles à l'oxytétracycline. Il y a lieu de signaler que les souches SjAD16, SjBA24, SjSM1 et SjSM8 présentent une résistance à 9 antibiotiques sur les 13 testées.

Tableau XV : Résultats de l'antibiorésistance des bactéries nodulant *S. junceum* (L.)

Souches	Antibiotiques												
	Bac (130µg)	Dox (30µg)	Lin (15µg)	Neo (30µg)	Oxa (5µg)	Pen (6µg)	Spi (10µg)	Van (30µg)	Amp (10µg)	Cfx (30µg)	Chl (30µg)	Oxy (30µg)	Kan (30µg)
SjAD3	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
SjAD5	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
SjAD6	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjAD13	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjAD16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
SjBA4	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjBA7	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
SjBA9	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjBA12	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
SjBA21	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
SjBA24	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
SjSM1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
SjSM4	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
SjSM8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
SjSM11	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
SjSA4	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjSA10	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjSA11	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
SjSA14	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
SjSA16	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjSA19	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjSA23	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
SjSA26	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+

(+) Sensible (-) Résistante

Bac: Bacitracine; **Dox:** doxycilline ; **Lin:** Lincomycine; **Neo:** Néomycine ; **Oxa:** Oxacilline;
Pen: Penicilline; **Spi :** Spiramycine ; **Van :** Vancomycine ; **Amp :** Ampicilline ; **Cfx :** céfalexine ;
Chl : Chloramphénicol ; **Oxy:** Oxytétracycline; **Kan:** Kanamycine.

D'autre part, il ressort de ces résultats que 82.6% des souches présentent une forte résistance à la pénicilline et chloramphénicol, 73.91% à la céfalexine, 69.56% à la néomycine et oxacilline. Pour le reste des antibiotiques, les résultats obtenus sont variables d'une souche à l'autre. Une faible résistance a été observée pour la bacitracine, lincomycine et vancomycine chez 47.82% des souches testées. Au contraire, la doxycycline et la pénicilline inhibent fortement la croissance de la majorité des souches testées (82.6%), suivie de la spiramycine (73.91%).

D'une façon générale, l'étude de l'antibiorésistance nous a permis de conclure qu'il y'a une hétérogénéité de réponse entre les souches envers les antibiotiques testés et une tendance à la résistance chez la plupart des souches. Ces résultats sont en accord avec ceux de Borges et al. (1990) qui ont rapporté que les souches de rhizobia à croissance lente sont plus résistantes aux antibiotiques que celles des rhizobia à croissance rapide.

Le mode d'action des antibiotiques contre les bactéries dépend de la structure chimique de l'antibiotique et des composants bactériens, principalement les parois cellulaires (Miličić et al., 2006). Par exemple, la pénicilline, l'ampicilline, la bacitracine, l'oxacilline, la céfalexine et la vancomycine sont connues pour empêcher la synthèse des parois bactériennes. D'autres antibiotiques tels que le chloramphénicol, la kanamycine, la néomycine, la doxycycline, la lincomycine, la spiramycine et l'oxytétracycline empêchent la synthèse des protéines cellulaires ou des membranes. La néomycine empêche également la synthèse de l'ARN.

4.5. Taxonomie numérique

Pour mieux affiner la caractérisation des 23 souches isolées des nodules racinaires de *S. junceum* (L.), les résultats de l'ensemble des tests phénotypiques étudiés ont été soumis à une analyse numérique, basée sur la Classification Ascendante Hiérarchique (C.A.H.). Cette dernière permet de classer nos souches par degré de ressemblance en allant des plus proches vers les plus éloignées. Les résultats ont été traités par UPGMA, le dendrogramme qui en

dérive est représenté par la figure 18. Les caractères les plus discriminants de cette analyse ont été groupés dans une matrice et représentés dans le tableau S3 (Annexe IV).

Le dendrogramme établi sur la base des caractères discriminants montre qu'à une distance de similarité de 0.53, les souches se trouvent réparties en quatre clusters bien distincts (I, II, III et IV) :

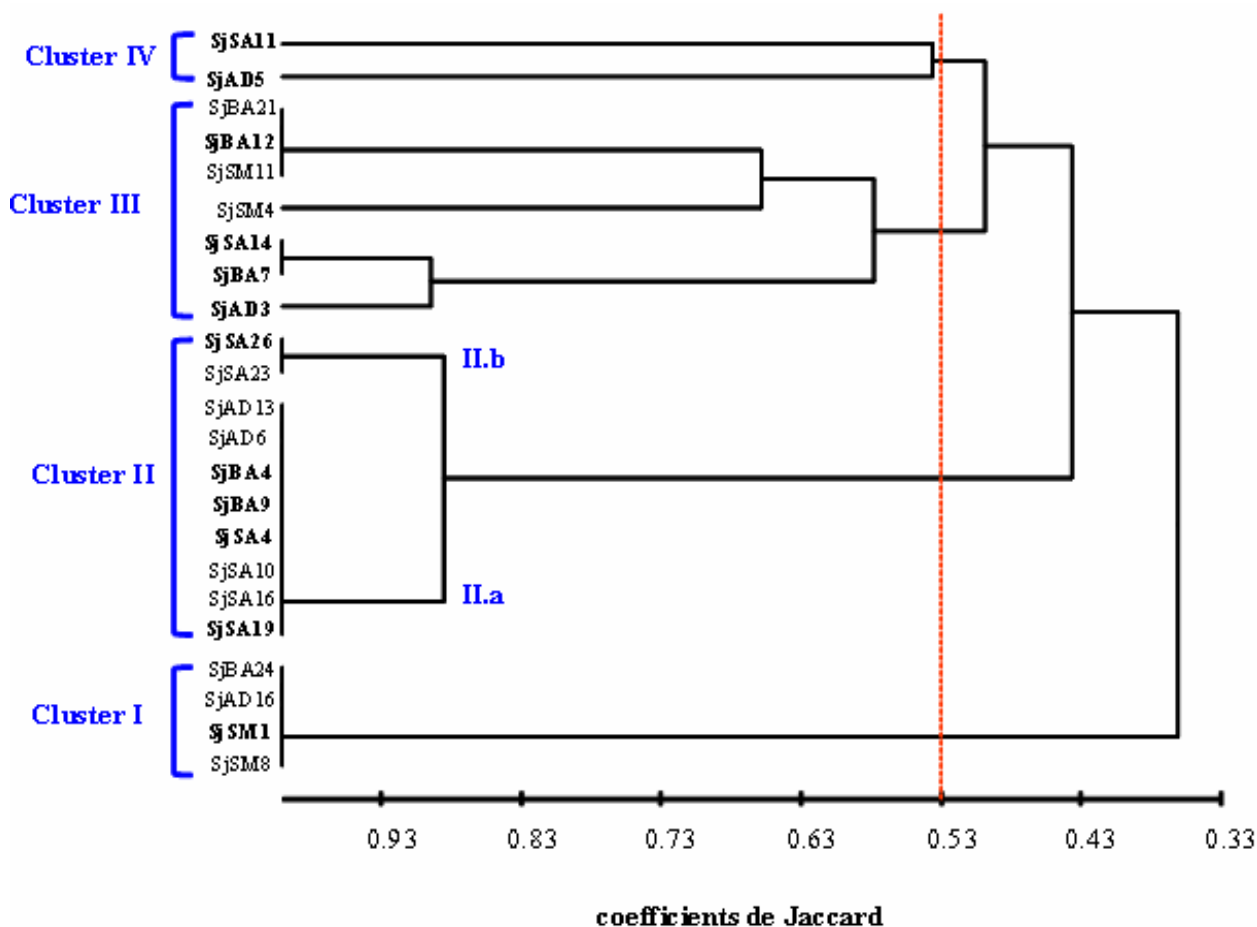


Figure 18 : Dendrogramme obtenu par la méthode UPGMA montrant les similitudes basées sur les résultats des tests phénotypiques entre les bactéries nodulantes *S. junceum* (L.) dans la région de Béjaïa.

Le Cluste I est constitué de quatre souches (SjAD16, SjBA24, SjSM1 et SjSM8) qui présentent une similitude de 100%. Ces souches utilisent l'arabinose, le rhamnose, le tréhalose, l'adonitol, l'inositol, le cellobiose, le raffinose, le saccharose, l'acide lactique, l'acide succinique et l'acétate de potassium comme seule source de carbone et d'énergie. Elles

assimilent également l'alanine, l'acide aspartique, l'isoleucine, la sérine comme source unique d'azote. Elles ne possèdent ni uréase ni β -galactosidase, mais elles réduisent les nitrates. Leur croissance est inhibée à pH < 5 ou à pH >7. Elles apparaissent comme étant les plus tolérantes à la salinité ; en effet, elles sont toutes capables de croître à une salinité de 1.5% de NaCl. Par contre, leur croissance est inhibée à une température de 35°C. Elles présentent une résistance à 9 antibiotiques sur 13 testés.

Le Cluster II regroupe 10 souches originaires de 3 sites différents. À une distance de similitude de 0.88, ce cluster se subdivise lui-même en deux sous-clusters dont le premier (IIa) est formé de 8 souches (SjSA19, SjSA16, SjSA10, SjSA4, SjBA9, SjBA4, SjAD6, SjAD13) et le deuxième sous-cluster (IIb) est composé de deux souches (SjSA23, SjSA26) qui se distinguent par leur incapacité d'utiliser le mannose, le maltose et le tréhalose comme source de carbone et d'énergie. Les souches du cluster II sont incapables de réduire les nitrates, ni de pousser à pH4 ou à pH>7 et elles ne tolèrent pas des températures supérieures à 35°C. Elles se distinguent surtout par leur sensibilité à la salinité, en effet, leur croissance est complètement inhibée dans un milieu de culture contenant 0.5% de NaCl. Elles sont sensibles à la doxycycline, vancomycine, pénicilline et oxytétracycline. Elles sont incapables d'assimiler le sucrose, raffinose, dextrine, salicine, sorbose, rhamnose, valine, leucine, serine et histidine comme seule source de carbone ou d'azote.

Le Cluster III renferme 7 souches dont trois (SjSM11, SjBA12 et SjBA21) sont similaires à 100%. Les souches de ce cluster sont caractérisées par leur capacité à assimiler tous les substrats carbonés testés, à l'exception du cellobiose et l'amidon. Elles sont incapables d'assimiler l'alanine comme source d'azote. Elles possèdent une uréase, une nitrate réductase et une β -galactosidase. Elles sont caractérisées par leur aptitude à pousser en présence de 1% de NaCl, elles présentent également une bonne croissance entre pH5 et pH9 et à des températures situées entre 20 et 30°C. Elles sont toutes résistantes à l'ampicilline,

bacitracine, chloramphenicol, cefalexine, lincomycine et vancomycine, mais sensibles à la doxycycline, neomycine, oxytetracycline, oxacilline, pénicilline et spiramycine.

Le cluster IV est formé par deux souches (SjSA11 et SjAD5), caractérisées par leur incapacité d'utiliser l'arabinose, inositol, adonitol et acide succinique comme seule source de carbone et d'énergie. Par contre, elles utilisent tous les acides aminés, comme source d'azote, à l'exception de la glycine bêtaïne. Elles sont sensibles à la bacitracine, doxycycline, vancomycine, pénicilline, oxytetracycline, lincomycine et cefalexine, mais résistantes à l'ampicilline, oxacilline, chloramphenicol, neomycine et spiramycine. Elles possèdent une β -galactosidase et une nitrate réductase, mais pas l'uréase. Elles présentent une bonne croissance entre 25 et 30 °C, mais pas à 35°C. Elles sont très sensibles à la salinité ; en effet, leur croissance est complètement inhibée en présence de 0.5% de NaCl.

4.6. Conclusion

D'une façon générale, la caractérisation phénotypique, à travers les caractères cellulaires, cultureux, biochimiques, physiologiques et la ré-infection de la plante-hôte d'origine, ont permis de classer les souches étudiées dans le groupe des bactéries à croissance lente du genre *Bradyrhizobium*. Par ailleurs, les résultats des tests phénotypiques appuyés par la taxonomie numérique ont révélé une importante diversité des bactéries nodulant *S. junceum* (L.) originaires de la région de Béjaïa. Malgré que cette diversité est retrouvée parmi les souches isolées de la même plante, elle semble néanmoins, dépendante des conditions environnementales ou édaphiques locales de leurs sites géographiques d'origine (Ojha *et al.*, 2017 ; Rathi *et al.*, 2018).

5. CARACTERISATION GENOTYPIQUE DES BNL

Dans cette partie, nous avons étudié la diversité génomique de nos souches, à travers une caractérisation moléculaire du gène codant l'ARNr 16S, de deux gènes de ménage (*recA* et *glnII*) et d'un gène symbiotique (*nodC*).

5. 1. Amplification de l'ADNr 16S

La PCR réalisée sur l'ADNr 16S a permis de générer une bande unique d'environ 1500 pb, révélée par électrophorèse chez toutes les bactéries nodulant *S. junceum* (L.) (Figure 19). Cette bande correspond bien à la taille attendue des gènes ARNr 16S chez les rhizobia (Laguerre *et al.*, 1994a).

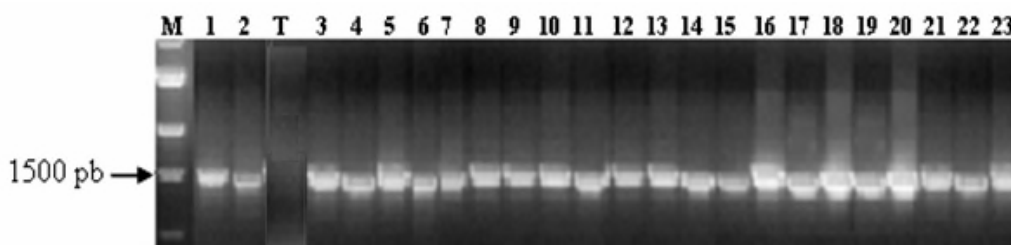


Figure 19: Electrophorèse des amplicons obtenus par PCR de l'ADNr 16S des bactéries nodulant *S. junceum* (L.)

(M= Marqueur ; T= témoin ; 1= SjAD3 ; 2= SjAD5 ; 3= SjAD6 ; 4= SjAD13 ; 5= SjAD16 ; 6= SjBA4 ; 7= SjBA7 ; 8= SjBA9 ; 9= SjBA12 ; 10= SjBA21 ; 11= SjBA24 ; 12= SjSM1 ; 13= SjSM4 ; 14= SjSM8 ; 15= SjSM11 ; 16= SjSA4 ; 17= SjSA10 ; 18= SjSA11 ; 19= SjSA14 ; 20= SjSA16 ; 21= SjSA19 ; 22= SjSA23 ; 23= SjSA26)

5. 2. Analyse du polymorphisme de restriction de l'ADNr 16S

Afin de réaliser un premier tri parmi les souches de la collection à retenir pour le séquençage et l'analyse phylogénétique, nous avons analysé ces dernières par PCR/RFLP de l'ADNr 16S. Malgré qu'elle offre moins d'information directe sur l'évolution que la comparaison des séquences, la RFLP reste néanmoins une méthode moins coûteuse, rapide et moins complexe à mettre en évidence (Neyra *et al.*, 1998). De plus, cette technique constitue une méthode suffisamment discriminante pour différencier des espèces au sein d'un même genre bactérien, tels que *Rhizobium* (Laguerre *et al.*, 1994a, 1996), *Pseudomonas* (Laguerre *et al.*, 1994b) et *Agrobacterium* (Ponsonnet et Nesme, 1994).

Les 4 endonucléases de restriction (*AluI*, *DdeI*, *HaeIII* et *Sau96I*) appliquées isolément sur le produit d'amplification de l'ADNr 16S des 23 souches de notre collection, ont permis de générer 4 à 7 profils de restriction distincts. Chaque profil possède deux à huit fragments, décelés avec chaque enzyme de restriction, et dont la taille varie de 100 à 850 pb. Le bilan de profils obtenus est représenté dans le Tableau XVI.

Tableau XVI: Profils de restriction du gène codant l'ARNr 16S amplifié par PCR

Souches	Profils de restriction produits par:				PCR-RFLP types	Nombre d'isolats
	<i>AluI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Sau96I</i>		
SjAD3	a	a	a	a	I	1
SjSA19	a	a	c	b	II	1
SjAD5 , SjAD16	a	b	b	b	III	2
SjSM1 , SjSM8, SjBA24	a	b	c	b	IV	3
SjSA4 , SjSA23, SjAD6	a	c	b	b	V	3
SjAD13, SjSA10, SjBA4	a	c	c	b	VI	3
SjSA11	a	c	e	f	VII	1
SjBA7	a	d	a	d	VIII	1
SjSA16, SjBA9	a	e	c	b	IX	2
SjBA12 , SjBA21, SjSM4, SjSM11	b	f	d	e	X	4
SjSA14	c	g	a	d	XI	1
SjSA26	d	d	b	c	XII	1
Nombre de profils	04	07	05	06		

- Les souches indiquées en gras se réfèrent aux souches sélectionnées pour les analyses de séquences.
- Les profils identiques sont désignés par la même lettre pour chaque enzyme de restriction.
- Les types PCR-RFLP représentent la combinaison des profils ou génotypes (notés de I à XII) obtenus avec les quatre enzymes de restriction.

Par ailleurs, la combinaison des profils de restriction du gène codant l'ARNr 16S générés par les quatre endonucléases a permis de distinguer, chez les 23 souches, 12 génotypes distincts (ou PCR/RFLP types) notés de I à XII et chaque profil regroupe de 1 à 4 isolats. Le regroupement sur la base des profils obtenus par PCR/RFLP révèle une diversité infra-spécifique et un polymorphisme génétique importants parmi les isolats étudiés. Il est à noter que les souches de Sidi-Aïch sont les plus diversifiées et sont réparties en sept profils distincts, suivies de celles de Barbacha, d'Adekar puis de Semaoune, avec respectivement cinq, quatre

et deux profils. Les profils IV, V, VI et X sont les plus dominants (56.5% des souches) et sont présents au moins dans deux sites différents.

Pour établir l'existence de corrélations potentielles entre les génotypes et les caractéristiques des différents échantillons de sols, nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP). Les résultats obtenus (Figure 20) indiquent une forte corrélation entre la distribution des génotypes et les sites d'échantillonnage. Les deux premiers axes (F1 et F2) de l'ACP sont les plus importants et contribuent à 79.5% de l'inertie totale.

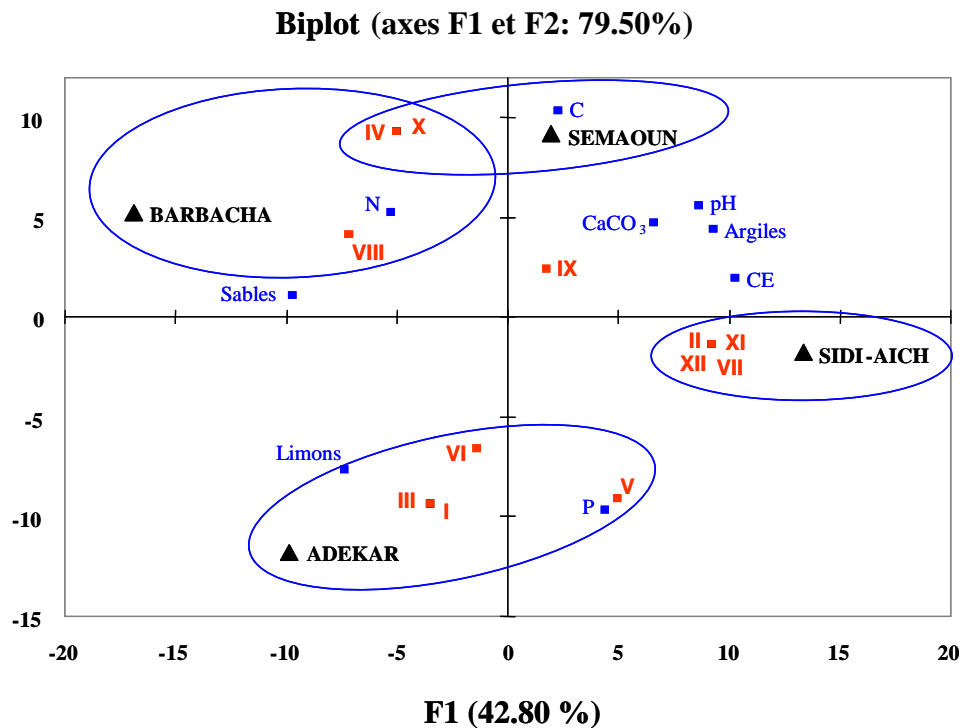


Figure 20 : Graphique des 2 premières dimensions de l'analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les données d'abondance du génotype ou profil RFLP (notées I à XII en rouge) en relation avec les facteurs de sol (en bleu ■) dans quatre sites d'échantillonnage (indiqués en symboles triangulaires ▲)

Une corrélation étroite a été observée entre les variables du sol d'Adekar (niveaux élevés des limons et de phosphore) et les profils I, III, V et VI. Les caractéristiques du sol de Sidi-Aïch (pH, niveaux élevés d'argile, calcaire total et conductivité électrique) ont été associées aux profils II, VII, XI et XII. Le sol de Barbacha avec les profils IV, VIII et X et celui de

Semaoune avec les profils IV et X partagent les mêmes caractéristiques (teneurs élevées en carbone organique et faibles teneurs en phosphore).

Les résultats de l'ACP démontrent une corrélation claire entre les génotypes des souches rhizobiennes et les caractéristiques du sol. Ils sont en accord avec ceux obtenus par Lu *et al.* (2009) sur les communautés de rhizobia isolés de *Caragana* en Chine ; et ceux de Fierer et Jackson (2006) sur la diversité et la biogéographie des communautés bactériennes du sol en Amérique du Nord et du Sud. Ces auteurs ont montré que la diversité génétique des souches peut être affectée par l'origine géographique du sol.

5. 3. Séquençage et phylogénie des bactéries nodulant *S. junceum* (L.)

Pour situer avec précision la position taxonomique et phylogénétique de nos souches par rapport aux espèces connues de rhizobia, un représentant de chaque génotype a été sélectionné pour le séquençage de l'ADNr 16S, des gènes de ménage (*recA*, *glnII*) et du gène symbiotique (*nodC*). Ainsi, 12 souches représentatives des génotypes obtenus par PCR/RFLP sont retenues pour l'étude phylogénétique.

5.3.1. Phylogénie basée sur les séquences de l'ADNr 16S

La comparaison de séquences de l'ADNr 16S avec le logiciel BLAST dans la base de données GenBank, montre que nos souches sont phylogénétiquement proches du genre *Bradyrhizobium*, avec au moins 99 % de similarité. Par ailleurs, l'arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement de 1150 pb des séquences partielles de l'ADNr 16S, montre la distribution des souches étudiées dans deux principaux clades (I et II) au sein du genre *Bradyrhizobium* (Figure 21). La topologie de l'arbre phylogénétique basée sur l'ADNr 16S est semblable aux conclusions des études antérieures (Willems *et al.*, 2001 ; Kwon *et al.*, 2005 ; Menna *et al.*, 2009 ; Durán *et al.*, 2014 ; Ojha *et al.*, 2017 ; Rathi *et al.*, 2018 ; Stępkowski *et al.*, 2018).

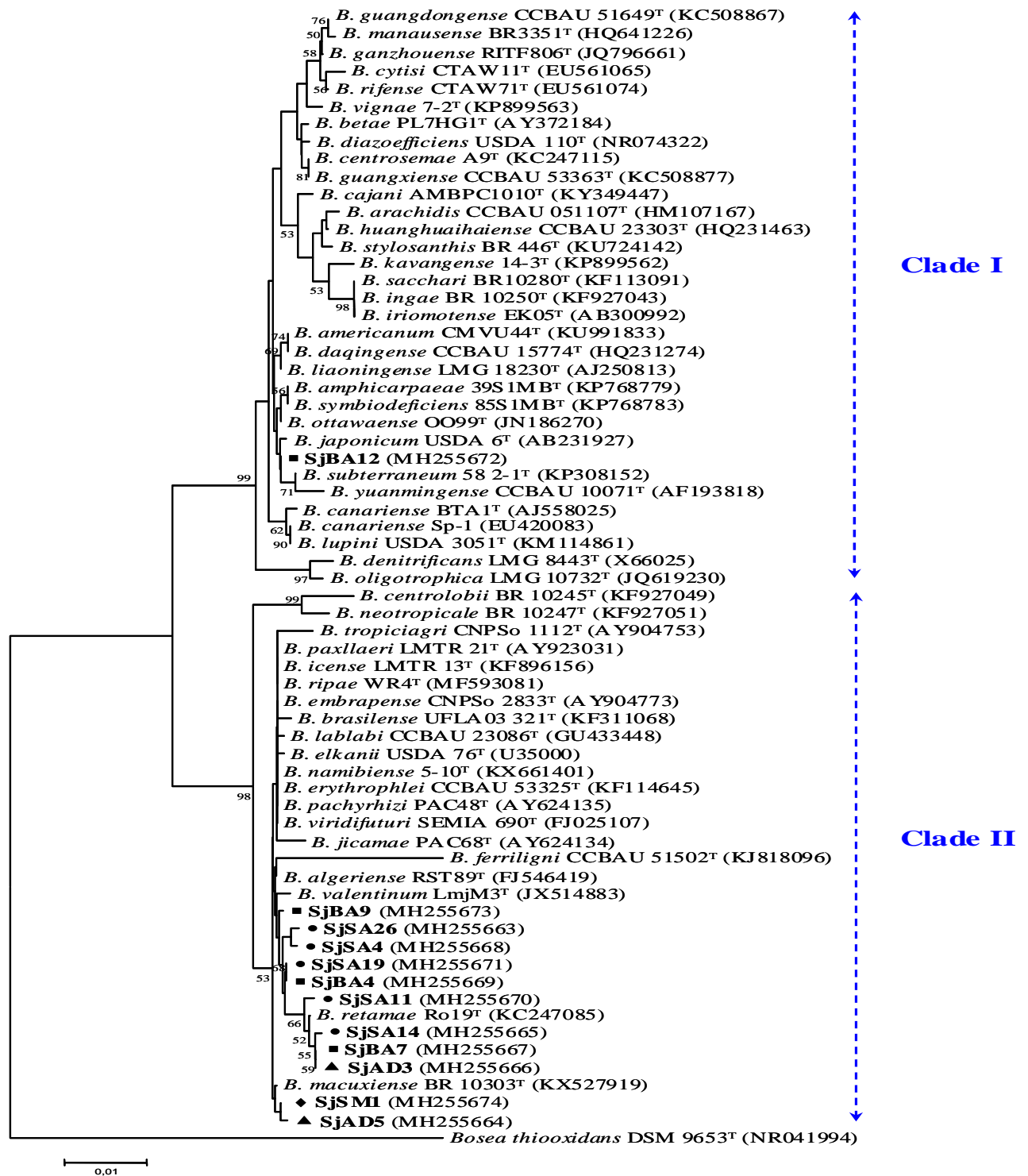


Figure 21 : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S

Les souches d'Algérie sont indiquées en gras et leurs origines géographiques en symboles : ■ Barbacha (BA), ▲ Adekar (AD), ● Sidi-Aïch (SA) et ♦ Semaoum (SM). *Bosa thiooxidans* DSM 9653^T a été prise comme outgroup. Les nombres entre parenthèses représentent les numéros d'accessions GenBank des souches. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l'espèce. Les valeurs bootstrap, exprimées en pourcentage de 1000 répétitions, sont données aux points de ramification (seules les valeurs $\geq 50\%$ sont représentées). La barre d'échelle de 1% indique le nombre de substitutions par site.

