

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
&
de la Recherche Scientifique
Université d'Oran « ES-SENIA »

Faculté
des Sciences

Département
de Biotechnologie

Thèse de Doctorat en Microbiologie

Présentée par :

M^{lle} MERABET Chahinez

Thème

**Diversité et rôle des rhizobia des régions salées
et arides d'Algérie**

Soutenue le ... /2007 devant la commission d'examen composée de :

Président : Mme FYAD-LAMECHE Fatima Zohra, Professeur à l'Université d'Oran
Examineur : Melle WILLEMS Anne, Professeur à l'université de Gand, Belgique
Examineur : Mr OUNANE Sidi Ahmed, Maitre de conférences, INA, Alger
Examineur : Mr BABA AHMED HAMED bey, Maitre de conférences, Université d'Oran ES-Senia
Directeurs de thèse : Mr BEKKI Abdelkader, Professeur à l'Université d'Oran
Mr de LAJUDIE Philippe, Directeur de recherches à l'IRD, France

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans les laboratoires suivants :

Au laboratoire de Biotechnologie des Interactions Plantes-Microorganismes de l'Université d'Oran, Es-Senia, Algérie

Au laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Montpellier, France

Au laboratoire de Microbiologie, Université de Gand, Belgique.

Par ce présent travail, j'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation et à son aboutissement.

Je remercie le professeur Abdelkader Bekki, Professeur à l'Université d'Es-Senia, pour avoir bien voulu être le directeur de ma thèse. Je lui suis reconnaissante pour ses conseils, ses encouragements et l'aide qu'il m'a apportée durant toutes ces années de thèse et bien avant pendant mon Magister. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée et pour l'opportunité de m'introduire dans le vaste monde de la recherche. Qu'il trouve dans cette thèse l'expression de ma profonde gratitude et respect.

Le destin réserve bien des surprises à l'être humain, et l'une des plus belles qu'il m'a faite est celle de m'avoir permis de travailler sous la direction de mon deuxième directeur de thèse le Dr Philippe de Lajudie, directeur de recherches à l'IRD, France. J'ai beaucoup appris de vous tant en sciences qu'en qualités humaines. Je vous adresse par ce travail tous mes remerciements de m'avoir encadré et dirigé pendant ces années de thèse.

Je tiens à remercier en ce lieu monsieur le directeur du LSTM le Dr Bernard Dreyfus de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa gentillesse et son aide, ainsi que toute l'équipe du LSTM, chercheurs, ingénieurs, techniciens et thésards.

Je remercie tous les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail :

Au professeur Fatima-Zohra Fyad-Lamèche, professeur à l'université d'Oran Es-Senia et qui a bien voulu présider ce jury.

Au professeur Anne Willems, professeur au laboratoire de Microbiologie de L'Université de Gand, Belgique. Je la remercie également de m'avoir accueillie pendant deux séjours au Laboratoire de Microbiologie de Gand, et au cours desquels, j'ai profité de ses conseils et de son aide pour la réalisation d'une grande partie de ce travail de thèse. Mes sincères remerciements vont également à tous les membres de son équipe : au Professeur M. Gillis, à Mme R. Coopman, au Dr M. Martens, ainsi qu'à tous les autres collègues du Fourth floor.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Sidi-Ahmed Ounane, maître de conférences à l'INA, d'Alger qui m'a fait l'honneur de bien vouloir se déplacer pour juger ce travail.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mr BABA Ahmed Hamed Bey, le chef du département de Biotechnologie pour ses conseils, son aide ses encouragements et d'avoir accepté malgré ses nombreuses taches d'examiner ce travail.

Une grande partie de ce travail de thèse a été possible grâce à une bourse de thèse de 18 mois accordée par le département de soutien et de formation (DSF) de l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement) de France et qui m'a permis de réaliser trois séjours au LSTM de Montpellier. Je remercie chaleureusement cet institut de m'avoir accordé ce financement.

Je remercie énormément Mr Miloud Aouissat, Melle Soraya Fares, Mr Madkour et toute l'équipe de l'ITELV (Institut technique d'élevage) à Saida, qui

nous ont offert une surface d'essai dans leur institut et pour toute l'aide qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de nos essais au champ.

Dédicaces

- ◆ *Je dédie ce travail en premier lieu à mes parents, qui ont toujours été présents à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Je n'aurais sûrement pas réalisé ce chemin sans votre aide constante, aujourd'hui cette thèse est là pour vous montrer que vos efforts ne furent pas vains.*
- ◆ *Je dédie ce travail à mon grand frère Sadri à sa femme Nacéra et ses deux filles Lina et Sirine.*
- ◆ *Une énorme dédicace à Hind, qui a contribué également à la réalisation de ce travail par son aide dans la rédaction et dans les tâches ménagères et à mon frère Douliem*
- ◆ *Une dédicace à toute ma famille dans tout le territoire algérien.*
- ◆ *Je dédie ce travail à tous mes collègues d'Oran qui m'ont soutenu et apporter aide, écoute et encouragements : En premier, A Leila Bouchentouf amie pour le bon et pour le pire, pour son aide morale et physique, pour ses encouragements, sa présence permanente à mes côtés, pour ses beaux yeux qui ont été les miens pour la correction de la thèse, qu' Allah te récompense autant que tu le mérites.*
- ◆ *A Inas et toute sa famille, tu me manques beaucoup chère copine.*
- ◆ *A Omar Hassaine notre ami de longue date, à Faiza Boukhatem qui m'envoie des figures pour ma thèse bien qu'elle avait les mains dans la pâte de Baklawwa (merci), à Sousou (soulef), à Faiza Boublenza la maman des deux petits chéris, à Fatima Ghazi, à Habiba et sa sœur Nadjwa, à Hocine Ameziane, Amine Borsali, Amel Guermouche, Meriem Bekki, Chahra Kassouar, Leila Stalli, notre chère Nacéra du département pour son sourire, Samia de la fac et son mari Nour-Eddine, Ghanem de la bibliothèque, à tous les enseignants, personnelles du département, techniciennes et étudiants.*
- ◆ *Je dédie cette thèse à ma copine Angèle et sa fille Noémie, pour ses conseils, son aide, sa présence à mes côtés, ses jolies phrases et toute l'amitié et la confiance qu'elle m'a accordée. Je dédie aussi ce travail à son mari Amidou et leur souhaite tout le bonheur du monde.*
- ◆ *Une dédicace pour mon amie Soraya d'Alger et ses deux enfants ainsi qu'à Nadia sa sœur et toute sa famille.*
- ◆ *A tous les amis du LSTM (ma deuxième famille de l'autre côté de la mer) qui ont rendu mes séjours à Montpellier si agréables et qui m'ont aidé à supporter l'éloignement de la famille. Je tiens à leur exprimer toute mon amitié et mon respect. A Odile et sa famille et en particulier Romain, à Gilou et ses petits, je te remercie*

pour ton grand cœur et ton aide en phylogénie. A J-C Avarre et sa douce Estelle pour leur présence si agréable à mon cœur, à Christine Leroux pour son amitié et ses bons petits plats, à Sophie et Jocelyn qui m'ont offert un toit et une famille d'accueil, pour leur gentillesse, à Marianne Jaubert, Jean-Claude Cleyet-Marel, Yves Prin, Pierre Beunard, Lucette Maure, Lucette Garcia, Brigitte Brunel, Eric Giraud, Joël Fardoux, Lionel Moulin et sa copine Delphine, Fabienne et son petit Alexandre, Cecile Rangin, Felix, Xavier, Laurie, Mouni (Mounia Khalifa), Marc Ducouso, Marc Bousot, Marc Neyra, Antoine Galiana pour son aide dans l'analyse statistique. A Clémence, Nathalie Pujet, Laure Hannibal et à Freddy (Frederic Zakhia).

- ◆ *A tous mes amis du Sénégal : Abdallah, Diégane, Ibrahima, Mansour, Samba, Fatou, Aboubakry et toute l'équipe du laboratoire de Dakar.*
- ◆ *A ma copine du Burkina Faso : La chère Kady*
- ◆ *A Younes du Maroc*
- ◆ *A Mosbah Mahdhi de Tunisie.*

M^{elle} Merabet chahinez

Résumé :

Dans le but de sélectionner des couples symbiotiques rhizobia/légumineuses effectives et adaptés aux contraintes pédoclimatiques des zones salées et arides d'Algérie, nous avons entrepris des prospections concernant les légumineuses d'intérêt présentes dans ces zones. Nous avons ainsi collecté des échantillons de sols, de nodules et de graines de *Medicago*, *Acacia*, *Retama*, *Lotus*, *Astragalus*, *Scorpiurus* et *Trigonella* dans plusieurs régions salées et arides d'Algérie. Une collection de 100 isolats bactériens ont été obtenus à partir des nodules racinaires et caractérisée par des tests phénotypiques et génotypiques. La majorité des isolats présentent une morphologie comparable à celle des rhizobia connus, mais se distinguent par leur particulière tolérance à la salinité (jusqu'à 800 mM NaCl dans YM), et leur forte mucosité. Le test de nodulation *in-vitro* en conditions contrôlées a confirmé leur infectivité et leur efficacité vis-à-vis de leurs plantes hôtes. Nous avons inclus dans notre étude 16 souches isolées de *Argyrobium uniflorum*, *Lotus creticus*, *Medicago sativa*, *Trigonella monspeliaca*, *Trigonella foenum graecum*, *Trifolium subterraneum* et *Lotus arabicus* échantillonnés dans la zone infra aride de Tunisie, au Sahel (Sénégal) et dans des sites dégradés du Liban. Un premier criblage de l'ensemble de la collection sur la base du séquençage de la zone centrale variable de 500 pb de l'ADNr 16S a permis d'affilier 88 souches à 11 groupes dans cinq genres : *Ensifer*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* et *Bradyrhizobium*. De façon singulière nous avons trouvé qu'en Algérie l'espèce *M. ciliaris* est associée à des bactéries affiliées aux genres *Ensifer*, *Rhizobium* et *Phyllobacterium*. Le séquençage de l'ADNr 16S total de représentants de chaque groupe a révélé cinq nouveaux groupes, deux dans les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* (collection d'Algérie) et trois dans le genre *Ensifer* (collection de Tunisie - Sénégal). L'originalité de ces groupes a ensuite été confirmée par d'autres approches. Ainsi l'analyse phylogénétique de plusieurs loci (MLSA) basée sur le séquençage de cinq gènes de ménage (*recA*, *atpD*, *glnA*, *thrC* et *gltA*), les tests auxanographiques et la recherche du gène *nodA*, nous permettent ainsi de proposer deux nouvelles espèces dans le genre *Ensifer* pour certaines souches originaires de Tunisie : *Ensifer maghrebium* sp. nov. pour les souches isolées de *Argyrobium uniflorum*, *Lotus creticus* et *Ensifer xericitae* sp. nov., pour les souches isolées de *Argyrobium uniflorum* et *Medicago sativa*. Un troisième groupe B de souches, toutes nodulant leur plante hôte d'origine (*Lotus arabicus*), a été rapproché à l'espèce *E. adhaerens* gvA. L'analyse des séquences par MLSA d'un quatrième groupe séparé dans *Rhizobium*, est en cours. Des microarrays dédiées aux gènes *nodA* et aux gènes de tolérance à la salinité ont été testées sur certaines souches. Nous avons par ailleurs suivi la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobia / *Medicago* le long d'un transect - gradient de salinité - dans la Sebkhah de Misserghin. Les résultats montrent que la distribution de la légumineuse est plus influencée par la salinité que son microsymbiote. Trois souches de *Ensifer medicae* et deux souches de *Ensifer meliloti* ont été sélectionnées sur la base de leur efficacité (mesure du poids sec des parties aériennes et de l'ARA) sur trois espèces de *Medicago* (*M. polymorpha* et *M. ciliaris*) en serre et deux variétés de *M. sativa* (d'Algérie et de Tunisie) en parcelles d'essai en zone semi-aride. Les couples symbiotiques les plus performants *Ensifer* / *Medicago* sont proposés en fin de cette étude.

Mots Clés : rhizobium, biodiversité, *Ensifer*, MLSA, salinité, inoculum.

Abstract :

In the purpose of selecting nitrogen-fixing rhizobia/legumes couples well adapted to saline and arid areas in Algeria, we prospected the leguminous plants of ecological and agronomical interest present in these areas. We collected samples of soils, plant seeds and root nodules of *Medicago*, *Acacia*, *Retama*, *Lotus*, *Astragalus*, *Scorpiurus* and *Trigonella* in several regions. A collection of 100 isolates were obtained from root nodules and identified by phenotypic and genotypic analyses. The majority of isolates presented morphological characteristics comparable to known rhizobia, tolerate high degree of salinity (up to 800 mM NaCl in YM medium) and were mucous. All strains were tested for nodulation with their host plant in standard tube conditions. We included in our study 16 isolates originating from *Argyrobium uniflorum*, *Lotus creticus*, *Medicago sativa*, *Trigonella monspeliaca*, *Trigonella foenum graecum*, *Trifolium subterraneum* and *Lotus arabicus* growing in the infra-arid zone of South Tunisia, in the Sahelian zone of Senegal and in degraded sites in Lebanon. A first screening of the bacterial collection, based on the 591 bp variable central part of the 16S rDNA sequencing, affiliated 88 strains to 11 groups in five genera, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* and *Bradyrhizobium*. Surprisingly, we found that *Medicago ciliaris* is, in Algeria, associated to three rhizobial species, *Ensifer*, *Rhizobium* and *Phyllobacterium*. The full length 16SrDNA sequencing of representative strains of each group revealed five new groups, two in *Rhizobium* (cluster E) and *Agrobacterium* (cluster D) among strains from Algeria, and three in *Ensifer* (clusters A, B, C) among strains of Tunisia and Senegal. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of five housekeeping gene (*recA*, *atpD*, *glnA*, *thrC* and *gltA*), auxanographic data and *nodA* gene sequencing confirmed that *Ensifer* clusters A and C, consisting of strains isolated from *Argyrobium uniflorum*, *Lotus creticus* and *Medicago sativa* in Tunisia, represent two new species, for which we propose the names *Ensifer maghrebium* sp. nov. and *Ensifer xericitae* sp. nov. respectively. A third group (cluster B) is close to *Ensifer adhaerens* gvA and nodulate their host plant of isolation, *Lotus arabicus*. MLSA of *Rhizobium* sp., (cluster E) is still in progress. We tested new microarrays designed with *nodA*- and salt tolerance- gene sequence diversity. We investigated the distribution of the two symbiotic partners rhizobia / *Medicago* across the salinity gradient along a transect in the Sebkhha of Misserghin. The results showed that the distribution of the legumes is more influenced by the salinity than their microsymbiote. We selected three *Ensifer medicae* and two *Ensifer meliloti* strains of the Algerian collection for greenhouse plant tests of their effectivity with two *Medicago* species (*M. polymorpha* and *M. ciliaris*). Their effectivity was estimated by ARA and plant aerial part dry weight measurements using statistical calculations of data. The most effective strains were tested in open field located in semi-arid zone of South-Western of Algeria, with two *Medicago sativa* varieties from Algeria and from Tunisia. We conclude on the most efficient *Ensifer/Medicago* combinations.

Key words: rhizobium, diversity, *Ensifer*, MLSA, salinity, inoculum.

Sommaire

Introduction Générale	01
1. Problématique	01
2. Solutions proposées et intérêt de la fixation biologique de l'azote	02
3. Objectifs de la thèse	06
4. Stratégie d'étude	07
Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique	
1. Synthèse Bibliographique	11
1. 1 Algérie (Géographie et Climat)	11
1. 2 L'aridité	13
1.2.1 Aridité et sécheresse : Impact sur la désertification	14
1. 2. 2 La flore des régions arides et semi-arides (place des légumineuses)	16
1. 3 La salinité : définition et conséquences sur les plantes et les microorganismes	19
1. 3. 1 Sol salé	22
1. 3. 2 Origine de la salinité	23
1. 3. 3 Effet de la salinité sur la croissance des plantes	25
1. 3. 4 Effet de la salinité sur la survie des BNL	26
1. 3. 5 Mécanismes d'osmorégulation chez les rhizobia	27
1. 4 Les légumineuses (Généralités)	30
1. 4. 1 Les légumineuses les plus répandues dans le Maghreb	31
1. 5 Les rhizobia	33
1. 5. 1 Taxonomie bactérienne polyphasique	34
1. 5. 2 Nouvelles approches taxonomiques	37
1. 5. 2. 1 MLSA (Multilocus Sequence Analysis)	38
1. 5. 2. 2 Les puces à ADN	41
1. 5. 3 Performances symbiotiques	42
1. 6 Classification actuelle des BNL	42
1.6.1 De <i>Sinorhizobium</i> à <i>Ensifer</i> : nomenclature d'un genre soumis à controverse	43
1. 7 La rhizobiologie au Maghreb	48

1. 8 L'inoculation pour l'agriculture et l'environnement	51
--	----

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2. Matériels et Méthodes	55
2. 1 Isolement des bactéries à partir de nodules	55
2. 2 Vérification de la pureté des souches	55
2. 2. 1 Vérification de la pureté des souches par repiquage et microscopie	55
2. 2. 2 Coloration de Gram	56
2. 3 Conservation des isolats	56
2. 4 Test de nodulation	56
2. 4. 1 Stérilisation des graines	57
2. 4. 2 Culture des plantes	58
2. 4. 3 Inoculation.	58
2. 5 Extraction de l'ADN génomique	58
2. 5. 1 Préparation de l'ADN génomique « à la protéinase K »	58
2. 5. 2 Extraction de l'ADN génomique par choc thermique	59
2. 5. 3 Extraction Alkaline de l'ADN (EK)	59
2. 6 Amplification par PCR	60
2. 7 Séquençage	61
2. 7. 1 Séquençage de l'ADNr 16S	61
2. 7. 2 Séquençage de l'espace intergénique ITS.	62
2. 7. 3 Séquençage des gènes de ménage	62
2. 7. 4 Séquençage du gène symbiotique <i>nodA</i>	63
2. 8 Construction phylogénétique	67
2. 9 Les hybridations ADN/ADN	68
2. 9. 1 Extraction d'ADN par la méthode de Marmur	68
2. 9. 2 Hybridations ADN-ADN en micro plaque	71
2. 10 <i>nod A</i> microarrays	73
2. 11 Tests auxanographiques	74
2. 12 Tolérance à la salinité	75
2. 12. 1 Tolérance des souches à différentes concentrations de NaCl	75
2. 12. 2 Utilisation des microarrays pour l'identification de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité chez <i>Ensifer meliloti</i>	76
2. 12. 3 Tolérance de la légumineuse à différentes concentrations de NaCl	77