Le premier clade englobe uniquement la souche SjBA12 appartenant à la lignée de *B. japonicum* avec une similarité de séquence de 99.91% avec la souche-type de *B. japonicum* USDA6^T. De plus, cette souche partage une similarité de 99.39% avec *B. canariense* Sp-1 isolé de *S. junceum* (L.) en Espagne (Ruiz-Díez *et al.*, 2009). Le deuxième clade comprend les 11 souches restantes qui sont regroupées au sein de la lignée *B. elkanii*. Ces souches présentent un pourcentage de similarité allant de 99.21% à 99.91% entre elles et au sein des espèces de *Bradyrhizobium* apparentées les plus proches phylogénétiquement (*B. algeriense* RST89^T, *B. macuxiense* BR 10303^T, *B. retamae* Ro19^T et *B. valentinum* LmjM3^T).

Il est bien établi que l'analyse de la séquence ADNr 16S est la base de la classification des bactéries, incluant celle des rhizobia. Toutefois, bien qu'il soit précis pour la définition des genres, l'ADNr 16S n'est pas suffisamment discriminatoire pour permettre une résolution intra-spécifique puisque ce gène est hautement conservé, ceci est dû à l'évolution très lente de sa séquence (Haukka *et al.*, 1996; Barrera *et al.*, 1997; Rivas *et al.*, 2009). D'autre part, les résultats obtenus avec cette séquence ne sont pas suffisamment corrélés avec les hybridations ADN/ADN, qui sont des critères de définition des espèces (Zakhia et de Lajudie, 2006).

D'autres gènes ayant démontré leur importance pour la différenciation entre les espèces ont été analysés. Ces gènes nommés gènes de ménage (housekeeping genes, en anglais), codent pour la synthèse des protéines assurant les fonctions indispensables à la survie de tous types de cellules comme : *atpD* (sous-unité β de l'ATP synthase), *glnII* (glutamine synthetase II), *recA* (recombinase A). Ces gènes sont ainsi de bons candidats comme marqueurs alternatifs à l'ADNr 16S (Gaunt *et al.*, 2001 ; Peix *et al.*, 2015) et ils ont été proposés comme un outil de choix dans le typage moléculaire afin de permettre la différenciation entre les espèces très proches (Menna *et al.*, 2009).

5.3.2. Phylogénie basée sur les gènes de ménage (*glnII* et *recA*)

Tenant compte des limites du gène ARNr 16S dans la taxonomie bactérienne et pour apporter un degré de précision supplémentaire à la phylogénie des bactéries nodulant *S. junceum* (L.), nous avons construit un arbre phylogénétique pour chaque gène de ménage (*glnII* et *recA*) ainsi que de la séquence résultant de leur concaténation, (Figures 22a, 22b et 22c).

Qu'ils aient été générés à partir des gènes isolés (Figures 22a et 22b) ou des gènes concaténés (Figure 22c), ces arbres montrent à nouveau une distribution des souches en deux grands clades I et II, identiques à ceux observés à partir des séquences de l'ADNr 16S, et dont les branchements sont supportés par de bonnes valeurs de bootstrap. Les gènes de ménage, cependant, montrent une résolution plus importante que celle obtenue avec le gène de l'ARNr 16S.

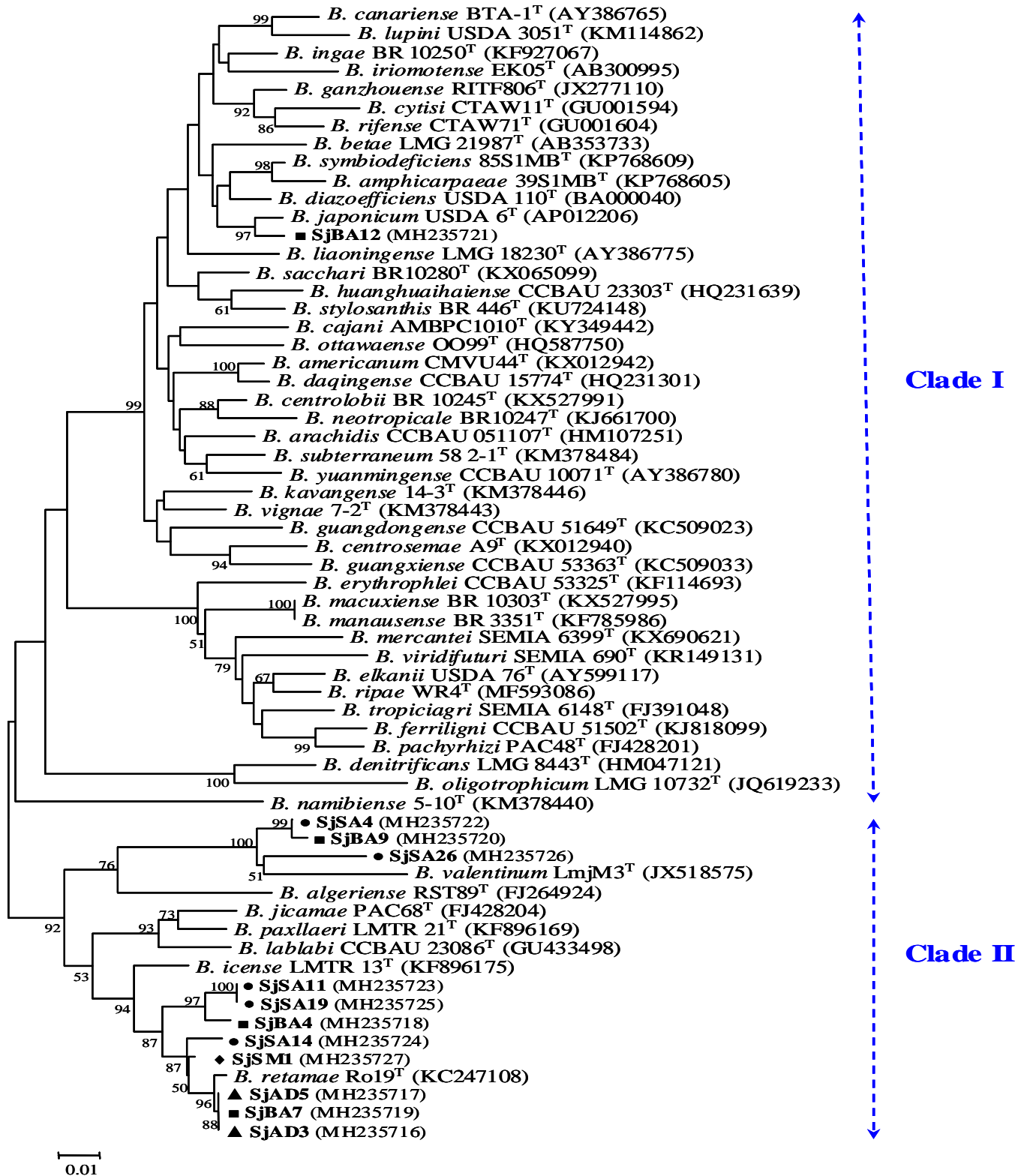


Figure 22a : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences du gène *glnII*.

Les souches d'Algérie sont indiquées en gras et leurs origines géographiques en symboles : ■ Barbacha (BA), ▲ Adekar (AD), ● Sidi-Aïch (SA) et ◆ Semaoun (SM). Les nombres entre parenthèses représentent les numéros d'accèsions GenBank des souches. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l'espèce. Les valeurs bootstrap, exprimées en pourcentage de 1000 répétitions, sont données aux points de ramification (seules les valeurs $\geq 50\%$ sont représentées). La barre d'échelle de 1% indique le nombre de substitutions par site.

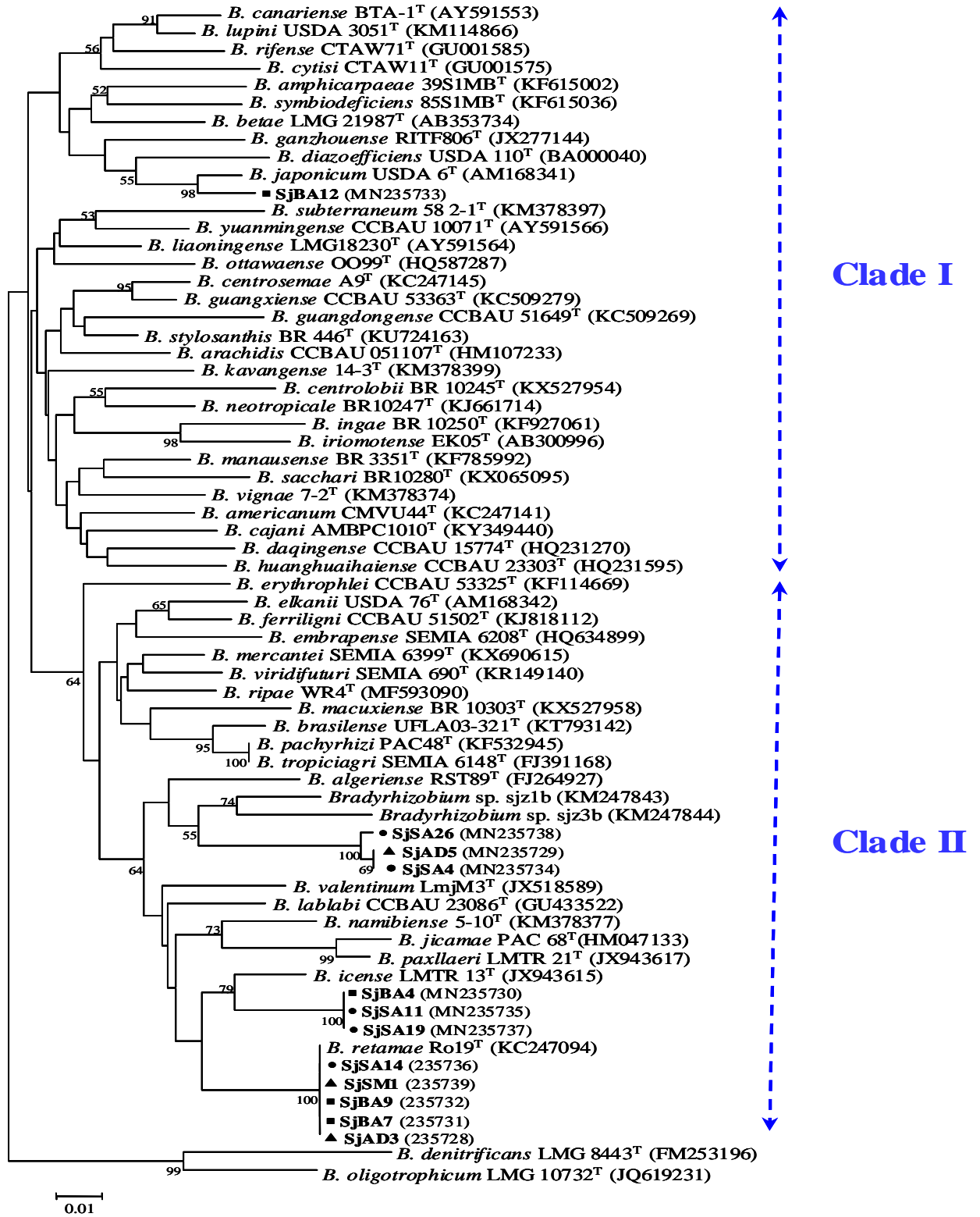


Figure 22b : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences du gène *recA*.

Les souches d'Algérie sont indiquées en gras et leurs origines géographiques en symboles : ■ Barbacha (BA), ▲ Adekar (AD), ● Sidi-Aïch (SA) et ◆ Semaoun (SM). Les nombres entre parenthèses représentent les numéros d'accèsions GenBank des souches. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l'espèce. Les valeurs bootstrap, exprimées en pourcentage de 1000 répétitions, sont données aux points de ramification (seules les valeurs $\geq 50\%$ sont représentées). La barre d'échelle de 1% indique le nombre de substitutions par site.

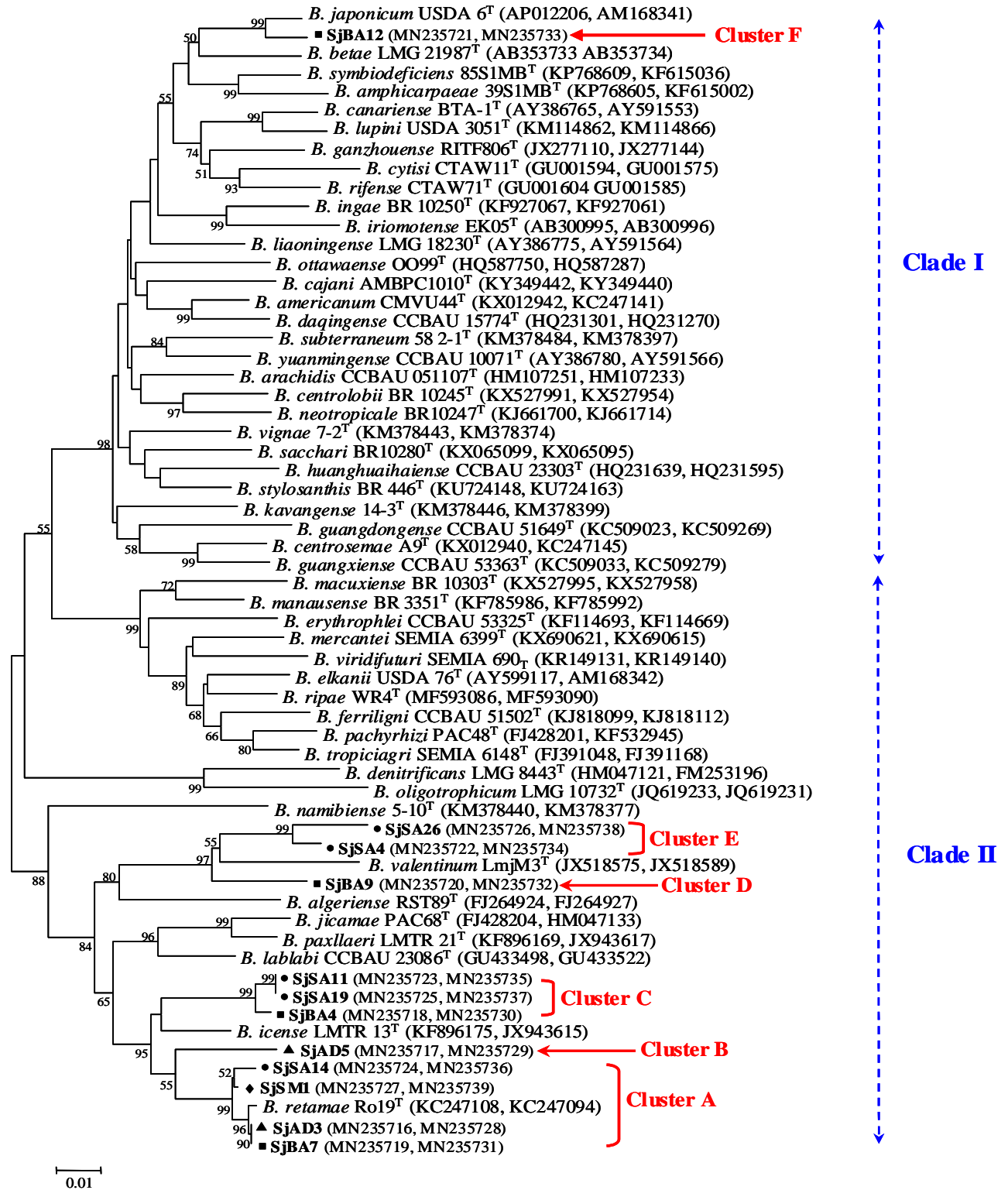


Figure 22c : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé les séquences des gènes de ménage (*glnII* et *recA*) concaténés.

Les souches d'Algérie sont indiquées en gras et leurs origines géographiques en symboles : ■ Barbacha (BA), ▲ Adekar (AD), ● Sidi-Aïch (SA) et ◆ Semaoun (SM). Les nombres entre parenthèses représentent les numéros d'accèsions GenBank des souches. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l'espèce. Les valeurs bootstrap, exprimées en pourcentage de 1000 répétitions, sont données aux points de ramification (seules les valeurs ≥ 50% sont représentées). La barre d'échelle de 1% indique le nombre de substitutions par site.

Pour améliorer la robustesse des constructions phylogéniques, un arbre supplémentaire a été construit après concaténation des gènes ADNr 16S, *glnII* et *recA*, des 12 souches représentatives pour lesquelles les séquences des trois gènes avaient été obtenues (Figure 23). Comme pour les deux gènes de ménage (*glnII* et *recA*, d'une longueur totale de 871 pb) (Figure 22c), l'arbre construit à partir des séquences des trois gènes concaténés (ADNr 16S, *glnII* et *recA*, d'une longueur totale de 1995 pb), a clairement dispersé les souches étudiées dans 6 clusters désignés de A à F, où la majorité des souches sont regroupées dans le clade II.

Le premier clade est constitué de la seule souche SjBA12 (cluster F) à laquelle *B. japonicum* USDA6^T a été identifié comme son plus proche voisin phylogénétique (99.19 % de similarité de séquence). La solidité de ce cluster est confirmée par une valeur de bootstrap de 100%. Les 11 souches du deuxième clade sont réparties en cinq clusters distincts (A à E). Les souches appartenant au cluster A (SjAD3, SjBA7, SjSA14 et SjSM1) partagent une similarité de séquence élevée allant de 99.31 à 99.77% avec *B. retamae* Ro19^T, une espèce capable de noduler *Retama* spp. (Guerrouj *et al.*, 2013). Cette espèce n'a pas été rapportée dans la littérature comme étant une bactérie associée aux nodules de *S. junceum* (L.).

L'aspect le plus intéressant de ces résultats concerne les souches des clusters B (SjAD5) et C (SjBA4, SjSA11 et SjSA19) qui ont montré de faibles identités de séquence avec les souches types de *B. retamae* Ro19^T (97.91 à 98.07%) et *B. icense* LMTR 13^T (97.60 à 98.27%) respectivement. De même, les souches appartenant aux clusters D (SjBA9) et E (SjSA4, SjSA26) ont également montré de faibles similitudes de séquence, allant de 97.03 à 97.5%, avec la souche-type de *B. valentinum* LmjM3^T. En appliquant une similitude de séquence de 98.8%, comme valeur seuil de définition des espèces génotypiques défini par Ojha *et al.* (2017), les sept souches distribuées dans les clusters B, C, D et E pourraient représenter deux à quatre nouvelles espèces potentielles au sein du genre *Bradyrhizobium*.

Par ailleurs, bien qu'elles soient isolées à partir de nodules de *S. junceum*, les séquences *recA* de nos souches, comparées aux seules séquences disponibles de *Bradyrhizobium* sp. (sjz1b et sjz3b) isolés en Croatie par Parker (2014), ont moins de 95% de similitude (Figure 21b).

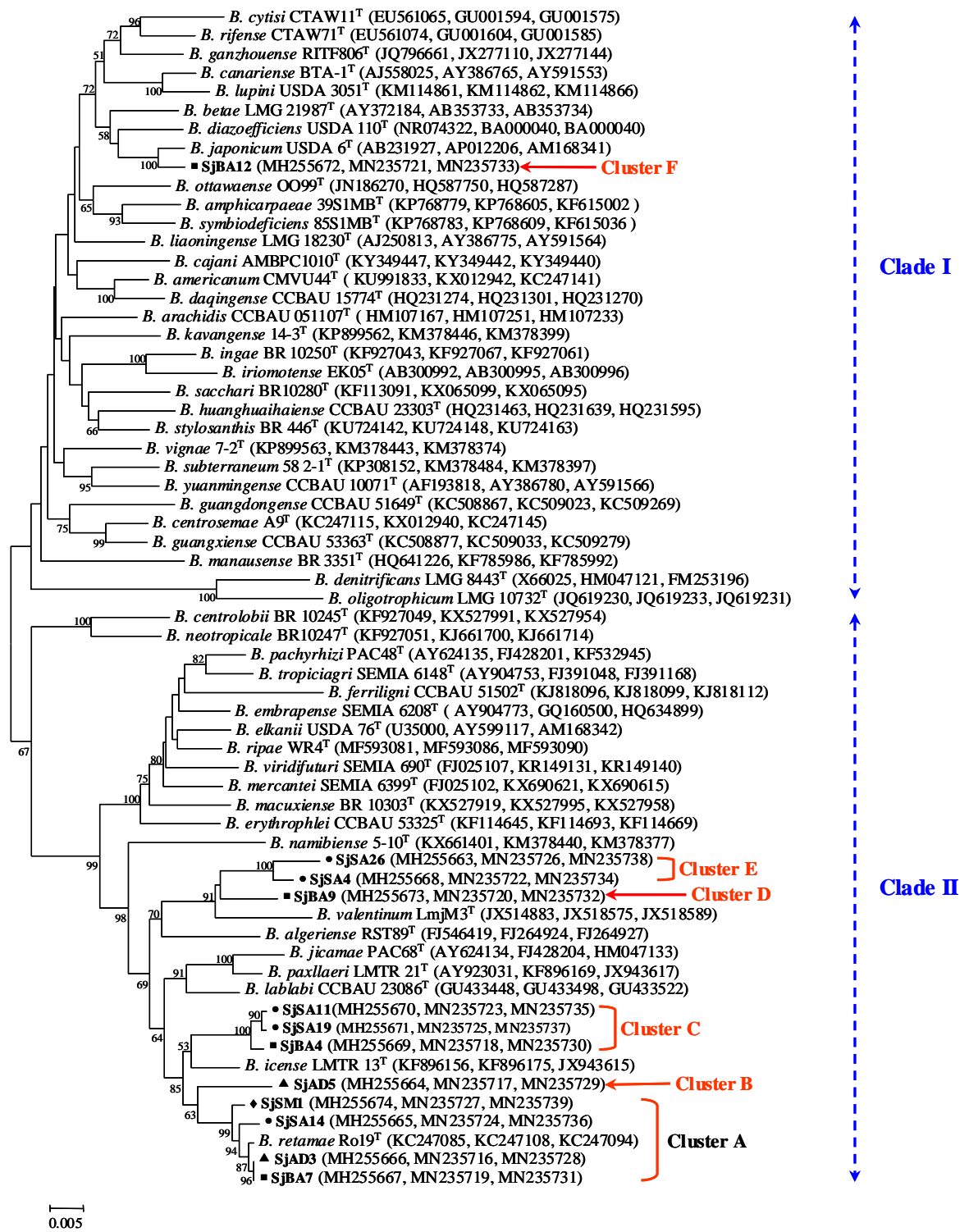


Figure 23 : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences de trois gènes (ADNr 16S, *glnII* et *recA*) concaténés.

Les souches d'Algérie sont indiquées en gras et leurs origines géographiques en symboles : ■ Barbacha (BA), ▲ Adekar (AD), ● Sidi-Aïch (SA) et ♦ Semaoun (SM). Les nombres entre parenthèses représentent les numéros d'accèsions GenBank des souches. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l'espèce. Les valeurs bootstrap, exprimées en pourcentage de 1000 répétitions, sont données aux points de ramification (seules les valeurs $\geq 50\%$ sont représentées). La barre d'échelle de 0.5% indique le nombre de substitutions par site.

Nos résultats sont en accord avec des études antérieures, qui ont rapporté que *S. junceum* (L.) de différentes régions méditerranéennes était principalement nodulé par des bactéries à croissance lente appartenant au genre *Bradyrhizobium* (Quatrini *et al.*, 2002; Cardinale *et al.*, 2008; Ruiz-Díez *et al.*, 2009; Parker, 2014). En plus de *B. canariense*, Ruiz-Díez *et al.* (2009) ont montré que *Phyllobacterium myrsinacearum* était également capable de noduler cette légumineuse arbustive. D'autre part, Stepkowski *et al.* (2018) ont rapporté que le genre *Bradyrhizobium* semble être le groupe prédominant des rhizobia nodulant la majorité des légumineuses appartenant à la tribu des Genisteeae. En effet, des travaux antérieurs au laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Béjaïa ont montré que les bactéries isolées à partir de nodules de *Retama raetam*, *Retama sphaerocarpa*, *Cytisus villosus*, *Lupinus micranthus*, *Calicotome spinosa*, *Genista ferox*, *Genista numidica* et *Genista tricuspidata* de la tribu des Genisteeae, originaires de différentes régions climatiques et écologiques du Nord-est d'Algérie, appartiennent à différentes espèces classées dans le genre *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. canariense*, *B. cytisi*, *B. rifense*, *B. lupini*, *B. elkanii*, *B. ottawaense*, *B. valentinum* et *B. algeriense*) (Boulila *et al.*, 2009 ; Ahnia *et al.*, 2014 ; Bourebaba *et al.*, 2016 ; Salmi *et al.*, 2018 ; Ahnia *et al.*, 2018 ; Boudehouche *et al.*, 2020). De même, Rodríguez-Echeverría *et al.* (2003) ont signalé dans la péninsule ibérique, que six légumineuses arbustives de la tribu des Genisteeae (*Cytisus balansae*, *C. multiflorus*, *C. scoparius*, *C. striatus*, *Genista hystrix* et *Retama sphaerocarpa*) formaient des nodules efficaces avec des souches appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Chahboune *et al.* (2012) ont isolé une nouvelle espèce (*Bradyrhizobium rifense*) de *Cytisus villosus* au Maroc, tandis que Guerrouj *et al.* (2013) ont analysé plusieurs souches de *Bradyrhizobium* isolées des nodules de deux espèces de *Retama* [*R. raetam* et *R. sphaerocarpa* L. (Boiss.)] poussant en Espagne et au Maroc. Ces auteurs ont proposé un nouveau symbiovar (sv. *retamae*) avec une nouvelle espèce nommée *B. retamae* sp. nov. D'autre part, Durán *et al.* (2014) ont isolé *B. valentinum*

des nodules de *Lupinus-mariae-josephae* (Lmj), une Genistee endémique de la région de Valence (Espagne). De même, Beukes *et al.* (2016) ont signalé la présence de *B. arachidis* parmi les symbiotes d'*Argyrobium rupestre* (tribu des Genistee) poussant en Afrique du Sud. En revanche, d'autres études ont rapporté que différentes espèces de Genistee telles que *Teline monspessulana* (Italie, Cardinale *et al.*, 2008), *Argyrobium rupestre* (Afrique du Sud, Beukes *et al.*, 2016) et *Genista saharae* (Algérie, Chaïch *et al.*, 2016) étaient nodulées par les souches de *Mesorhizobium*. Mahdhi *et al.*, (2008) ont rapporté l'isolement de *Sinorhizobium*, *Rhizobium* et *Agrobacterium* de *Retama raetam* dans les zones arides de Tunisie. D'autres espèces appartenant aux genres *Ensifer* et *Neorhizobium* ont pu noduler *Genista saharae* poussant dans le Nord-est du Sahara Algérien (Chaïch *et al.*, 2016).