2. 13 Préparation de l'inoculum et test de la tolérance des souches à la dessiccation . . .	77
2. 14 Estimation du potentiel fixateur d'azote (essais en serre)	78
2. 14. 1 Observation du phénotype des plants inoculés	79
2. 14. 2 Comparaison des poids secs des parties aériennes	79
2. 14. 3 Mesure de l'activité réductrice d'acétylène	80
2. 15 Essais d'inoculation au champ	82
Chapitre 3 : Résultats et Discussion	
3. Résultats et Discussion	83
3. 1 Diversité des rhizobia des zones salées et arides d'Algérie et de quelques pays du sud de la Méditerranée (Tunisie et Liban) et d'Afrique de l'Ouest (Sénégal)	83
3. 1. 1 Introduction	83
3. 1. 2 Prospection	84
3. 1. 3 Constitution d'une collection de souches	85
3. 1. 4 Etude de la diversité des isolats	89
3. 1. 4. 1 Caractéristiques morphologiques	89
3. 1. 4. 1. 1 Caractéristiques macroscopiques	89
3. 1. 4. 1. 2 Caractéristiques microscopiques	90
3. 1. 4. 2 Caractéristiques génotypiques	90
3. 1. 4. 2. 1 Séquençage de l'ADNr 16S	90
3. 1. 4. 2. 1. 1 Séquençage partiel de l'ADNr 16S	90
3. 1. 4. 2. 1. 2 Séquençage total de l'ADNr 16S	97
3. 1. 4. 2. 2 MLSA (Multilocus Sequence Analysis)	101
3. 1. 4. 2. 3 Séquençage de l'ITS	108
3. 1. 4. 2. 4 Hybridations ADN-ADN	108
3. 1. 4. 3 Spécificité d'hôte	109
3. 1. 4. 4 Recherche et identification des gènes de nodulation <i>nodA</i>	113
3. 1. 4. 4. 1 Séquençage du gène <i>nodA</i>	113
3. 1. 4. 4. 2 Microarrays dédiées aux gènes <i>nodA</i>	116
3. 1. 4. 5 Tests auxanographiques	117
3. 1. 5 Discussion et Conclusion	125
3. 2 Impact de la salinité sur la croissance et la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobia/ <i>Medicago</i> dans « la Sebka de Misserghin »	130
3. 2. 1 Introduction	130

3. 2. 1. 1	Présentation de la Sebkha d'Oran (localisation et origine) . . .	131
3. 2. 1. 2	Caractéristiques écologiques de la Sebkha d'Oran	132
3. 2. 1. 3	La zone d'étude « la Sebkha de Misserghin »	133
3. 2. 2	Impact de la salinité sur la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobia/ <i>Medicago</i> dans « la Sebkha de Misserghin »	134
3. 2. 2. 1	Echantillonnage	134
3. 2. 2. 2	Croissance et distribution spatiale des <i>Medicago</i> dans la zone d'étude	135
3. 2. 2. 3	Distribution spatiale des rhizobia dans la zone d'étude	138
3. 2. 3	Tolérance des rhizobia de la collection d'Algérie à la salinité	143
3. 2. 3. 1	Sur milieu YMA	143
3. 2. 3. 2	Sur milieu M9	145
3. 2. 4	Recherche de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité chez <i>Ensifer meliloti</i>	149
3. 2. 5	Conclusion	150
3. 3	Sélection d'inoculum	153
3. 3. 1	Introduction	153
3. 3. 2	Test en Serre	154
3. 3. 2. 1	Analyse du phénotype des plants inoculés	154
3. 3. 2. 2	Comparaison des poids secs des parties aériennes et mesure de l'ARA	155
3. 3. 3	Essais au champ	161
3. 3. 3. 1	Présentation de la zone d'étude	163
3. 3. 3. 2	Analyses du sol avant le semis	163
3. 3. 3. 3	Mise en place de l'essai	167
3. 3. 3. 4	Mesure du poids sec des parties aériennes des plantes inoculées	168
3. 3. 3. 5	Analyses du sol après semis et la première récolte	172
3. 3. 4	Evaluation de la survie des souches sélectionnées de <i>Ensifer meliloti</i> à la dessiccation	174
3. 3. 5	Conclusion	175
	Conclusion générale et perspectives	177
	Références Bibliographiques	182

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Normes de salinité du sol	23
Tableau 02 : Classification de bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses	45
Tableau 03 : Programmes d'amplification PCR de différents gènes étudiés	64
Tableau 04 : Amorces utilisées dans l'amplification et le séquençage des différents gènes étudiés	66
Tableau 05 : Echelle de McFarland	75
Tableau 06 : Isolats bactériens obtenus à partir de nodules récoltés <i>in natura</i> (*) ou par piégeage (**) à partir des échantillons de sols prélevés dans différentes régions salées et arides d'Algérie (2003- 2004)	87
Tableau 07 : Souches originaires de Tunisie, Liban et Sénégal de la collection LSTM incluses dans cette étude.	89
Tableau 08 : Valeurs d'hybridation ADN-ADN entre les trois genomovars de <i>E. adhaerens</i> et les représentants du cluster B.	109
Tableau 09 : Tests auxanographiques pour les groupes séparés en <i>Rhizobium</i> et <i>Ensifer</i>	121
Tableau 10 : Distribution des rhizobia et de leurs hôtes <i>M. ciliaris</i> et <i>M. polymorpha</i> le long du transect salin dans la Sebkhia de Misserghin	140
Tableau 11 : Distribution des gènes divergents ou absents dans trois réplicons	150
Tableau 12 : Effet de l'inoculation sur la croissance (hauteur des tiges, poids sec des parties aériennes et racinaires) de <i>Medicago ciliaris</i> et <i>Medicago polymorpha</i> cultivés en serre pendant 6 semaines et estimation de l'efficacité des souches par mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA).	156
Tableau 13 : Analyses granulométriques de sol	164
Tableau 14 : Composition du sol de la zone d'essai à Saida	165
Tableau 15 : Etude statistique sur l'effet de l'inoculation avec des souches de <i>E. medicae</i> (souche 1 : STM 990, souche 2 : STM 994) et une souche de <i>E. meliloti</i> (souche 3 : STM 1064) sur la croissance de deux variétés de <i>Medicago sativa</i> (cultivar d'Algérie et cultivar de Tunisie).	172

Tableau 16 : Analyses du sol des différents blocs (inoculé et témoin) après la première récolte de *Medicago sativa* 173

Liste des Figures

Figure 01: Organigramme de la stratégie d'étude	9
Figure 02 : Carte géographique de l'Algérie	12
Figure 03 : Carte mondiale des zones arides (crédit : CRU/UEA, UNEP/DEWA)	14
Figure 04 : Localisation des chotts et marais (indiqués sur la carte par un point jaune).	21
Figure 05 : Exemple de formation d'une Sebkha	22
Figure 06 : Ordre de précipitation des sels dans une eau de mer et formation d'évaporites	22
Figure 07 : Impact de l'irrigation sur la salinisation des terres agricoles	25
Figure 08 : Principaux solutés compatibles chez les rhizobia	29
Figure 09 : Métabolisme de la Glycine bétaine chez <i>E. meliloti</i> 102F34	30
Figure 10 : Arbre phylogénétique des légumineuses	32
Figure 11 : La résolution taxonomique de quelques nouvelles approches basées sur l'étude des séquences du génome entier	39
Figure 12 : Schéma montrant le degré d'homologie de séquence de six gènes de ménage entre les différentes espèces de <i>Ensifer</i> .	40
Figure 13 : Position des amorces internes du gène ARNr 16S et de l'espace intergénique ITS utilisées dans cette étude	62
Figure 14 : Mise en place de l'essai et inoculation de graines de <i>Medicago sativa</i> au champ	82

Figure 15 : Provenances des isolats (carte de l'Algérie).	86
Figure 16 : Aspect macroscopique des colonies de rhizobia après 72 heures de culture sur YMA à 28°C	90
Figure 17 : Caractéristiques microscopiques des isolats étudiés après coloration de Gram.	90
Figure 18 : Segment d'ADN codant pour l'ARNr 16S amplifié par PCR	93
Figure 19 : Dendrogramme basé sur la comparaison des séquences de la région 440-1031 du gène codant pour l'ARNr 16S, obtenu par la méthode du Neighbor-Joining et montrant la position phylogénétique de différentes souches d'Algérie	95
Figure 20 : Dendrogramme comparant les séquences partielles de l'ADNr16S (413 pb, positions 497-910) et montrant la position phylogénétique des BNL du Sénégal de Tunisie et du Liban	96
Figure 21 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S obtenu par la méthode du Neighbor-Joining, en utilisant la distance de Kimura 2	100
Figure 22 : Amplifiats des différents gènes de ménage, comparés au marqueur de taille moléculaire le Smart Ladder (M) sur gel d'Agarose	102
Figure 23 : Arbres phylogénétiques de trois gènes de ménage (<i>atpD</i> , <i>gltA</i> et <i>glnA</i>) des isolats de Tunisie et du Sénégal comparés aux espèces de référence d' <i>Ensifer</i> . Les arbres ont été construits par maximum de vraisemblance (ML). Les valeurs de bootstrap indiquées sont celles de 70 et plus issues de 100 répétitions	106
Figure 24 : Arbres phylogénétiques de deux gènes de ménage (<i>recA</i> , <i>thrC</i>) et arbre regroupant l'analyse de quatre gènes les plus congruents (<i>recA</i> , <i>thrC</i> , <i>gltA</i> , <i>glnA</i>) des isolats de Tunisie et du Sénégal comparés aux souches de référence d' <i>Ensifer</i> . Les arbres ont été construits par maximum de vraisemblance (ML). Les valeurs de bootstrap indiquées sont supérieures à 70% issues de 100 répétitions	107
Figure 25 : <i>Medicago ciliaris</i> et <i>Medicago polymorpha</i> nodulées par <i>E. medicae</i> STM 990 (30 jours après l'inoculation)	111
Figure 26 : Nodules obtenus sur <i>Lotus arabicus</i> inoculés avec <i>E. adhaerens</i> ORS 529 (20 jours après l'inoculation)	112
Figure 27 : Pseudonodules de <i>Medicago ciliaris</i> obtenus in-vitro avec <i>Agrobacterium rubi</i> STM 1001(30 jours d'inoculation)	112
Figure 28 : Arbre phylogénétique des séquences du gène <i>nodA</i> (longueur d'Alignement 587 pb) obtenu par la méthode du Neighbor-Joining, et montrant la position des représentants des groupes séparés suivant leur plante d'isolement.	115

Figure 29 : Hybridation avec des produits PCR de gène <i>nodA</i> de <i>E. meliloti</i> et <i>E. medicae</i>	117
Figure 30 : Dendrogramme montrant la position des Cluster A (<i>E. maghrebium</i>) ; Cluster B (<i>E. adhaerens</i>) et Cluster C (<i>E. xericitae</i>) d'après leur profil de métabolisme de 100 sources de carbone.	124
Figure 31 : Localisation de la Sebkhha d'Oran (A) et celle de Misserghin (B)	134
Figure 32 : Distribution de <i>Medicago ciliaris</i> et <i>Medicago polymorpha</i> le long du transect salin dans la Sebkhha de Misserghin	135
Figure 33 : Systèmes racinaires de <i>Medicago ciliaris</i> récoltés dans deux sites différents de la Sebkhha de Misserghin.	136
Figure 34 : Croissance de <i>Medicago ciliaris</i> à 25mM NaCl comparée à un témoin sans NaCl	138
Figure 35 Croissance <i>E. meliloti</i> STM 1064 sur milieu YMA avec et sans NaCl	143
Figure 36 : Pourcentage de souches tolérant différentes concentrations de NaCl sur milieu YMA.	144
Figure 37 : Cinétique de croissance de <i>E. meliloti</i> STM 1064 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.	145
Figure 38 : Cinétique de croissance de <i>E. meliloti</i> STM 1062 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.	146
Figure 39 : Cinétique de croissance de <i>E. meliloti</i> RCR 2011 (souche de référence de l'espèce) sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.	146
Figure 40 : Cinétique de croissance de <i>E. medicae</i> STM 990 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.	147
Figure 41 : Cinétique de croissance de <i>E. medicae</i> STM 1003 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl	147
Figure 42 : Cinétique de croissance de <i>E. medicae</i> STM 994 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.	148

- Figure 43 :** Effet de l'inoculation avec la souche STM 994 de *Ensifer medicae* sur la croissance de deux espèces de *Medicago* (*Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha*) en comparaison avec un témoin non inoculé 157
- Figure 44 :** Effet de l'inoculation avec une souche de *Ensifer medicae* (STM 990, STM 994) et une souche Nitragin de *Ensifer meliloti* STM 2348 sur la croissance de deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*). 157
- Figure 45 :** Effet de l'inoculation sur la croissance de *M. ciliaris* inoculé avec des souches de *E. medicae* (STM 994, STM 990, STM 1003) et *E. meliloti* (STM 1064, STM 1062, ORS 634, STM 2347, STM 2348, STM 2350, STM 2354). (a) Hauteur des tiges, b) poids sec des parties aériennes, c) Mesure de l'ARA). 159
- Figure 46 :** Effet de l'inoculation sur la croissance de *Medicago polymorpha* inoculés avec des souches de *E. medicae* (STM 994, STM 990, STM 1003) et *E. meliloti* (STM 1064, STM 1062, ORS 634, STM 2347, STM 2348, STM 2350, STM 2354). (a) Hauteur des tiges, b) poids sec des parties aériennes, c) Mesure de l'ARA). 160
- Figure 47 :** Aspect des nodules obtenus sur *Medicago polymorpha* inoculée en serre par la souche STM 1003 de *E. medicae*. 161
- Figure 48 :** Premiers résultats de la levée après 14 jours du semis 168
- Figure 49 :** *Medicago sativa* (variété d'Algérie et de Tunisie) inoculé avec la souche STM 994 de *E. medicae* 169
- Figure 50 :** Effet de l'inoculation par *E. meliloti* STM 1064 et *E. medicae* (STM 990 et STM 994) sur la croissance de deux variétés de *Medicago sativa* (Algérie et Tunisie). 170

Introduction Générale

Introduction Générale

1. Problématique:

L'Algérie, située sur la rive sud de la Méditerranée, est le deuxième pays d'Afrique par sa superficie (2 381 741 km²). La plus grande partie de son territoire (84 %) est recouverte par les sables du désert le plus grand et le plus aride au monde, le Sahara. Le reste du pays est situé dans des étages bioclimatiques variant de semi-aride à sub-humide. Les besoins alimentaires de la population algérienne, particulièrement dans les régions arides et semi-arides ne sont pas couverts par la production agricole nationale qui reste très faible comparée à la demande (CNES, 1996). Les importations de produits agro-alimentaires se sont élevées à 3,56 milliards de dollars US en 2003 et le taux de dépendance alimentaire pour les céréales seules représente 25,2 % des importations agricoles (Bedrani, 2005). Si l'Algérie a pu faire face à une partie de ses dépenses durant plusieurs décennies, et palier temporairement à ces problèmes, c'est essentiellement grâce à la richesse de son territoire en zone saharienne en ressources naturelles « le pétrole et le gaz naturel » qui représentent 96 % des exportations du pays et 58 % des recettes budgétaires. Cependant les exportations notamment celles du pétrole brut sont dépendantes de la conjoncture mondiale et limitées par les restrictions quantitatives décidées par l'OPEP.

L'Algérie se doit de réfléchir à un moyen de subsistance durable et ne plus compter que sur les recettes des exportations d'hydrocarbures soumises à quotas et épuisables à long terme.

Pour répondre aux besoins de la population croissante, il est impératif de définir une stratégie pour assurer l'indépendance alimentaire et promouvoir l'économie du pays. Le secteur le plus prometteur est sans doute celui de l'agriculture. Le pays couvre une superficie agricole totale de 8,2 millions d'hectares (FAO, 2005). Malheureusement la superficie des terres cultivables en régions arides et semi-arides diminue continuellement notamment celles destinées au pâturage. L'avancée du désert et la désertification menacent près de 32 millions d'hectares de la zone steppique suscitant ainsi l'inquiétude quant à la sécurité alimentaire de plus de 7 millions de personnes qui y vivent et dont la majorité vit de l'élevage (Garçon, 2006).

La désertification est un vrai problème du 21^{ème} siècle selon le président algérien (Le monde, 2006), elle touche près d'un tiers de la superficie des terres émergées du globe (4 milliards d'hectares), chaque année, environ 24 milliards de tonnes de sols fertiles disparaissent ([http:// www.notre-planète.info/actualités/actu_364.php](http://www.notre-planète.info/actualités/actu_364.php)), sous l'action conjuguée de facteurs climatiques et humains tels que la sécheresse prolongée, le surpâturage des zones steppiques, l'exploitation massive des sols et le déboisement incontrôlé des forêts. L'assemblée générale des Nations Unies a déclaré l'année 2006 « année internationale des déserts et de la désertification » et a voulu par cette déclaration sensibiliser l'opinion publique aux problèmes de la désertification et aider à préserver les zones arides, leurs communautés et leur diversité biologique.

En plus de la désertification et du déficit hydrique, la salinisation des sols pose un problème sérieux pour la production végétale. 500000 hectares de terres arables ne peuvent plus servir à l'agriculture en raison de leur salinisation (Garçon, 2006) et près de 300000 hectares de terres irrigables sur 1,4 millions d'hectares, inventoriées, classées et susceptibles d'être irriguées, sont menacées par le processus de salinisation en Algérie (Ghazi, 2004). Ce problème se double d'un deuxième que constitue l'exode des habitants du Sud, vers les zones côtières du Nord occupant ainsi des terres fertiles jusque-là utilisées à des fins agricoles. En 2004, 60 % de la population algérienne vivait sur une bande côtière de 1,7 % de la superficie totale du pays avec une densité de 233 habitants/Km² et ce nombre continue d'augmenter jusqu'à ce jour. Des études statistiques montrent que depuis l'indépendance, l'urbanisation effrénée et anarchique a causé la perte de 200000 hectares de terres agricoles. En conséquence, la superficie agricole utile (S.A.U.) par habitant a fortement régressé, passant de 0,82 ha en 1982 à 0,20 ha en 2004 (Ghazi, 2004). Ces données indiquent une situation inquiétante de l'agriculture du pays et de la sécurité alimentaire de son peuple.

2. Solutions proposées et intérêt de la fixation biologique de l'azote:

De nombreuses actions ont été entreprises par le gouvernement algérien depuis les années 70 en collaboration avec différents organismes du secteur agricole, urbain, hydraulique et en collaboration avec des chercheurs universitaires, pour protéger les terres arables contre la désertification, la salinisation et leur réhabilitation pour la production agro-pastorale et la reconstitution d'un couvert végétal protégeant le sol de l'érosion.

Parmi les projets en cours dans ce sens, citons celui entrepris par le secteur des forêts visant à la consolidation et l'extension du « barrage vert », sur une superficie de 3 millions

d'hectares (Forum des Nations Unies sur les forêts, 2005). Le relancement du « barrage vert » vise le développement intégré (agro-sylvo-pastoral). Il comprend la reconstitution des massifs forestiers dégradés de l'Atlas Saharien par des espèces adaptées à ces zones, et le reboisement des terres dégradées. L'échec du premier barrage vert conçu en 1979 est dû principalement au manque d'études sur les caractéristiques du sol, aux choix des espèces introduites et au manque d'un suivi rigoureux de ces plantations.

D'autres projets visent également à lutter contre le phénomène d'ensablement par les techniques de fixation des dunes et protection des parcours à l'aide d'arbres et arbustes ; la mise en place d'une infrastructure de désenclavement (ouverture et aménagement de pistes) ; la couverture sanitaire du troupeau ; la mobilisation des ressources en eau (retenues collinaires, point d'eau). La gestion des forêts, des terres agricoles et des prairies peut contribuer à réduire les émissions de dioxyde de carbone, de méthane et d'oxyde nitreux.

Dans le domaine pastoral, plusieurs tentatives ont été entreprises pour améliorer les parcours dégradés et augmenter la production fourragère. Entre 1985 et 1992, la steppe a bénéficié pour l'ensemble de ces régions de 165 projets relatifs au programme pastoral. En 1995, pour renforcer les efforts des secteurs agricoles, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique a dégagé des Programmes Nationaux Prioritaires de Recherche (P.N.R.) dans le cadre du développement des zones de parcours (Nedjraoui, 1999) par l'étude des possibilités de productivité des agro-systèmes avec mise en valeur et possibilité d'utilisation des sols salés et la gestion des ressources naturelles. La charge de coordonner et d'animer ces projets a été déléguée au Centre de Recherches Scientifiques et Techniques sur les Régions Arides (C.R.S.T.R.A.).

Néanmoins, tous ces projets, ne peuvent aboutir que par l'utilisation de plantes (ligneuses ou herbacées) adaptées aux contraintes pédoclimatiques qui prévalent dans ces régions. Les espèces endémiques et spontanées sont les meilleures candidates étant déjà adaptées aux contraintes de ces régions.

Parmi ces espèces végétales fréquentes en Algérie, les légumineuses considérées depuis longtemps comme pionnières des sols pauvres en minéraux notamment en azote grâce à leurs symbioses avec des bactéries du sol fixatrices d'azote appelées collectivement "rhizobiums" ou "Bactéries Nodulant les Légumineuses" ("BNL", Zakhia *et al.*, 2004). Cette association qui se traduit par la formation d'un organe symbiotique « le nodule » à l'intérieur duquel les rhizobia réduisent l'azote atmosphérique en ammoniacque, assimilable par la légumineuse. La légumineuse devient ainsi indépendante de la fertilisation azotée.

Cette association joue un rôle important à la fois écologique et économique. La symbiose rhizobia / légumineuses contribue à l'enrichissement des sols en azote. En effet, on estime que la fixation symbiotique de l'azote contribue à plus de 100 millions de tonnes d'azote par an (Graham, 1998). Elles peuvent jouer un rôle dans la fertilisation des régions désertiques et avoir un impact dans le contrôle du processus de désertification (Nutti et Casella, 1989). Dans de nombreux pays les légumineuses ont été utilisées pour la réhabilitation des terres dégradées (Requena *et al.*, 2001) et la revégétalisation des sites miniers après exploitation (Franco et de Faria, 1997). Outre ce rôle de maintien de la fertilité des sols, les légumineuses participent à la production de fourrage, de bois et présentent une importante source de nourriture humaine (pois, haricots, lentilles, arachide...) constituant un apport essentiel en protéines. Les légumineuses sont également utilisées dans les systèmes de rotation de culture. L'enfouissement des résidus de récolte ou des plantes entières de légumineuses riches en azote permet d'accroître la teneur en azote organique du sol. Les cultures qui succèdent aux légumineuses peuvent ainsi bénéficier de l'azote fixé et libéré progressivement par la décomposition des résidus enfouis dans le sol (Priefer *et al.*, 2001). Une culture de luzerne, utilisée comme engrais vert, peut enrichir le sol avec 50 à 100 kg d'azote/ha (Le Tacon et Obaton, 1984). L'azote issu de la fixation symbiotique est aussi beaucoup plus adapté à l'agriculture des pays en développement comparativement aux engrais chimiques azotés qui sont d'une part coûteux (il faut environ 1,5 tonne de pétrole pour la fabrication d'une tonne d'azote ammoniacal), le coût des engrais azotés ou phosphatés ayant triplé entre 1993 et 2004 en Algérie (FAO, 2005), et d'autre part polluants (Al-Sherif, 1998 ; Dixon et Wheeler, 1986 ; Sprent et Sprent, 1990) pour l'environnement et les nappes phréatiques (Papastylianou, 1990).

En Algérie, plusieurs espèces de légumineuses fourragères constituent la base de la flore des pâturages, des jachères et des prairies (Abdelguerfi *et al.*, 2000) et constituent un aliment de choix pour le cheptel en raison de leur richesse en protéines et leur bon indice d'appétibilité.

Les espèces fourragères et pastorales spontanées les plus représentées appartiennent aux genres : *Medicago*, *Scorpiurus*, *Lolium*, *Trifolium* (*repens*, *hybridum*, *subterraneum*, *fragiferum*), *Bromus*, *Lotus*, *Hedysarum*. A l'ICARDA, 24 % du germoplasme conservé est de type fourrager, dont 66 % proviennent d'Afrique du Nord et de l'Ouest de l'Asie (FAO, 1996), alors qu'au niveau mondial sur les 15 espèces fourragères les plus collectées, l'Algérie participe pour 2196 accessions soit 42 % du nombre total d'accessions (Bouzerzour *et al.*, 2002). Plusieurs espèces sont endémiques des régions salées, arides et côtières du pays dont :

les *Lotus* qui sont largement représentées autour du bassin méditerranéen. Ces espèces jouent un rôle important dans l'amélioration de la production pastorale et/ou fourragère dont l'espèce *Lotus creticus* L. qui présente également une bonne résistance au sel et peut supporter les eaux saumâtres (Foury, 1954). Le genre *Astragalus* est aussi largement représenté au niveau du bassin méditerranéen et rencontré dans différents milieux. La morphologie de certains de ses taxons (épineux) leur permet de se maintenir dans les parcours soumis au surpâturage. Le genre *Medicago*, est le plus étudié, avec plusieurs espèces fourragères qui expriment un très fort potentiel de fixation de l'azote et une très forte productivité de protéines à l'hectare (Huguet *et al.*, 1994). Certaines espèces de *Medicago* sont endémiques des régions arides et salées, leur prolifération est pourtant limitée par la désertification et la salinité des sols. Dans les années 1980, des essais d'introduction en Algérie, de cultivars de *Medicago* sélectionnés en Australie ont montré qu'il était préférable d'employer des écotypes locaux mieux adaptés aux contraintes du milieu. En effet, les cultivars introduits rencontrent d'énormes difficultés d'adaptation: faible productivité, sensibilité aux stress abiotiques et mauvaise nodulation. Yahia et Fyad-Lameche (2003) démontrent que, des écotypes algériens de *M. aculeata* et *M. ciliaris* présentent une tolérance au froid supérieure à celle de *M. polymorpha* et *M. sativa*. Ces auteurs, mettent en évidence la présence d'une teneur en protéines plus prononcée chez les écotypes originaires des régions de haute altitude et tolérants au froid comparée à ceux des régions de basse altitude et plus sensibles au froid. La sélection des cultivars adaptés aux contraintes édaphiques et climatiques des régions cibles est importante avant leur utilisation. En plus de leur intérêt en agriculture, les luzernes peuvent être utilisées pour la réhabilitation des sols dégradés et pour la lutte contre l'érosion (Prosperi *et al.*, 2006). Certaines espèces peuvent s'établir dans des sols acides. Les luzernes et autres légumineuses fourragères sont également utilisées dans les systèmes de rotation de culture (Hamadache, 2001) dans le but d'accroître la production céréalière, la diversification des ressources fourragères et la diminution des jachères en Algérie. Des tentatives d'introduction de luzernes annuelles dans un assolement blé-*Medicago* avaient pour objectifs l'amélioration de la structure et de la fertilité du sol et par conséquent une intensification de la production végétale et animale. D'autres légumineuses spontanées présentent aussi un grand intérêt écologique et pastoral. Les légumineuses arbustives du genre *Retama*, avec l'espèce *R. raetam* adaptée aux écosystèmes arides jouent un rôle important dans le maintien et la stabilité des dunes de sable, servent de nourriture pour les dromadaires et de traitement contre les rhumatismes. Les arbres du genre *Acacia* sont également très présents dans tout le territoire, grâce à leur résistance à la

sécheresse et à la salinité, ils sont d'excellents candidats pour la reforestation de ces zones (Räsänen *et al.*, 2001) en plus de leur intérêt dans la production de gomme arabique.

Malgré la diversité des légumineuses d'intérêt et surtout leurs adaptations aux contraintes locales (biotiques et abiotiques), ce patrimoine ne semble pas assez valorisé au niveau méditerranéen et surtout dans les pays du sud de la méditerranée où de nombreuses espèces spontanées risquent de disparaître sous l'action du surpâturage et en l'absence de production de semences dû à des contraintes techniques et sociales (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 2002).

Ainsi, pour la réussite de l'établissement de ces légumineuses dans les zones salées et arides et le renforcement de leur présence, il est nécessaire de sélectionner aussi bien les espèces de légumineuses adaptées que leurs micro-symbiotes. Certains auteurs (Zahran, 1999, Prierer *et al.*, 2001 ; Brigido *et al.*, 2007 ; Chimining'wa et Vessey, 2006) ont montré que les facteurs environnementaux tels que le stress hydrique, la salinité et le pH sont des facteurs limitant de la croissance et de l'activité des deux partenaires de la symbiose. Dans cet objectif, plusieurs études sur les rhizobia ont été réalisées et un bon nombre de nouvelles espèces ont été identifiées (pour une revue voir Zakhia *et al.*, 2004, N'zoué *et al.*, 2007 ; Willems, 2006), enrichissant la taxonomie actuelle qui compte plus de 56 espèces de BNL, réparties en 13 genres. Néanmoins, les études sur la diversité des rhizobia associées aux légumineuses spontanées et endémiques des régions arides et salées d'Algérie restent peu documentées (Sebbane *et al.*, 2006, Benhizia *et al.*, 2004) et c'est dans le but d'apporter plus de connaissances sur ces partenaires symbiotiques et le rôle qu'ils sont susceptibles de jouer que s'intègre notre travail.

3. Objectifs de la thèse :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la lutte contre l'extension des sols affectés par la salinité et la sécheresse en Algérie et leur valorisation pour la production végétale.

L'objectif du travail consiste en l'étude des associations rhizobia / légumineuses présentes dans ces régions et jusqu'à présent peu inventoriées, en particulier celles associées aux espèces d'intérêt fourrager ou pastoral telles que les *Medicago* et de sélectionner par la suite les meilleurs couples symbiotiques susceptibles de jouer un rôle dans la réhabilitation de ces zones, l'augmentation de la production fourragère et dans la lutte contre la désertification et l'érosion du sol.

Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire au préalable de disposer de connaissances nécessaires sur les légumineuses spontanées et endémiques de ces régions et sur la diversité des populations naturelles de rhizobia associées et dont peu de données sont disponibles.

• **Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre du projet européen BACDIVERS QLRT-2001-02097** dont le but était de développer des outils moléculaires pour explorer et exploiter la diversité des *Sinorhizobium* (*Ensifer*).

Ce projet a réuni 10 partenaires de quatre continents (**Europe** : France, Belgique, Finlande, Allemagne et Royaume Uni ; **Russie** ; **Afrique** : Algérie ; **Amérique** : USA). Le projet visait aussi à identifier par différentes approches phénotypiques et génotypiques des isolats de légumineuses des zones arides, salées et dégradées de différents pays, notamment d'Afrique et de Russie et de développer des outils moléculaires tels que la MLSA et les microarrays pour leur caractérisation. Plusieurs types de puces ont été construites au cours de ce projet, certaines dédiées à la caractérisation taxonomique, d'autres aux gènes symbiotiques, d'autres aux gènes de tolérance aux stress (salinité, sécheresse et dessiccation). Des programmes de bioinformatique ont été élaborés pour l'analyse des résultats (The arrayLIMS et EMMA2 software) et ont été mis à la disposition des partenaires du projet.

Les souches présentant des caractéristiques symbiotiques intéressantes et une bonne tolérance à la salinité ont été testées en termes d'inoculum en serre et au champ.

4. Stratégie d'étude :

Cette thèse est constituée de trois chapitres. Le premier chapitre correspond à une synthèse bibliographique ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique. Elle comporte une étude sur les zones arides et salées d'Algérie, l'influence des facteurs climatique et édaphique qui y prévalent sur la croissance et la survie des organismes et la place de la symbiose rhizobia / légumineuse dans ces écosystèmes.

Le deuxième chapitre est la présentation du matériel et méthodes utilisés dans cette étude.

Le troisième chapitre, correspond aux résultats obtenus. Ce chapitre est divisé en trois sous-chapitres :

Un premier sous-chapitre qui comporte une étude sur la diversité des rhizobia des régions salées et arides d'Algérie, certains pays du sud de la méditerranée et de l'Afrique de l'Ouest. Dans ce chapitre, nous avons recensé les légumineuses endémiques et/ou spontanées

présentes dans des régions salées au nord de l'Algérie dont certaines sont sous climat-semi-aride et d'autres régions plus au sud situées dans des zones arides, où nous avons remarqué la présence de légumineuses spontanées tels que *Acacia tortilis* et des *Medicago* et enfin nous avons isolé également des souches présentant des symbioses effectives en milieu pollué par les hydrocarbures. Nous avons identifié ces microorganismes par une approche phénotypique et moléculaire. A ces isolats d'Algérie, nous avons inclus des isolats des zones arides, dégradées et salées de Tunisie, Liban et Sénégal et isolé des légumineuses spontanées de ces régions dont le partenaire microbien était mal connu. Ces isolats formaient des groupes séparés et présentaient des caractéristiques symbiotiques intéressantes. Le deuxième sous-chapitre, est principalement une étude de l'influence de la salinité sur la croissance et la distribution des deux partenaires de la symbiose (rhizobia / *Medicago*) dans une région salée de l'ouest algérien : la Sebkha de Misserghin. La Sebkha de Misserghin a été choisie comme zone modèle d'étude pour la présence d'un gradient naturel de salinité et la présence des légumineuses notamment des *Medicago* le long de ce gradient. La question majeure était de savoir si ce gradient de salinité influençait la distribution des deux partenaires de la symbiose et comment cette dernière pouvait-elle s'établir dans une région à forte salinité ? Dans ce sous-chapitre, nous avons également étudié la tolérance de toutes les souches originaires de l'Algérie à différents degrés de salinité. La cinétique de croissance en présence de 600 et 800 mM de NaCl a été suivie pour les souches les plus tolérantes. La tolérance de deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*) a été testée en présence d'un gradient de salinité. Ces tests sont réalisés dans le but de sélectionner des partenaires symbiotiques tolérants au sel et qui peuvent être introduits dans des régions salées.

Le troisième sous-chapitre, est une étude des propriétés symbiotiques (infectivité et efficacité) de certaines souches de *Ensifer meliloti* et *E. medicae* tolérantes à la salinité et effectives au laboratoire en conditions contrôlées. Cette étude a pour objectif de sélectionner les meilleures candidates à utiliser comme inoculum. Le criblage s'est déroulé en deux étapes : la première étape en conditions contrôlées sur support inerte avec comparaison de la croissance des plants inoculés avec les témoins non inoculés. La croissance des plants a été estimée par la mesure du poids sec des parties aériennes, et la fixation de l'azote par la mesure de l'ARA. Les souches choisies en test contrôlé (en serre) ont été testées au champ et la croissance des plants témoins et inoculés estimée par mesure du poids sec des parties aériennes.

Le protocole d'étude est schématisé dans la figure (1).