5.3.3. Phylogénie basée sur les séquences du gène (*nodC*)

Le gène *nodC* est très important pour la nodulation et la fixation de l'azote chez toutes les espèces rhizobiennes. La classification résultant de l'analyse de ce gène reflète la spécificité symbiotique et la gamme d'hôtes des espèces de légumineuses (Laguerre *et al.*, 2001). En outre, sa séquence est fortement conservée au niveau des symbiovars chez les légumineuses (Laguerre *et al.*, 2001 ; Álvarez-Martínez *et al.*, 2009).

L'arbre phylogénétique généré à partir du gène *nodC* (Figure 24) a placé la majorité de nos souches (91.66%) dans le cluster symbiovar *retamae* déjà décrit par Guerrouj *et al.*, (2013) sur diverses légumineuses de la tribu des Genistee. Ces souches sont regroupées avec *B. retamae* Ro19^T, *B. valentinum* LmjM3^T et *B. algeriense* RST89^T, nodulant respectivement *Retama monosperma*, *Lupinus mariae-josephae* et *Retama sphaerocarpa*. La similitude de séquence de ces souches entre elles et au sein des espèces de *Bradyrhizobium* les plus proches, est comprise entre 98.57 et 100%. La souche SjBA12 a montré une homologie de séquence de 81.62% avec le gène *nodC* des souches de référence de *Bradyrhizobium* symbiovar *glycinearum*, et des similitudes de séquence de 82.34 à 82.68% avec le gène *nodC* des

souches de référence de *Bradyrhizobium* symbiovar *tropici*. Ces valeurs de similitudes sont inférieures à celles trouvées chez divers symbiovars des espèces de *Bradyrhizobium*. Ces résultats laissent indiquer l'existence d'un éventuel nouveau symbiovar dans le genre *Bradyrhizobium* représenté par la souche SJB12.

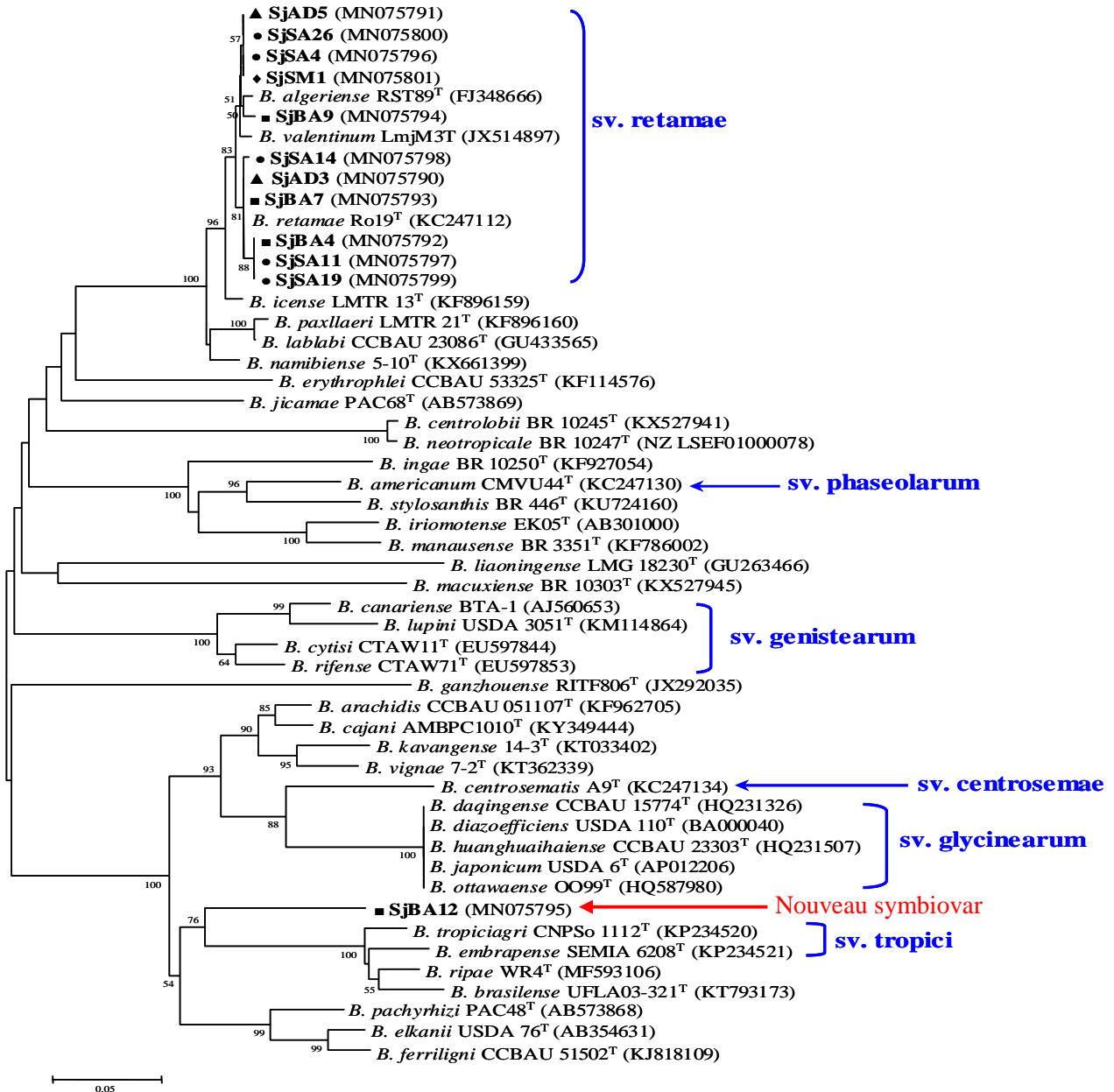


Figure 24 : Arbre phylogénétique (Neighbor Joining) basé sur les séquences du gène *nodC*.

Les souches d'Algérie sont indiquées en gras et leurs origines géographiques en symboles : ■ Barbacha (BA), ▲ Adekar (AD), ● Sidi-Aïch (SA) et ◆ Semaoun (SM). Les nombres entre parenthèses représentent les numéros d'accèsions GenBank des souches. La lettre "T" indique que la séquence utilisée provient de la souche type de l'espèce. Les valeurs bootstrap, exprimées en pourcentage de 1000 répétitions, sont données aux points de ramification (seules les valeurs $\geq 50\%$ sont représentées). La barre d'échelle de 5% indique le nombre de substitutions par site.

La discordance observée entre la phylogénie du gène *nodC* et les gènes de ménage soutient l'hypothèse de multiples transferts latéraux des gènes symbiotiques entre les lignées de *Bradyrhizobium* (Barcellos *et al.*, 2007 ; Menna et Hungria, 2011). En outre, il a été suggéré que ces événements de transfert latéral pourraient bien avoir affecté l'évolution des nodules racinaires et la fonction symbiotique rhizobienne (Moulin *et al.*, 2004 ; Vinuesa *et al.*, 2005a, 2005b ; Menna et Hungria, 2011).

5.4. Conclusion

Les résultats des analyses phylogénétiques montrent que, quel que soit le gène utilisé (ADNr 16S ou gènes de ménage), les arbres obtenus convergent vers la même topologie. Les 12 souches représentatives des génotypes PCR/RFLP sont réparties en deux grands clades au sein du genre *Bradyrhizobium*. Toutefois, la classification résultant de l'analyse MLSA des gènes concaténés (*glnII* et *recA* et ADNr 16S) ont permis d'affilier 33.33% des souches à *B. retamae* et 8.33% à *B. japonicum*. Les 58.33% des souches restantes peuvent représenter deux à quatre nouvelles espèces génomiques probables. Ces résultats indiquent également que les souches de *Bradyrhizobium* nodulant *S. junceum* (L.) provenant de différents sites de la région de Bejaïa sont génétiquement différentes et très éloignées les unes des autres. En conséquence, la situation concernant la nodulation des espèces de légumineuses de la tribu des Genisteae est complexe et doit être mieux clarifiée.

**Conclusion générale
&
Perspectives**

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

À l'instar des régions du Nord d'Algérie, Béjaïa se caractérise par une grande diversité de légumineuses spontanées et cultivées, parmi elles l'espèce *Spartium junceum* (L.) de la tribu des Genisteeae, qui joue un rôle important dans les écosystèmes naturels en s'adaptant aux conditions écologiques défavorables. En effet, cette légumineuse arbustive est très efficace par son aptitude à résister à différentes contraintes pédo-climatiques, ceci grâce à son système racinaire qui renferme des nodules hébergeant des bactéries, qui vivent en symbiose avec elle et qui lui procurent les quantités d'azote nécessaires à sa nutrition azotée et la régénération de la fertilité des sols.

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif principal de contribuer à la connaissance de la diversité des bactéries nodulant *S. junceum* (L.) en vue de leur utilisation, comme biofertilisant, dans des projets de remédiation et de restauration des sols pauvres, dégradés et/ou pollués. Cette étude a porté sur une collection de 23 nouvelles souches bactériennes isolées des nodosités de *S. junceum* (L.), collectées de 4 sites distincts situés dans la région de Béjaïa (Nord-est d'Algérie). Ces bactéries ont été caractérisées à travers une approche polyphasique, basée sur les caractéristiques symbiotiques, phénotypiques et génotypiques

Les sols d'origine des prélèvements, ont pour la plupart, des taux en carbone, azote et phosphore relativement faibles, avec un taux de calcaire variable et ils sont non salins. Les sols d'Adekar et de Barbacha sont neutres et de texture sablo-limoneuse, alors que ceux de Semaoune et de Sidi-Aïch sont alcalins et présentent une texture limono-argilo-sableuse.

Du point de vue propriété symbiotique, le test de nodulation *in vitro* a mis en évidence la capacité des souches testées à induire la formation de nodules effectifs sur les racines de leur plant-hôte d'origine, confirmant ainsi leur appartenance au BNL. Toutefois, le nombre de

nodules formés ainsi que l'efficacité symbiotique sont variables d'une souche à l'autre. La souche SjAD16 a été la plus efficace puisqu'elle a induit des effets très positifs sur tous les paramètres symbiotiques mesurés (NN, NT, PMS et ES). Par conséquent, elle pourrait être sélectionnée dans la formulation d'inoculum, comme biofertilisant destiné aux applications écologiques, notamment la réhabilitation des écosystèmes dégradés et le maintien de la fertilité naturelle des sols pauvres.

La caractérisation phénotypique de ces bactéries, basée sur les critères morphologiques, biochimiques et physiologiques, a révélé une large diversité au sein de cette population. Le fait que les colonies de la majorité de nos souches n'apparaissent qu'après 5 à 7 jours d'incubation sur le milieu YEMA et que la plupart d'entre elles possèdent un temps de génération supérieur à 8 heures, nous permet d'orienter l'appartenance de nos souches au genre *Bradyrhizobium*. Cette assignation à ce genre est appuyée par l'alcalinisation du milieu YEMA additionné au bleu de bromothymol.

Les résultats des tests nutritionnels montrent que la plupart des souches utilisent une large gamme de substrats carbonés, avec une préférence marquée aux polyalcools, acides organiques et quelques monosaccharides. Elles assimilent aussi la plupart des acides aminés testés, avec une préférence au tryptophane, glutamate, proline et acide aspartique. Toutes les souches ont un optimum de croissance situé entre 20 et 30°C et la plupart d'entre elles ne tolèrent pas des températures supérieures à 35°C. Elles présentent un optimum de croissance compris entre pH6 et pH 7 et la plupart d'entre elles se développent mieux aux pH acides. L'optimum de croissance de toutes les souches est situé entre 0 et 1% de NaCl. Au-delà de cette concentration (1%), la croissance des souches diminue progressivement, sauf pour les souches SjBA24, SjAD16, SjSM1 et SjSM8 qui semblent se développer bien en présence de 1.5% de NaCl dans le milieu. Toutefois, aucune croissance n'a été observée au-delà de 1.5% de NaCl. Par ailleurs, une diversité de réponse entre les souches envers les antibiotiques testés

a été observée. Cependant, la majorité d'entre elles a montré une tendance à la résistance à la plupart des antibiotiques utilisés. Enfin, l'analyse numérique par UPGMA des caractères phénotypiques discriminants a permis de distinguer quatre clusters dont le premier est constitué de quatre souches, le deuxième renferme dix souches, le troisième englobe sept souches et le quatrième renferme deux souches.

Sur le plan moléculaire, l'analyse des profils RFLP de l'ADNr 16S générés par les 4 endonucléases de restriction (*AluI*, *DdeI*, *HaeIII* et *Sau96I*), a permis de mettre en évidence un polymorphisme intra-spécifique étant donné que les 23 souches testées sont représentées par 12 génotypes différents. Cette diversité génétique serait liée à l'origine géographique des souches et les conditions édaphiques.

Les séquences partielles du gène codant l'ARNr 16S, des gènes de ménage (*glnII* et *recA*) et du gène symbiotiques (*nodC*), confirment l'appartenance des 12 souches représentatives des différents génotypes obtenus par PCR/RFLP au genre *Bradyrhizobium*.

L'analyse phylogénétique basée sur les séquences nucléotidiques de l'ARNr 16S, permet de subdiviser les souches représentatives en deux clades bien distincts (I et II). Le clade I renferme une seule souche (SjBA12), tandis que le clade II englobe les 11 souches restantes. Néanmoins, la topologie de l'arbre découlant de l'analyse du gène codant l'ARNr 16S ne permet pas de discriminer entre les espèces proches du même groupe. Par ailleurs, les phylogénies établies sur la base des séquences concaténées des deux gènes de ménage (*glnII* et *recA*) ou sur les séquences concaténées des trois gènes (*ADNr 16S*, *glnII* et *recA*) se sont avérées similaires entre elles et en accord avec la classification découlant de l'utilisation de l'ADNr 16S. Cependant, les souches étudiées sont réparties en 06 clusters différents (A à F). Le clade I renferme un seul cluster (F) constitué de la souche SjBA12, phylogénétiquement apparentée à *B. japonicum* USDA 6^T, tandis que le clade II renferme les 11 souches restantes qui sont réparties en 5 clusters distincts (A à E). Les souches du cluster A sont étroitement

liées à *B. retamae*, tandis que les autres souches des clusters (B, C, D et E) pourraient constituer de nouvelles espèces génomiques.

L'analyse des séquences du gène symbiotique (*nodC*) montre que la majorité des souches sont retrouvées dans le cluster symbiovar *retamae*, qui comprend désormais les souches *B. retamae* Ro19^T, *B. valentinum* LmjM3^T et *B. algeriense* RST89^T, nodulant respectivement *Retama monosperma*, *Lupinus mariae-josephae* et *Retama sphaerocarpa*. La souche SJB12, quant à elle, pourrait être définie comme nouveau symbiovar au sein du genre *Bradyrhizobium*.

Dans la perspective d'avoir une vision globale de la diversité des bactéries associées à la légumineuse *S. junceum* (L.), il apparaît nécessaire de compléter ce travail par :

- l'enrichissement de la collection par d'autres souches bactériennes provenant des autres régions d'Algérie ;
- la réalisation des tests de nodulation croisée afin de déterminer le spectre d'hôtes parmi les espèces de légumineuses de la tribu des *Genisteeae*.
- la sélection de souches performantes pour la production d'inoculum destinés à des essais d'inoculation des plants de *S. junceum* (L.), d'abord au niveau des pépinières et ensuite en plein champs ;
- l'étude d'un grand nombre de caractères (Test BIOLOG, composition en acides gras,...) et l'utilisation des souches de référence afin d'affiner l'analyse phénotypique ;
- l'exploitation d'autres gènes (*atpD*, *rpoA*, *nifH*, *nodD*,...) et l'intégration d'autres outils moléculaires (hybridation ADN/ADN, spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquençage du génome total) pour une systématique et une phylogénie plus fines et précises.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahnia, H., Boulila, F., Boulila, A., Boucheffa, K., Durán, D., Bourebaba, Y., Salmi, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. and Rey, L. (2014).** *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105(6), 1121-1129.
- Ahnia, H., Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Palacios, J. M., Rey, L., Ruiz-Argüeso, T., Boulila A., and Imperial, J. (2018).** *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 41(4), 333-339.
- Ainouche, A., Bayer, R. J., Cubas, P. and Misset, M. T. (2003).** Phylogenetic relationships within tribe *Genisteae* (*Papilionoideae*) with special reference to genus *Ulex*. In: B. B. Klitgaard and A. Bruneau (editors). *Advances in legume systematics* part 10, Higher Level Systematics, pp. 239-252. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Alazard, D. (1985).** Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 732-734.
- Alday, J. G., Santana, V. M., Marrs, R. H. and Martínez-Ruiz, C. (2014).** Shrub-induced understory vegetation changes in reclaimed mine sites. *Ecological Engineering*, 73, 691-698.
- Alexander, M. (1984).** Ecology of *Rhizobium*. In Biological nitrogen fixation. *Ecology, technology and physiology*. , Plenum Press N.Y., 39-50.
- Allen, O. N. and Allen, E. K. (1981).** *The leguminosae : a source book of characteristics, uses, and nodulation.*, The University of Wisconsin Press, Madison, WI.
- Allen, N. S., Bennett, M. N., Cox, D. N., Shipley, A., Ehrhardt, D. W. and Longn S. (1994).** Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{++} and H^+ currents and on cytoskeletal behavior, In M. J. Daniels, J. A. Downie, and A. E. Osbourn (ed.), *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, vol. 3, p 107-113. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Allen, J. F., Thake, B. and Martin, W. F. (2019).** Nitrogenase inhibition limited oxygenation of Earth's proterozoic atmosphere. *Trends in plant science*, 24(11), 1022-1031.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Álvarez-Martínez, E. R., Valverde, Á., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P. F., Santillana, N., Zúñiga, D., Peix, A and Velázquez, E. (2009).** The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Archives of microbiology*, 191(8), 659-668.
- Angelini, L.G., Lazzeri, A., Levita, G., Fontanelli, D. and Bozzi, C. (2000).** Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) gaud.) and Spanish broom (*Spartium junceum* L.) fibres for composite materials: agronomical aspects, morphology and mechanical properties. *Industrial Crops and Products*, 11(2-3), 145-161.
- Angelini, L.G., Tavarini, S. and Foschi, L. (2013).** Spanish broom (*Spartium junceum* L.) as new fiber for biocomposites: the effect of crop age and microbial retting on fiber quality. In *Conference Papers in Science* (Vol. 2013). Hindawi, pp. 1-5.

- Anne, P. (1945).** Sur le dosage rapide du carbone organique des sols. *Annales d'agronomie*, 2(1), 161-172.
- Appelbaum, E. R., Thompson, D. V., Idler, K. and Chartrain, N. (1988).** *Rhizobium japonicum* USDA 191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. *Journal of bacteriology*, 170(1), 12-20.
- Appleby, C.A. (1984).** Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 443-478.
- Argaw, A. (2015).** Iron requirement for soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] inoculated with selected exotic and native isolates of *Bradyrhizobium* sp. under irrigated conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(10), 1491-1509.
- Arnold, M.F.F., Penterman, J., Shabab, M., Chen, E.J. and Walker, G.C. (2018).** Important late-stage symbiotic role of the *Sinorhizobium meliloti* exopolysaccharide succinoglycan. *J. Bacteriol.*, 200(13), e00665-17.
- Aubert, S., Bligny, R., Douce, R., Gout, E., Ratcliffe, R.G. and Roberts, J.K.M. (2001).** Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ¹³C and ³¹P nuclear magnetic resonance. *Journal of Experimental Botany*, 52(354), 37-45.
- Avissar, Y.J. and Nadler, K.D. (1978).** Stimulation of tetrapyrrole formation in *Rhizobium japonicum* by restricted aeration. *Journal of bacteriology*, 135(3), 782-789.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K. and Bruneau, A. (2017).** «A new subfamily classification of the *Leguminosae* based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG) », *Taxon*, 66, 44-77.
- Balachandar, D., Raja, P., Kumar, K. and Sundaram, SP. (2007).** Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2(2), 49-57.
- Barcellos, F. G., Menna, P., da Silva Batista, J. S. and Hungria, M. (2007).** Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Applied and environmental microbiology*, 73(8), 2635-2643.
- Barea, J. M., Requena, N. and Jimenez, I. (1996).** A revegetation strategy based on the management of arbuscular mycorrhizae, Rhizobium and rhizobacteria for the reclamation of desertified Mediterranean shrubland ecosystems. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 20, 75-86.
- Barboni, L., Manzi, A., Bellomaria, B. and Quinto, A.M. (1994).** Alkaloid content in four *Spartium junceum* populations as a defensive strategy against predators. *Phytochemistry*, 37(4), 1197-1200.
- Barrera, L. L., Trujillo, M. E., Goodfellow, M., Garcia, F. J., Hernandez-Lucas, I., Davila, G., van Berkum, P. and Martinez-Romero, E. (1997).** Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1086-1091.
- Bartsev, A. V., Deakin, W. J., Boukli, N. M., McAlvin, C. B., Stacey, G., Malnoë, P., Broughton, W. J. and Staehelin, C. (2004).** NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiology*, 134, 871-879.
- Batut, J. and Boistard, P. (1994).** Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66(1-3), 129-150.

- Bautista, S., Mayor, A. G., Bourakhouadar, J. and Bellot, J. (2007).** Plant spatial pattern predicts hillslope runoff and erosion in a semiarid Mediterranean landscape. *Ecosystems*, 10(6), 987-998.
- Beauchamp, C. J. (1993).** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*, 74(1), 19-27.
- Beck, D. P., Materon, L. A. and Afandi, F. (1993)** Practical Rhizobium-legume technology manual. Technical manual n°19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria, 389p.
- Becker, M., Ladha, J. K. and Ottow, J. C. G. (1988).** Stem-nodulating legumes as green manure for lowland rice. *Philipp. J. Crop Sci*, 13, 121-127.
- Belhadi, D., de Lajudie, P., Ramdani, N., Le Roux, C., Boulila, F., Tisseyre, P., Boulila, A., Benguedouar, A., Kaci, Y. and Laguerre, G. (2018).** *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Systematic and applied microbiology*, 41(2), 122-130.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A. and Squartini, A. (2004).** Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and applied microbiology*, 27(4), 462-468.
- Benson, D.R. and Silvester, W.B. (1993).** Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57(2), 293-319.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P. and Falkowski, P. (2003).** Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in microbiology*, 154(3), 157-164.
- Bernal, P., Llamas, M.A. and Filloux, A. (2018).** Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environmental microbiology*, 20(1), 1-15.
- Berrada, H. and Fikri-Benbrahim, K. (2014).** Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *British Microbiology Research Journal*, 4(6): 616-639.
- Beukes, C. W., Stępkowski, T., Venter, S. N., Clapa, T., Phalane, F. L., le Roux, M. M. and Steenkamp, E.T. (2016).** Crotoniaceae and Genisteae of the South African great escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100, 206-218.
- Bisby, F. A. (1981).** Genisteae (Adanson) Benth. In: Polhill, R. M. & Raven, P. H. (editors). *Advances in Legume Systematics*, Part 1, pp. 409-425. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Bischof, S., and Kovačević, Z., (2013).** Parts of the plant. In: *From Weed to Fabric*, Faculty of Textile Technology. University of Zagreb, Zagreb, pp. 25-38.
- Bocchi, S. et Malgioglio, A. (2010).** *Azolla-Anabaena* as a biofertilizer for rice paddy fields in the Po Valley, a temperate rice area in Northern Italy. *International Journal of Agronomy*, pp. 1-5.
- Boncompagni, E., Østerås, M., Poggi, M. C. and le Rudulier, D. (1999).** Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family Rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Applied and environmental microbiology*, 65(5), 2072-2077.
- Boogerd, F. C. and van Rossum, D. (1997).** Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology reviews*, 21, 5-27.
- Bordeleau, L. M. and Prévost, D. (1994).** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and soil*, 161(1), 115-125.

- Borges, A. C., Guimarães, W. V., Muchovej, R. M. C., and Gonzalez, G. D. L. R. (1990).** Resistance of *Bradyrhizobium japonicum* strains to selected antibiotics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(3), 340-342.
- Boscari, A., Mandon, K., Poggi, M. C. and Le Rudulier, D. (2004).** Functional expression of *Sinorhizobium meliloti* BetS, a high-affinity betaine transporter, in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 5916-5922.
- Bossard, C. C., Randall, J. M. and Hoshovsky, M. C. (Eds). (2000).** Invasive Plants of California's Wildlands. University of California Press, pp 306-309.
- Botineau, M. (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Editions :Tec & doc. Paris : Lavoisier, 1315p.
- Boudehouche, W., Parker, M. A. and Boulila, F. (2020).** Relationships of *Bradyrhizobium* strains nodulating three Algerian *Genista* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(3), 126074.
- Boulila, F., Depret, G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S., Laguerre, G. (2009).** *Retama* species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 245–255.
- Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Ahnia, H., Boulila, A., Temprano, F., Temprano, F., Palacios, J. M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T. and Rey, L. (2016).** Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the Western Mediterranean: Algeria and Spain. *Systematic and applied microbiology*, 39(4), 266-274.
- Bremmen, J. M. and Mulvaney, C.S. (1982).** Nitrogen-total. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds). *Methods of Soil Analysis*. Part 2, Soil Science. Society of America, Madison, pp 595-624.
- Brewin, N. J. (1991).** Development of the legume root nodule. *Annual review of cell biology*, 7(1), 191-226.
- Broughton, W. J. and Perret, X. (1999).** Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. *Current opinion in plant biology*, 2(4), 305-311.
- Brundu, G. A. D., Camarda, I., Caredda, M., Garau, G., Maltoni, S. L. and Deiana, P. (2004).** A contribution to the study of the distribution of *Medicago-Sinorhizobium* symbiosis in Sardinia (Italy). *Agricoltura mediterranea*, 134(1), 33-48.
- Bruneau, A., Mercure, M., Lewis, G. P. and Herendeen, P. S. (2008).** Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. *Botany*, 86(7), 697-718.
- Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (editors) (1974).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Burén, S. et Rubio, L. M. (2018).** State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. *FEMS microbiology letters*, 365(2), fnx274.
- Burén, S., Jiménez-Vicente, E., Echavarri-Erasun, C. and Rubio, L. M. (2020).** Biosynthesis of nitrogenase cofactors. *Chemical Reviews*, 120(12), 4921-4968.
- Burns, R. C., Holsten, R. D. and Hardy, R. W. F. (1970).** Isolation by crystallization of the Mo-Fe protein of *Azotobacter* nitrogenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 39(1), 90-99.
- Burris, R.H., 1994.** Biological nitrogen fixation. Past and future. In: Hegazi, N.A., Fayez, M., Monib, M. (Eds.), *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. The American University in Cairo Press, Cairo, Egypt, pp. 1-11.