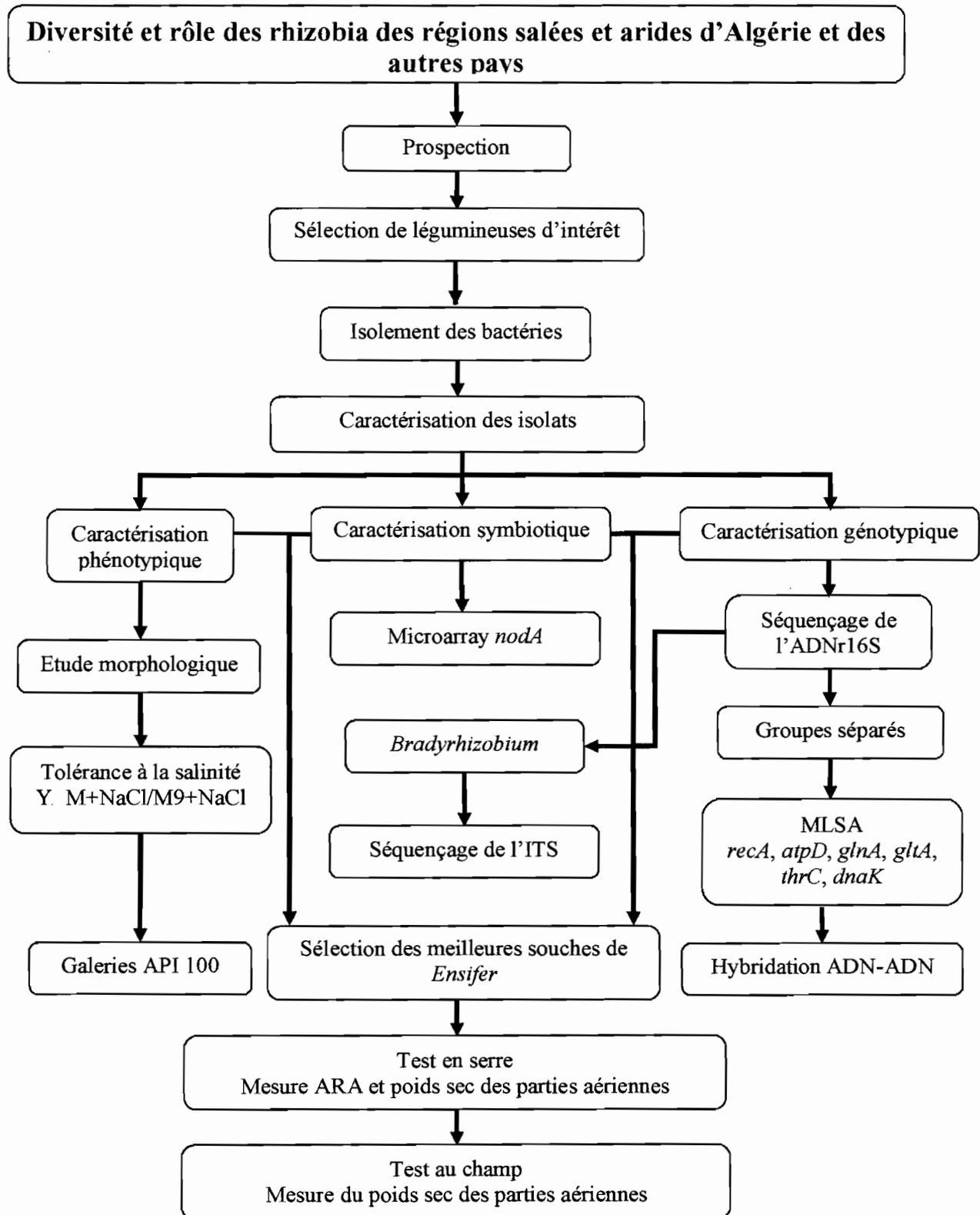


Figure 1: Organigramme de la stratégie d'étude

5. Financement

La thèse a été **cofinancée** par la Faculté des Sciences de l'Université d'Oran ES-Senia (Algérie) et l'**IRD** (Institut de Recherche pour le Développement, France) pour une durée de 18 mois, répartie en 3 séjours de 6 mois par an, dans la cadre de la politique d'aide du DSF (Département de Soutien et Formation) pour le renforcement des capacités des équipes de recherches des communautés scientifiques au Sud.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

1. Synthèse Bibliographique

1. 1 Algérie (Géographie et Climat) :

L'Algérie est située sur la côte Nord de l'Afrique et au centre du Maghreb. Sa géographie est caractérisée par la présence de deux chaînes montagneuses importantes, l'Atlas Tellien au Nord et l'Atlas Saharien au Sud (figure 2), qui séparent le pays en trois types de milieux qui se distinguent par leur relief, leur morphologie et leur écologie donnant lieu à une importante diversité biologique.

Du Nord au Sud, on distingue : le Système Tellien, les Hautes Plaines steppiques et le Sahara. Le Tell est la région du Nord, qui longe le littoral méditerranéen sur une bande de 1200 km et qui s'étend vers l'intérieur du pays entre 80 à 190 Km. Il s'agit d'une plaine étroite et discontinue avec de nombreuses vallées où se trouve la plus grande partie des terres cultivables de l'Algérie. Son climat est méditerranéen avec des hivers doux et pluvieux et des étés chauds et secs. C'est la région la plus humide d'Algérie. Les chutes de pluie annuelles sont de l'ordre de 400 mm à 1000 mm et les températures moyennes avoisinent 10°C en janvier et 27°C en juillet. En été, les vents chauds et secs venant du Sahara intensifient la sécheresse et endommagent parfois les récoltes. Ces vents portent le nom de Sirocco (Connu localement comme le Chehili).

La longue et large dépression dite des Hauts Plateaux qui s'étend entre l'Atlas Tellien et l'Atlas Saharien à 1100 m d'altitude est le domaine des régions semi-arides. Son profil en cuvette explique la présence de nombreux lacs salés (chotts) collectant les eaux de surface. Plus on descend vers le Sud, plus le climat devient sec : les précipitations annuelles dans les hauts Plateaux et l'Atlas Saharien ne dépassent pas 200 à 400 mm, les températures moyennes avoisinent les + 5°C voire -7°C en hiver et les chutes de neige y sont fréquentes. La température estivale varie de 30 à 38°C. La vocation de cette zone est essentiellement pastorale.

Au Sud de l'Atlas Saharien s'étend l'immense désert du Sahara qui couvre 80 % de la superficie de l'Algérie. Le Sahara se compose pour une grande part de plateaux rocheux (les regs) et de plaines caillouteuses. Deux vastes régions de sable (les Ergs) : le Grand Erg occidental et le Grand Erg oriental, constituent les principaux ensembles de reliefs dunaires du désert Saharien. Au Sud du désert, on trouve des massifs volcaniques fortement érodés.

Dans le Hoggar, le mont Tahat culmine à 2918 mètres. Le Sahara est une région ventée et très aride, où les amplitudes thermiques sont souvent considérables : les températures, pouvant atteindre plus de 45°C le jour et moins de 10°C la nuit, s'expliquent par l'absence totale d'une humidité capable d'en atténuer les contrastes. La hauteur des pluies annuelles est inférieure à 130 mm dans l'ensemble du désert Algérien. (<http://www.bahdja.free.fr/geo/geographie.html>)

Les zones arides et semi-arides représentent donc environ 90 % de la superficie de l'Algérie. Dans ces régions l'aridité et la salinité sont les principales contraintes pour la production agricole et ont des répercussions considérables sur l'économie du pays.

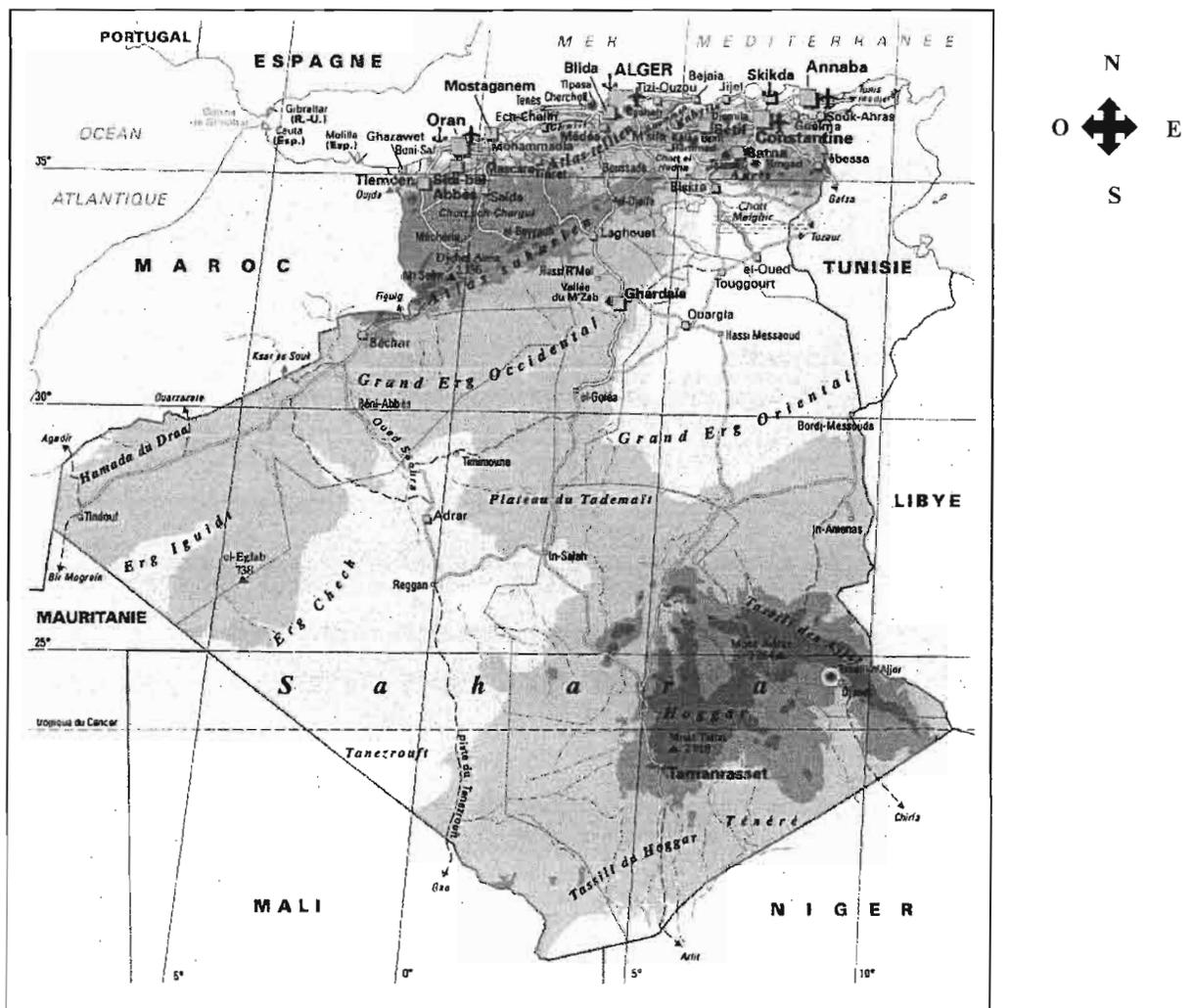


Figure 2 : Carte géographique de l'Algérie

1. 2 L'aridité :

Des régions arides existent dans tous les continents et représentent 33 % de la superficie émergée de la terre (figure 3). Elles occupent une proportion importante des surfaces de certains continents : 57 % de l'Afrique, 69 % de l'Australie et 84 % de la région du Moyen-Orient.

Les régions arides, semi-arides et subhumides sèches, sont caractérisées par des écosystèmes extrêmement fragiles, à sols pauvres et à faible productivité. Une exploitation non rationnelle des terres arides conduit à la dégradation de la couverture végétale et l'exposition des sols à l'érosion éolienne et hydrique. L'érosion hydrique affecte 28 % des terres de l'Algérie du Nord et près de 600000 hectares de terres en zone steppique sont totalement désertifiées sans possibilité de remontée biologique suite à l'érosion éolienne. L'érosion se manifeste par la formation de rigoles et de ravines sur tout le versant avec affleurement de la roche mère et une évolution en bad-lands (qui sont des terrains argileux ravinés par le ruissellement torrentiel) (Hadjiat, 1997). Dans ces régions, les changements climatiques deviennent de plus en plus contraignants pour la croissance et le développement des plantes (Higazy *et al.*, 1995). La sécheresse observée depuis longtemps a conduit au processus de salinisation des sols. Sous ces conditions, la physiologie des plantes est perturbée (Gupta et Abrol, 1990). Certaines espèces spontanées ont disparu, d'autres sont menacées de disparition (halophytes incluses) (Chamard, 1993) et de chute de rendement (Yeo *et al.*, 1991 ; Chevery et Robert, 1993).

Pour mieux comprendre les mécanismes climatiques et édaphiques présents dans les régions arides, il est important de définir au préalable ce qu'est l'aridité.

L'aridité se définit en regard de la faiblesse des précipitations moyennes annuelles et par le fort déficit de celles-ci par rapport à l'évapotranspiration potentielle (ETP). C'est un concept climatique à référence spatiale (zone aride), l'aridité ne doit pas être confondue avec la sécheresse, concept météorologique à référence temporelle. L'extension de l'aridité est déterminée par la persistance de températures élevées favorisant l'apparition de sécheresses qui bloquent les cycles et le développement de la végétation, par la présence d'anticyclones étendus et durables, l'éloignement des sources d'humidité océaniques et l'effet d'abri derrière des barrières montagneuses.

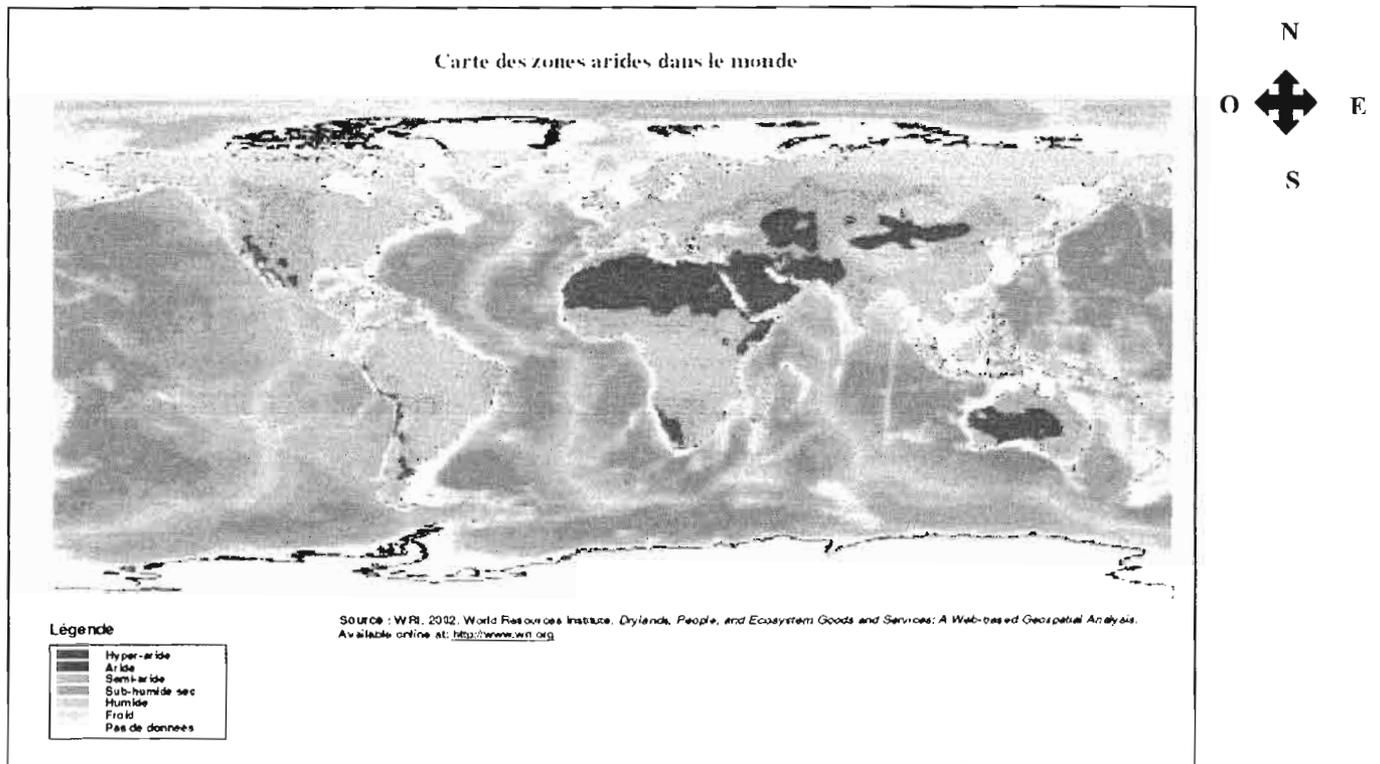


Figure 3 : Carte mondiale des zones arides

Source : WRI, 2002. World Resources Institute. *Drylands, People, and Ecosystem Goods and Services: A Web-based Geospatial Analysis*. Available online at: <http://www.wri.org>

1.2.1 Aridité et sécheresse : Impact sur la désertification

L'aridité impose un risque potentiel mais permanent de salinisation des sols irrigués, de dégradation des sols et d'érosion éolienne détruisant les couches fertiles du sol. La sécheresse persistante est un risque limité dans le temps mais agit sur l'ensemble du milieu puisque son impact se transmet de la pluie (sécheresse climatique) au sol (sécheresse édaphique), aux produits de la terre (sécheresse agricole) et aux nappes aquifères (sécheresse hydrologique) (Rognon, 1996). Un des principaux impacts négatifs de l'aridité et de la sécheresse sur l'environnement est sa désertification. Le terme « désertification » est apparu entre 1920 et 1930 souvent associé à l'avancée du désert et aux dunes de sable envahissant lentement des régions fertiles. Cette vision populaire de la désertification a perdu tout fondement dans les milieux scientifiques : les grands déserts de notre planète sont en fait des écosystèmes naturels dont les limites peuvent avancer ou reculer d'une manière ou d'une autre.

Selon la CDD (Convention des Nations Unies sur la lutte contre la désertification), la désertification est définie actuellement comme la dégradation des terres dans les zones arides, semi-arides et subhumides sèches suite à divers facteurs, parmi lesquels les variations

climatiques et les activités humaines (UNCCD, 1995). Elle ne concerne donc pas les terres qui sont déjà désertiques, mais des terres productives fragiles qui reçoivent 100 à 1000 mm de précipitations annuelles et qu'une utilisation non viable peut endommager ou anéantir (Freddy Nachtergaele, expert de la FAO).

Les facteurs climatiques et leurs variations sont un des moteurs de la désertification (Hillel et Rosenzweig, 2002). Selon la convention cadre des Nations Unies, les changements climatiques sont attribués directement ou indirectement à une activité humaine altérant la composition de l'atmosphère mondiale qui vient s'ajouter à la variabilité naturelle du climat observé au cours de périodes comparables. Des activités telles que l'utilisation des combustibles fossiles, la destruction des forêts qui absorbent le dioxyde de carbone, le changement d'exploitation des terres et les activités agricoles participent à l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre (GES). Dans quelques décennies à un siècle ou plus, le réchauffement planétaire global serait la principale conséquence de cette concentration de GES avec une hausse de la température moyenne globale de surface de 1,3 à 3°C (Djimingué, 1998).

Parmi les activités humaines liées à l'agriculture qui participent au processus de désertification : le surpâturage qui détruit le couvert végétal protégeant les sols. En 1968, les parcours steppiques algériens avec 1,6 milliards d'UF (unité fourragère) (Chellig, 1969) nourrissaient 7890 10^3 équivalents ovins, ce qui donnait une charge de 1,9 ha/ eq. ovin. En 1996, le cheptel équivalait à 19170 10^3 eq. ovin et la charge réelle des 15 millions d'hectares correspondrait à 0,78 ha/eq.ovins. Les différentes études (Aïdoud, 1989 ; Kacimi, 1996) ont montré que les parcours se sont fortement dégradés et que la production fourragère est équivalente à environ 1/3 de ce qu'elle était en 1968. La charge pastorale potentielle serait d'environ 8 ha/eq. ovin et donc dix fois supérieure à la charge réelle des parcours. Ce qui donne lieu à un surpâturage intense causant des dégâts sur les aires pâturées prélevant ainsi une quantité de végétation largement supérieure à la production annuelle. De nombreuses ressources génétiques précieuses d'origines méditerranéennes sont ainsi menacées de disparition à court terme à cause du surpâturage, du labour et de l'artificialisation du milieu de l'Afrique du Nord (Abdelguerfi et Laouar, 1999, Abdelguerfi et Laouar, 2002), ceci est d'autant plus grave que beaucoup de taxons sont endémiques du Sud de la méditerranée.

L'Europe n'est pas exclue de la liste des zones à risque de désertification, notamment dans les régions méditerranéennes du Sud (Garcia Latorre *et al.*, 2001 ; Yassoglou, 2000). La Banque Mondiale estime qu'au niveau planétaire, le manque à gagner des régions affectées

par la désertification pourrait s'élever à 42 milliards de dollars américains, alors que le coût annuel de la lutte contre la désertification atteint seulement 2,4 milliards (UNCCD, 1995).

L'Algérie est au cœur de la désertification avec plus des 4/5 de son territoire en zones semi-arides et arides. Le pays a instauré la date du 17 juin comme journée de lutte contre la désertification, et a institué une commission appelée Organe National de Coordination (ONC) à composantes interdisciplinaire et multisectorielle auprès du ministère de l'Agriculture, dont les missions sont d'évaluer et examiner les différentes causes ayant provoqué la désertification, de contribuer à l'élaboration d'une politique de lutte intégrée contre ce phénomène, d'évaluer le programme d'action à court et moyen termes dans la mise en œuvre de cette politique, de suivre les programmes de sensibilisation et de vulgarisation (FOSA, 2000).

Dans sa lutte contre ce fléau, beaucoup de projets sont initiés dans le domaine de l'agroforesterie et de la sylviculture, avec notamment des programmes de reboisements. La gestion des forêts, des terres agricoles et des prairies peut contribuer à réduire les émissions de dioxyde de carbone, de méthane et d'oxyde nitreux. Ces actions doivent être appuyées par les recherches et l'exploitation de ressources végétales endémiques et spontanées adaptées aux contraintes pédoclimatiques de ces régions. Plusieurs organismes et instituts de recherches scientifiques (USTHB, INRAA, INA, INRF, ANRH) et techniques (DGF, HCDS, ANAT, ABHS, ANN, ITDAS) contribuent par des études sur divers aspects de la désertification, de ces causes directes et indirectes et les moyens de lutte.

1. 2. 2 La flore des régions arides et semi-arides (place des légumineuses) :

Les régions arides et semi-arides sont généralement dotées d'une flore résistante à la sécheresse et à la présence de sel. Certaines de ces plantes ont développé une capacité de stockage de l'eau dans leurs feuilles, leurs racines et leurs tiges. D'autres ont des racines pivotantes qui atteignent les nappes phréatiques, préservent l'intégrité du sol et entravent l'érosion. Les tiges et les feuilles de certaines plantes ralentissent par leur surface la vitesse des vents chargés de sables et protègent le sol contre l'érosion (<http://www.unesco.org/water/news/newletter/archives>).

Dans les milieux arides de l'Afrique du Nord, les espèces pastorales ainsi que leur cortège floristique, sont de plus en plus menacées d'érosion génétique. La végétation des steppes halophytes (*Atriplex* ssp., *Salsola* ssp., *Traganum* ssp., *Arthrocnemum* ssp.) est relativement plus épargnée. Le surpâturage restreint les surfaces couvertes par les meilleures espèces pastorales telles que *Cenchrus ciliaris*, *Tricholoena tenerifae*, *Tetrapogon villosus*,

Medicago sativa ssp. *tuneta* qui se trouvent cantonnées dans les sites refuge à l'état de reliques (Boussaid *et al.*, 1998). Deux légumineuses pastorales *Hedysarum humile* et *Hedysarum flexuosum* ne subsistent plus au Maroc et en Algérie que sous forme de populations isolées, alors qu'elles ont disparu en Tunisie (Ben Fadhel *et al.*, 1997).

Le maintien, *in situ*, des taxons pastoraux steppiques est précaire (Dupuy, 1986 ; Le Houérou, 1980). Le surpâturage ramène les pérennes au niveau du sol et empêche la floraison et la fructification des annuelles palatables. Celles-ci sont progressivement remplacées par des commensales sans grande valeur nutritive. Le défrichement (cas de steppe à *Stipa tenacissima*) transforme la physionomie des parcours et expose les sols à l'érosion hydrique et éolienne. L'irrégularité et l'insuffisance pluviométrique, associées aux pressions anthropiques, contribuent largement à réduire le niveau de la diversité floristique. Néanmoins, en Algérie la liste des espèces pastorales locales présentant de remarquables capacités d'adaptation aux facteurs du milieu aride est longue à énumérer. De nombreuses pérennes et annuelles, considérées comme de bonnes espèces pastorales subsistent encore et peuvent constituer en tant que telles ou après amélioration de très bonnes candidates dans le repeuplement de certains parcours dégradés.

Le genre *Medicago* est également représenté par un grand nombre d'espèces. Les espèces pérennes sont *M. falcata* L. Lam., *M. lupulina* L., *M. sativa* subsp. *tunetana* Murb. Ce dernier taxon est bien adapté au pâturage est fréquent en Algérie orientale dans les régions d'altitude (Abdelguerfi et Laouar, 1999). Certaines populations de *M. sativa* semblent assez résistantes au sel et sont très recherchées par les agriculteurs des oasis pour leurs caractéristiques agronomiques. Certaines espèces de *Medicago* annuelles sensibles à la salinité et au déficit minéral du sol sont présentes dans des zones salées (Sebkhas) souvent associées aux plantes pérennes halophyles (Abdelly *et al.*, 1999 ; Abdelly *et al.*, 1995) et produisent 50 % de la biomasse de ces écosystèmes.

Dans la région la plus aride de l'Algérie, le Sahara, la végétation est très clairsemée. Bien que la flore apparait pauvre comparée à l'étendue du désert, le nombre de genres présents est relativement élevé car il est fréquent qu'un genre soit représenté par une seule espèce. L'endémisme y est élevé du fait des vastes espaces impropres à la vie : pour le Sahara septentrional, on dénombre 162 espèces endémiques (Quezel, 1978). Selon Ozenda (1977), le mode d'adaptation à la sécheresse des plantes sahariennes permet de différencier deux types de plantes: les achebs (plantes éphémères) qui apparaissent après la période des pluies et effectuent tout leur cycle végétatif avant le dessèchement du sol. Les plantes permanentes ou vivaces présentant des caractéristiques d'adaptation (morphologique, anatomique). Ce type de

végétation constamment présent est moins sujet aux variations saisonnières et constitue les seuls parcours camelins toujours disponibles, même en été (Chehma, 1987).

Une étude floristique spatio-temporelle du Sud-Est algérien dans différents types de parcours (ergs, regs, hamadas, lits d'oueds, dépressions et sols salés) a permis de recenser 74 espèces végétales spontanées appartenant à 28 familles, comprenant 30 vivaces et 44 éphémères avec une présence plus riche en espèces et familles dans les lits d'oueds comparés aux sols salés qui sont les plus pauvres en végétation (Chehma *et al.*, 2005). La seule famille de légumineuse trouvée est celle des Fabacées. Elle est représentée essentiellement par les espèces suivantes : *Acacia raddiana*, *Astragalus akkensis*, *Astragalus gombo*, *Genista saharae*, *Neurada procumbens*, *Ononis angustissima*, *Retama raetam*, avec dominance de cette dernière espèce dans les lits d'oueds avec une fréquence de recouvrement de 60 % et classée à l'échelle 4 de dominance et d'abondance de Braun-Blanquet (1951) (Chehma *et al.*, 2005). Les arbustes *Retama raetam* jouent un rôle important dans la stabilisation des dunes, empêchant ainsi l'avancée des sables du désert vers les terres agricoles. Quant aux dépressions salées, elles ne sont peuplées que par des plantes vivaces, principalement des Tamaricacées et Zygophyllacées.

- *Sur quelle base peut-on choisir les bonnes candidates végétales pour une culture ou une revégétalisation des zones arides et salées ?*

La classification éco-climatique proposée par Le Houérou (1989) offre un cadre utile aux choix des espèces à cultiver ou à planter dans les travaux de reboisement ou de régénération des pâturages, ou en arboriculture fruitière dans les zones semi-arides et arides. Cette classification basée sur l'indice de xéricité (P/EPRG : pluviosité/demande évaporative) et m (moyenne des températures minimales journalières du mois le plus froid) permet de déterminer les différentes zones éco-climatiques avec le nombre de jour de sécheresse et de précipitation. Ainsi, les *Acacia* sahariens ne se développent quand m est inférieur à 3°C, il en est de même des *Acacia* exotiques à phyllodes utilisés dans la fixation des dunes et les plantations sylvo-pastorales. Le re-semis des pâturages n'est possible que dans la zone de l'aride supérieur à hivers frais à froids. Les variétés de luzernes à cycle long (Sonora, Moapa, Peruvian, San Joaquin, African, Indian, Gabès, Tagiura, El Unico...) ne produisent de bons résultats que dans les variantes à hivers doux à chauds (m>5°C). Par contre, les luzernes à cycle court sont bien adaptées aux variantes à hivers frais à froids (Du puits, Omega, Gamma, Flamande,..). Les variétés intermédiaires (Provence, hunter River, W.L. 501, Demnate...) produisent les meilleurs résultats dans les variantes à hivers tempérés à doux. Plusieurs légumineuses semblent adaptées pour la production de fourrage dans les zones arides

(*Macroptilium artopurpureum*, *Medicago littoralis*, *M. scutellata*, *M. tornata*, *M. truncatula*, *Glycine wighii*, *Ornithopus compressus*, *Acacia*, *Leucaena*, *Aeschynomene*, *Albizia*, *Indigofera*...). L'installation de certaines légumineuses est facilitée par l'inoculation avec des souches de rhizobia adéquates (Nutti et Casella, 1989). Un modèle d'association légumineuses/ halophytes peut être envisagé pour la réhabilitation des zones salées et arides destinée à assurer la couverture végétale de ces régions et comme fourrage pour les ovins

1. 3 La salinité : définition et conséquences sur les plantes et les microorganismes :

Au niveau mondial, on a pu estimer à 3 hectares les terres arables perdues chaque minute du fait de la salinisation (Kovda, 1983). En l'an 2000, plus de 400 Mha de terres seraient affectées par la salinité (Bot *et al.*, 2000). Particulièrement, dans les zones arides et semi-arides où la contrainte saline s'associe souvent au déficit hydrique pour limiter la production végétale (Ben Khaled *et al.*, 2003). En Afrique, près de 40 Mha sont affectés par la salinisation, soit près de 2 % de la surface totale.

En Algérie, les zones salées sont représentées par des lacs salés portant les noms de Chotts et Sebkhass (figure 4), et par des terres agricoles salinisées suite à l'irrigation et qui représentent environ 10-15 % des terres arables (World Ressources, 1987). Les lacs salés les plus connus sont : Chotts Chergui, Zahrez, Hodna présents dans les régions steppiques semi-arides et arides des Hauts Plateaux (900-400 m d'altitude), les Chotts Mérouane et Melrhir qui se situent dans des régions sahariennes arides et hyperarides dans le point le plus bas du Sahara (-35 m d'altitude). Ces Chotts occupent des surfaces allant de 52200 à 523426 hectares. Les Sebkhass sont plus présentes dans le Nord. Au Nord Ouest on compte trois grandes Sebkhass : celle d'Arzew, de Benziane et d'Oran (celle d'Oran est présentée dans le sous-chapitre 3.2). Les deux premières font l'objet d'une exploitation minière (extraction de sel).

Plusieurs définitions sont données aux Chotts et aux Sebkhass. Selon Pouget (1971), la différence entre Chott et Sebkhass réside dans leur mode d'alimentation en eau. Les Sebkhass (figure 5) sont alimentées par les eaux de crue ; les Chotts sont alimentés à la fois par le ruissellement et par les nappes artésiennes profondes remontant en surface par des sources et/ou des suintements.

Les Sebkhass sont aussi représentées sous forme de bassins fermés dont le fond est imperméable et où s'accumulent les produits solubles et insolubles issus du bassin versant.

Elles se distinguent également des « daïa » caractérisées par la présence d'un drainage par le fond (Benziane, 1983). Les Chotts seraient donc de véritables « machines évaporatoires » (Coque, 1962). En période pluvieuse normale, hiver-printemps, une couche d'eau de quelques centimètres, saturée en sel recouvre la surface, laissant, après évaporation des dépôts de chlorure de sodium, parfois exploitables. Après de fortes pluies, les Chotts peuvent constituer de véritables lacs de plusieurs mètres de profondeur; quelques mois après, l'évaporation très forte assèche complètement la surface.

Le vent balayant cette surface desséchée et dénudée peut, dans certaines conditions, entraîner des particules argileuses et des cristaux de sels (chlorure de sodium, gypse) qui s'accumulent en bordure de la dépression. Certaines Sebkhass sont exploitées comme mines à sel. Les sels exploités sont ceux accumulés en surface suivant l'ordre de sédimentation des évaporites (figure 6), généralement le NaCl ou le KCl.

Dans une autre définition, le Chott qui est un terme arabe désignant la bordure, est donc la bordure verte de la dépression, qui comporte une végétation, alors que Sebkhass est la partie humide équivalente à lac salé et donc ne comporte pas de végétation. Si on prend en considération cette définition, le Chott inclus donc toujours une Sebkhass alors que l'inverse n'est pas vrai (http://www.algeria.strabon.org/portal/article.php3?id_article=63).

Mais avant d'aborder l'effet de l'excès du sel dans le sol sur la croissance des plantes et des microorganismes, il est important de définir ce qu'est un sol salé.

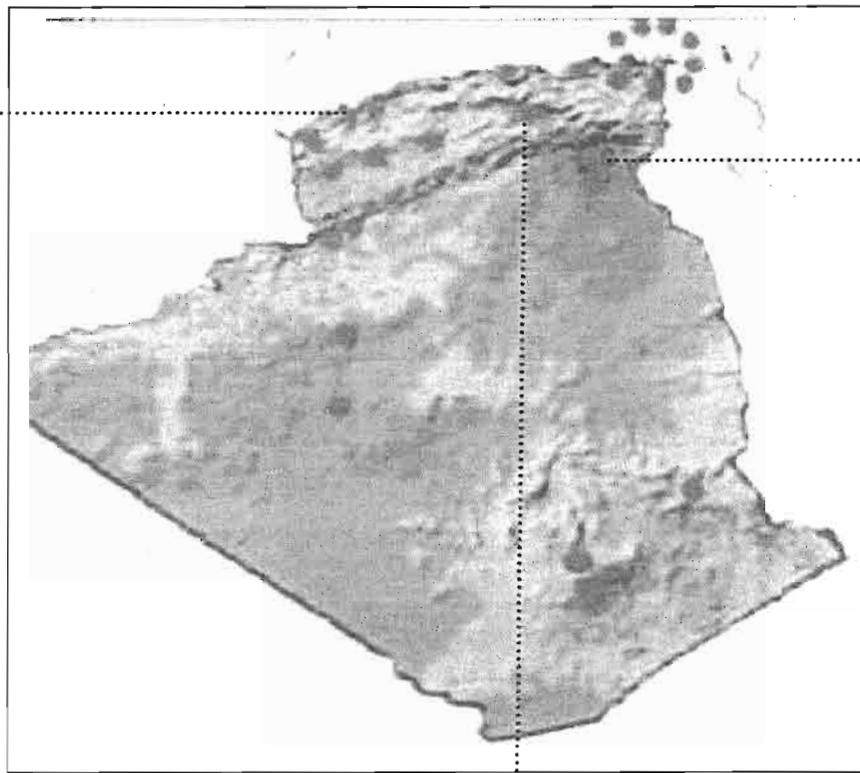
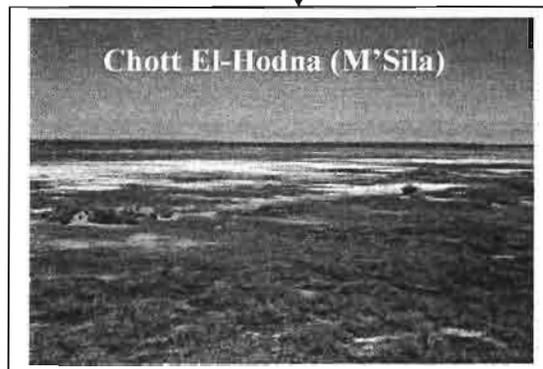
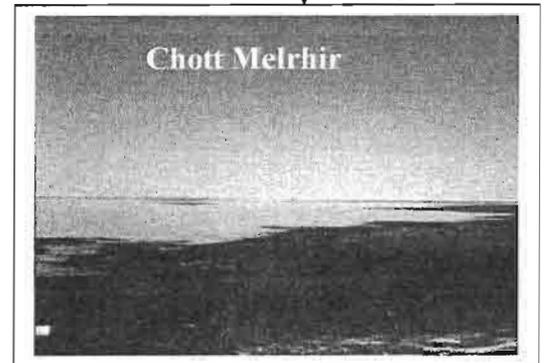


Figure 4 : Localisation des chotts et marais (indiqués sur la carte par un point jaune).