- Busquets, M., Calvet, C., Camprubí, A. and Estaún, V. (2010).** Differential effects of two species of arbuscular mycorrhiza on the growth and water relations of *Spartium junceum* and *Anthyllis cytisoides*. *Symbiosis*, 52(2-3), 95-101.
- Caetano-Anollés, G., Wall, L. G., De Micheli, A. T., Macchi, E. M., Bauer, W. D., and Favelukes, G. (1988).** Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant physiology*, 86(4), 1228-1235.
- CAL-IPC. (2006).** *California Invasive Plant Inventory*. Published by California Invasive Plant Council. Cal-IPC 2006-02. Berkeley, California. <https://www.cal-ipc.org/>
- Cannon, S. B., Ilut, D., Farmer, A. D., Maki, S. L., May, G. D., Singer, S. R. et Doyle, J. J. (2010).** Polyploidy did not predate the evolution of nodulation in all legumes. *PLoS one*, 5(7), e11630.
- Cardinale, M., Lanza, A., Bonni, M. L., Marsala, S., Puglia, A. M. and Quatrini, P. (2008).** Diversity of rhizobia nodulating wild shrubs of Sicily and some neighbouring islands. *Archives of microbiology*, 190(4), 461-470.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Lanza, A., Orlando, S., Daffonchio, D., Puglia, A. M. and Quatrini, P. (2010).** Rehabilitation of Mediterranean anthropogenic soils using symbiotic wild legume shrubs: plant establishment and impact on the soil bacterial community structure. *Applied Soil Ecology*, 46(1), 1-8.
- Cardoso, D. B. O. S., Pennington, R. T., De Queiroz, L. P., Boatwright, J. S., Van Wyk, B. E., Wojciechowski, M. F. and Lavin, M. (2013).** Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *South African Journal of Botany*, 89, 58-75.
- Castro, J., Zamora, R., Hódar, J. A. and Gómez, J. M. (2002).** Use of shrubs as nurse plants: a new technique for reforestation in Mediterranean mountains. *Restoration Ecology*, 10(2), 297-305.
- Castro, J., Zamora, R., Hódar, J. A., Gómez, J. M. and Gómez-Aparicio, L. (2004).** Benefits of using shrubs as nurse plants for reforestation in Mediterranean mountains: a 4-year study. *Restoration Ecology*, 12(3), 352-358.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Barrijal, S., Velázquez, E., and Bedmar, E. J. (2012).** *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(5), 302-305.
- Chaia, E. E., Wall, L. G. and Huss-Danell, K. (2010).** Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte Frankia. A review. *Symbiosis*, 51(3), 201-226.
- Chaïch, K., Bekki, A., Bouras, N., Holtz, M. D., Soussou, S., Mauré, L., Brunel, B., de Lajudie, P. and Cleyet-Marel, J. C. (2017).** Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis*, 71(2), 111-120.
- Chaintreuil, C., Arrighi, J. F., Giraud, E., Miché, L., Moulin, L., Dreyfus, B., Munive-Hernández, J. A., Villegas-Hernandez, M. A. and Béna, G. (2013).** Evolution of symbiosis in the legume genus *Aeschynomene*. *New Phytologist*, 200(4), 1247-1259.
- Chaintreuil, C., Rivallan, R., Bertioli, D. J., Klopp, C., Gouzy, J., Courtois, B., Parrinello, H... and Arrighi, J. F. (2016).** A gene-based map of the Nod factor-independent *Aeschynomene evenia* sheds new light on the evolution of nodulation and legume genomes. *DNA Research*, 23(4), 365-376.
- Chen, L., Figueredo, A., Villani, H., Michajluk, J. and Hungria, M. (2002).** Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), 448-457.

- Cheng, Q. (2008).** "Perspectives in biological nitrogen fixation research". *Journal of Integrative Plant Biology* 50(7): 786-798.
- Cleland, E.E. and Harpole, W.S. (2010).** Nitrogen enrichment and plant communities. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1195, 46- 61.
- Cleyet-Marel, J. C., Rome, S., Salducci, X. and Wery, J. (1996).** Importance des composés phénoliques dans les interactions entre plantes et microorganismes: Exemple des relations Rhizobium/légumineuses. *Acta botanica gallica*, 143(6), 521-529.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2012).** *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Systematic and applied microbiology*, 35, 302-305.
- Chaia, E. E., Wall, L. G. et Huss-Danell, K. (2010).** Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte Frankia. A review. *Symbiosis*, 51(3), 201-226.
- Chang, Y.L., Wang, J.Y., Wang, E.T., Liu, H.C., Sui, X.H., Chen, W.X. (2011).** *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 61, 2496-2502.
- Cheng, Q. (2008).** Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of integrative plant biology*, 50(7), 786-798.
- Colombo, M. L., Assisi, F., Della Puppa, T., Moro, P., Sesana, F. M., Bissoli, M., Borghini, R., Perego, S., Galasso, G., Banfi, E. and Davanzo, F. (2010).** Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. *Journal of pharmaceutical sciences and research*, 2(7), 417.
- Corby, H.D.L. (1981).** The systematic value of leguminous root nodules. In *Advances in Legume Systematics*, Part 2, Polhil, R.M and Raven, P.H. (Eds.): 657-669.
- Corby, H. D. L. (1988).** Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae. *Kirkia*, 53-123.
- Coruzzi, G. M. (2003).** Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. In *The Arabidopsis Book*. Edited by Meyerowitz E, Somerville C, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 31(1), 1-17.
- Cristofolini, G. and Chiapella, L. F. (1984).** Origin and diversification of «Genisteeae» (Fabaceae): a serosystematic purview. *Webbia*, 38(1), 105-122.
- Crespi, M. and Gálvez, S. (2000).** Molecular mechanisms in root nodule development. *Journal of plant growth regulation*, 19(2):155-166.
- Crisp, M., Gilmore, S. and Van Wyk, B. E. (2000).** Molecular phylogeny of the genistoid tribes of papilionoid legumes. In *Advances in Legume Systematics*, Part 9, pp. 249-276. (P. S. Herendeen and A. Bruneau, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew. UK.
- Csonka, L. N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(1), 121-147.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R. and Bono, J. J. (2001).** Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in plant science*, 6(1), 24-30.
- Czernic, P., Gully, D., Cartieaux, F., Moulin, L., Guefrachi, I., Patrel, D., Pierre, O., Fardoux, J., Chaintreuil, C., Nguyen, P. ... and Giraud, E. (2015).** Convergent evolution of endosymbiont differentiation in Dalbergioid and inverted repeat-lacking clade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides. *Plant Physiology*, 169(2), 1254-1265.

- Dai, Z., Guo, X., Yin, H., Liang, Y., Cong, J. and Liu, X. (2014).** Identification of nitrogen-fixing genes and gene clusters from metagenomic library of acid mine drainage. *PLoS one*, 9(2).
- Danso, S. K. A. (1995).** Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertilizer research*, 42(1-3), 33-41.
- Dazzo, F. B., Orgambide, G. G., Philip-Hollingsworth, S., Hollingsworth, R. I., Ninke, K. O. and Salzwedel, J. L. (1996).** Modulation of development, growth dynamics, wall crystallinity, and infection sites in white clover root hairs by membrane chitolipooligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Journal of bacteriology*, 178(12), 3621-3627.
- Dean, D. R and Jacobson, M. R. (1992).** Biochemical genetics of nitrogenase. In: *Biological nitrogen fixation*. Stacey G, Burris RH, Evans HJ (eds). Chapman & Hall, New York, pp. 763-834.
- De Faria, S. M., Lewis, G. P., Sprent, J. I. and Sutherland, J. M. (1989).** Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New phytologist*, 111(4), 607-619.
- Delgado, M. J., Garrido, J. M., Ligeró, F., and Lluch, C. (1993).** Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*, 89(4), 824-829.
- Delgado, M. J., Ligeró, F., and Lluch, C. (1994).** Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(3), 371-376.
- Denison, R. F. (2000).** Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist*, 156(6), 567-576.
- Dénarié, J. et Truchet, G. (1979).** La symbiose *Rhizobium*-légumineuses : rôles respectifs des partenaires. *Physiologie végétale*, 17 (4), 643-667.
- Dénarié, J., Debellé, F. and Promé, J. C. (1996).** Rhizobium lipo-chitolooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry*, 65(1), 503-535.
- De Lajudie, P. M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., ... and Moulin, L. (2019).** Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(7), 1852-1863.
- Desperrier, N., Baccou, J. C., Sauvaire, Y. and Paris-Pireyre, N. (1984).** Nouvelle méthode pour mesurer *in situ* l'activité nitrogénase par réduction de l'acétylène. *Plant and soil*, 77(1), 115-124.
- Diaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J., Lugtenberg, B. J. and Kijne, J. W. (1989).** Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*, 338(6216), 579-581.
- Dighe, N. S., Shukla, D., Kalkotwar, R. S., Laware, R. B., Bhawar, S. B. and Gaikwad, R. W. (2010).** Pelagia Research Library. *Der Pharmacia Sinica*, 77-84.
- Dilworth, M. J. (1966).** Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 127(2), 285-294.
- Dilworth, M. J. (1980).** [74] Leghemoglobins. In *Methods in enzymology* (Vol. 69, pp. 812-823). Academic Press.
- Dixon, R. O. D. and Wheeler, C. T. (1986).** Nitrogen fixation in plants. *Blackie and son, GLASGOW(UK)*.

- Dixon, R. and Kahn, D. (2004).** Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621-631.
- Doyle, J. J. (1994).** Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25(1), 325-349.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., Ballenger, J. A., Dickson, E. E., Kajita, T. and Ohashi, H. (1997).** A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *American Journal of Botany*, 84, 541-554.
- Doyle, J. J. and Luckow, M. A. (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant physiology*, 131(3), 900-910.
- Downie, J. A. and Walker, S. A. (1999).** Plant responses to nodulation factors. *Current opinion in plant biology*, 2(6), 483-489.
- Downie, J. A. (2010).** The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 150-170.
- Dreyfus, B. L. and Dommergues, Y. R. (1981).** Tropical Legume *Sesbania Rostrata*. *FEMS Microbiology Letters*, 10, 313-317.
- Drummond, M., Clements, J., Merrick, M. and Dixon, R. (1983).** Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, 301(5898), 302-307.
- Duff, S. M., Qi, Q., Reich, T., Wu, X., Brown, T., Crowley, J. H. and Fabbri, B. (2011).** A kinetic comparison of asparagine synthetase isozymes from higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(3), 251-256.
- Dupont, L., Hérouart, D., Alloing, G., Hopkins, J., Pierre, O., Frenedo, P. and El Msehli, S. (2012).** *The legume root nodule: from symbiotic nitrogen fixation to senescence* (p. 850). London: In TECH Open Access Publisher.
- Durán, D., Rey, L., Mayo, J., Zúñiga-Dávila, D., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Martínez-Romero, E. and Ormeno-Orrillo, E. (2014).** *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(6), 2072-2078.
- Durand, J. H. (1983).** Les sols irrigables. Etude pédologique. Presses universitaires de France, Paris, 339p.
- Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E.G., Hungria, M., Kaschuk, G., Blair, M.W. and Ortiz, R. (2015).** Chapter one-advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. *Advances in Agronomy*, 129: 1-116.
- Eady, R. R. (1996).** Structure-function relationships of alternative nitrogenases. *Chemical reviews*, 96(7), 3013-3030.
- Ehrhardt, D. W., Atkinson, E. M. and Long, S. R. (1992).** Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*, 256, 998-1000.
- El-Din, A. K. Y. G. (1992).** A succinate transport mutant of *Bradyrhizobium japonicum* forms ineffective nodules on soybeans. *Canadian journal of microbiology*, 38(3), 230-234.
- Elkan, G. H. (1992).** Taxonomy of the rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 446-450.
- Elmerich, C. (1993).** Fixation biologique de l'azote. In : *Annales de l'Institut Pasteur. Actualités*, Vol. 4, N° 2, pp. 133-153.

- Elsheikh, E. A. (1998).** Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. *Annals of Applied Biology*, 132, 507-524.
- Evans, H. J., Emerich, D. W, Ruiz-Argüeso, T., Albrecht, S. H., Maier, R. J., Simpson, F. and Rusell, S. A. (1978).** Hydrogen metabolism in legume nodules and rhizobia: some recent developments. - In *Hydrogenases: Their Catalytic Activity. Structure and Function* (H. G. Schlegel and K. Schneider, eds). pp. 287-306. Erich Goltze KG, Gottingen. ISBN 3-88452-602-0.
- Fabre, S., Gully, D., Poitout, A., Patrel, D., Arrighi, J. F., Giraud, E., Czernic, P. and Cartieaux, F. (2015).** Nod factor-independent nodulation in *Aeschynomene evenia* required the common plant-microbe symbiotic toolkit. *Plant physiology*, 169(4), 2654-2664.
- Fåhraeus, G. (1957).** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Microbiology*, 16(2), 374-381.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E. and Gresshoff, P. M. (2010).** Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 61-76.
- Fernandez-Lopez, M., Goormachtig, S., Gao, M., D'Haese, W., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1998).** Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12724-12728.
- Fierer, N. and Jackson, R. B. (2006).** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.
- Finan, T. M., Wood, J. M. and Jordan, D. C. (1983).** Symbiotic properties of C4-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*, 154(3), 1403-1413.
- Fisher, R. F., Egelhoff, T. T., Mulligan, J. T. and Long, S. R. (1988).** Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes and Development*, 2(3), 282-293.
- Fischer, H. M. (1994).** Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 58(3), 352-386.
- Fisher, K. and Newton, W.E. (2002).** Nitrogen fixation-a general overview. In: *Nitrogen Fixation at the Millennium*, G.J. Leigh (Ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 1-34.
- Foucher, F. and Kondorosi, E. (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. In *The Plant Cell Cycle* (pp. 229-242). Springer, Dordrecht.
- Franche, C., Lindström, K. and Elmerich, C. (2009).** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil*, 321(1-2), 35-59.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E. and Gresshoff, P. M. (2010).** Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 61-76.
- Galinski, E.A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37, 273-328.
- Gaucher, G. (1968).** Traité de pédologie agricole. Le sol et ses caractéristiques agronomiques. Edition Dunod, Paris [FRA], 578 p.
- Gaucher, G. and Burdin, S. (1974).** Géologie, Géomorphologie et Hydrologie des terrains salés. Ed. P.U.F., Paris, 231 p.

- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. and Young, J. P. (2001).** Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(6), 2037-2048.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H. and Walker, G. C. (2008).** Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual review of genetics*, 42, 413-441.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., ... and Bena, G. (2007).** Legumes symbioses: absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, 316(5829), 1307-1312.
- Giraud, E. (2007).** Symbiose rhizobium/légumineuse: un nouveau sésame. *médecine/sciences*, 23(6-7), 663-666.
- Gómez-Aparicio, L. (2009).** The role of plant interactions in the restoration of degraded ecosystems: a meta-analysis across life-forms and ecosystems. *Journal of Ecology*, 97(6), 1202-1214.
- Graham, P. H. and Parker, C. A. (1964).** Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant and soil*, 383-396.
- Graham, P. H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 475-484.
- Graham, P. H. and Vance, C. P. (2003).** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.
- Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M. H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M. A., El Idrissir, M. M., Velázquez, E., Fernández-Pascuala, M., Bedmar, E. J. and Peix, A. (2013).** Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Systematic and applied microbiology*, 36(4), 218-223.
- Guignard, J.L. (2001).** Abrégés de Botaniques. Systématique moléculaire, 12^{ème} édition. Préface de J. M. Pelt. Edition Masson, 290 pages.
- Guignard, J. L. and Dupont, F. (2004).** Abrégés de Botanique. Systématique moléculaire, 13^{ème} édition. Préface de J. M. Pelt. Edition Masson. 285 pages.
- Guldner, E., Godelle, B. and Galtier, N. (2004).** Molecular Adaptation in Plant Hemoglobin, a Duplicated Gene Involved in Plant-Bacteria Symbiosis. *Journal of molecular evolution*, 59, 416-425.
- Hungria, M. and Vargas, M. A. (2000).** Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field crops research*, 65, 151-164.
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K. and Burns, R. C. (1968).** The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiology*, 43, 1185-1207.
- Hardy, R. W. F., Burns, R. C. and Parshall, G. W. (1971).** The biochemistry of N₂ fixation. In *Bioinorganic Chemistry*; Dessy, R., et al.; Advances in Chemistry; American Chemical Society: Washington, DC, 1971.
- Hartmann, A., Füsseder, A. and Klingmüller, W. (1983).** Mutants of *Azospirillum* affected in nitrogen fixation and auxin production. In *Azospirillum II, Genetics, Physiology, Ecology* (Experientia Supplementum, vol. 48), pp. 78-88. Edited by W. Klingmüller. Basel : Birkhauser-Verlag.

- Hartmann, A. and Hurek, T. (1988).** Effect of carotenoid overproduction on oxygen tolerance of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Microbiology*, 134(9), 2449-2455.
- Haukka, K., Lindström, K., Peter, J. and Young, W. (1996).** Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *Systematic and applied microbiology*, 19(3), 352-359.
- Haukka, K., Lindström, K. and Young, J. P. W. (1998).** Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 419-426.
- Havelka, U. D., Boyle, M. G. and Hardy, R. W. F. (1982).** Biological nitrogen fixation. In "Nitrogen in agricultural soils"; Ed. Stevenson FJ., 22, 365-422. *American Society of Agronomy*, Madison, USA.
- He, L., Soupene, E., Ninfa, A. and Kustu, S. (1998).** Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 180(24), 6661-6667.
- Henry, C., Raivoarisoa, J. F., Razafimamonjy, A., Ramanankierana, H., Andrianaivomahefa, P., Ducouso, M. and Selosse, M. A. (2017).** Transfer to forest nurseries significantly affects mycorrhizal community composition of *Asteropeia mcphersonii* wildings. *Mycorrhiza*, 27(4), 321.
- Hernandez-Lucas, I., Segovia, L., Martinez-Romero, E. and Pueppke, S. G. (1995).** Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2775-2779.
- Herrera, M. A., Salamanca, C. P. and Barea, J. M. (1993).** Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 129-133.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J. and Sanjuan, J. (1999).** At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1), 87-97.
- Hill, S., Kennedy, C., Kavanagh, E., Goldberg, R. B. and Hanau, R. (1981).** Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *K. pneumoniae*. *Nature*, 290(5805), 424-426.
- Hirel, B. and Lea, P.J. (2001).** Ammonia assimilation. In *Plant Nitrogen*. Edited by Lea PJ, Morot-Gaudry JF: Springer, Berlin, Heidelberg , 79-99.
- Hirsch, A.M., Bhuvaneshwari, T.V., Torrey, J.G., and Bisseling, T. (1989).** Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86, 1244-1248.
- Hirsch, A. M. (1992).** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122, 211-237.
- Horvath, B., Bachem, C. W., Schell, J. and Kondorosi, A. (1987).** Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *The EMBO Journal*, 6(4), 841-848.
- Houlton, B. Z., Morford, S. L. and Dahlgren, R. A. (2018).** Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in Earth's surface environment. *Science*, 360(6384), 58-62.

- Howard, J. B. and Rees, D. C. (1996).** Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemical reviews*, 96(7), 2965-2982.
- Hubber, A., Vergunst, A. C., Sullivan, J. T., Hooykaas, P. J. and Ronson, C. W. (2004).** Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Molecular microbiology*, 54(2), 561-574.
- Hueck, C. J. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 379-433.
- ILDIS (2017).** International Legume Database and Information Service. *World Database of Legumes* (version 10). Reading, UK: School of Plant Sciences, University of Reading. <http://www.ildis.org/>
- Igarashi, R. Y. and Seefeldt, L. C. (2003).** Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 38(4), 351-384.
- Jack, R., De Zamaroczy, M. and Merrick, M. (1999).** The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 181(4), 1156-1162.
- Jackson, M. L. (1958).** Soil chemical analysis prentice Hall. Inc., Englewood Cliffs, NJ, 498, 183-204.
- Jackson, L. E., Burger, M. and Cavagnaro, T. R. (2008).** Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 341-363.
- Jaffré, T. et Pelletier, B. (1992).** Plantes de Nouvelle-Calédonie permettant de revégétaliser des sites miniers. Nouméa, Nouvelle-Calédonie, Orstom/SLN, 115 p.
- Jebara, M., Mhamdi, R., Aouani, M. E., Ghrir, R. and Mars, M. (2001).** Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(2), 139-147.
- Joerger, R. D., Jacobson, M. R., Premakumar, R., Wolfinger, E. D. and Bishop, P. E. (1989).** Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*, 171(2), 1075-1086.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32, 136-139.
- Jordan, D. C. (1984).** Family III *Rhizobiaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by NR Krieg and JG Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 1, 234-254.
- Kahindi, J. H. P., Woomer, P., George, T., de Souza Moreira, F. M., Karanja, N. K. and Giller, K. E. (1997).** Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied soil ecology*, 6, 55-76.
- Kajita, T., Ohashi, H., Tateishi, Y., Bailey, C. D. and Doyle, J. J. (2001).** *rbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. *Systematic Botany*, 515-536.
- Kape, R., Parniske, M. and Werner, D. (1991).** Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(1), 316-319.
- Käss, E. and Wink, M. (1995).** Molecular phylogeny of the Papilionoideae (Family Leguminosae): *rbcL* gene sequences versus chemical taxonomy. *Botanica Acta*, 108(2), 149-162.

- Käss, E. and Wink, M. (1996).** Molecular evolution of the Leguminosae: phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(5), 365-378.
- Käss, E. and Wink, M. (1997).** Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS 1 and 2). *Molecular Phylogenetics and evolution*, 8(1), 65-88.
- Katović, D., Katović, A. and Krnčević, M. (2011).** Spanish broom (*Spartium junceum* L.)- history and perspective. *Journal of Natural Fibers*, 8(2), 81-98.
- Keele, B. B., Hamilton, P. B. and Elkan, G. H. (1970).** Gluconate catabolism in *Rhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology*, 101(3), 698-704.
- Khamees, H. S., Gallon, J. R. and Chaplin, A. E. (1987).** The pattern of acetylene reduction by cyanobacteria grown under alternating light and darkness. *British Phycological Journal*, 22(1), 55-60.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Koenen, E. J., Ojeda, D. I., Steeves, R., Migliore, J., Bakker, F. T., Wieringa, J. J., Kidner, J., Bakker, F.T., Wieringa, J.J., Kidner, C., Hardy, O.J., Pennington, R.T., Bruneau, B. and Hughes, C.E. (2020).** Large-scale genomic sequence data resolve the deepest divergences in the legume phylogeny and support a near-simultaneous evolutionary origin of all six subfamilies. *New Phytologist*, 225(3), 1355-1369.
- Korir, H., Mungai, N. W., Thuita, M., Hamba, Y. and Masso, C. (2017).** Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Frontiers in plant science*, 8, 141.
- Kovačević, Z., Vukušić, S. B. and Zimniewska, M. (2012).** Comparison of Spanish broom (*Spartium junceum* L.) and flax (*Linum usitatissimum*) fibre. *Textile research journal*, 82(17), 1786-1798.
- Kovačević, Z., Bischof, S., and Antonović, A. (2017).** Enhancement of *Spartium junceum* L. fibres properties. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 254, No. 2, p. 022005). IOP Publishing.
- Kovačević, Z., Bischof, S., Vujasinović, E. and Fan, M. (2019).** The influence of pretreatment of *Spartium junceum* L. fibres on the structure and mechanical properties of PLA biocomposites. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(4), 449-463.
- Kowalska, J. and DeBeer, S. (2015).** The role of X-ray spectroscopy in understanding the geometric and electronic structure of nitrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(6), 1406-1415.
- Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E. and Udell, S. E. (1992).** Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 501-505.
- Kwon, S. W., Park, J. Y., Kim, J. S., Kang, J. W., Cho, Y. H., Lim, C. K., Parker, M. A. and Lee, G. B. (2005).** Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 263-270.
- Ladha, J. K. and So, R. B. (1994).** Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(1), 62-73.

- Lafay, B., Bullier, E. and Burdon, J. J. (2006).** Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Parasponia* (Ulmaceae) do not constitute a separate coherent lineage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(5), 1013-1018.
- Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F. and Amarger, N. (1994a).** Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 60(1), 56-63.
- Laguerre, G., Rigottier-Gois, L. and Lemanceau, P. (1994b).** Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. *Molecular ecology*, 3(5), 479-487.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M. R., Charnay, M. P., Louvrier, P., Mazurier, S. I., Rigottier-Gois and Amarger, N. (1996).** Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and environmental microbiology*, 62(6), 2029-2036.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. and 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.
- Lavin, M., Herendeen, P. S. and Wojciechowski, M. F. (2005).** Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Systematic biology*, 54(4), 575-594.
- Lea, P. J., Robinson, S. A. and Stewart, G. R. (1990).** The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine. *The biochemistry of plants*, 16, 121-159.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. and Dénarié, J. (1990).** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344(6268), 781-784.
- Le Rudulier, D. and Bernard, T. (1986).** Salt tolerance in *Rhizobium*: a possible role for betaines. *FEMS Microbiology Reviews*, 2(1-2), 67-72.
- Lewis, G., B. Schrire, B. Mackinder, and M. Lock. (eds.). (2005).** Legumes of the world. Richmond, UK, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewis, G. P., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., Rico, L. and Clark, R. (2013).** A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context- A tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany*, 89, 76-84.
- Li, F. W., Brouwer, P., Carretero-Paulet, L., Cheng, S., De Vries, J., Delaux, P. M., ... and Pryer, K. M. (2018).** Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses. *Nature plants*, 4(7), 460-472.
- Limpens, E. and Bisseling, T. (2003).** Signaling in symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 343-350.
- Lindström, K., Murwira, M., Willems, A. and Altier, N. (2010).** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in microbiology*, 161(6), 453-463.
- Lindström, K. and Mousavi, S. A. (2020).** Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1314-1335.