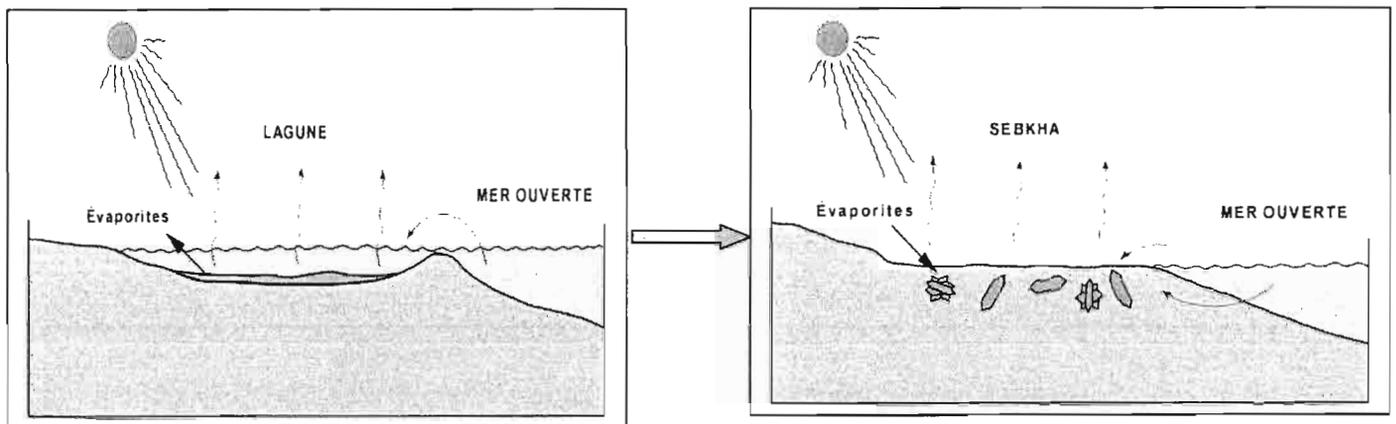


Figure 5 : Exemple de formation d'une Sebkhia

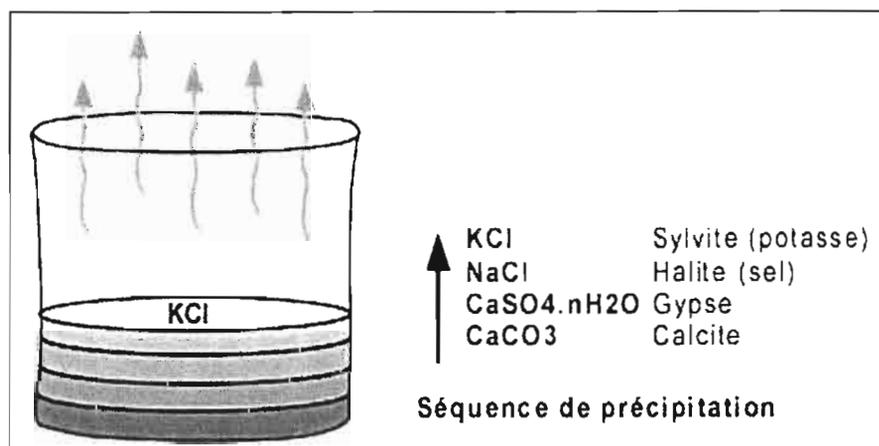


Figure 6 : Ordre de précipitation des sels dans une eau de mer et formation d'évaporites

Lorsque l'eau s'évapore, elle dépose ses particules détritiques et les ions qu'elle contient précipitent sous forme de sels. Les matériaux déposés constituent une séquence évaporitique. L'ordre de précipitation des sels est le suivant : CaCO₃ - CaSO₄ - NaCl - MgSO₄ - sels de Br et K

1. 3. 1 Sol salé :

Les sols salés sont des sols ayant des sels dans la phase aqueuse et/ou des ions sodium (Na⁺) dans les sites d'échanges excédant les limites spécifiques. La majorité des cations présents dans les sols salés sont le sodium (Na⁺), le calcium (Ca²⁺), le magnésium (Mg²⁺) et aussi le potassium (K⁺). La majorité des anions sont les ions chlorure (Cl⁻), sulfate (SO₄²⁻),

bicarbonate (HCO_3^-), carbonate (CO_3^{2-}) et nitrate (NO_3^-). Ces sols sont généralement divisés en trois catégories : les sols salés, sols sodiques et sols salé-sodiques (Qadir *et al.*, 2000).

Les estimations montrent qu'environ 955×10^6 hectares dans le monde sont considérés comme affectés par différentes catégories de salinité (Szabolcs, 1994). Une proportion de 40/60 existe entre les sols salés-sodiques/sols sodiques (Tanji, 1990 ; Qadir *et al.*, 1996). Selon Szabolcs (1989), 340 millions d'ha (23 %) des terres cultivées sont salées et environ 560 millions d'ha (37 %) sont sodiques. En Algérie, plus de 95 % des sols des régions arides sont soit calcaires, soit gypseux, soit salé-sodiques (Halitim, 1988).

La salinité du sol peut être déterminée par la conductivité électrique d'une solution aqueuse de sol. La conductivité électrique E_{Ce} (Electrical Conductivity of the extract) avec l'unité de decisiemens/mètre (dS/m) ou millimhos/centimètre (mmhos/cm) est l'expression des ions et cations dans le sol. Le degré de salinité des sols est donc mesuré par la conductivité et évalué selon les normes internationales présentées dans le tableau (01) :

Tableau 01 : Normes de salinité du sol
(ISS, http://www.iges-stb.org/pdf/dico_donesol2.pdf)

Salinité (E_{Ce} : mS/cm)	Salinité du sol	Réponse des plantes
0 à 2	Non salé	Pas d'impact sur la croissance des plantes
2 à 4	Légèrement salé	La croissance des plantes sensibles peut être réduite
4 à 8	Moyennement salé	La croissance de plusieurs plantes est réduite
8 à 16	Salé	Bonne croissance des plantes tolérantes au sel.
> 16	Très salé	Bonne croissance des plantes très tolérantes au sel.

$$1 \text{ S/m} = 10^4 \mu\text{S/cm} = 10 \text{ mS/cm} = 10^3 \text{ mS/m (normalisation française, afnor, 1986)}$$

1. 3. 2 Origine de la salinité:

A mesure que les roches et les sols sont érodés par l'eau, de petites quantités de sels minéraux qu'ils contiennent sont entraînées jusque dans les fleuves et les couches aquifères,

s'infiltrant ainsi dans l'eau d'irrigation. Si on utilise trop peu d'eau dans un champ, les sels s'incrustent dans le sol. Mais le plus grave danger pour le sol est l'eau en trop grande quantité qui cause son engorgement et élève, à son tour, le niveau de la nappe phréatique. Le sol fonctionne alors comme une éponge, aspirant l'eau dans la rhizosphère par capillarité. Cet effet peut attirer l'eau à la surface sur environ 1,5 m, selon les sols. L'eau s'évapore et le sel reste autour des racines, entravant leur capacité d'absorber l'eau. Ce processus se produit en particulier dans les régions arides.

Il existe deux types de salinisation des sols. Une salinité d'origine naturelle présente dans 80 % des terres salinisées, on parle alors de salinisation "primaire", due aux sels se formant lors de l'altération des roches ou à des apports naturels externes. Par ces processus naturels, les sels peuvent se concentrer à la surface du sol et y causer un état appelé salinité du sol. Mais 20 % des terres salinisées, dont près de 15 millions d'hectares sur le continent Africain, ont une origine « anthropique ». On parle alors de salinisation "secondaire", induite par l'activité humaine, liée aux pratiques agricoles, en particulier à l'irrigation. En effet, même si une eau d'irrigation est relativement pauvre en sels, cela entraîne le dépôt d'au moins 6 tonnes/ha (2,4 tonnes/acres) de sels sur le sol par an (figure 7).

En zone saharienne d'Algérie, l'horizon de surface d'un champ de blé de salinité égale à 2 dS/m a augmenté de six fois atteignant 12 dS/m après cinq campagnes d'irrigation avec des eaux diversement minéralisées. Cette salinité secondaire s'est traduite par une chute considérable du rendement céréalier (Djili *et al.*, 2003).

Néanmoins, ces problèmes de salinité peuvent être réduits par de meilleures pratiques d'irrigation. La collection de la FAO « Irrigation and Drainage Papers » contient des directives sur l'évaluation de la salinité des sols en champ et sur les systèmes de drainage pour aider à prévenir la salinisation. La FAO a également réalisé des manuels de formation à l'intention des agents de vulgarisation et des agriculteurs intéressés. Des études sont en cours pour déterminer la possibilité d'utiliser la télédétection (images par satellite) en vue de cartographier les zones touchées par la salinisation.

Cependant, dans le cas d'une absence de stratégie durable d'irrigation et de drainage notamment dans les zones arides, la salinisation pourrait menacer 10 % de la récolte céréalière dans le monde, et qui représente la nourriture de base de plusieurs pays pauvres (FAO, 2002).

Le degré de salinité peut donc être modifié par tous les processus qui influent sur le bilan de l'eau dans le sol, dont la géologie, l'hydrologie (eau), le climat (spécialement les tendances à long terme des précipitations), le couvert végétal et les pratiques agricoles.



Figure 7 : Impact de l'irrigation sur la salinisation des terres agricoles.

(Syrie, 1997) (source FAO, 2002)

1. 3. 3 Effet de la salinité sur la croissance des plantes :

La salinité affecte la croissance des plantes suite à l'effet de rétention d'eau provoqué par des concentrations élevées de sel. La plante privée d'eau réagit et se défend en fermant les stomates présents au niveau des feuilles empêchant ainsi l'évaporation de l'eau mais en conséquence empêche également la diffusion du CO_2 nécessaire à la photosynthèse affectant ainsi la croissance de la plante (Rhodes et Nadolska-Orczyk, 2001 ; Reddy *et al.*, 2004). Les sels présents en grande quantité dans le sol peuvent également provoquer une intoxication de la plante par absorption déséquilibrée des cations.

La baisse de production de la biomasse est une réponse classique à la contrainte saline. Lachâal *et al.* (1997) ont démontré que les légumineuses aussi bien tolérantes que sensibles au sel peuvent accumuler les ions Na^+ et Cl^- dans les feuilles et que cette accumulation est compatible avec la croissance à condition que la fourniture des éléments nécessaires à la croissance soit assurée. Ainsi, la croissance des plantes est limitée par l'effet de l'inhibition par le sel des transports des éléments nutritifs et non aux effets toxiques des ions Na^+ et Cl^- accumulés dans les feuilles.

Néanmoins, la tolérance des plantes vis-à-vis de la salinité varie largement en fonction de l'espèce, de la variété, du stade végétatif et des facteurs liés au milieu (température, humidité, intensité de la lumière et fertilité du sol) (Cordovilla *et al.*, 1995).

Cette tolérance est déterminée par de nombreuses voies biochimiques qui facilitent la rétention et/ou l'acquisition de l'eau, protège la fonction des chloroplastes et maintien

l'équilibre ionique. Les voies principales incluent celles qui mènent à la synthèse de métabolites osmotiques, et certains radicaux libres cofacteurs d'enzymes qui contrôlent le flux d'ions et de l'eau. Plusieurs espèces tolérantes accumulent des métabolites méthylés, qui jouent un rôle crucial comme osmoprotecteurs et récupérateurs de radicaux. Leur synthèse est corrélée avec l'induction de stress par l'augmentation de la photo- respiration (Kumar Parida et Bandhu Das, 2005).

Chez les légumineuses comme pour le reste des végétaux, la salinité affecte la croissance des plantes mais différemment selon les espèces (Zahran, 1991a ; Zahran, 1991b ; Keating *et al.*, 1986 ; Giridhar, 1987). *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris* et *Glycine max* sont plus tolérantes que d'autres. Abdel-wahab et Zahran, (1983) et Cordovilla *et al.* (1995) rapportent que certaines lignés de *V. faba* tolérantes au sel maintiennent même une activité de fixation d'azote en présence de sel. D'autres légumineuses comme *Prosopis*, *Acacia* et *Medicago sativa* sont également tolérantes au sel mais moins que leurs microsymbiotes (Fagg et Stewart, 1994 ; Zhang *et al.*, 1991 ; Abdel-Wahab et Zahran, 1983).

Chez certaines variétés de trèfle, la réponse au stress salin se traduit par une baisse de la croissance et de la teneur en protéines foliaires solubles jusqu'à 75 % à 6 g/L de NaCl avec accumulation significative de la proline et des sucres solubles dans les feuilles (Ben Khaled *et al.*, 2003).

1. 3. 4 Effet de la salinité sur la survie des BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuses) :

La salinité réduit la survie et la distribution des rhizobia dans le sol et la rhizosphère (Tate, 1995 ; Jenkins *et al.*, 1989). Elle affecte également le processus de nodulation ainsi que la fixation symbiotique de l'azote (El-Sheikh et Wood, 1995). Néanmoins, cet effet diffère selon que les souches de rhizobia présentes dans le sol sont sensibles ou tolérantes au sel (Kumar *et al.*, 1999). Ohwad *et al.* (1998) ont montré que des souches de *Rhizobium* sensibles au sel formaient des nodules inefficients avec le soja.

L'excès de sel peut également provoquer des modifications du contenu protéique (Soussi *et al.*, 2001) et de la synthèse des lipopolysaccharides (LPS), essentielles à l'initiation de la nodulation chez des rhizobia (Lioret *et al.*, 1995).

L'effet néfaste du sel est essentiellement dû à l'augmentation de l'osmolarité du milieu environnant la bactérie. Cette osmolarité entraîne un efflux d'eau entraînant une diminution du volume du cytoplasme. Cette plasmolyse affecte le métabolisme de la cellule et le fonctionnement des macromolécules et finalement conduit à l'arrêt de la croissance (Le Rudulier, 2005).

Néanmoins, tout comme chez les plantes, la tolérance à la salinité chez les bactéries diffère considérablement entre les espèces. Selon Imhoff (1986), les bactéries peuvent être classées en quatre catégories selon leur demande en sel :

- Les bactéries non halophiles : se développent en dessous de 0,2 M NaCl
- Les bactéries légèrement halophiles : se développent de 0,2 jusqu'à 1-1,2 M NaCl
- Les bactéries halophiles modérées : se développent à partir de 1-2 M jusqu'à 2,5 M NaCl
- Les bactéries extrêmement halophiles : se développent de 2-2,5 M NaCl et plus.

Chez les rhizobia, la tolérance à la salinité diffère entre espèces et également chez les souches appartenant à la même espèce. Des souches de *Ensifer meliloti* tolèrent entre 300 et 700 mM NaCl (Embalomatis *et al.*, 1994 ; Helemish *et al.*, 1991 ; Mohammad *et al.*, 1991 ; Sanginga *et al.*, 1996). Il a été rapporté que la croissance de cette espèce de rhizobia était sévèrement inhibée par des ions Mg^{+2} , alors que les ions Na^+ ou K^+ ont un effet moins inhibiteur (Jian *et al.*, 1993). Chez d'autres espèces de rhizobia la tolérance à la salinité varie entre 300 et 850 mM NaCl. Abdel-Wahab et Zahran (1979) et Breedveld *et al.* (1991) rapportent que des souches de *Rhizobium leguminosarum* tolèrent des concentrations de NaCl supérieures à 350 mM. Les rhizobia isolés de *Vigna unguiculata* tolèrent des concentrations de 450 mM NaCl (Mpepereki *et al.*, 1997). Les rhizobia isolées de légumineuses ligneuses sont substantiellement tolérantes à la salinité et peuvent pour certaines souches isolées d'*Acacia*, *Prosopis* et *Leucaena* tolérer entre 500 et 850 mM de NaCl (Lal et Khanna, 1995 ; Zahran *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1991)

La vitesse de croissance des rhizobia semble également intervenir dans la tolérance de ces bactéries à la salinité. El-Sheikh et Wood (1995) ont observé que des souches de rhizobia isolées du pois chiche et à croissance rapide sur milieu de culture, étaient plus tolérantes à la salinité que celles à croissance lente.

D'autres activités de transport et de métabolisme sont déclenchées chez la bactérie pour ajuster sa pression osmotique. Ce sont les mécanismes d'osmorégulation.

1. 3. 5 Mécanismes d'osmorégulation chez les rhizobia :

Les mécanismes d'osmorégulation ont été étudiés selon différentes approches biochimiques et moléculaires notamment chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* (Lucht et

Bremer, 1994) et chez certaines espèces de rhizobia mais tout n'est pas connu des mécanismes complexes qui interviennent dans cette osmorégulation.

La réponse la plus commune face au stress est l'accumulation par la cellule de solutés compatibles, communément nommés osmolytes (figure 8) afin de maintenir une pression osmotique positive essentielle au bon fonctionnement de la cellule et à son intégrité structurale.

Dans un premier temps, les bactéries résistantes stimulent le transport des ions potassium qui vont s'accumuler dans la cellule bactérienne. En présence de fortes concentrations de sel (supérieure à 300, 400 mM NaCl) dans le milieu extérieur, le taux de glutamate ou d'ions potassium libres intracellulaire augmente fortement et peut sextupler en quelques minutes dans les cellules de *E. meliloti* (Botsford et Lewis, 1990 ; Jian *et al.*, 1993 ; Le Rudulier et Bernard, 1986). Cette accumulation d'ions potassium a été observée également chez *E. fredii* (Susheng *et al.*, 1993), et des rhizobia isolés de plantes ligneuses *Leucaena leucocephala* (Yap et Lim, 1983). Les ions potassium contrôlent strictement le flux des ions Mg^{+2} durant le choc osmotique.

Chez d'autres bactéries Gram négatif, l'osmorégulation est entièrement dépendante de la présence de proline exogène accumulée souvent à des concentrations élevées (Csonka *et al.*, 1989). Cette accumulation de proline peut être le résultat d'une stimulation de la synthèse et/ou d'activité de transport. Cependant, la proline ne semble pas jouer de rôle dans l'osmorégulation chez le *Rhizobium*, même sous conditions de stress sa concentration intracellulaire est faible (Le Rudulier et Bernard, 1986).

Il existe donc une hiérarchie dans l'accumulation des osmolytes dans la cellule. Les ions potassium et le glutamate servent à réguler l'osmolarité cytoplasmique dans le cas où la pression osmotique externe est relativement basse. Cependant dans le cas où la pression osmotique externe est élevée des systèmes de transport de vrais osmoprotecteurs interviennent dont ceux de la glycine bêtaïne ou de son précurseur la choline (Brhada et le Rudulier, 1994). Il a été démontré que l'ajout de 1 mM de glycine bêtaïne permet la restauration de la croissance de *E. meliloti* dans un milieu contenant une concentration inhibitrice de 0,5 M NaCl (Le Rudulier, 2005).

La glycine bêtaïne est accumulée par différentes bactéries pendant le stress osmotique, incluant des espèces halophiles telles que *Ectothiorhodospira halochloris* (Csonka, 1989 ; Galinski et Truper, 1982) et des bactéries non halophiles telles que *Escherichia coli* (Perroud et le Rudulier, 1985) et *E. meliloti* (Le Rudulier et Bernard, 1986).

Chez *E. meliloti*, la glycine bétaine est accumulée dans le cytoplasme de la bactérie suite à son transport à partir de l'environnement ou à sa biosynthèse directement à partir de précurseurs, la choline ou la glycine bétaine aldehyde (Le Rudulier *et al.*, 1984 ; Styrvold *et al.*, 1986). Cependant, la choline elle même ne joue aucun rôle osmoprotecteur chez des mutants bloqués dans la voie de biosynthèse de la glycine bétaine (Pocard *et al.*, 1997). Brhada et le Rudulier, (1994), ont observé que chez des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, la restauration de la croissance en présence de 0,3 M NaCl avec de la Choline a eu lieu après celle de la Glycine bétaine, ce qui serait dû au temps nécessaire à la synthèse de cette dernière par son précurseur (figure 9).

La synthèse de la glycine bétaine à partir de la choline ou de la choline-O-sulfate est codée par le gène de régulation *betI* et trois gènes structuraux *betC* (Choline sulfatase), *betB* (bétaine aldehyde dehydrogenase) et *betA* (Choline dehydrogenase). Il a été démontré par Mandon *et al.* (2003) que les gènes *betICBA* constituent un seul opéron malgré la présence de régions inter géniques comportant des éléments en mosaïque entre les gènes *betI* et *betC* et entre *betB* et *betA*. La glycine bétaine est transportée du milieu extérieur par deux activités de transport bétaine qui ont été mises en évidence chez *E. meliloti* : Le système Hut à faible affinité (Boncompagni *et al.*, 2000) et le système BetS de transport de la bétaine choline carnitine (BCCT) nécessaire pour un premier ajustement osmotique (Boscari *et al.*, 2002). Un troisième système de transport Choline-ABC (Cho) a été récemment identifié (Dupont *et al.*, 2004). En faible osmolarité, la glycine bétaine et la proline bétaine peuvent également être utilisées comme source de carbone et d'azote chez *E. meliloti* (Bernard *et al.*, 1986 ; Smith *et al.*, 1988).

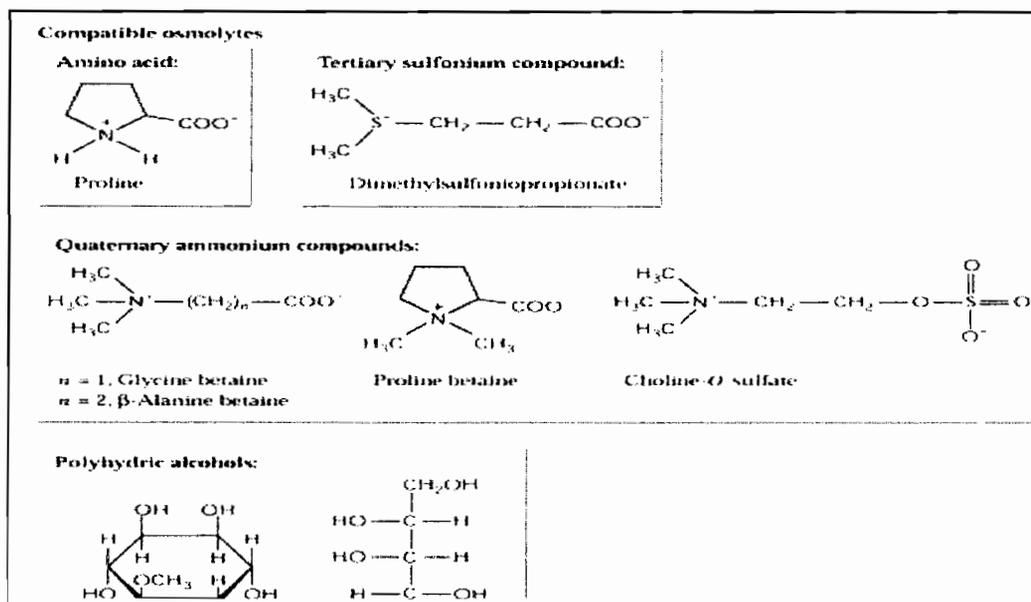


Figure 8: Principaux solutés compatibles chez les rhizobia.
(Le Rudulier *et al.*, 1984 ; Miller et Wood, 1996 ; Le Rudulier, 2005)

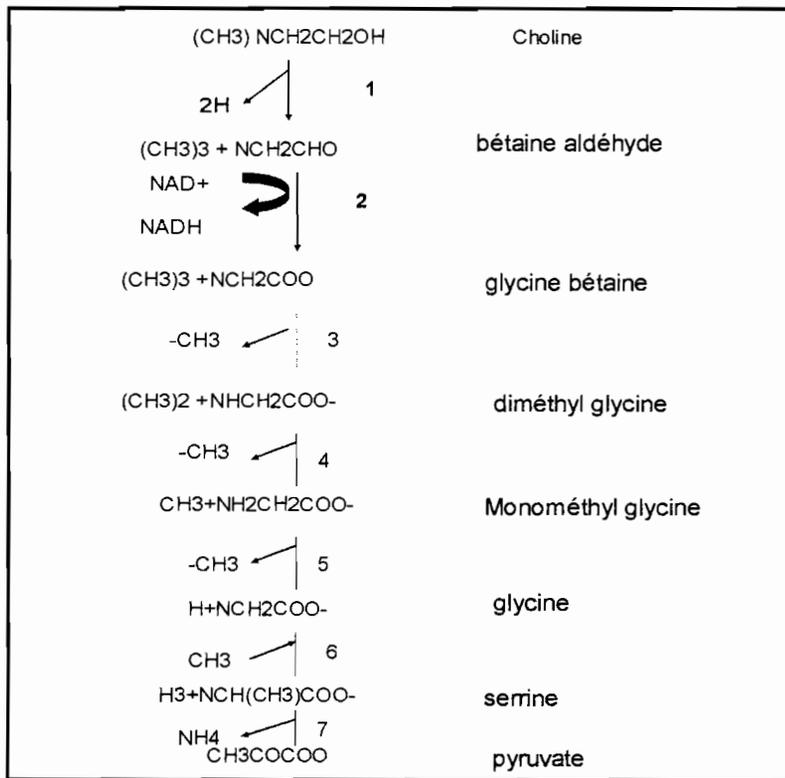


Figure 9: Métabolisme de la Glycine bétaine chez *S. meliloti* 102F34 (Smith *et al.*, 1988)

1. la Choline oxydase,
2. bétaine aldéhyde déhydrogénase ;
3. glycine bétaine transméthylase ;
4. diméthyl glycine déhydrogénase ;
5. monométhyl glycine déhydrogénase ;
6. la sérine trans hydroxyméthylase ;
7. la sérine déhydratase

1. 4 Les légumineuses (Généralités):

La famille des légumineuses est l'une des plus importantes parmi les plantes à fleurs dicotylédones. Cette famille dont le fruit est une gousse, compte environ 18 000 espèces de répartition mondiale et à grand intérêt économique. Les légumineuses comptent des espèces alimentaires (pois, fèves, haricots), ornementales (arbre de Judée) et fourragères (luzerne) (Encarta ® 2006). Les légumineuses appartiennent à la famille des Fabaceae qui est subdivisée en trois sous familles : les Mimosoideae, Caesalpinioideae et Papilionoideae qui ne sont pas toutes nodulées (figure 10). Peu d'espèces nodulent avec la primitive sous famille des Caesalpinioideae (23 %) qui est la plus diverse et compte environ 162 genres avec approximativement 3000 espèces, contrairement à la majorité de celles des deux autres sous familles Mimosoideae (90 %) et qui renferme environ 77 genres et 3000 espèces et la plus grande part est attribuée aux Papilionoideae (97 %) et qui regroupe 467 genres et environ 14000 espèces (Sprent, 1995; Lewis *et al.*, 2003).

Jusqu'à présent environ 20 % des 18000 espèces de plantes légumineuses ont été étudiées du point de vue nodulation (Sprent, 1995), ce qui laisse un large éventail d'espèces de légumineuses à étudier, notamment celles spontanées et endémiques de l'Afrique du Nord.

1. 4. 1 Les légumineuses les plus répandues dans le Maghreb :

Le bassin méditerranéen est le berceau de diversification d'un grand nombre d'espèces végétales notamment celles d'intérêt fourrager et/ou pastoral. Plus de 500 espèces pastorales en sont originaires (Talamucci et Chaulet, 1989) dont les genres *Trifolium*, *Medicago*, *Vicia*, *Astragalus*, *Lathyrus*, *Ononis*, *Avena*, *Eragrostis*, *Hordeum*, *Dactylis*, *Phalaris*, *Lolium*, *Bromus*, *Stipa* sont largement représentés. Le degré d'endémisme de la flore du bassin Méditerranéen est très élevé. Sur 976 espèces appartenant à 18 genres de Fabacées fourragères et/ou pastorales, 336 espèces sont endémiques à la région méditerranéenne. Au Maroc, sur les 550 espèces endémiques, la famille des Fabacées est parmi les plus riches en espèces endémiques (environ 63 espèces) (M'hirit et Maghnoij, 1997). En Algérie, l'endémisme est assez important chez les Fabacées et les Poacées. Plusieurs espèces sont spontanées ou endémiques des régions arides et salées, dont les nombreuses espèces de *Medicago* annuelles, de *Lotus*, de *Retama*, de *Scorpiurus*, d'*Astragalus* et des arbres *Acacia*. En Tunisie, les légumineuses constituent la deuxième famille après les Composées par ordre d'importance du nombre de taxons. Leur rôle est capital dans toutes les opérations de développement et également de restauration et de réhabilitation. La majorité des légumineuses sont annuelles, abondantes dans les zones semi-aride à humide et diminue dans les zones arides avec seulement 33 % sont des taxons pérennes. (Le Floch et Grossmann, 1998). Les *Medicago* occupent une place importante dans la flore tunisienne avec des cultivars locaux d'une valeur agronomique confirmée et qui se développent vigoureusement dans les zones arides et semi-arides. Parmi les cultivars les plus populaires, *M. sativa* var. Gabes qui peut persister deux fois plus dans un sol contenant 10 g/L de NaCl après la deuxième coupe comparé à deux autres cultivars testés de la même espèce « Hunter Field et Hybride 555 » (Seklani *et al.*, 1996). Néanmoins, la flore endémique tunisienne est moins importante que celle de l'Algérie et du Maroc. Les taxons propres à la Tunisie sont au nombre de 34 dont environ 6 sont des Fabacées et 1 est une Poacée.

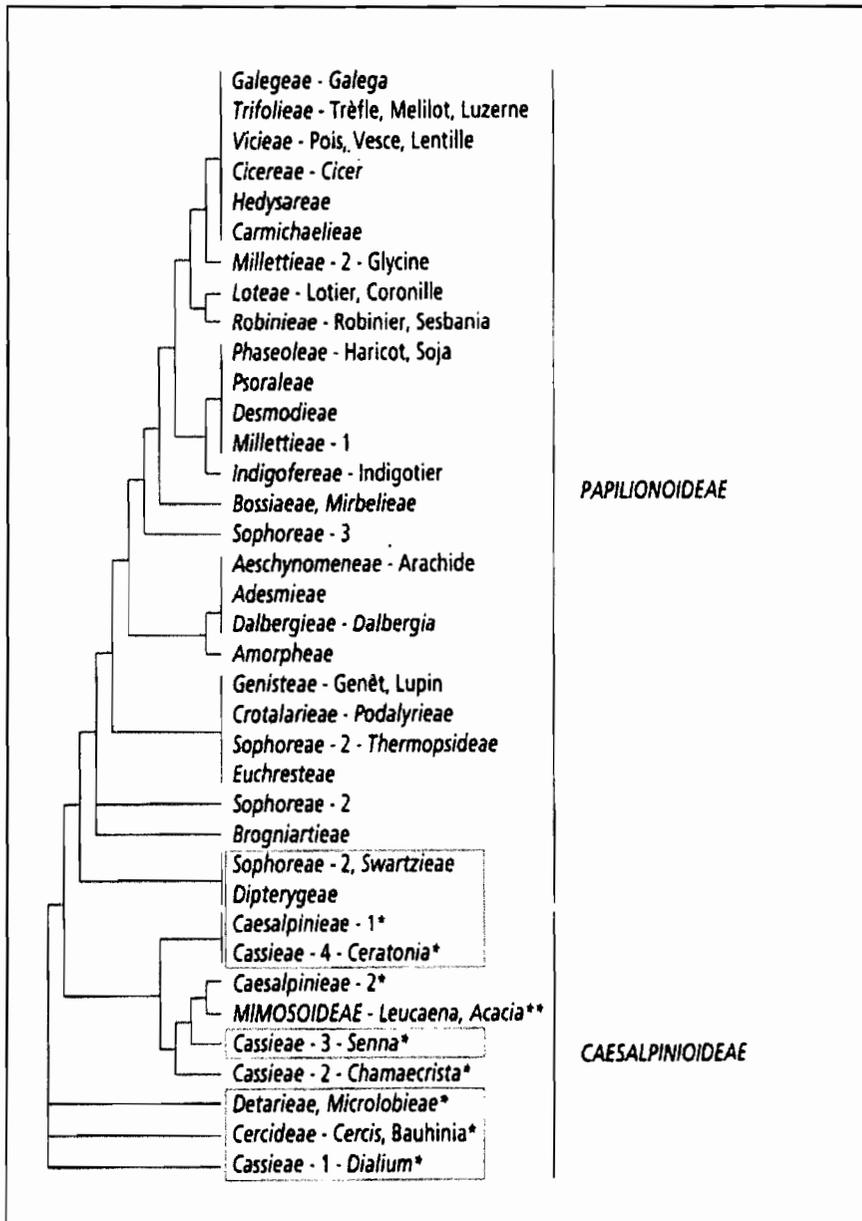


Figure 10 : Arbre phylogénétique des légumineuses construit à partir des séquences *rbcl*.

Les trois principales familles sont représentées. Les principales tribus sont indiquées et les genres essentiels sont mentionnés en termes vernaculaires. Les encadrements soulignent les plantes connues pour ne pas noduler. Les Papilionoideae et les Mimosoideae constituent des familles très regroupées, les représentants des Caesalpinioideae (*) sont plus dispersés (d'après Doyle, 1998).

Le germoplasme fourrager du bassin méditerranéen a été largement utilisé dans les programmes d'amélioration des autres régions du monde. Plusieurs caractères de ces ressources génétiques, comme le haut rendement et la résistance aux stress abiotiques (froid, sécheresse) et biotiques (maladies, insectes), ont servi de base génétique dans ces programmes d'amélioration. Plusieurs exemples d'écotypes fourragers du bassin Méditerranéen ont été utilisés au niveau international dont Demnat et Gabes de *Medicago sativa*, Rivoli de *Medicago tomata* et El-Golea d'*Omithopus compressus* et Jebala d'*O. prinnatus* (FAO, 1996 ; Tazi, 1999). Néanmoins, plusieurs de ces espèces endémiques des régions méditerranéennes risquent de disparaître en absence d'une stratégie de conservation et de valorisation de cette richesse et qui devrait être sérieusement entreprise. Qu'il s'agisse du Sud de l'Europe ou du

Nord de l'Afrique, la production de semences d'écotypes locaux rencontre des difficultés énormes de nature diverse (Porqueddu *et al.*, 2000 ; Abdelguerfi *et al.*, 2000).

Actuellement, grâce aux systèmes de production de semences en Australie, plusieurs ressources génétiques méditerranéennes ont pu être valorisées et conservées dans des centres de recherches dont le AMGRC (Australian *Medicago* Ressource Centre) et SARDI (Australian Research and Development Institute). Ces instituts maintiennent et gèrent une collection fourragère de plus de 38000 accessions représentant 159 genres et 731 espèces. La plus large collection est constituée de *Medicago*, mais il existe aussi d'autres légumineuses comme les *Lotus*, *Hedysarum*, *Melilotus*, *Onobrychis*, *Astragalus* et *Trigonella*. En plus de cette collection, des centres de recherches australiens ont pu mettre au point des cultivars utiles à partir d'un matériel originaire le plus souvent du Bassin méditerranéen et de ce fait d'exporter grâce à leur systèmes de production de semences d'espèces d'intérêt fourrager et/ou pastoral des quantités de semences importantes vers l'Argentine, les Etats Unies d'Amérique, l'Espagne et l'Arabie Saoudite (Norman *et al.*, 2000). Parmi les espèces les plus exportées entre 1997 et 1998, environ 3984 tonnes de luzerne (*Medicago sativa*) et 1485 tonnes des autres espèces de légumineuses pastorales.

D'autres laboratoires dans les pays européens, ont également consenti beaucoup d'efforts dans le rassemblement et l'évaluation du matériel végétal notamment des différentes espèces de medics (*Medicago* annuelles). Le laboratoire d'amélioration des plantes fourragères de l'INRA de Montpellier est un exemple. La collection du laboratoire comporte 2095 échantillons au total de 25 espèces différentes de medics (*M. aculeata* Willd, *M. arabica* Huds, *M. ciliaris* Krock, *M. intertexta* Mill, *M. minima* Bat, *M. murex* Willd, *M. orbicularis* Bart, *M. polymorpha* L., *M. praecox* DC., *M. rigidula* All., *M. scutellata* Mill., et *M. truncatula* Gaernt). Parmi ces échantillons, 484 proviennent d'Algérie (Prosperi *et al.*, 1995).

L'intérêt grandissant à l'égard des légumineuses est du principalement à leur possibilité de s'établir dans des sols pauvres et carencés en azote. Cette possibilité de s'établir dans ces sols et de l'enrichir est possible grâce à leur association avec des bactéries du sol appelées rhizobia.

1.5 Les rhizobia:

Les rhizobia sont les partenaires symbiotiques des légumineuses. Ils induisent la formation des nodules à l'intérieure desquels ils fixent l'azote atmosphérique en azote combiné utilisable par les plantes. Dans la majorité des cas, cette fixation d'azote

atmosphérique a lieu à l'intérieur du nodule (racinaire ou caulinaire) organe de symbiose entre la légumineuse et la bactérie, cependant chez quelques Caesalpinacées et la non-légumineuse *Parasponia*, les rhizobia ne pénètrent pas à l'intérieur des cellules, mais fixent l'azote de l'air dans les cordons d'infection, appelés dans ce cas cordons fixateurs (Duhoux et Nicole, 2004).

La capacité des rhizobia à former des nodules repose sur la présence dans leur génome d'un ensemble de gènes de nodulation indispensables à la symbiose. Les gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de facteurs Nod, qui sont des lipochitooligosaccharides qui agissent comme molécules signal et induisent la formation des nodules (Parniske et Downie, 2003 ; Perret *et al.*, 2000). Parmi ces gènes, les gènes communs *nodA*, *nodB*, *nodC* qui sont des gènes clé de la nodulation car ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des facteurs Nod. Dans la mesure où ces gènes n'ont pas de paralogues chez les non rhizobia, ils constituent la signature moléculaire d'un rhizobium. Un grand nombre de séquences partielles ou complètes des gènes *nodABC* sont aujourd'hui disponibles dans les banques de données, avec plus d'une centaine de séquences complètes pour *nodA*.