- Lograda, T., Chaker, A. N., Chalard, P., Ramdani, M., Chalchat, J. C., Silini, H. and Figueredo, G. (2009).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Genista numidica* Spach. and *G. saharae* Coss et Dur. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(7), 495-499.
- Long, S. R. (1989).** Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56(2), 203-214.
- Long, S. R. (2001).** Genes and signals in the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant physiology*, 125(1), 69-72.
- Loureiro, M. D. F., De Faria, S. M., James, E. K., Pott, A. and Franco, A. A. (1994).** Nitrogen-fixing stem nodules of the Legume, *Discolobium pulchellum* Benth. *New Phytologist*, 128(2), 283-295.
- Lu, Y. L., Chen, W. F., Wang, E. T., Guan, S. H., Yan, X. R. and Chen, W. X. (2009).** Genetic diversity and biogeography of rhizobia associated with *Caragana* species in three ecological regions of China. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(5), 351-361.
- MacLean, A.M., Finan, T.M. and Sadowsky, M.J. (2007).** Genomes of the symbiotic nitrogen fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology*, 144(2), 615-622.
- Mahdhi, M., Nzoué, A., de Lajudie, P. and Mars, M. (2008).** Characterization of root-nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils. *Progress in Natural Science*, 18(1), 43-49.
- Martinez-Romero, E. (1994).** Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant and Soil*. 161, 11-20.
- Martins, C. M., Borges, W. L., Costa, J. D. S. and Rumjanek, N. G. (2015).** Rhizobial diversity from stem and root nodules of *Discolobium* and *Aeschynomene*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37, 163-170.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. and Batut, J. (2009).** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. *Trends in microbiology*, 17(10), 458-466.
- Masson-Boivin, C. and Sachs, J. L. (2018).** Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Current opinion in plant biology*, 44, 7-15.
- Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Mauré, L., Moulin, L., Cleyet-Marel J.C. and Brunel, B. (2012).** Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and applied microbiology*, 35(2), 65-72.
- McNeil, S. D., Nuccio, M. L. and Hanson, A. D. (1999).** Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiology*, 120(4), 945-949.
- Menna, P., Barcellos, F. G. and Hungria, M. (2009).** Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 2934-2950.
- Menna, P. and Hungria, M. (2011).** Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12), 3052-3067.

- Merabet, C., Bekki, A., Benrabah, N., Bey, M. B.H., Bouchentouf, L., Ameziane, H., Rezki, M. A., Domergue, O., Cleyet-Marel, J.C., Avare, J.C., Béna, G., Bailly, X. and de Lajudie, P. (2006).** Distribution of *Medicago* species and their microsymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Research and Management*, 20(3), 219-231.
- Miché, L., Moulin, L., Chaintreuil, C., Contreras-Jimenez, J. L., Munive-Hernández, J. A., Del Carmen Villegas-Hernandez, M., Crozier, F. and Béna, G. (2010).** Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environmental microbiology*, 12(8), 2152-2164.
- Miflin, B. J. and Habash, D. Z. (2002).** The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of experimental botany*, 53(370), 979-987.
- Miličić, B., Deliđ, D., Kuzmanović, Đ., Stajković, O. and Jošić, D. (2006).** Intrinsic antibiotic resistance of different *Bradyrhizobium Japonicum* and *Rhizobium Galegae* strains. *Romanian Biotechnological Letters*, 11, 2723-273.
- Minchin, F. R. (1997).** Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 881-888.
- Minchin, F.R., James, E.K. and Becana, M. (2008).** Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species, and antioxidants in legume nodules. In: Dilworth MJ, James EK, Sprent JI *et al.* (eds). *Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 321-62.
- Mhamdi, R., Mrabet, M., Laguerre, G., Tiwari, R. and Aouani, M. E. (2005).** Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Canadian journal of microbiology*, 51(2), 105-111.
- Mohamed, S. H., Smouni, A., Neyra, M., Kharchaf, D., and Filali-Maltouf, A. (2000).** Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant and Soil*, 224(2), 171-183.
- Mönchgesang, S., Strehmel, N., Schmidt, S., Westphal, L., Taruttis, F., Müller, E., ... and Scheel, D. (2016).** Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.
- Moreira, F. M., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K. and Franco, A. A. (1993).** Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(1), 135-146.
- Moreira, F., Viedma, O., Arianoutsou, M., Curt, T., Koutsias, N., Rigolot, E., ... and Mouillot, F. (2011).** Landscape-wildfire interactions in southern Europe: implications for landscape management. *Journal of environmental management*, 92(10), 2389-2402.
- Moshiri, F., Kim, J. W., Fu, C. and Maier, R. J. (1994).** The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase in vitro and in vivo. *Molecular microbiology*, 14(1), 101-114.
- Moulin, L. (2002).** Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène *nod A* à l'identification de rhizobia au sein des béta-protéobactéries. *Thèse de Doctorat*. Université Claude Bernard-Lyon I. 289p.
- Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C. and Stepkowski, T. (2004).** Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular phylogenetics and evolution*, 30(3), 720-732.

- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P. and Lindström, K. (2014).** Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and applied microbiology*, 37(3), 208-215.
- Mousavi, S. A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P. and Lindström, K. (2015).** Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Systematic and applied microbiology*, 38(2), 84-90.
- Mrabet, M., Mnasri, B., Romdhane, S. B., Laguerre, G., Aouani, M. E. and Mhamdi, R. (2006).** *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), 304-309.
- Mulligan, J. T. and Long, S. R. (1989).** A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics*, 122(1), 7-18.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T. and Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51, 263-273.
- Nelson, M. S. and Sadowsky, M. J. (2015).** Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 491.
- Neyra, M., Khbaya, B., de Lajudie, P., Dreyfus, B. and Normand, P. (1998).** Computer-assisted selection of restriction enzymes for *rrs* genes PCR-RFLP discrimination of rhizobial species. *Genetics Selection Evolution*, 30(1), 1-13.
- Newcomb W. (1981).** Nodule morphogenesis and differentiation. In: *Biology of the Rhizobiaceae*. K.L. Giles and A.G. Atherley Eds. Academic Press, New York. pp. 247-298.
- Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P. and Fernandez, M. P. (1995).** Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 640-648.
- Oaks, A. and Hirel, B. (1985).** Nitrogen metabolism in roots. *Annual Review of Plant Physiology*, 36(1), 345-365.
- Odee, D. W., Sutherland, J. M., Makatiani, E. T., McInroy, S. G. and Sprent, J. I. (1997).** Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and Soil*, 188(1), 65-75.
- Ojha, A., Tak, N., Rathi, S., Chouhan, B., Rao, S. R., Barik, S. K., Joshi, S.R., Sprent J.S., James E.K. and Gehlot, H. S. (2017).** Molecular characterization of novel *Bradyrhizobium* strains nodulating *Eriosema chinense* and *Flemingia vestita*, important unexplored native legumes of the sub-Himalayan region (Meghalaya) of India. *Systematic and applied microbiology*, 40(6), 334-344.
- Oldroyd, G.E.D. (2013).** Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252-263.
- Oldroyd, G.E.D. and Dixon, R. (2014).** Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr Opin Biotechnol*, 26, 19-24.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P. and Udvardi, M.K. (2005).** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*, 15, 531-535.

- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S. and Saeki, K. (2013).** Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), 17131-17136.
- Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., Yasuda, M., Nouwen, N., Teaumroong, N. and Giraud, E. (2016).** Rhizobium–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *International Society for Microbial Ecology*, 10(1), 64-74.
- Op den Camp, R. H., Polone, E., Fedorova, E., Roelofsen, W., Squartini, A., Op den Camp, H. J., ... and Geurts, R. (2012).** Nonlegume *Parasponia andersonii* deploys a broad rhizobium host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. *Molecular plant-microbe interactions*, 25(7), 954-963.
- Pandya, M., Rajput, M. et Rajkumar, S. (2015).** Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. *Microbiology*, 84(1), 80-89.
- Pardo, C., Cubas, P. and Tahiri, H. (2004).** Molecular phylogeny and systematics of *Genista* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (*trnL-trnF* intergenic spacer). *Plant Systematics and Evolution*, 244(1-2), 93-119.
- Pardo, C., Cubas, P. and Tahiri, H. (2008).** Genetic variation and phylogeography of *Stauracanthus* (Fabaceae, Genisteae) from the Iberian Peninsula and northern Morocco assessed by chloroplast microsatellite (cpSSR) markers. *American Journal of Botany*, 95(1), 98-109.
- Parker, M. A. (2014).** The spread of *Bradyrhizobium* lineages across host legume clades: from *Abarema* to *Zygia*. *Microbial ecology*, 69(3), 630-640.
- Pawlowski, K., Ribeiro, A. and Bisseling, T. (1996).** Nitrogen fixing root nodule symbioses: legume nodules and actinorhizal nodules. In *Biotechnology annual review* (Vol. 2, pp. 151-184). Elsevier.
- Pawlowski, K. and Demchenko, K.N. (2012).** The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma*, 249, 967-979.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E. and Bedmar, E. J. (2015).** Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 17-42.
- Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W. J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(1), 180-201.
- Peters, N. K., Frost, J. W. and Long, S. R. (1986).** A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233(4767), 977-980.
- Peters, J. W., Fisher, K. and Dean, D. R. (1995).** Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annual review of microbiology*, 49(1), 335-366.
- Peters, N. K. (1997).** Nodulation: finding the lost common denominator. *Current Biology*, 7(4), R223-R226.
- Peters, J. W. and Szilagyi, R. K. (2006).** Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology* 2006, 10(2):101-108.
- Pienkos, P. T., Bodmer, S. and Tabita, F. R. (1983).** Oxygen inactivation and recovery of nitrogenase activity in cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 153(1), 182-190.
- Polhill, R.M. (1976).** Genisteae (Adans.) Benth. and related tribes (Leguminosae). *Botanical systematic*, 1, 143-368.
- Polhill, R. M and Raven, P. H. (1981) (eds).** Advances in legume systematics. Royal Botanic Gardens, Kew, England.

- Polhill, R. M. (1994).** Classification of the Leguminosae. In F.A. Bisby, J. Buckingham, and J. B. Harborne [eds.], *Phytochemical dictionary of the Leguminosae*, 1(XXXV–XLVIII). Chapman and Hall, New York, USA.
- Poly, F., Monrozier, L. J. and Bally, R. (2001).** Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in microbiology*, 152(1), 95-103.
- Ponsonnet, C. and Nesme, X. (1994).** Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Archives of Microbiology*, 161(4), 300-309.
- Postgate, J. R. (1982).** The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 252.
- Preti, F. and Giadrossich, F. (2009).** Root reinforcement and slope bioengineering stabilization by Spanish Broom (*Spartium junceum* L.). *Hydrology & Earth System Sciences*, 13(9), 1713-1726.
- Pueppke, S. G. and Broughton, W. J. (1999).** *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(4), 293-318.
- Quatrini, P., Scaglione, G., Cardinale, M., Caradonna, F. and Puglia, A. M. (2002).** *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 13-21.
- Rai, A. N., Söderbäck, E. and Bergman, B. (2000).** Cyanobacterium-plant symbioses. *New Phytologist*, 147(3), 449-481.
- Ramdani, N., Belhadi, D., Kaci, Y. and Benallaoua, S. (2020).** Symbiotic, phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobium* sp. nodulating *Spartium junceum* L. from Bejaia, northeastern Algeria. *Symbiosis*, 81, 25-37.
- Räsänen, L.A. and Lindström, K. (1999).** The effect of heat stress on the symbiotic interaction between *Sinorhizobium* sp. and *Acacia senegal*. *FEMS microbiology ecology*, 28(1), 63-74.
- Rathi, S., Tak, N., Bissa, G., Chouhan, B., Ojha, A., Adhikari, D., Barik, S.K., Satyawada, R.R., Sprent, J.I., James, E.K. and Gehlot, H. S. (2018).** Selection of *Bradyrhizobium* or *Ensifer* symbionts by the native Indian caesalpinoid legume *Chamaecrista pumila* depends on soil pH and other edaphic and climatic factors. *FEMS microbiology ecology*, 94(11), 180.
- Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn, S.E. (2000):** Biologie végétale. 2^{ème} édition. Edition de Boeck. Paris France, pp. 653-660.
- Raza, S., Jørnsgård, B., Abou-Taleb, H. and Christiansen, J. L. (2001).** Tolerance of *Bradyrhizobium* sp.(*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in applied microbiology*, 32(6), 379-383.
- Rees, D. C., Akif Tezcan, F., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andrade, S., Einsle, O. and Howard, J. B. (2005).** Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 363(1829), 971-984.
- Rehder, D. (2000).** Vanadium nitrogenase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 80, 133-136.
- Rennie, R. J. and Rennie, D. A. (1983).** Techniques for quantifying N₂ fixation in association with nonlegumes under field and greenhouse conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(8), 1022-1035.

- Requena, N., Perez-Solis, E., Azcón-Aguilar, C., Jeffries, P. and Barea, J. M. (2001).** Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, 67(2), 495-498.
- Richter, G. (1993).** Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie végétale. Edition Louis Jean, 341-352 Editeur : Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (PPUR, France).
- Rivas, R., Martens, M., De Lajudie, P. and Willems, A. (2009).** Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(2), 101-110.
- Robert, F. M., Molina, J. A. and Schmidt, E. L. (1982).** Properties of *Rhizobium leguminosarum* isolated from various regions of Morocco. *Annales de Microbiologie*, Vol. 133, No. 3, pp. 461-470.
- Roberts, G. P. and Brill, W. J. (1981).** Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Annual Reviews in Microbiology*, 35(1), 207-235.
- Robson, R. L. and Postgate, J. R. (1980).** Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 183-207.
- Rodríguez-Echeverría, S., Pérez-Fernández, M. A., Vlaar, S. and Finnan, T. (2003).** Analysis of the legume–rhizobia symbiosis in shrubs from central western Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1367-1374.
- Rodríguez-Quinones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P. and Kondorosi, A. (1987).** Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant molecular biology*, 8(1), 61-75.
- Rodríguez-Echeverría, S. and Pérez-Fernández, M. A. (2003).** Soil fertility and herb facilitation mediated by *Retama sphaerocarpa*. *Journal of Vegetation Science*, 14(6), 807-814.
- Ronson, C. W., Lyttleton, P. and Robertson, J. G. (1981).** C4-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(7), 4284-4288.
- Ryu, C.M. (2015).** Against friend and foe: type 6 effectors in plant-associated bacteria. *J Microbiol*, 53:201-208.
- Rubio, L. M. and Ludden, P. W. (2005).** Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 405-414.
- Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Puertas-Mejía, M. A., de Felipe, M. D. R. and Fernández-Pascual, M. (2009).** Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Archives of microbiology*, 191(1), 35-46.
- Rundel, P. W. (1989).** Ecological success in relation to plant form and function in woody legumes. *Advances in legume biology*, 377-398.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Salmi, A., Boulila, F., Bourebaba, Y., Le Roux, C., Belhadi, D. and De Lajudie, P. (2018).** Phylogenetic diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Calicotome spinosa* in the Northeast of Algeria. *Systematic and applied microbiology*, 41(5), 452-459.
- Sanhueza, C. and Zalba, S. M. (2012).** Experimental control of Spanish broom (*Spartium junceum*) invading natural grasslands. *Management of Biological Invasions*, 3(2), 97-104.

- Sarita, S., Sharma, P. K., Prierer, U. B. and Prell, J. (2005).** Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(1), 1-11.
- Sarr, P. S., Yamakawa, T., Fujimoto, S., Saeki, Y., Thao, H. T. and Myint, A. K. (2009).** Phylogenetic diversity and symbiotic effectiveness of root-nodulating bacteria associated with cowpea in the south-west area of Japan. *Microbes and environments*, 24 (2):105-112.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D. and Young, J. M. (2003).** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of general and applied microbiology*, 49(3), 155-179.
- Schlesier J, Rohde M, Gerhardt S and Oliver Einsle, O. (2016).** A Conformational switch triggers nitrogenase protection from oxygen damage by Shethna protein II (FeSII). *J Am Chem Soc*; 138:239-47.
- Sharma, P. K., Kundu, B. S. and Dogra, R. C. (1993).** Molecular mechanism of host specificity in legume-Rhizobium symbiosis. *Biotechnology advances*, 11(4), 741-779.
- Schlaman, H. R., Okker, R. J. and Lugtenberg, B. J. (1992).** Regulation of nodulation gene expression by NodD in Rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 174(16), 5177.
- Schöllhorn, R. and Burris, R. H. (1967).** Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(1), 213.
- Schultze, M., and Kondorosi, A. (1998).** Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual review of genetics*, 32(1), 33-57.
- Schumpp, O. and Deakin, W. J. (2010).** How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. *Trends in plant science*, 15(4), 189-195.
- Scippa, G. S., Di Michele, M., Di Iorio, A., Costa, A., Lasserre, B. and Chiatante, D. (2006).** The response of *Spartium junceum* roots to slope: anchorage and gene factors. *Annals of Botany*, 97(5), 857-866.
- Schrire, B. D., Lavin, M. A. T. T. and Lewis, G. P. (2005).** Global distribution patterns of the *Leguminosae*: insights from recent phylogenies. *Biologische skrifter*, 55, 375-422.
- Seefeldt, L.C., Dance I.G. and Dean D.R. (2004).** Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. *Biochemistry*. 43, 1401-1409.
- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M. and Dean, D. R. (2009).** Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual review of biochemistry*, 78, 701-722.
- Seefeldt L. C., Hoffman B. M., Peters J. W., Raugei S., Beratan D. N., Antony E. and Dean, D.D. (2018).** Energy transduction in nitrogenase. *Acc. Chem. Res.*, 512179-2186. 10.1021/acs.accounts8b00112.
- Serraj, R., Roy, G., and Drevon, J. J. (1994).** Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. *Physiologia Plantarum*, 91(2), 161-168.
- Serraj, R., Vasquez-Diaz, H., and Drevon, J. J. (1998).** Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion, and ion distribution in soybean, common bean, and alfalfa. *Journal of plant nutrition*, 21(3), 475-488.
- Sharma, P. K., Kundu, B. S. and Dogra, R. C. (1993).** Molecular mechanism of host specificity in legume-Rhizobium symbiosis. *Biotechnology advances*, 11(4), 741-779.
- Sieciechowicz, K. A., Joy, K. W. and Ireland, R. J. (1988).** The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry*, 27(3), 663-671.

- Simpson, F. B. (1987).** The hydrogen reactions of nitrogenase. *Physiologia Plantarum*, 69(1), 187-190.
- Singleton, P. W. (1983).** A Split-Root Growth System for Evaluating the Effect of Salinity on Components of the Soybean *Rhizobium japonicum* Symbiosis. *Crop Science*, 23(2), 259-262.
- Sippel, D. and Einsle, O. (2017).** The structure of vanadium nitrogenase reveals an unusual bridging ligand. *Nature chemical biology*, 13(9), 956-960.
- Sippel, D., Rohde, M., Netzer, J., Trncik, C., Gies, J., Grunau, K., ... and Einsle, O. (2018).** A bound reaction intermediate sheds light on the mechanism of nitrogenase. *Science*, 359(6383), 1484-1489.
- Smibert, R. M. and Krieg, N. R. (1984).** Chapter 20: General characterization. *Manual of Methods for General Bacteriology*. In: Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB (eds), 409-443.
- Smith, B. E., Campbell, F., Eady, R. R., Eldridge, M., Ford, C. M., Hill, S., ... and Yates, M. G. (1987).** Biochemistry of nitrogenase and the physiology of related metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 317(1184), 131-146.
- Smith, L. T., Smith, G. M., D'souza, M. R., Pocard, J. A., Rudulier, D. L. and Madkour, M. A. (1994).** Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: mechanism and control by other environmental signals. *Journal of Experimental Zoology*, 268(2), 162-165.
- Smith, B. E., Richards, R. L. and Newton, W. E. (Eds.). (2013).** Catalysts for nitrogen fixation: nitrogenases, relevant chemical models and commercial processes (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Soltner, D. (1988).** Les bases de la production végétale. Le sol-le climat-la plante. Tome 1: le sol. Edition : collection Sciences et Techniques, 16^{ème} édition. « Le clos Lorelle ». Sainte-Gemmes-Sur Loire, 49000 Angers, France, 453 p.
- Soltis, P. S. and Soltis, D. E. (2013).** Angiosperm phylogeny: a framework for studies of genome evolution. In *Plant genome diversity*, Volume 2 (pp. 1-11). Springer, Vienna.
- Somasegaran, P. and Hoben, J. H. (1994).** Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Ed. Springer-Verlag, New York. 450p.
- Spaink, H. P., Sheeley, D. M., van Brussel, A. A., Glushka, J., York, W. S., Tak, T., ... and Lugtenberg, B. J. (1991).** A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*, 354, 125-130.
- Spaink, H. P. and Carlson, R. W. (1996).** Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15(5-6), 559-582.
- Spaink, H. P. (2000).** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 257-288.
- Spiller, H. A. R. T. and Shanmugam, K. T. (1987).** Physiological conditions for nitrogen fixation in a unicellular marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain SF1. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5379-5384.
- Sprent, J. I. and Raven, J. A. (1992).** Evolution of nitrogen-fixing symbioses. *Biological nitrogen fixation*, 461-496.
- Sprent J.I. (2009).** Legume nodulation. A global perspective. John Wiley and sons (Eds), Wiley-Blackwell, United Kingdom, 200p.

- Stępkowski, T., Banasiewicz, J., Granada, C. E., Andrews, M. and Passaglia, L. M. (2018).** Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the tribe Genisteeae. *Genes* (Review). 9(163):1-25.
- Stewart G.R., Mann A.F. and Fentem P.A. (1980).** Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and glutamate synthase, dans Stumpf P.K., Conn E.E. et Mifflin B.J. Ed., *The Biochemistry of Plants, Vol. 5: Amino Acids and Derivatives*, p. 271-327, Academic Press, New York.
- Stougaard, J. (2000).** Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant physiology*, 124(2), 531-540.
- Stowers, M. D. and Elkan, G. H. (1984).** Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. *Plant and soil*, 80(2), 191-200.
- Stowers, M. D. (1985).** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annual review of microbiology*, 39, 89-108.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G. and Nowak, J. (1997).** Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25(1), 13-19.
- Sugawara, M., Epstein, B., Badgley, B. D., Unno, T., Xu, L., Reese, J., Farmer, A. D. ... and Sadowsky, M. J. (2013).** Comparative genomics of the core and accessory genomes of 48 *Sinorhizobium* strains comprising five genospecies. *Genome biology*, 14(2), R17.
- Sutherland, J. M. and Sprent, J. I. (1993).** Nitrogen fixation by legume trees. In : *Symbioses in nitrogen-fixing trees*. N.S. Subba Rao & J.I. Sprent (eds.), 33-63. Oxford & ISH, New Delhi.
- Sutton, W. D., Pankhurst, C. E. and Craig, A. S. (1981).** The *Rhizobium* bacteroid state. *International review of cytology*, Supp, 13, 149-177.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. (2013).** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Talibart, R., Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Wroblewski, H., Blanco, C., and Bernard, T. (1994).** Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *Journal of Bacteriology*, 176(17), 5210-5217.
- Taylor, L. P. and Grotewold, E. (2005).** Flavonoids as developmental regulators. *Current opinion in plant biology*, 8(3), 317-323.
- Terefework, Z. (2002).** Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. Thesis of the University of Helsinki. 58p.
- Timmers, A. C., Holsters, M. and Goormachtig, S. (2005).** Endocytosis and endosymbiosis. In *Plant Endocytosis* (pp. 245-266). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Tohge, T., de Souza, L.P. and Fernie, A.R. (2017).** Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *J. Exp. Bot.*, 68, 4013-4028.
- Travlos, I. S., Economou, G. and Karamanos, A. J. (2007).** Seed germination and seedling emergence of *Spartium junceum* L. in response to heat and other pre-sowing treatments. *Journal of Agronomy*, 6(1), 152.

- Turner, S. L. and Young, J. P. W. (2000).** The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution*, 17(2), 309-319.
- Udvardi, M. K. and Day, D. A. (1997).** Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual review of plant biology*, 48(1), 493-523.
- Ureta, A. and Nordlund, S. (2002).** Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *Journal of bacteriology*, 184(20), 5805-5809.
- Valladares, F., Zaragoza-Castells, J., Sánchez-Gómez, D., Matesanz, S., Alonso, B., Portsmouth, A., Delgado, A. and Atkin, O. K. (2008).** Is shade beneficial for Mediterranean shrubs experiencing periods of extreme drought and late-winter frosts? *Annals of Botany*, 102(6), 923-933.
- van Brussel, A. A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P. C., Spaink, H. P., Tak, T., Lugtenberg, B. J. and Kijne, J. W. (1992).** Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*, 257(5066), 70-72.
- van Der Heijden, M. G., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T. R., Rutten, M., Van Logtestijn, R. and Staehelin, C. (2006).** Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), 178-187.
- van Rhijn, P. and Vanderleyden, J. (1995).** The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 124-142.
- van Rossum, D. I. M. A. N., Schuurmans, F. P., Gillis, M., Muyotcha, A., Van Verseveld, H. W., Stouthamer, A. H. and Booger, F. C. (1995).** Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1599-1609.
- van Velzen, R., Holmer, R., Bu, F., Rutten, L., van Zeijl, A., Liu, W., ... and Geurts, R. (2018).** Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), E4700-E4709.
- Vasse, J., De Billy, F., Camut, S. and Truchet, G. (1990).** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4295-4306.
- Vance, C. P. (1983).** *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease?. *Annual review of microbiology*, 37(1), 399-424.
- Vincent, J. M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Program (IBP) handbook n°15. Blackwells Scientific Publications, Oxford.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. and Martínez-Romero, E. (2005a).** Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 34(1), 29-54.

- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D. and Martínez-Romero, E. (2005b).** *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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 569-575.
- Vose, P. B., Ruschel, A. P., Victoria, R. L. Saito, S. M. T. and Matsui, E. (1981).** ¹⁵N as a tool in biological nitrogen fixation research. In: *Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture*. Peter H. Graham (ed.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia: 575-592.
- Vriezen, J. A., De Bruijn, F. J. and Nüsslein, K. (2007).** Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and environmental microbiology*, 73, 3451-3459.
- Wagner, W. L., Herbst, D. R. and Sohmer, S. H. (1999).** *Manual of the Flowering Plants of Hawai'i*, Vols. 1 and 2 (Revised edition). University of Hawai'i Press/Bishop Museum Press. 1918 + [1] pp.
- Wais, R. J., Keating, D. H. and Long, S. R. (2002).** Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant physiology*, 129(1), 211-224.
- Walker, L., Lagunas, B. and Gifford, M. L. (2020).** Determinants of host range specificity in legume-rhizobia Symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3028.
- Wang, D., Yang, S., Tang, F. and Zhu, H. (2012).** Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular microbiology*, 14(3), 334-342.
- Wasson, A. P., Pellerone, F. I. and Mathesius, U. (2006).** Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *The Plant Cell*, 18(7), 1617-1629.
- Watson, L. and Dallwitz, M. J. (1999).** The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. University of New Orleans.
- Weiss, M. C., Sousa, F. L., Mrnjavac, N., Neukirchen, S., Roettger, M., Nelson-Sathi, S., and Martin, W. F. (2016).** The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature microbiology*, 1(9), 1-8.
- Welsh, D. T. (2000).** Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS microbiology reviews*, 24, 263-290.
- Widmer, F., Shaffer, B. T., Porteous, L. A. and Seidler, R. J. (1999).** Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 374-380.
- Willems, A. and Collins, M. D. (1993).** Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 305-313.
- Willems, A., Coopman, R. and Gillis, M. (2001).** Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(1), 111-117.
- Willems, A. (2006).** The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, 287(1), 3-14.
- Wilson, K. (1997).** Preparation of genomic DNA from Bacteria. In: Ausubel FM *et al.* (eds) *Current protocols in molecular biology*. Wiley, New York, 2.4, 1-5.

- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M. and Sanderson, M. J. (2004).** A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American journal of botany*, 91(11), 1846-1862.
- Wood, M. and Cooper, J. E. (1988).** Acidity, aluminium and multiplication of *Rhizobium tripolii*: possible mechanisms of aluminium toxicity. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(1), 95-99.
- Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J. and Fan, H. (1995).** *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 706-711.
- Yadav, N. R. and Vyas, S. R. (1971).** Effect of salts and pH on the growth of *Rhizobium* strains. *Indian Journal of Microbiology*, 11, 97-102.
- Yadav, N. R. and Vyas, S. R. (1973).** Salt and pH Tolerance of Rhizobia. *Folia Microbiologica., Praha*, 18, 242-247.
- Yahara, T., Javadi, F., Onoda, Y., de Queiroz, L. P., Faith, D. P., Prado, D. E., ... and Nkonki, T. (2013).** Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators, and strategies. *Taxon*, 62(2), 249-266.
- Yelton, M. M., Yang, S. S., Edie, S. A. and Lim, S. T. (1983).** Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *Microbiology*, 129(5), 1537-1547.
- Young, J. P. W. and Johnston, A. W. B. (1989).** The evolution of specificity in the legume-Rhizobium symbiosis. *Trends in ecology and evolution*, 4(11), 341-349.
- Zahran, H. H. (1999).** Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 968-989.
- Zakhia, F. and de Lajudie, P. (2001).** Taxonomy of rhizobia. *Agronomie, EDP Sciences*, 21 (6-7), 569-576.
- Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J. C., Gillis, M., Dreyfus, B. and de Lajudie, P. (2004).** Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Systematic and applied microbiology*, 27(3), 380-395.
- Zakhia, F. and de Lajudie, P. (2006).** La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Canadian journal of microbiology*, 52(3), 169-181.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. and Steward, G. F. (2003).** Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental microbiology*, 5(7), 539-554.
- Zézé, A., Mutch, L. A. and Young, J. P. W. (2001).** Direct amplification of *nodD* from community DNA reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environmental microbiology*, 3(6), 363-370.
- Zhang, X., Harper, R., Karsisto, M. and Lindström, K. (1991).** Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(1), 104-113.

- Zhang, F., Charles, T. C., Pan, B. and Smith, D. L. (1996).** Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum nod* genes at low temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(12), 1579-1583.
- Zhang, Y. F., Wang, E. T., Tian, C. F., Wang, F. Q., Han, L. L., Chen, W. F. and Chen, W. X. (2008).** *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS microbiology letters*, 285(2), 146-154.
- Zouhar, K. (2005).** *Spartium junceum*. In : *Fire Effects Information System*. Washington DC, USA: USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory. <http://www.fs.fed.us/database/feis>
- Zribi, K., Mhamdi, R., Huguet, T. and Aouani, M. E. (2004).** Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural populations of *Medicago truncatula* in Tunisian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(6), 903-908.

Annexes

ANNEXE I

1 : Composition chimique du milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar, Vincent, 1970) :

Mannitol : 10g ; Extrait de levure : 0.4g ; K_2HPO_4 : 0.5g ; $MgSO_4 (7H_2O)$: 0.2g ; NaCl : 0,1g ; Agar : 15g ; H_2O distillée (q.s.p.) : 1000 ml.

2 : Composition chimique du milieu YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth, Vincent, 1970) :

Mannitol : 10g ; Extrait de levure : 0.4g ; K_2HPO_4 : 0.5g ; $MgSO_4 (7H_2O)$: 0.2g ; NaCl : 0.1g ; H_2O distillée (q.s.p.) : 1000 ml.

Le pH des milieux YEMA et YEMB sont ajustés à 6.8, puis stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

3 : Composition chimique du milieu utilisé pour le test de nodulation (Fahraeus, 1957) :

$CaCl_2$: 0.100g ; $MgSO_4 (7H_2O)$: 0.120g ; KH_2PO_4 : 0.100g ; $Na_2HPO_4 (2H_2O)$: 0.150g ; Citrate ferrique: 0.005g ; Agar : 8g ; Solution stock d'oligoéléments* : 1m ; H_2O distillée (q.s.p.) : 1000 ml.

Le pH du milieu est ajusté à 6.7, puis stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

4 : *Solution stock d'oligoéléments (par litre d'eau distillée) :

H_3BO_3 : 2.86g ; $MnSO_4 (4H_2O)$: 2.03g ; $ZnSO_4 (7H_2O)$: 0.22g ; $CuSO_4 (5H_2O)$: 0.08g ; $Na_2MoO_4 (H_2O)$: 0.09g.

Le milieu Fahraeus et la solution stock d'oligoéléments sont stérilisés à 120°C pendant 20 min.

ANNEXE II

Tableau S1 : Numéros d'accèsion des séquences des souches de *Bradyrhizobium* isolées de *Spartium junceum* (L.) d'Algérie.

Souches	16s rRNA	<i>glnII</i>	<i>recA</i>	<i>nodC</i>
SjAD3	MH255666	MN235716	MN235728	MN075790
SjAD5	MH255664	MN235717	MN235729	MN075791
SjBA4	MH255669	MN235718	MN235730	MN075792
SjBA7	MH255667	MN235719	MN235731	MN075793
SjBA9	MH255673	MN235720	MN235732	MN075794
SjBA12	MH255672	MN235721	MN235733	MN075795
SjSA4	MH255668	MN235722	MN235734	MN075796
SjSA11	MH255670	MN235723	MN235735	MN075797
SjSA14	MH255665	MN235724	MN235736	MN075798
SjSA19	MH255671	MN235725	MN235737	MN075799
SjSA26	MH255663	MN235726	MN235738	MN075800
SjSM1	MH255674	MN235727	MN235739	MN075801

ANNEXE III

Tableau S2: Résultats des tests de corrélations entre les paramètres symbiotiques

Statistiques descriptives :

Variables	Observations	Obs. avec données manquantes	Obs. sans données manquantes	Minimum	Maximum
NT	69	0	69	0,820	4,230
NN	69	0	69	0,000	30,000
PMS	69	0	69	0,790	2,120
ES (%)	69	0	69	45,755	107,738

Matrice de corrélation (Pearson) :

Variables	NT	NN	PMS	ES (%)
NT	1	0,198	0,755	0,758
NN	0,198	1	0,371	0,355
PMS	0,755	0,371	1	0,906
ES (%)	0,758	0,355	0,906	1

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

p-values :

Variables	NT	NN	PMS	ES (%)
NT	0	0,088	0,000	0,000
NN	0,088	0	0,001	0,002
PMS	< 0,0001	0,001	0	< 0,0001
ES (%)	< 0,0001	0,002	< 0,0001	0

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

ANNEXE IV

Tableau S3 : Les caractères phénotypiques des bactéries représentées par les clusters

Caractères	Cluster I	Cluster II	Cluster III	Cluster IV
Nombre de souches	04	10	07	02
Croissance à :				
pH 4.0	-	-	-	-
pH 5.0	-	+	+	-
pH 6.0	+	+	+	+
pH 7.0	+	+	+	+
pH 8.0	-	-	+	-
pH 9.0	-	-	+	-
pH 10.0	-	-	-	-
Tolérance au NaCl				
0%	+	+	+	+
0.5%	+	-	+	-
1%	+	-	+	-
1.5%	+	-	-	-
2%	-	-	-	-
2.5%	-	-	-	-
3%	-	-	-	-
Croissance à:				
20°C	+	+	+	-
25°C	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+
35°C	-	+	-	-
40°C	-	-	-	-
45°C	-	-	-	-
50°C	-	-	-	-
Résistance aux antibiotiques				
Bacitracine	+	-	+	-
Doxycycline	+	-	-	-
Lincomycine	+	-	+	-
Néomycine	+	+	-	+
Oxacilline	+	+	-	+
Penicilline	+	-	-	-
Spiramycine	+	-	-	+
Vancomycine	+	-	+	-
Ampicilline	-	+	+	+
Cefalexine	-	+	+	+
Chloramphenicol	-	+	+	+
Oxytetracycline	-	-	-	-
Kanamycine	+	+	+	+
Nitrate reductase	+	-	+	+
Uréase	-	+	+	-
β-galactosidase	-	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
BTB	+	+	+	+
Utilisation de sources de carbon				
D-rhamnose	+	-	+	+
L-arabinose	+	+	+	+
D-mannose	-	+	+	+
D-sorbose	-	+	+	+

Tableau S3 (Suite)

D-galactose	-	+	+	+
Sucrose	+	-	+	+
Maltose	-	+(8)	+	+
Cellobiose	+	+	-	+
Raffinose	+	-	+	+
Dextrine	-	-	+	+
Salicine	-	-	+	+
D-tréhalose	+	+(8)	+	+
L-xylose	-	+	+	+
Inositol	+	+	+	-
Adonitol	+	+	+	-
Lactose	-	+	+	+
Acide succinique	+	+	+	-
Acide lactique	+	+	+	+
Acétate de potassium	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Acide citrique	+	+	+	+
Acide fumarique	+	+	+	+
Acide malique	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-
Utilisation des acides amines				
Valine	-	-	+	+
Leucine	-	-	+	+
Histidine	-	-	+	+
Glycine betaine	-	+	+	-
Alanine	+	+	-	+
Aspartate	+	+	+	+
Isoleucine	-	+	+	+
Sérine	+	-	+	+
Tryptophane	+	+	+	+
Glutamate	+	+	+	+
Proline	+	+	+	+

- Le chiffre entre parenthèse indique le nombre d'isolats positifs pour le caractère sur le nombre total des souches testées du même cluster ;
- Seuls les caractères surlignés en jaune ont été utilisés dans la taxonomie numérique (UPGMA).

Article

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/341488209>

Symbiotic, phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobium* sp. nodulating *Spartium junceum* L. from Bejaia, northeastern Algeria

Article in *Symbiosis* · May 2020

DOI: 10.1007/s13199-020-00679-8

CITATIONS

0

READS

73

4 authors, including:



D. Belhadi

Université de Béjaïa

14 PUBLICATIONS 77 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Kaci Yahia

University of Science and Technology Houari Boumediene

17 PUBLICATIONS 183 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Rhizosphere and PGPR [View project](#)



Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and drought tolerance [View project](#)

*Symbiotic, phenotypic and genotypic
characterization of Bradyrhizobium sp.
nodulating Spartium junceum L. from
Bejaia, northeastern Algeria*

**Nacer Ramdani, Djellali Belhadi, Yahia
Kaci & Said Benallaoua**

Symbiosis

ISSN 0334-5114

Volume 81

Number 1

Symbiosis (2020) 81:25-37

DOI 10.1007/s13199-020-00679-8

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Nature B.V.. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Symbiotic, phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobium* sp. nodulating *Spartium junceum* L. from Bejaia, northeastern Algeria

Nacer Ramdani¹ · Djellali Belhadi¹ · Yahia Kaci² · Said Benallaoua³Received: 21 November 2019 / Accepted: 23 April 2020 / Published online: 19 May 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Twenty-three bacterial strains were isolated from root nodules of *Spartium junceum* L., growing wild in four distinct geographic locations in Bejaia city (Northeastern Algeria). They were analyzed based on their symbiotic effectiveness, phenotypic properties and restriction fragment length polymorphism of the 16S rRNA gene. In addition, sequence analyses of the ribosomal gene, protein-coding housekeeping genes *glnII* and *recA*, and symbiotic gene (*nodC*) were used to clarifying their taxonomic and phylogenetic position.

Plant infection tests revealed that all strains were able to form nodules on their original host plant, but with variable nodulation ability and symbiotic effectiveness. All strains were slow-growing, alkali-producing rhizobia in YEMA medium. According to phenotypic test results, the strains were grouped in four main clusters in a UPGMA dendrogram, while they were discriminated into 12 distinct genotypes by 16S rDNA-RFLP. Phylogenetic analyses of 16S rRNA genes and two concatenated housekeeping genes, *glnII* and *recA*, distributed the representative strains from each RFLP genotypes into two major clades within *Bradyrhizobium* genus. Some of these strains were closely related to *B. retamae* and *B. japonicum* whereas others represented four novel genospecies. Based on analysis of the symbiotic gene sequence (*nodC*), all strains were placed in the symbiovar *retamae* cluster except for SjBA12 which possibly constitutes a new symbiovar within the genus *Bradyrhizobium*.

Keywords *Spartium junceum* L. · *Bradyrhizobium* sp. · Symbiotic effectiveness · Phenotypic characterization · Phylogeny

1 Introduction

Evergreen sclerophyllous plant communities especially legume shrubs, are common in the Mediterranean ecosystems as a result of their ability to adapt to the local climate of hot dry summers and cool, wet winters (Rodríguez-Echeverría et al. 2003; Blumler 2005). These shrubs are considered

among the most successful pioneer plants as a result of their ability to rapidly colonize dry degraded areas, and thus often used to restore disturbed ecosystems (Valladares et al. 2002; Gómez-Aparicio et al. 2004; Gómez-Aparicio 2009; Busquets et al. 2010). Spanish Broom, *Spartium junceum* (L.), is one of these perennial shrubs native to the Mediterranean region from Southern Europe to Northwest Africa and Southwest Asia. (Angelini et al. 2000; Travlos et al. 2007). It has been introduced in many countries as a garden plant and used for soil erosion control (Bossard et al. 2000). *S. junceum* (L.) is the only species of the *Spartium* in the Genisteae tribe; and possesses xerophytic features that provide remarkable adaptability and resistance to drought and adverse environments (Preti and Giadrossich 2009). This shrub can grow vigorously in sunny areas from 0 to 1400 m above sea level (Pignatti 1982). It thrives quite well in arid regions with poor, dry and rocky soils (Busquets et al. 2010). Because of such characteristics, it is typically found in marginal soils, disturbed areas such as eroded, stony hillsides and roadsides (Preti and Giadrossich 2009; Sanhueza and Zalba 2012).

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13199-020-00679-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Nacer Ramdani
ramdani_nacer@hotmail.fr

¹ Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

² Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, Faculté des Sciences Biologiques USTHB, BP 132 El Alia, Alger, Algeria

³ Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

Spanish Broom is not a source of food as its flowers and seeds are toxic (Barboni et al. 1994; Colombo et al. 2010). However, as a legume, it is able to fix atmospheric nitrogen (N₂) via symbiotic bacteria termed rhizobia in its root nodules. This biological allows a net input of atmospheric nitrogen into the natural and agricultural ecosystems where it grows (Jackson et al. 2008), improving degraded soil fertility (Cardinale et al. 2010) and facilitating the establishment and growth of other plant species (Castro et al. 2002; Gómez-Aparicio 2009; Alday et al. 2014). Together, these help prevent landslides (Scippa et al. 2006; Preti and Giadrossich 2009) and help to combat erosion and desertification (Castro et al. 2004; Bautista et al. 2007). Despite its ecological importance, not much is known about the diversity and symbiotic effectiveness of its bacterial partners. One aim of the present study was to select the most efficient “legumes-rhizobia” in this partnership to enhance competitiveness and nodule occupancy in the natural environment (Herrera et al. 1993). Studies of the endosymbiotic bacteria from the root nodules of *Spartium junceum* in the Mediterranean region of Europe have indicated that *Bradyrhizobium* spp. are the main symbionts nodulating this species (Quatrini et al. 2002; Cardinale et al. 2008; Ruiz-Díez et al. 2009; Parker 2014). However, there is no information available about the microsymbionts associated with this legume from the Southern Mediterranean particularly Algeria. The current study, therefore, aimed to: (i) investigate the diversity of endosymbiotic bacteria associated with *S. junceum* (L.) nodulation by phenotypic and genotypic methods; (ii) evaluate their symbiotic performances in order to select the efficient strains that could be included in the inoculum formulations.

2 Materials and methods

2.1 Nodules, seeds and soils sampling

The root nodules used in this study were collected from wild *S. junceum* (L.) plants growing in four different locations of Bejaia city (Northeastern Algeria) namely: Adekar, Barbacha, Semaoun and Sidi-Aïch. Healthy nodules were detached along with a portion of the root and stored in tubes containing silica gel, separated by a cotton layer, until the isolation process. Soils were collected in the immediate vicinity of the plant at a depth of 0–25 cm and were analyzed for organic carbon (OC) content, total nitrogen (TN), available P, pH, texture, electric conductivity (EC) and total limestone (CaCO₃) according to Sarkar and Haldar (2005). Seeds of *S. junceum* L. were also collected directly on the sampling sites during summer.

2.2 Rhizobial isolation

Dried nodules were carefully detached from roots, re-hydrated overnight at 4 °C by immersion in distilled water and then surface-sterilized following standard procedures (Vincent 1970). Each nodule was crushed in 50 µl of sterile saline solution (0.9% NaCl) and the resultant suspension was streaked on Congo Red-Yeast Extract Mannitol Agar (CR-YEMA) media plates (Somasegaran and Hoben 1994). The plates were then incubated for 3 to 10 days at 28 °C. Individual colonies were checked for purity by repeated streaking on fresh YEMA medium and by microscopic examination of the cellular morphology and Gram-stain reaction. Purified strains were maintained at 4 °C on YEMA slopes containing 0.3% CaCO₃ for short-term use and at –80 °C on YEM broth (YEMB) with 20% glycerol (v/v) for long-term storage.

2.3 Plant nodulation and symbiotic effectiveness test

The nodulation ability and symbiotic performance of the strains was tested on the original host plant as described by Somasegaran and Hoben (1994). The undamaged *S. junceum* seeds were scarified by immersion in concentrated sulphuric acid for 30 min, and then rinsed thoroughly with sterile distilled water. After that, the seeds were incubated on water agar (1%) plates in darkness at 25 °C until emergence. The germinated seeds were individually transferred to sterilized 250 ml flasks containing N-free Fahraeus semisolid agar medium (0.8%) (Fahraeus 1957). Two days after planting, the seedlings were inoculated separately with a suitable bacterial suspension (approx. 1×10^8 cells per plant). Plants were grown in growth chamber with a 16/8 h light/dark photoperiod, at 25/18 °C day/night temperature and 60–70% relative humidity. To evaluate the symbiotic effectiveness (SE) of bacteria, two non-inoculated controls were prepared: one receiving 10 mM KNO₃ as positive control, and another, as a negative control, with only N-free Fahraeus medium. All experiments were performed in triplicate. After 12 weeks of growth, plants were harvested and examined for the presence of nodules. Roots containing nodules were separated from shoots, washed properly with tap water and the number of nodules (NN) per plant was counted. Shoot dry weights (SDW) were measured after the plants were dried in the oven at 65 °C to constant weight. The shoots were then crushed and analyzed for N-content (TNS) by Kjeldahl digestion method (Bremmen and Mulvaney 1982). Symbiotic performance of each isolate was evaluated by calculating the percent of symbiotic effectiveness (%SE) defined as:

$$\%SE = \frac{IPSDW}{NIFPSDW} \times 100$$

(Where *IPSDW*: inoculated plant shoot dry weight; *NIFPSDW*: noninoculated N-fertilized plant shoot dry weight). Finally, the strains were rated as highly effective ($SE > 80\%$), effective ($50\text{--}80\%$), less effective ($35\text{--}50\%$) and ineffective ($SE < 35\%$) (Beck et al. 1993).

To select the efficient strains, the data collected were analysed by one-way ANOVA using XLSTAT software (2016, version 2.0). The Tukey's HSD test was completed to compare the means and to detect significant differences of 5% among the treatments, Pearson's correlation coefficients were also calculated to establish relationships between the measured parameters.

2.4 Phenotypic characterization and numerical taxonomy

The strains nodulating the original host plant were examined for their cellular characteristics and colony morphologies. The acid/alkaline reaction was evaluated on YEMA plates containing bromothymol blue (BTB; 0.0025%, w/v) as pH-change indicator (Vincent 1970; Somasegaran and Hoben 1994). Generation times were determined with Erlenmeyer flasks cultures grown in YEMB medium and incubated on gyratory shaker (170 rpm) at 28 °C. Bacterial growth was evaluated by measuring optical density at 600 nm every 6 h (Yelton et al. 1983). Physiological tests including oxidase, catalase, urease and nitrate reductase activity were performed as described in the Manual of Methods for General Bacteriology (Gerhardt et al. 1981). The intrinsic tolerance to antibiotics was assessed by disk diffusion method on YEMA plates using ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), kanamycin (30 µg), spiramycin (10 µg), penicillin (6 µg), oxytetracycline (30 µg), lincomycin (15 µg), bacitracin (130 µg), neomycin (30 µg), doxycycline (30 µg), vancomycin (30 µg), oxacillin (5 µg) and cefalexin (30 µg). Inhibition zones diameters greater than 2 mm were considered as sensitive (Ladha and So 1994). Use of carbohydrates as the sole carbon source was tested in YEMB medium supplemented with 0.5% NH_4Cl instead of yeast extract as nitrogen source. Mannitol was replaced by one of the following carbon substrates at final concentration of 0.1%: D-glucose, D-fructose, D-rhamnose, D-arabinose, D-mannose, D-sorbose, D-galactose, sucrose, maltose, cellobiose, raffinose, dextrin, starch, salicine, D-trehalose, L-xylose, sorbitol, inositol, adonitol, glycerol, lactose, succinic acid, fumaric acid, malic acid, citric acid, lactic acid and potassium acetate. A similar procedure was performed to investigate the use of amino acids as sole nitrogen and carbon sources, except that yeast extract and mannitol of YEMB medium was replaced by one of the following amino acids at final concentration of 0.1%: aspartic acid, glutamic acid, proline, valine, leucine, alanine, serine, tryptophane, histidine, isoleucine and glycine betaine. All carbon substrates and

amino acids were sterilized using 0.22 µm size membrane filters before adding them to the medium. The capacity of the strains to grow at different pH values (4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10), at different temperatures (20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 °C) and their tolerance to sodium chloride (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3%) were performed on YEMB medium as described by Smibert and Krieg (1981).

The phenotypic characters results were converted into a two-dimensional binary matrix, in which the positive tests were coded as "1" and the negative as "0", and analysed by using XLSTAT software (2016, version 2.0). For each pair of strains, a Jaccard similarity (S_j) coefficient was calculated, and a UPGMA algorithm was used to perform hierarchical cluster analysis and infer a dendrogram.

2.5 Genotypic characterization

2.5.1 DNA preparation, PCR amplification and electrophoresis

Bacterial genomic DNAs were extracted and purified from cultures grown in YEMB using the CTAB/chloroform/isoamyl alcohol method as described by Wilson (1997). The DNA samples were then diluted to 40 ng μl^{-1} for PCR amplification and kept at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until required analysis. The 16S rRNA gene was amplified using the primers 41F and 1488R with cycling parameters and reactions as described by Herrera-Cervera et al. (1999). The *glnII* gene was amplified using the primers GSII-1 and GSII-4 as described by Turner and Young (2000), while *recA* gene fragment was amplified with *recA41F* and *recA640R* primers following the protocol described by Zhang et al. (2008). Amplification of *nodC* gene fragments was carried out using primers 540F and 1160R in accordance with procedures specified by Sarita et al. (2005). The amplified DNA of each gene was resolved by 1% (w/v) agarose gel electrophoresis in TAE buffer (20 mM Tris-HCl, 4 mM sodium acetate, 1 mM disodium EDTA [pH 7.4]) with appropriate DNA size standards, followed by staining with ethidium bromide (0.5 µg/ml), visualized with a UV transilluminator and photographed.

2.5.2 16S rDNA-RFLP analysis

The PCR products of 16S rRNA gene were digested by four restriction endonucleases *AluI*, *DdeI*, *HaeIII* and *Sau96I* separately in a 10 µl reaction volume following the manufacturer's recommendations (New England Biolabs inc.). PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) products were analyzed by horizontal electrophoresis in 3% agarose, as described before. The band sizes and numbers of DNA fragments were estimated by visual comparison with the standard molecular weight markers (100 bp DNA Ladder, Invitrogen). According to the nomenclature defined by Laguerre et al. (1994), each distinct fingerprint was assigned

a letter, and RFLP patterns obtained from digestion were combined, and then used to form PCR-RFLP types. Additionally, a Principal Component Analysis (PCA) was performed using the XLSTAT (2016, version 2.0) software to determine relationships between soil properties and 16S rDNA-RFLP data of the *S. junceum*-rhizobial strains. During this analysis, the soil physicochemical parameters and the rhizobial genotypes were considered as active variables.

2.5.3 DNA sequencing and phylogenetic analysis

Based on the results of PCR–RFLP, 12 representative strains were selected for partial sequencing of the 16S rRNA, house-keeping (*glnII* and *recA*) and symbiotic (*nodC*) genes. PCR amplified products were column-purified with a NucleoSpin kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's recommendations, and sequenced using the same primers as for PCR amplification. Sequence reactions were performed using the ABI Big Dye chain-terminator method with fluorescent ddNTPs and both strands were sequenced by using a model 370A DNA sequencer (Applied Biosystems). The partial sequences obtained were checked and corrected manually when necessary using the ChromasPro program version 1.42. Sequences were preliminarily compared with those available in the GenBank database through BLASTn (Altschul et al. 1990), and then aligned using the ClustalW program implemented in the MEGA 6 software package (Tamura et al. 2013). Phylogenetic trees were obtained with neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) using the Kimura's 2-parameter model (Kimura 1980), and statistical support of the trees was calculated by bootstrap analyses using 1000 replications. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

2.5.4 Nucleotide sequence accession numbers

The sequences used in this work are available in GenBank database under the accession numbers from MH255663 to MH255674 for 16S rRNA gene, MN075790 to MN075801 for *nodC* gene fragments, MN235716 to MN235727 for *glnII*, and MN235728 to MN235739 for *recA*.

3 Results and discussion

3.1 Soils physicochemical properties

The soils from which the *S. junceum* nodules were collected varied in their physicochemical properties (Table 1). Adekar and Barbacha soils had a sandy-loam texture with a high sand content (61.7% and 71.2%, respectively) and were characterized by a neutral pH. Sidi-Aïch and Semaoun soils were also sandy-clay-loams but had a higher clay content (31.9% and 30.1%, respectively) and an alkaline pH. The total limestone (CaCO_3) content was greater in Semaoun (33.74%) and Sidi-Aïch (19.68%) soils, but in Adekar (7.86%) and Barbacha (2.23%) soils. The electric conductivity (EC) values of all the soils were below to the salinity scale established by the United States Salinity Laboratory (Richards 1954). Chemical analysis revealed that all the soils were poor in nutrients.

3.2 Rhizobial isolation, nodulation tests and symbiotic effectiveness

A collection of 23 rhizobial strains was made from the root nodules of *S. junceum* L. growing in four different locations in Bejaia, northeastern Algeria. All strains were able to induce

Table 1 Origin of *Spartium* strains and physicochemical properties of soils used in this study

Strains	Geographical origin	Physicochemical properties of soils									
		Texture class	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	pH (H ₂ O)	OC (%)	TN (%)	P (ppm)	EC (μS/cm ⁻¹)	CaCO ₃ (%)
SjAD3, SjAD5, SjAD6, SjAD13, SjAD16	Adekar (36°43'25.10"N 4°34'54.56"E) Asl: 718 m	Sandy-Loam	2.0	36.3	61.7	6.9	0.9	0.07	0.45	145	7.86
SjBA4, SjBA7, SjBA9, SjBA12, SjBA21, SjBA24	Barbacha (36°34'33.29"N 4°58'21.76"E) Asl: 721 m	Sandy-Loam	3.1	25.7	71.2	7.1	1.6	0.36	0.13	123	2.23
SjSM1, SjSM4, SjSM8, SjSM11	Semaoune (36°37'35.32"N 4°49'26.20"E) Asl: 200 m	Sandy-Loam	30.1	13.4	56.7	8.5	1.8	0.11	0.20	212	33.74
SjSA4, SjSA10, SjSA11, SjSA14, SjSA16, SjSA19, SjSA23, SjSA26	Sidi-Aïch (36°35'33.80"N 4°40'11.80"E) Asl: 111 m	Sandy-Clay-Loam	31.9	14.3	53.8	8.4	1.5	0.14	0.40	245	19.68

OC Organic Carbon, TN Total Nitrogen, P Available Phosphorus, EC Electrical Conductivity, CaCO₃ Total Limestone, Asl Above Sea Level

root nodules on the original host plant (Table 2). The nodules produced by the majority of strains (91.3%) were red, and the plants appeared healthy with a dark-green colour, in contrast to the yellow colour of the negative uninoculated control plants. The nodules induced by SjsA19 and SjsA4 strains (8.7%) were small, slightly pink and the plants were yellow-green and stunted, suggesting low rates of N₂ fixation. The average nodules number (NN) per plant was significantly different ($P < 0.001$) among strains. Maximum nodulation was shown by SjsAD16 followed by SjsBA7. Strains SjsA4 and SjsA19 induced the formation of fewer nodules. Strain SjsAD16 was the most effective, with 3.51% of total nitrogen in the shoots (TNS), however all inoculated plants, whatever the strain showed higher TNS contents compared with the negative control. Interestingly, all strains gave rise to higher shoot dry weights (SDW) compared with the negative control. The maximum SDW were obtained in plants inoculated with SjsAD16, SjsBA7, SjsA10 and SjsA16 strains.

Table 2 Symbiotic properties of *Spartium* strains

Strains	NN	TNS	DWS	SE
SjsAD3	14.0 ^{def}	1.95 ^{efg}	1.38 ^{de}	72.02 ^{b-e}
SjsAD5	20.0 ^{a-e}	1.79 ^{e-h}	1.71 ^{ab}	89.19 ^{a-d}
SjsAD6	14.6 ^{c-f}	1.91 ^{efg}	1.70 ^{ab}	88.77 ^{a-d}
SjsAD13	21.6 ^{a-d}	1.98 ^{efg}	1.75 ^{ab}	90.91 ^{a-d}
SjsAD16	27.3 ^a	3.51 ^{ab}	1.87 ^a	97.58 ^{ab}
SjsBA4	21.3 ^{a-e}	1.98 ^{efg}	1.39 ^{de}	72.34 ^{a-e}
SjsBA7	25.6 ^a	2.07 ^{ef}	1.83 ^a	94.82 ^{ab}
SjsBA9	15.3 ^{c-f}	1.46 ^{fgh}	1.24 ^{def}	64.72 ^{de}
SjsBA12	15.3 ^{c-f}	1.90 ^{efg}	1.25 ^{def}	65.14 ^{cde}
SjsBA21	23.6 ^{abc}	1.93 ^{efg}	1.46 ^{bcd}	76.22 ^{a-e}
SjsBA24	20.6 ^{a-e}	2.20 ^{de}	1.69 ^{abc}	88.22 ^{a-d}
SjsSM1	25.3 ^{ab}	2.83 ^{cd}	1.71 ^{ab}	89.16 ^{a-d}
SjsSM4	22.0 ^{a-d}	1.76 ^{e-h}	1.40 ^{cde}	72.70 ^{a-e}
SjsSM8	12.3 ^{ef}	1.73 ^{e-h}	1.14 ^{ef}	59.67 ^e
SjsSM11	15.3 ^{c-f}	1.42 ^{gh}	1.25 ^{def}	65.01 ^{cde}
SjsA4	9.6 ^f	1.22 ^h	1.07 ^f	55.57 ^e
SjsA10	21.3 ^{a-e}	2.99 ^{bc}	1.79 ^a	92.67 ^{abc}
SjsA11	14.6 ^{c-f}	1.75 ^{e-h}	1.38 ^{de}	72.24 ^{a-e}
SjsA14	13.0 ^{def}	1.57 ^{e-h}	1.24 ^{def}	64.42 ^{de}
SjsA16	21.0 ^{a-e}	2.17 ^e	1.76 ^a	91.75 ^{a-d}
SjsA19	9.3 ^f	1.19 ^h	1.13 ^{ef}	58.31 ^e
SjsA23	16.3 ^{b-f}	1.98 ^{efg}	1.40 ^{cde}	73.19 ^{a-e}
SjsA26	20.6 ^{a-e}	2.00 ^{efg}	1.72 ^{ab}	89.69 ^{a-d}
Positive control	0.00 ^g	3.89 ^a	1.94 ^a	100.00 ^a
Negative control	0.00 ^g	0.44 ⁱ	0.40 ^g	21.16 ^f

Values followed by the same letter in each column did not differ (Tukey HSD test, $p < 0.05$)

SE Symbiotic effectiveness (%); DWS Dry Weight Shoots (g plant⁻¹); NN Nodules Number plant⁻¹; TNS Total Nitrogen Shoot (%)

Based on symbiotic effectiveness (% SE) (Beck et al. 1993), the strains could be classified into two groups: group I included 43.5% of strains that were found to be highly effective and group II with 56.5% of strains also being effective.

There was a significant positive correlation between the symbiotic parameters (Pearson coefficient, r values). The increase in shoots dry weight was positively correlated with the number of nodules ($r = 0.547$, $P < 0.0001$) and shoot total nitrogen ($r = 0.766$, $P < 0.0001$). In addition, the symbiotic effectiveness was positively correlated with the number of nodules ($r = 0.493$, $P < 0.0001$), and shoot total nitrogen ($r = 0.727$, $P < 0.0001$), and also strongly correlated with shoot dry weight ($r = 0.909$, $p < 0.0001$).

The results obtained in the present study are in line with published data that assumed that *Bradyrhizobium* sp. forms an efficient N₂-fixing symbiosis with *S. junceum* L. (Cardinale et al. 2008), *Glycine max* L. Merrill (Chen et al. 2002; Argaw 2015) and *Vigna unguiculata* (Sarr et al. 2009). The present study enabled us to identify the most effective strains, and particularly the strain SjsAD16. This could be used in the future to inoculate plants for environmental applications such as the restoration of degraded and poor soils.

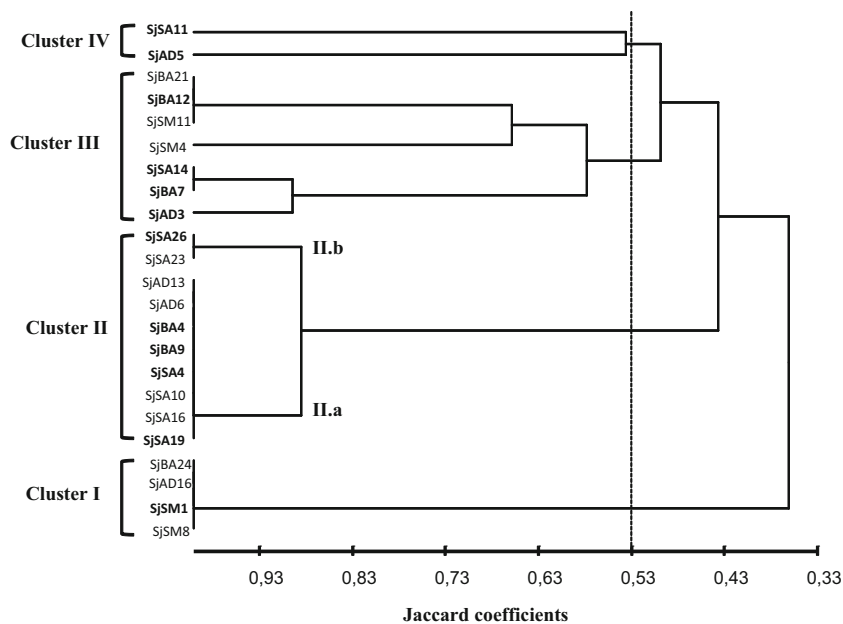
3.3 Phenotypic characterization and numerical taxonomy

All *S. junceum* strains streaked on YEMA plates produced circular colonies ($\varnothing < 2$ mm), cream, less gummy, slightly convex, translucent and non mucoid after 5 to 7 days growth at 28 °C. They were motile, non-spore-forming, Gram-negative rod-shaped. The change in colour of the green to blue YEMA-BTB medium pH indicator reflects the strong ability of strains to produce alkalis. The mean generation times of strains were longer (8.4 to 22.2 h), which makes it possible to identify them as slow-growing rhizobia. These characteristics are typical of bacteria in the genus *Bradyrhizobium* (Jordan 1982; Elkan 1992; Odee et al. 1997).

All strains used glucose, fructose, mannitol, glycerol, sorbitol, citric acid, fumaric acid and malic acid as carbon and energy source; tryptophan, glutamate, proline as nitrogen and carbon source; however none of them were able to assimilate starch. They produced oxidase and catalase and were resistant to kanamycin. The optimal growth was between 25 and 30 °C at neutral pH (6 and 7), but their growth was completely inhibited at 45 and 50 °C, at pH 4 and 10, and at concentrations under 1.5% of NaCl.

Numerical taxonomic analysis based on the 52 variable features among the 79 tested (Table S1) revealed 4 distinctive clusters at a Jaccard similarity coefficient level of 0.53 (Fig. 1). The first cluster consisted of four strains (SjsAD16, SjsBA24, SjsSM1 and SjsSM8) that displayed 100% similarity. They grow between pH 6 and 7, at temperatures between 20 and 30 °C, but not at 35 °C and were able to grow with NaCl

Fig. 1 UPGMA dendrogram showing the similarities based on phenotypic tests results between *Spartium junceum* strains in northeastern Algeria



concentrations up to 1.5%. All strains reduced nitrate, but they have no urease and β -galactosidase. They were resistant to bacitracin, doxycylin, lincomycin, neomycin, oxacillin, penicillin, spiramycin and vancomycin, but sensitive to ampicillin, cefalexin, chloramphenicol and oxytetracycline. Cluster I strains used arabinose, rhamnose, trehalose, adonitol, inositol, cellobiose, raffinose, sucrose, lactic acid, succinic acid and potassium acetate as a sole carbon source and energy. They also assimilated alanine, aspartic acid, isoleucine, serine as a unique carbon and nitrogen source. The second cluster was the largest and included 10 strains originating from 3 different localities. They grew well at temperatures between 25 and 35 °C, but not at pH 4 and pH above 7 and they were inhibited at a concentration of 0.5% NaCl. All of them were nitrate reductase negative and were unable to use sucrose, raffinose, dextrin, salicine, sorbose, rhamnose, valine, leucine, serine, histidine as sole carbon and nitrogen source. They were sensitive to doxycycline, vancomycin, penicillin, oxytetracycline, lincomycin, bacitracin and spiramycin. This cluster is subdivided into two sub-clusters “IIa” and “IIb” at a linkage distance of 0.88. Strains of sub-cluster IIa differ from those of sub-cluster IIb by the use of mannose, maltose and trehalose. The third cluster consisted of seven strains of which three strains (SjsBA21, SjsSM11 and SjsBA12) shows 100% similarity. Strains of this cluster were resistant to ampicillin, bacitracin, chloramphenicol, cefalexin, lincomycin and vancomycin, but sensitive to doxycylin, neomycin, oxytetracycline, oxacillin, penicillin and spiramycin. They grew on YEMB supplied with 1% NaCl, at pH 5–9, and were able to grow well between 20 and 30 °C, but not at 35 °C. All of them were urease, nitrate reductase and β -galactosidase positive. All the carbon and nitrogen sources tested were assimilated except cellobiose and alanine. Finally, the two strains forming cluster IV were

unable to use arabinose, inositol, adonitol and succinic acid as unique carbon and energy sources. All the amino acids tested were used by these strains as unique carbon and nitrogen sources other than glycine betaine. They were sensitive to bacitracin, doxycycline, vancomycin, penicillin, oxytetracycline, lincomycin and cefalexin, but resistant to ampicillin, oxacillin, chloramphenicol, neomycin and spiramycin. The β -galactosidase and nitrate reductase were positive but urease was negative. Growth was observed between 25 and 30 °C but not at 35 °C. They did not tolerate all NaCl concentrations tested.

An important phenotypic diversity was observed between the strains in terms of growth at a range of pH, temperature, tolerance to NaCl, utilization of sugars, amino and organic acids, and antibiotic resistance. According to Ojha et al. (2017), such differences may be associated with local environmental or edaphic conditions.

3.4 Genotypic characterization

3.4.1 PCR-RFLP analysis of 16S rDNA

Digestion of the resulting PCR products of 16S rRNA gene with *AluI*, *DdeI*, *HaeIII* and *Sau96I* yielded respectively four, seven, five and six profiles (Table 3). The combination of the restriction patterns produced 12 different RFLP profiles, revealing a high polymorphism. The strains from Sidi-Aïch were the most diverse and distributed in seven profiles, followed by those of Barbacha, Adekar and Semaoun with five, four and two distinct profiles, respectively. Profiles IV, V, VI and X were the most dominant (56.5% of strains) and were present at least in two different sites (Table 3).

Table 3 Restriction profiles of amplified 16S rRNA gene

Strains	Restriction pattern produced by:				PCR-RFLP types	Number of isolates
	<i>AluI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Sau96I</i>		
SjAD3	a	a	a	a	I	1
SjSA19	a	a	c	b	II	1
SjAD5 , SjAD16	a	b	b	b	III	2
SjSM1 , SjSM8, SjBA24	a	b	c	b	IV	3
SjSA4 , SjSA23, SjAD6	a	c	b	b	V	3
SjAD13, SjSA10, SjBA4	a	c	c	b	VI	3
SjSA11	a	c	e	f	VII	1
SjBA7	a	d	a	d	VIII	1
SjSA16, SjBA9	a	e	c	b	IX	2
SjBA12 , SjBA21, SjSM4, SjSM11	b	f	d	e	X	4
SjSA14	c	g	a	d	XI	1
SjSA26	d	d	b	c	XII	1

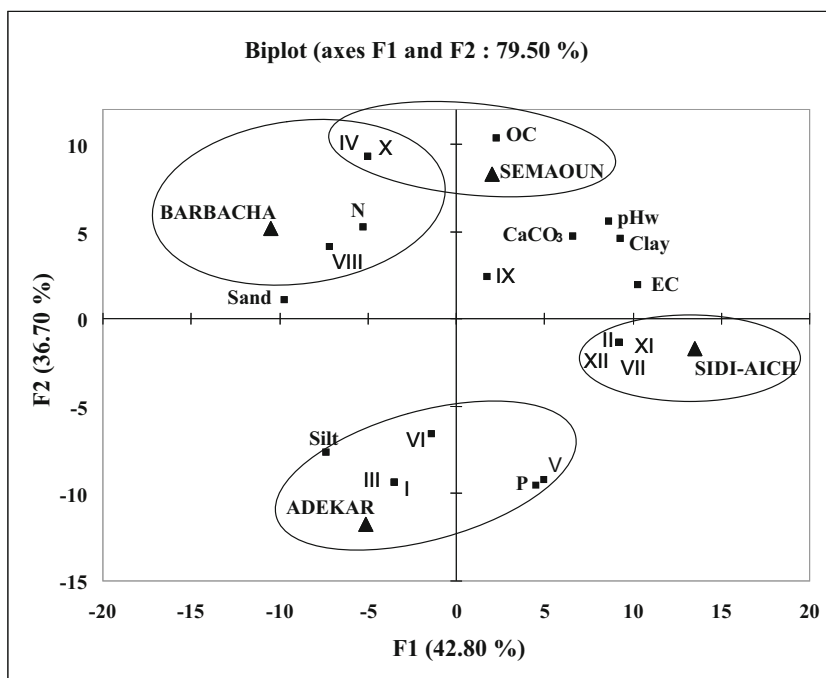
The strain indicated in bold refers to strains selected for sequence analyses of 16S rRNA in this study
 Identical patterns are designated by the same letter for each restriction enzyme
 PCR-RFLP types represent the combination of patterns (from I to XII) obtained with the four restriction enzymes

Principal Component Analysis of the PCR-RFLP genotype distribution according to the soil characteristics (Fig. 2) showed that the first two components explained 79.5% of the total variation. A close correlation was observed between the Adekar soil variables (high levels of silt and phosphorus) and profiles I, III, V and VI. Sidi-Aich soil characteristics (pHw, high levels of clay, total limestone and electric conductivity) were associated to profiles II, VII, XI and XII. Barbacha soil with the profiles IV, VIII and X and Semaoun

soil with the profiles IV and X shared the same characteristics (high organic carbon content and low phosphorus).

Our results provide evidence for a clear correlation between the genotypes of rhizobial strains and the soil characteristics. This finding is in agreement with the results of Lu et al. (2009) on the *Caragana* rhizobia communities in China; and those of Fierer and Jackson (2006) on the diversity and biogeography of soil bacterial communities in North and South America.

Fig. 2 Graph of the first 2 dimensions of principal correspondence analysis (PCA) performed on RFLP pattern (noted I to XII) abundance data in relation to soil factors (in bold and square symbols ■) in four sampling sites (triangle symbols ▲)



3.4.2 Phylogenetic analysis of rhizobial strains nodulating *Spartium junceum* L.

The representative strains of each PCR-RFLP profile were subjected to molecular characterization using sequence analysis of core (16S rDNA, *glnII*, *recA*) and symbiotic (*nodC*) genes. According to the 16S rRNA gene sequencing results and the similarity search carried out in GenBank database using BLAST program, the strains isolated from nodules of *S. junceum* L. in northeastern Algeria belong to the genus *Bradyrhizobium*. The phylogenetic tree (Supplementary Fig. S3a) constructed from 1150 bp alignment of the 16S rRNA gene sequences clearly grouped these strains into two distinct major clades, which is in agreement with previous studies (Willems et al. 2001; Kwon et al. 2005; Menna et al. 2009; Durán et al. 2014; Ojha et al. 2017; Rathi et al. 2018 and Stepkowski et al. 2018). The first clade contained only SjBA12 strain clustered at sequence similarity of 99.91% with *B. japonicum* USDA 6^T in *B. japonicum* lineage. This strain shared 99.39% sequence similarity when compared with *B. canariense* Sp-1 isolated from *S. junceum* L. in Spain (Ruiz-Díez et al. 2009). The second clade including the remaining 11 strains grouped within the *B. elkanii* lineage and shared 99.21–99.91% sequence similarity with each other and within the closest related *Bradyrhizobium* species (*B. algeriense* RST89^T, *B. macuxiense* BR 10303^T, *B. retamae* Ro19^T and *B. valentinum* LmjM3^T).

Although precise for the definition of genera, 16S rRNA gene sequence analysis in *Bradyrhizobium* strains is not sufficiently sensitive to distinguish closely related species (Haukka et al. 1996; Barrera et al. 1997; Willems et al. 2001; Rivas et al. 2009). Several other molecular markers such as housekeeping genes have been proposed with the aim of enhancing the resolving power in delineating among of some *Bradyrhizobium* species (Vinuesa et al. 2005a). In order to ascertain the phylogenetic position of our strains within the *Bradyrhizobium* genus, a phylogenetic tree was generated using two housekeeping genes (*recA* and *glnII*). Based on the sequence analysis made from individual and concatenated genes, the test strains were consistently grouped into two separate clades, I and II (Supplementary figures 3Sb, 3Sc and 3Sd). Overall, these grouping results were consistent with the relationships revealed in the 16S rRNA phylogeny of *Bradyrhizobium* previously reported. Phylogenetic tree of the concatenated two genes (*glnII* and *recA*, with a total length of 871 bp) (Supplementary Fig. 3Sd) was compared to that of the concatenated three genes (16S rDNA, *glnII* and *recA*, with a total length of 1995 bp) (Fig. 3). In both trees, the test strains were dispersed among six distinct clusters designated A to F, where the majority of the strains were clustered in the clade II. It is inferred in the tree with the concatenated sequences of three genes (Fig. 3), that the first clade was composed exclusively by the strain SjBA12 (cluster F) to which *B. japonicum*

USDA 6^T was identified as its closest phylogenetic neighbour (99.19% sequence similarity). The strains in the second clade were distributed into five distinct clusters (A to E). Strains belonging to cluster A (SjAD3, SjBA7, SjSA14 and SjSM1) shared a high sequence similarity (99.31 to 99.77%) with *B. retamae* Ro19^T, a species able to nodulate *Retama* spp. (Guerrouj et al. 2013). This species has not previously been reported to elicit nodules in *S. junceum* L. The most interesting aspect of these findings, concerns the strains of clusters B (SjAD5) and C (SjBA4, SjSA11 and SjSA19) which showed low sequence identities with the type strains of *B. retamae* Ro19^T (97.91 to 98.07%) and *B. icense* LMTR 13^T (97.60 to 98.27%) respectively. The strains belonging to clusters D (SjBA9) and E (SjSA4, SjSA26) also showed low sequence similarities, ranging from 97.03 to 97.5%, with the type strain of *B. valentinum* LmjM3^T. By applying a 98.8% sequence similarity, as a threshold value according to Ojha et al. (2017) for species delineation, the seven strains distributed in B, C, D and E clusters probably represent four novel species within *Bradyrhizobium* genus. In addition, although isolated from *S. junceum* nodules, the *recA* sequences of our strains, when compared to the only available sequences of *Bradyrhizobium* sp. (sjz1b and sjz3b) isolated in Croatia by Parker (2014), have less than 95% similarity (Fig. S3c).

Our results are in agreement with previous studies, which reported that *S. junceum* L. from different Mediterranean regions was mainly nodulated by slow growing bacteria belonging to the genus *Bradyrhizobium* (Quatrini et al. 2002; Cardinale et al. 2008; Ruiz-Díez et al. 2009; Parker 2014). In addition to *B. canariense*, Ruiz-Díez et al. (2009) reported that *Phyllobacterium myrsinacearum* was also able to nodulate this species. On the other hand, Stepkowski et al. (2018) reported that the genus *Bradyrhizobium* is the predominant rhizobium lineage nodulating Genisteeae tribe of legumes. This tribe includes *Retama raetam*, *Retama sphaerocarpa*, *Cytisus villosus*, *Lupinus micranthus* and *Calicotome spinosa* which grow in various climatic regimes in Algeria and nodulated by different species (*B. japonicum*, *B. canariense*, *B. cytisi*, *B. rifense*, *B. lupini*, *B. elkanii* and *B. algeriense*) classified in the genus *Bradyrhizobium* (Boulila et al. 2009; Ahnia et al. 2014; Bourebaba et al. 2016; Salmi et al. 2018; Ahnia et al. 2018). It is interesting that Rodríguez-Echeverría et al. (2003) reported that in the Iberian Peninsula, that six shrubby legumes (*Cytisus balansae*, *C. multiflorus*, *C. scoparius*, *C. striatus*, *Genista hystrix* and *Retama sphaerocarpa*), formed effective nodules with strains belonging to *Bradyrhizobium* genus. Chahboune et al. (2012) isolated a new species (*Bradyrhizobium rifense*) from *Cytisus villosus* in Morocco, while, Guerrouj et al. (2013) analyzed several strains of *Bradyrhizobium* isolated in Spain and Morocco from *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*, and proposed a novel symbiovar (sv. *retamae*) with a novel species named *B. retamae* sp. nov.

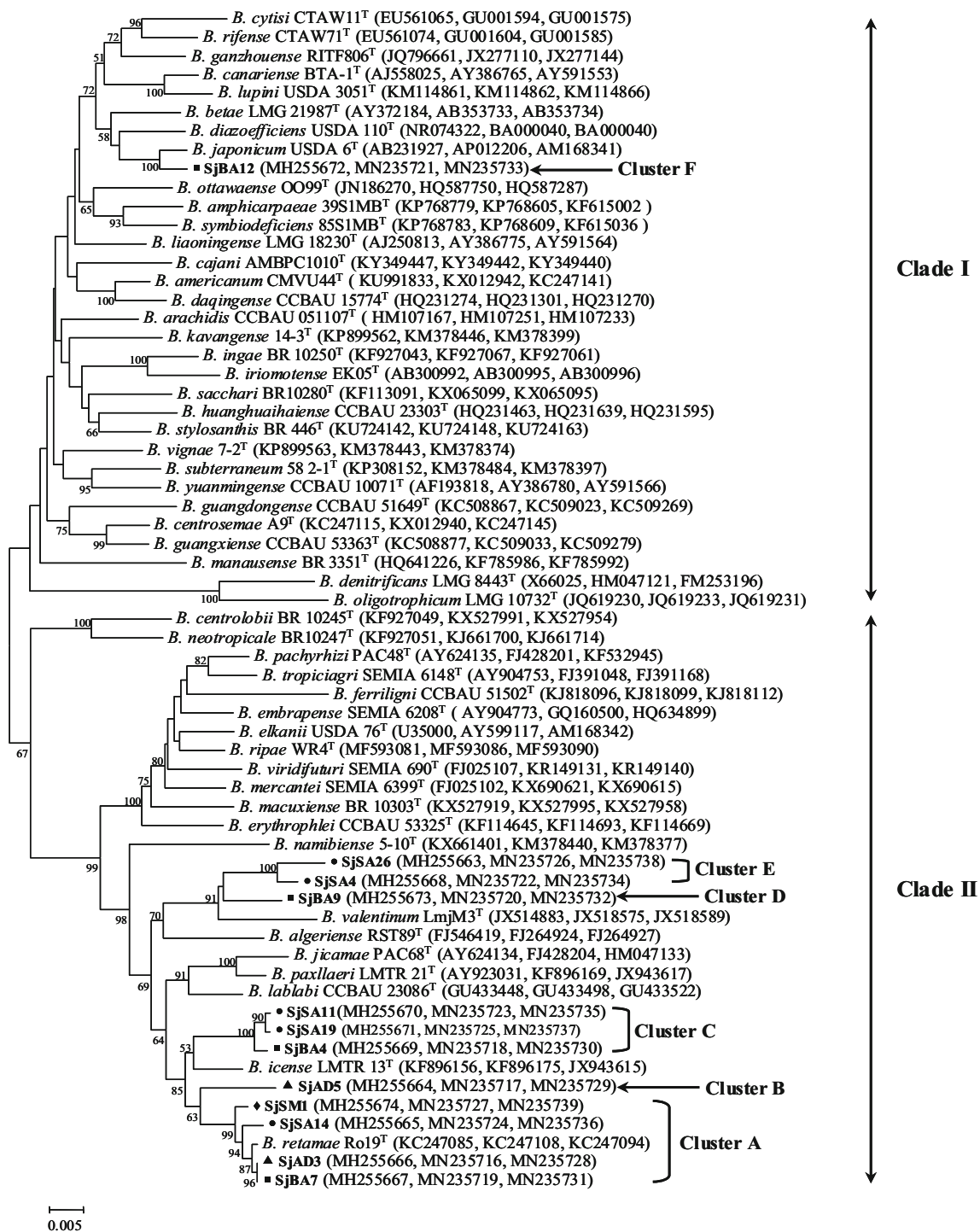


Fig. 3 Neighbour-joining tree constructed from concatenated *rrs*, *glnII* and *recA* genes to show the phylogenetic relationships between the *Spartium junceum*-*Bradyrhizobium* strains in northeastern Algeria (shown in bold) and reference/type strains (T). Numbers on branches

indicate the percentage of bootstrapped trees supporting each node (only values >50% were indicated). The bar represents 0.5% nucleotide substitution. Sampling sites: ■ Barbacha (BA), ▲ Adekar (AD), ● Sidi-Aïch and ◆ Semaoun (SM). Sj: *Spartium junceum*

Moreover, Durán et al. (2014) isolated *B. valentinum* that nodulated *Lupinus-mariae-josephae* (*Lmj*) growing in small area in Valencia region (Spain). In addition, Beukes et al. (2016) reported the presence of *B. arachidis* among

Argyrolobium rupestre symbionts growing in South Africa. In contrast, several studies have reported that different Genisteeae species such as *Teline monspessulana* (Italy, Cardinale et al. 2008), *Argyrolobium rupestre* (South

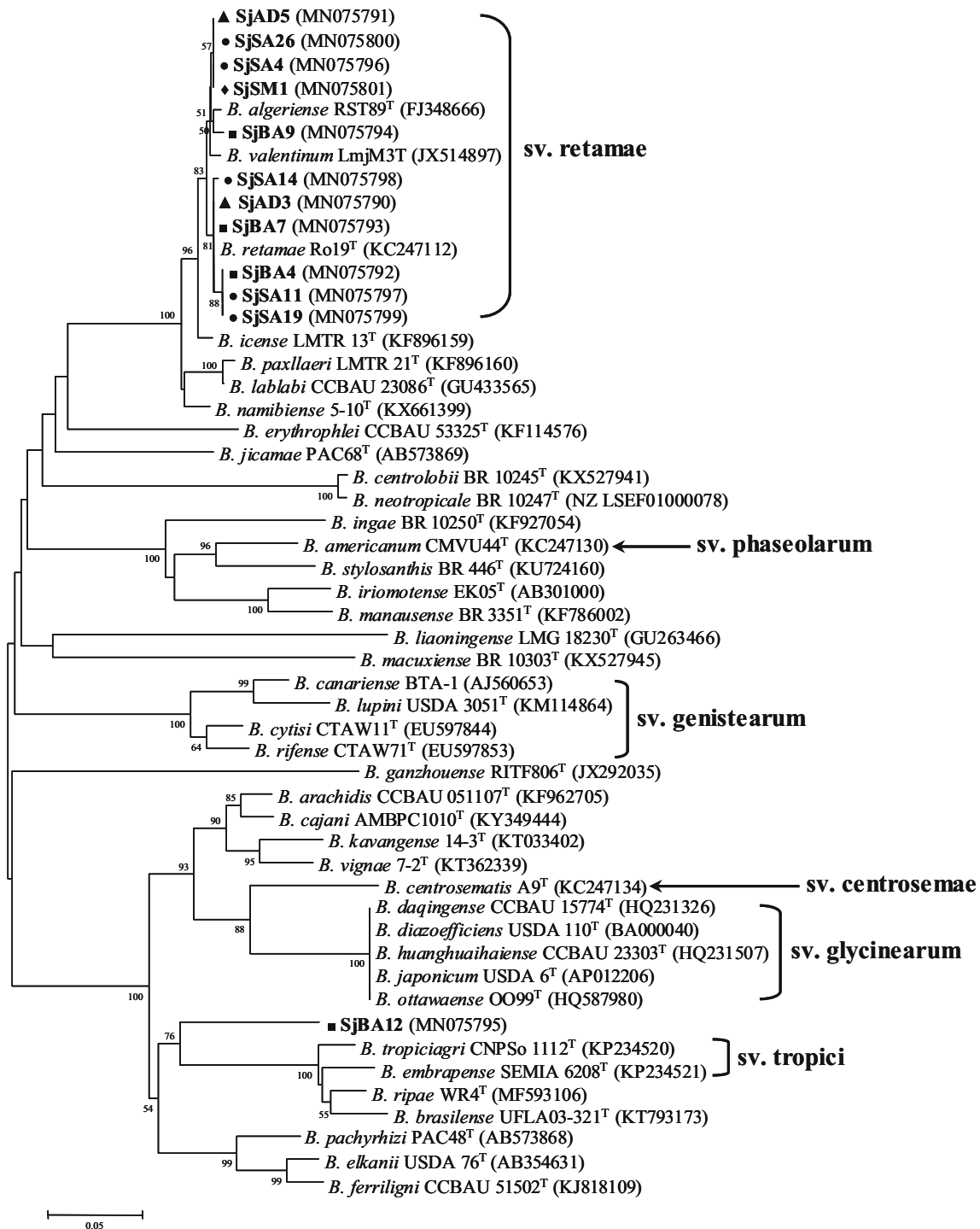


Fig. 4 Neighbour-joining phylogeny for *nodC* gene of *Spartium junceum*-*Bradyrhizobium* strains in northeastern Algeria (shown in bold) and reference/type strains (T). Numbers on branches indicate the percentage of bootstrapped trees supporting each node (only values >50%

were indicated). The bar represents 5% nucleotide substitution. Sampling sites: ■ Barbacha (BA), ▲ Adekar (AD), ● Sidi-Aïch and ◆ Semaoum (SM). Sj: *Spartium junceum*

Africa, Beukes et al. 2016) and *Genista saharae* (Algeria, Chaïch et al. 2016) were able to nodulate by *Mesorhizobium* strains. Mahdhi et al. (2008) reported the isolation of *Sinorhizobium*, *Rhizobium* and *Agrobacterium* from *Retama raetam* in arid zones in Tunisia. Other species

belonging to the genera *Ensifer* and *Neorhizobium* were able to nodulate *Genista saharae* growing in the northeast of the Algerian Sahara (Chaïch et al. 2016). Thus the situation with respect to nodulation of species in the Genisteeae tribe of legumes is complex and needs clarification.

3.4.3 Phylogeny based on symbiotic gene *nodC*

The phylogenetic tree generated from the *nodC* gene (Fig. 4) placed the majority of our strains (91.66%) within symbiovar *retamae* cluster, represented by *B. retamae* strain Ro19^T, *B. valentinum* LmjM3^T and *B. algeriense* RST89^T, nodulating respectively *Retama monosperma*, *Lupinus mariae-josephae* and *Retama sphaerocarpa*. The sequence similarity of these strains with each other, and within the closest related *Bradyrhizobium* species, was between 98.57 to 100%. The SjBA12 strain showed 81.62% sequence similarity to the *nodC* gene of the reference strains of *Bradyrhizobium* symbiovar *glycinearum*, and sequence similarities of 82.34 and 82.68% to the *nodC* gene of the reference strains of *Bradyrhizobium* symbiovar *tropicum*. These similarities values were lower than those found among various symbiovar in *Bradyrhizobium* species. This indicates the existence of a possible new symbiovar in *Bradyrhizobium* genus represented by the SjBA12 strain.

The observed discordance between the *nodC* and housekeeping genes phylogenies supports the hypothesis of multiple lateral transfers of symbiotic genes among *Bradyrhizobium* lineages (Barcellos et al. 2007; Menna and Hungria 2011). Furthermore, it has been suggested that these lateral transfer events may well have affected root-nodule evolution and rhizobial symbiotic function (Moulin et al. 2004; Vinuesa et al. 2005a, 2005b; Menna and Hungria 2011).

4 Conclusion

A collection of 23 efficient strains of *Bradyrhizobium* were isolated from *S. junceum* L. nodules thriving in the Bejaia region of Algeria. The MLSA analysis of the 12 representative 16S rDNA-RFLP genotypes showed affiliation with affiliate 33.33% of the strains to *B. retamae* and 8.33% to *B. japonicum*. The remaining 58.33% of the strains may represent four possible new genospecies. These results indicate that *Bradyrhizobium* strains nodulating *S. junceum* from various parts of the Bejaia region were genetically different and very distant from each other. Additional analyzes based on the genomic, supplemented as needed by other phenotypic tests, are required to elucidate further the taxonomic status of the newly discovered strains.

References

Ahnia H, Boulila F, Boulila A, Boucheffa B, Durán D, Bourebaba Y, Salmi A, Juan Imperial J, Ruiz-Argüeso T, Rey L (2014) *Cytisus*

- villosus* from northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. Antonie Van Leeuwenhoek 105: 1121–1129. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0173-9>
- Ahnia H, Bourebaba Y, Durán D, Boulila F, Palacios JM, Rey L, Ruiz-Argüeso T, Boulila A, Imperial J (2018) *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from northeastern Algeria. Syst Appl Microbiol 41(5):452–459. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.05.005>
- Alday JG, Santana VM, Marrs RH, Martínez-Ruiz C (2014) Shrub-induced understory vegetation changes in reclaimed mine sites. Ecol Eng 73:691–698. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.079>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215(3):403–410
- Angelini LG, Lazzeri A, Levita G, Fontanelli D, Bozzi C (2000) Ramie (*Boehmeria nivea* (L.) gaud.) and Spanish broom (*Spartium junceum* L.) fibres for composite materials: agronomical aspects, morphology and mechanical properties. Ind Crop Prod 11(2–3): 145–161
- Argaw A (2015) Iron requirement for soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] inoculated with selected exotic and native strains of *Bradyrhizobium* sp. under irrigated conditions. Arch Agron Soil Sci 61(10):1491–1509. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.1000876>
- Barboni L, Manzi A, Bellomaria B, Quinto AM (1994) Alkaloid content in four *Spartium junceum* populations as a defensive strategy against predators. Phytochemistry 37(4):1197–1200. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89557-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89557-6)
- Barcellos FG, Menna P, da Silva Batista JS, Hungria M (2007) Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. Appl Environ Microbiol 73:2635–2643. <https://doi.org/10.1128/AEM.01823-06>
- Barrera LL, Trujillo ME, Goodfellow M, García FJ, Hernández-Lucas I, Dávila G, Van Berkum P, Martínez-Romero E (1997) Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. Int J Syst Evol Microbiol 47(4):1086–1091. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1086>
- Bautista S, Mayor ÁG, Bourakhouadar J, Bellot J (2007) Plant spatial pattern predicts hillslope runoff and erosion in a semiarid Mediterranean landscape. Ecosystems 10(6):987–999. <https://doi.org/10.1007/s10021-007-9074-3>
- Beck DP, Materon LA, Afandi F (1993) Practical rhizobium-legume technology manual. Technical manual n°19. International Center for Agricultural Research in the dry areas, Aleppo, Syria
- Beukes CW, Stepkowski T, Venter SN, Clapa T, Phalane FL, le Roux MM, Steenkamp ET (2016) Crotalariaeae and Genisteae of the south African great escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. Mol Phylogenet Evol 100:206–218. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.011>
- Blumler MA (2005) Three conflated definitions of Mediterranean climates. Middle States Geogr 38(1):52–60
- Bossard CC, Randall JM, Hoshovsky MC (Eds) (2000) Invasive Plants of California's Wildlands. University of California Press, pp 306–309
- Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benallaoua S, Laguerre G (2009) *Retama* species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. Syst Appl Microbiol 32:245–255. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.01.005>
- Bourebaba Y, Durán D, Boulila F, Ahnia H, Boulila A, Temprano F, Palacios JM, Imperial J, Ruiz-Argüeso T, Rey L (2016) Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the Western Mediterranean: Algeria and Spain. Syst Appl Microbiol 39(4):266–274. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.04.006>

- Bremmen JM, Mulvaney CS (1982) Nitrogen-total. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds) *Methods of Soil Analysis*. Part 2, Soil Science Society of America, Madison, pp 595–624
- Busquets M, Calvet C, Camprubí A, Estaún V (2010) Differential effects of two species of arbuscular mycorrhiza on the growth and water relations of *Spartium junceum* and *Anthyllis cytisoides*. *Symbiosis* 52(2–3):95–101. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0097-8>
- Cardinale M, Lanza A, Bonni ML, Marsala S, Puglia AM, Quatrini P (2008) Diversity of rhizobia nodulating wild shrubs of Sicily and some neighbouring islands. *Arch Microbiol* 190(4):461–470. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0394-2>
- Cardinale M, Brusetti L, Lanza A, Orlando S, Daffonchio D, Puglia AM, Quatrini P (2010) Rehabilitation of Mediterranean anthropogenic soils using symbiotic wild legume shrubs: plant establishment and impact on the soil bacterial community structure. *Appl Soil Ecol* 46(1):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.05.007>
- Castro J, Zamora R, Hódar JA, Gómez JM (2002) Use of shrubs as nurse plants: a new technique for reforestation in Mediterranean mountains. *Restor Ecol* 10(2):297–305. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100X.2002.01022.x>
- Castro J, Zamora R, Hódar JA, Gómez JM, Gómez-Aparicio L (2004) Benefits of using shrubs as nurse plants for reforestation in Mediterranean Mountains: a 4-year study. *Restor Ecol* 12(3):352–358. <https://doi.org/10.1111/j.1061-2971.2004.0316.x>
- Chahboune R, Carro L, Peix A, Ramírez-Bahena MH, Barrijal S, Velázquez E, Bedmar EJ (2012) *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst Appl Microbiol* 35:302–305. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.06.001>
- Chaïch K, Bekki A, Bouras N, Holtz MD, Soussou S, Mauré L, Brunel B, De Lajudie P, Cleyet-Marel JC (2016) Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *Symbiosis* 71(2):111–120. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0414-y>
- Chen LS, Figueredo A, Villani H, Michajluk J, Hungria M (2002) Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biol Fertil Soils* 35:448–457. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0493-1>
- Colombo ML, Assisi F, Puppa TD et al (2010) Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. *J Pharm Sci Res* 2(7):417–425
- Durán D, Rey L, Mayo J, Zúñiga-Dávila D, Imperial J, Ruiz-Argüeso T, Martínez-Romero E, Ormeño-Orrillo E (2014) *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(6):2072–2078. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.060426-0>
- Elkan GH (1992) Taxonomy of the rhizobia. *Can J Microbiol* 38(6):446–450
- Fahraeus G (1957) The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16:374–381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>
- Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci* 103(3):626–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB (1981) *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington
- Gómez-Aparicio L (2009) The role of plant interactions in the restoration of degraded ecosystems: a meta-analysis across life-forms and ecosystems. *J Ecol* 97(6):1202–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01573.x>
- Gómez-Aparicio L, Zamora R, Gómez JM, Hódar JA, Castro J, Baraza E (2004) Applying plant facilitation to forest restoration: a meta-analysis of the use of shrubs as nurse plants. *Ecol Appl* 14(4):1128–1138. <https://doi.org/10.1890/03-5084>
- Guerrouj K, Ruíz-Díez B, Chahboune R, Ramírez-Bahena MH, Abdelmoumen H, Quiñones MA, el Idrissi MM, Velázquez E, Fernández-Pascual M, Bedmar EJ, Peix A (2013) Definition of a novel symbiovar (sv. *Retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst Appl Microbiol* 36(4):218–223. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.001>
- Haukka K, Lindström K, Young JPW (1996) Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *Syst Appl Microbiol* 19:352–359. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80062-2](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80062-2)
- Herrera MA, Salamanca CP, Barea JM (1993) Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 59(1):129–133
- Herrera-Cervera JA, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Tichy HV, Requena N, Amarger N, Martínez-Romero E, Olivares J, Sanjuan J (1999) At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol Ecol* 30(1):87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00638.x>
- Jackson LE, Burger M, Cavagnaro T (2008) Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annu Rev Plant Biol* 59:341–363. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092932>
- Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 32(1):136–139
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16(2):111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kwon SW, Park JY, Kim JS, Kang JW, Cho YH, Lim CK, Parker MA, Lee GB (2005) Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(1):263–270. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63097-0>
- Ladha JK, So RB (1994) Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *Int J Syst Bacteriol* 44(1):62–73
- Laguerre G, Allard MR, Revoy F, Amarger N (1994) Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 60(1):56–63
- Lu YL, Chen WF, Wang ET, Guan SH, Yan XR, Chen WX (2009) Genetic diversity and biogeography of rhizobia associated with *Caragana* species in three ecological regions of China. *Syst Appl Microbiol* 32(5):351–361. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.10.004>
- Mahdhi M, Nzoué A, de Lajudie P, Mars M (2008) Characterization of root-nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils. *Prog Nat Sci* 18(1):43–49. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2007.06.002>
- Menna P, Hungria M (2011) Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(12):3052–3067. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.028803-0>
- Menna P, Barcellos FG, Hungria M (2009) Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(12):2934–2950. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.009779-0>
- Moulin L, Béna G, Boivin-Masson C, Stępczowski T (2004) Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol Phylogenet Evol* 30:720–732. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00255-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00255-0)

- Odee DW, Sutherland JM, Makatiani ET, McInroy SG, Sprent JI (1997) Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant Soil* 188(1):65–75. <https://doi.org/10.1023/A:1004204413140>
- Ojha A, Tak N, Rathi S, Chouhan B, Rao RS, Barik SK, Joshi SR, Sprent JS, James EK, Gehlot HS (2017) Molecular characterization of novel *Bradyrhizobium* strains nodulating *Eriosema chinense* and *Flemingia vestita*, important unexplored native legumes of the sub-Himalayan region (Meghalaya) of India. *Syst Appl Microbiol* 40:334–344. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.06.003>
- Parker MA (2014) The spread of *Bradyrhizobium* lineages across host legume clades: from *Abarema* to *Zygia*. *Microb Ecol* 69(3):630–640. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0503-5>
- Pignatti S (1982) Flora d'Italia. Edagricole, Bologna. Trotter, A., 1941. La Ginestra. Arte della Stampa, Roma 3:61–71
- Preti F, Giadrossich F (2009) Root reinforcement and slope bioengineering stabilization by Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Hydrol Earth Syst Sci* 13(9):1713–1726
- Quatrini P, Scaglione G, Cardinale M, Caradonna F, Puglia AM (2002) *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *J Appl Microbiol* 92(1):13–21. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01485.x>
- Rathi S, Tak N, Bissa G et al (2018) Selection of *Bradyrhizobium* or *Ensifer* symbionts by the native Indian caesalpinoid legume *Chamaecrista pumila* depends on soil pH and other edaphic and climatic factors. *FEMS Microbiol Ecol* 94(11):1–34. [f1y180]. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy180>
- Richards L (1954) United States salinity laboratory staff, diagnosis and improvement of saline and alkali soils. In: Richards L. Agriculture handbook, US Department of Agriculture, USA, p60
- Rivas R, Martens M, De Lajudie P, Willems A (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 32(2):101–110. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.12.005>
- Rodríguez-Echeverría S, Pérez-Fernández MA, Vlaar S, Finan TM (2003) Analysis of the legume-rhizobia symbiosis in shrubs from central western Spain. *J Appl Microbiol* 95(6):1367–1374. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02118.x>
- Ruiz-Diez B, Fajardo S, Puertas-Mejía MA, de Felipe MDR, Fernández-Pascual M (2009) Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch Microbiol* 191(1):35–46. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0426-y>
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406–425
- Salmi A, Boulila F, Bourebaba Y, Le Roux C, Belhadi D, de Lajudie P (2018) Phylogenetic diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Calicotome spinosa* in the northeast of Algeria. *Syst Appl Microbiol* 41(5):452–459. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.05.005>
- Sanhueza C, Zalba SM (2012) Experimental control of Spanish broom (*Spartium junceum*) invading natural grasslands. *Manag Biol Invasions* 3(2):97–104. <https://doi.org/10.3391/mbi.2012.3.2.04>
- Sarita S, Sharma PK, Priefer UB, Prell J (2005) Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule strains. *FEMS Microbiol Ecol* 54:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.015>
- Sarkar D, Haldar A (2005) Physical and chemical methods in soil analysis: fundamental concepts of analytical chemistry and instrumental techniques. New Age International (P) Ltd, New Delhi
- Sarr PS, Yamakawa T, Fujimoto S, Saeki Y, Thao HTB, Myint AK (2009) Phylogenetic diversity and symbiotic effectiveness of root-nodulating bacteria associated with cowpea in the south-west area of Japan. *Microbes Environ* 24:105–112. <https://doi.org/10.1264/jisme2.ME08558>
- Scippa GS, Di Michele M, Di Iorio A, Costa A, Lasserre B, Chiatante D (2006) The response of *Spartium junceum* roots to slope: anchorage and gene factors. *Ann Bot* 97(5):857–866. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj603>
- Smibert RM, Krieg NR (1981) General characterization. In: Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB (eds) Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, pp 409–443
- Somasegaran P, Hoben JH (1994) Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. Springer-Verlag, New York
- Stępkowski T, Banasiewicz J, Granada CE, Andrews M, Passaglia LMP (2018) Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the tribe Genisteae. *Genes* (Review) 9(163):1–25. <https://doi.org/10.3390/genes9030163>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12):2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Travlos IS, Economou G, Karamanos AJ (2007) Seed germination and seedling emergence of *Spartium junceum* L. in response to heat and other pre-sowing treatments. *J Agron* 6(1):152–156
- Turner SL, Young JP (2000) The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol* 17(2):309–319. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026311>
- Valladares F, Villar-Salvador P, Domínguez S, Fernández-Pascual M, Peñuelas JL, Pugnaire FI (2002) Enhancing the early performance of the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.: fertilisation versus *Rhizobium* inoculation. *Plant Soil* 240:253–262. <https://doi.org/10.1023/a:1015752320773>
- Vincent JM (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook n°15. Blackwells Scientific Publications, Oxford
- Vinuesa P, Silva C, Werner D, Martínez-Romero E (2005a) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol Phylogenet Evol* 34:29–54. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.08.020>
- Vinuesa P, León-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Pérez-Galdona R, Werner D, Martínez-Romero E (2005b) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acidtolerant 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* 55:569–575. <https://doi.org/10.1099/ijso.0.63292-0>
- Willems A, Coopman R, Gillis M (2001) Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(1):111–117. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-111>
- Wilson K (1997) Preparation of genomic DNA from Bacteria. In: Ausubel FM et al (eds) Current protocols in molecular biology. Wiley, New York. 2.4, pp 1–5
- Yelton MM, Yang SS, Edie SA, Lim ST (1983) Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J Gen Microbiol* 129(5):1537–1547
- Zhang YF, Wang ET, Tian CF, Wang FQ, Han LL, Chen WF, Chen WX (2008) *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS Microbiol Lett* 285:146–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01169.x>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

RÉSUMÉ

Vingt-trois souches bactériennes ont été isolées à partir de nodules racinaires de *Spartium junceum* (L.), poussant à l'état sauvage dans quatre sites géographiques différents de la région de Béjaïa (Nord-est d'Algérie). Pour clarifier leur position taxonomique et phylogénétique, les souches ont été analysées par une approche polyphasique combinant une caractérisation symbiotique (nodulation, efficacité), des techniques phénotypiques (morphologie, biochimie et physiologie, appuyée par une taxonomie numérique) et des techniques génotypiques (PCR/RFLP de l'ADNr 16S, séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, de deux gènes de ménage codant pour les protéines *glnII* et *recA* et d'un gène symbiotique, *nodC*).

Les tests d'infection des plantes ont révélé que toutes les souches étaient capables de former des nodules sur leur plante hôte d'origine, mais avec une capacité de nodulation et une efficacité symbiotique variables. Toutes les souches sont des rhizobia à croissance lente produisant des alcalis dans le milieu YEMA. Selon les résultats des tests phénotypiques, les souches ont été groupées en quatre principaux clusters dans un dendrogramme UPGMA, alors qu'elles ont été discriminées en 12 génotypes distincts par comparaison de leur profil PCR/RFLP de l'ADNr 16S. Les analyses phylogénétiques du gène codant l'ARNr 16S et de deux gènes de ménage concaténés, *glnII* et *recA*, ont réparti les souches représentatives en deux clades majeurs au sein du genre *Bradyrhizobium*. Certaines de ces souches sont étroitement apparentées à *B. retamae* et *B. japonicum*, tandis que d'autres pourraient former de nouvelles espèces génomiques.

Sur la base de l'analyse de la séquence du gène symbiotique (*nodC*), la majorité des souches a été placée dans le cluster symbiovar *retamae* à l'exception de la souche SjBA12 qui pourrait constituer un nouveau symbiovar au sein du genre *Bradyrhizobium*.

Mots clés : *Spartium junceum* (L.), *Bradyrhizobium* sp., Caractérisation Symbiotique et Phénotypique, PCR/RFLP, Phylogénie (ADNr 16S, *glnII*, *recA*, *nodC*).

ABSTRACT

Twenty-three bacterial strains were isolated from root nodules of *Spartium junceum* (L.), growing wild in four distinct geographic locations in Bejaia region (Northeastern Algeria). To clarify their taxonomic and phylogenetic position, the strains were analyzed using a polyphasic approach combining symbiotic characterization (nodulation, effectiveness), phenotypic techniques (morphology, biochemistry and physiology, supported by numerical taxonomy) and genotypic techniques (PCR/RFLP of 16S rDNA, sequencing of the 16S *rRNA* gene, two housekeeping genes, *glnII* and *recA*, and a symbiotic *nodC* gene).

Plant infection tests revealed that all strains were able to form nodules on their original host plant, but with variable nodulation ability and symbiotic effectiveness. All strains were slow-growing, alkali-producing rhizobia in YEMA medium. According to phenotypic test results, the strains were grouped in four main clusters in a UPGMA dendrogram, while they were discriminated into 12 distinct genotypes by comparison of their 16S rDNA PCR/RFLP profile. Phylogenetic analyses of 16S *rRNA* genes and two concatenated housekeeping genes, *glnII* and *recA*, distributed the representative strains into two major clades within *Bradyrhizobium* genus. Some of these strains were closely related to *B. retamae* and *B. japonicum* whereas others could be form new genospecies.

Based on analysis of the symbiotic gene sequence (*nodC*), the majority of strains were placed in the symbiovar *retamae* cluster except for SjBA12 strain which possibly constitutes a new symbiovar within the genus *Bradyrhizobium*.

Keywords: *Spartium junceum* (L.), *Bradyrhizobium* sp., Symbiotic and Phenotypic Characterization, PCR/RFLP, Phylogeny (16S rDNA, *glnII*, *recA*, *nodC*).