Pour une production optimale, une légumineuse devra trouver un partenaire microbien non limitant, adapté à son environnement, et capable d'assurer la mise en place d'une symbiose efficace. Ainsi, il est important de bien connaître le partenaire bactérien indigène spécifique de la légumineuse à implanter, sa position taxonomique, le nombre présent dans le sol pour la nodulation et son efficacité. Dans le cas où les souches indigènes sont peu ou pas efficaces, une inoculation de nature à modifier l'équilibre microbien dans le sol peut être envisagée. Mais avant toute tentative d'inoculation il est important d'étudier les partenaires symbiotiques des légumineuses spontanées de ces régions, leur diversité et l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur cette diversité.

Diverses méthodes sont utilisées pour la caractérisation du partenaire microbien. Nous présenterons dans la partie suivante les techniques les plus utilisées dans la taxonomie actuelle des BNL, d'autres techniques moins utilisées ou très récentes dont le pouvoir discriminatif est encore à confirmer sont détaillées dans des revues suivantes (Vandamme *et al.*, 1996 ; Zakhia et de Lajudie, 2006 ; Coenye *et al.*, 2005).

1. 5. 1 Taxonomie bactérienne polyphasique :

La taxonomie est une science dynamique qui évolue selon les progrès de la connaissance et des théories retenues. Dans le passé, la taxonomie reposait principalement sur des caractères phénotypiques. Ces critères se sont avérés insuffisants pour une taxonomie juste des bactéries car ils ne reflètent qu'une partie du génome. L'introduction de caractères

génotypiques et phylogénétiques a permis la description de plusieurs genres et espèces bactériens et une meilleure étude et compréhension des relations taxonomiques des procaryotes. Cette classification est dite polyphasique (Wayne *et al.*, 1987 ; Vandamme *et al.*, 1996). La taxonomie bactérienne (rhizobia) actuelle repose sur une approche polyphasique (Graham *et al.*, 1991 ; Vandamme *et al.*, 1996 ; Stackebrandt *et al.*, 2002 ; Gillis *et al.*, 2005)

L'espèce bactérienne est définie selon cette approche comme un groupe de souches avec un certain degré d'homogénéité caractérisées par un certain nombre de caractères phénotypiques, par une valeur d'hybridation ADN-ADN significative (50-70 %) et une homologie de séquence d'ADNr 16S supérieure à 97 % (Vandamme *et al.*, 1996 ; Ursing *et al.*, 1995).

Ces critères taxonomiques sont toujours utilisés dans les études de diversité et de description de nouvelles espèces mais en dépit de leur avantage, elles présentent également certaines limites.

Jusqu'à la fin des années 60, la taxonomie bactérienne était basée sur une analyse phénotypique. Cette analyse reposait essentiellement sur l'étude de la morphologie de la cellule bactérienne; des caractéristiques physiologiques et biochimiques, notamment celles du métabolisme des sources de carbone par emploi de galeries miniaturisées (BIOLOG, BIOTYPE, API) ; l'analyse des acides gras cellulaires (Jones et Krieg, 1984 ; Suzuki *et al.*, 1993) ; étude du profil protéique total par SDS-PAGE (Laemmli, 1970 ; Roberts *et al.*, 1980 ; de Lajudie *et al.*, 1994) et la technique de Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) (Selander *et al.*, 1986 ; Wang *et al.*, 1999 ; Jebara *et al.*, 2001).

Bien que cette caractérisation soit importante et ait permis l'identification de nombreux microorganismes notamment dans le domaine médical, elle s'est avérée néanmoins insuffisante pour une classification juste des microorganismes. Pour certains groupes de bactéries, le manque de caractéristiques phénotypiques distinctives pose souvent des problèmes pour leur description ou leur différenciation. D'autres limites ont également été observées, les caractères phénotypiques peuvent être variables parmi les membres d'une même espèce, être contrôlés par des gènes plasmidiques, par conséquent sujets à perte ou gain. Les résultats sont parfois variables selon la méthodologie employée, et, par analyse numérique les différents genres bactériens ne forment pas nécessairement de groupes distincts (Zakhia et de Lajudie, 2006).

Le développement de la biologie moléculaire a permis l'étude des relations phylogénétiques entre les microorganismes par l'utilisation de techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARN.

Parmi les techniques les plus importantes jusqu'à ce jour pour la description d'une nouvelle espèce bactérienne celle des hybridations ADN-ADN (Graham *et al.*, 1991 ; Vandamme *et al.*, 1996 ; Stackebrandt *et al.*, 2002). L'homologie ou la parenté génétique ADN-ADN est évaluée par réassociation ou hybridation de l'ADN total monobrin d'une souche avec l'ADN total monobrin d'une autre souche. Bien que la technique d'hybridation ADN-ADN soit depuis longtemps considérée comme incontournable dans la délimitation des espèces, elle présente un certain nombre de limites. Elle est fastidieuse et délicate à réaliser, et ne reste accessible qu'à un petit nombre de laboratoires spécialistes. Un autre inconvénient de la technique est lié à la nature même du génome des rhizobia, qui peut être composé pour une grande part jusqu'à 50 % d'ADN plasmidique, par définition non stable dans la cellule et qui pourrait grandement influencer les résultats des hybridations. Ces inconvénients laissent penser que les hybridations ADN-ADN sont appelées à jouer un rôle moins prépondérant à l'avenir pour la description d'espèce et plus de poids devrait être donné à l'avenir aux analyses de génétique des populations et de phylogénie, basées sur des données de séquences de plusieurs gènes situés le long du génome (Zakhia et de Lajudie, 2006) .

L'étude des gènes ribosomiques, notamment par la technique de séquençage s'est révélée jusqu'à présent décisive pour la taxonomie moléculaire et la phylogénie des procaryotes (Woese et Fox, 1977 ; Woese, 1991). Le séquençage de l'ADNr 16S est devenu le critère le plus précieux dans la classification bactérienne. Les séquences codant pour l'ARNr16S sont constituées de zones très conservées et de parties de séquences très variables (Woese, 1987 ; Schleifer et Ludwig, 1989 ; Stackebrandt et Goebel, 1994). La méthode connaît son extension avec la constitution de banques de données rassemblant les séquences de très nombreuses espèces bactériennes et qui sont disponibles dans des bases de données consultables sur Internet. Il en va de même pour les programmes informatiques indispensables à l'alignement des séquences, au traitement des données et à la construction d'arbres phylogénétiques. Les études phylogénétiques qui permettent l'affiliation d'une espèce à un genre sont essentiellement basées sur la comparaison des séquences d'ADNr 16S.

Cette technique joue également un rôle important dans la nécessité ou pas d'utiliser des hybridations ADN-ADN dans la classification d'une espèce. Ainsi, il est bien établi que deux microorganismes qui présentent moins de 97 % d'homologie de séquences d'ADNr 16S présentent entre eux une valeur d'hybridation inférieure à 60 % et dans ce cas selon la définition de l'espèce (Stackebrandt et Goebel, 1994) appartiennent à deux espèces différentes. Par contre, il est nécessaire de recourir aux hybridations lorsque l'homologie de

séquence entre deux souches est supérieure à 97 % pour statuer sur leur affiliation à des espèces différentes ou non.

Or cette technique présente également des limites. Il a été prouvé que certains génomes bactériens renferment plusieurs copies divergentes de ce gène, démontré chez la souche type de *E. saheli* (deux séquences différentes du gène) (Haukka *et al.*, 1996). D'autres auteurs (Eardly *et al.*, 2005 ; Hashimoto *et al.*, 2003 et Vinuesa *et al.*, 2005a) ont démontré que les gènes ribosomiaux peuvent être sujets à des conversions et des recombinaisons. Ueda *et al.* (1999) et Schouls *et al.* (2003) montrent la présence de transfert horizontal de gène. Il est important de souligner que les transferts horizontaux de gènes sont fréquents chez les bactéries et permettent d'introduire de nouveaux gènes ou allèles importants pour l'adaptation écologique de la bactérie et qui peuvent conduire à une diversification et une spéciation (Ochman *et al.*, 2000 ; Cohan, 2001).

Néanmoins, La classification actuelle des BNL repose encore sur le séquençage de l'ADNr 16S. Cette classification est néanmoins satisfaisante car elle permet la séparation des différents genres décrits jusqu'à ce jour, mais tenant compte des limites citées plus haut, il devient clair que les arbres phylogénétique basés sur un seul gène ne reflètent pas la relation phylogénétique et évolutive entre taxons en raison de la possibilité de transferts horizontaux de gènes, et de phénomènes de recombinaison donnant des séquences mosaïques (Coenye *et al.*, 2005 ; Vinuesa *et al.*, 2005 ; Eardly *et al.*, 2005).

Le séquençage de l'ITS (Internal Transcribed Spacer) chez les rhizobia trouve son application dans la discrimination de groupes de souches ayant peu de divergence dans leurs séquences d'ADNr 16S. Cette technique combinée aux hybridations ADN-ADN a permis la description de différents groupes génomiques dans le genre *Bradyrhizobium* (Willems *et al.*, 2003b).

Le développement de nouvelles approches génotypiques visant à étudier les séquences du génome entier offrent une plus grande quantité d'information possible à analyser avec le développement d'outils de bioinformatique. Certaines de ces approches sont déjà utilisées en taxonomie et d'autres sont analysées actuellement pour une future application.

1. 5. 2 Nouvelles approches taxonomiques :

Le séquençage des génomes entiers constitue une véritable révolution dans le domaine bactériologique en général et taxonomique en particulier, de nouveaux outils sont actuellement développés en génomique et qui permettent l'étude de la diversité des rhizobia.

Les plus utilisées sont la technique MLSA et les puces à ADN (DNA microarrays). D'autres méthodes récentes sont actuellement en cours d'étude (figure 11) (Coenye *et al.*, 2005).

Actuellement les structures du génome entier de près de 160 bactéries ont été déterminées et le séquençage de plusieurs centaines de génomes bactériens sont en cours (Ussery, 2004).

Chez les BNL, des génomes entiers ont été séquencés : *Ensifer meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001), *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002) et *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000), *Rhizobium etli* CFN42 (Gonzalez *et al.*, 2006), *Rhizobium leguminosarum* 3841 (Young *et al.*, 2006). D'autres génomes sont en cours de séquençage notamment ceux de deux espèces de *Bradyrhizobium* photosynthétiques.

1.5.2.1 MLSA (Multilocus Sequence Analysis) :

Les gènes de ménage (housekeeping gene) sont par définition les gènes qui assurent les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules. Le séquençage d'un ou de plusieurs "gènes de ménage" (MLSA ou Multilocus Sequence Analysis) est actuellement utilisé dans de nombreuses études populationnelles et de taxonomie en rhizobiologie. La technique MLSA offre l'avantage de fournir des résultats comparables entre les laboratoires. Elle a été recommandée par le *ad hoc* comité pour la réévaluation de l'espèce bactérienne (Stackebrandt *et al.*, 2002) et propose l'analyse d'un minimum de cinq gènes de ménage pour une caractérisation phylogénétique adéquate.

Des études récentes (Wertz *et al.*, 2003 ; Zeigler, 2003 ; Naser *et al.*, 2005 ; Adékambi et Drancourt, 2004) confirment que les séquences de gènes de ménage peuvent prédire les relations entre génomes et peuvent être utilisées dans l'identification au niveau de l'espèce. Zeigler (2003) suggère que l'information donnée par le séquençage de moins de cinq gènes de ménage a un pouvoir identique ou même supérieur à celui obtenu par les hybridations ADN-ADN.

NIVEAU TAXONOMIQUE

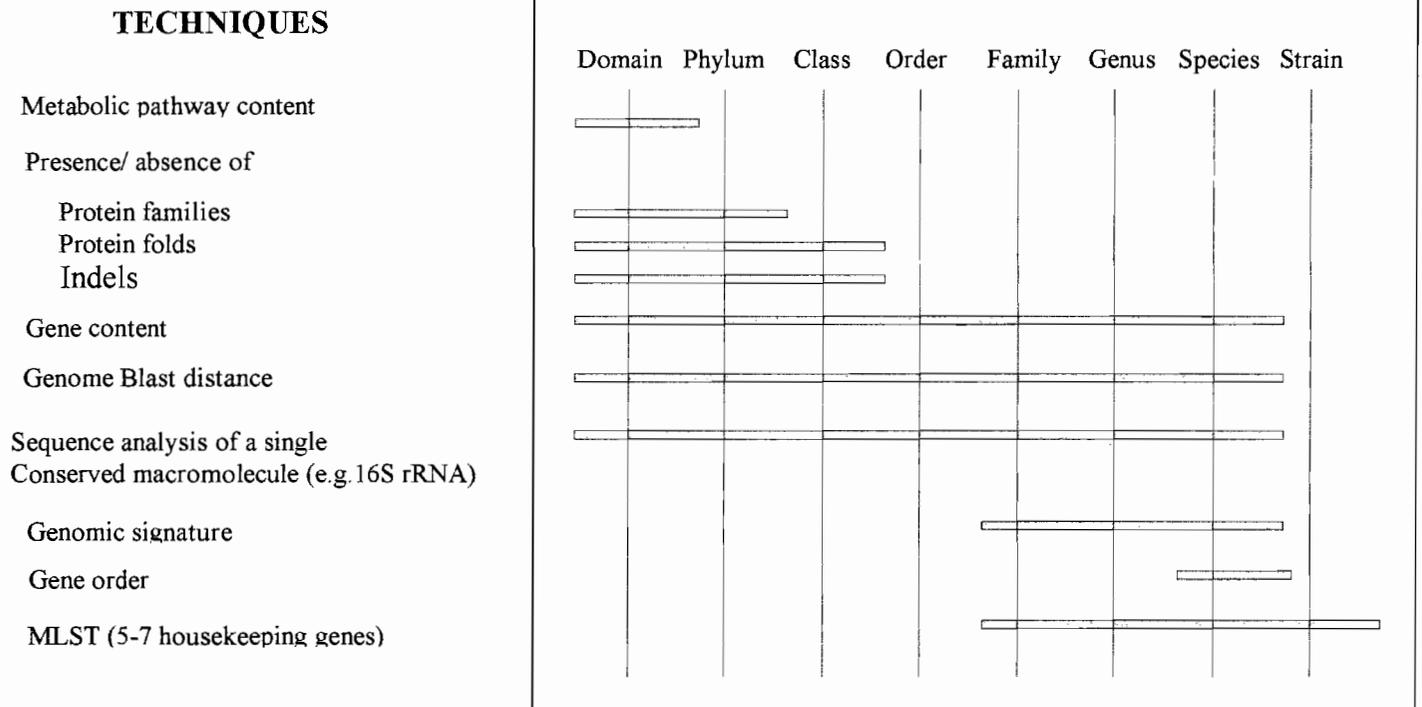


Figure 11 : La résolution taxonomique de quelques nouvelles approches basées sur l'étude des séquences du génome entier (d'après Coenye *et al.*, 2005)

Cette discrimination est possible à condition de bien choisir les gènes qui seront analysés et propose les critères suivants pour leur sélection : ces gènes doivent être (i) universellement présents dans les génomes ; (ii) idéalement présents en copie unique sur le génome ; (iii) les séquences doivent être assez longues pour contenir un nombre d'informations suffisant mais aussi suffisamment courtes pour pouvoir être séquencées. Les phylogénies de ces marqueurs sont comparées avec ceux de l'ADNr 16S.

Plusieurs auteurs ont utilisé récemment la technique MLSA pour l'étude de la diversité des rhizobia. Gaunt *et al.* (2001) ont comparé les phylogénies de deux gènes de ménage *recA* (Recombinase A) et *atpD* (ATP synthase beta subunit) chez les groupes d'*Agrobacterium* et *Rhizobium* et ont montré que les résultats obtenus ne concordent pas toujours avec ceux de l'ADNr 16S. Vinuesa *et al.* (2005a) ont utilisé une combinaison de *recA* et *atpD* pour la classification d'isolats de *Sesbania* du Venezuela et ont comparé les résultats obtenus avec ceux de la *SSU* et du gène *nifH*. D'autres gènes ont également été utilisés dans des études de diversité des rhizobia et des non rhizobia telles que le *glnA* (Glutamine synthetase) (Turner et Young, 2000), *gltA* (Citrate synthase) (Hernandez-Lucas *et al.*, 2004), *dnaK* (Stepkowki

et al., 2003). Les séquences de l'*atpD* ont également été étudiées en comparaison avec d'autres marqueurs dans la description de nouvelles espèces de *Phyllobacterium* (Mantelin *et al.*, 2006).

Les arbres *dnaK* permettent une bonne résolution dans les genres *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Rhizobium* souvent meilleure que celle de l'ADNr 16S (Stepkowski *et al.*, 2003).

Martens et collaborateurs (2007) ont étudié le pouvoir discriminatif de cinq gènes de ménage *recA* (recombinaseA), *glnA* (glutamine synthetase typeI), *gltA* (citrate synthase I), *thrC* (threonine synthase), *dnaK* (heat shock protein Hsp70) chez douze espèces de référence de *Ensifer* connues en comparaison de l'ADNr 16S. Les résultats montrent que le signal phylogénétique obtenu avec l'ADNr 16S n'est pas congruent avec celui des autres gènes de ménage. Ceci suggère la possibilité de recombinaisons dans l'ARNr16S entre les rhizobia (van Berkum *et al.*, 2003 ; Vinuesa *et al.*, 2005b). Par contre, une congruence significative a été obtenue avec trois gènes de ménage ; *dnaK*, *glnA* et *thrC*. Ceci suggère que l'utilisation des séquences de l'ADNr 16S comme seul marqueur dans le genre *Ensifer* pourrait être insuffisant pour une caractérisation fiable. Dans une seconde étape, ces auteurs ont comparé l'homologie de séquence inter et intra spécifique entre les espèces de *Ensifer* (figure12) et qui a révélé une discrimination plus nette entre les espèces avec les cinq gènes de ménage comparée à celle de l'ADNr 16S.

La technique MLSA devrait prendre une place grandissante en taxonomie, du fait de la relative facilité de sa mise en œuvre, de la disponibilité des séquences de différents gènes déposées dans les banques de données et qui sont comparables dans l'espace et le temps.

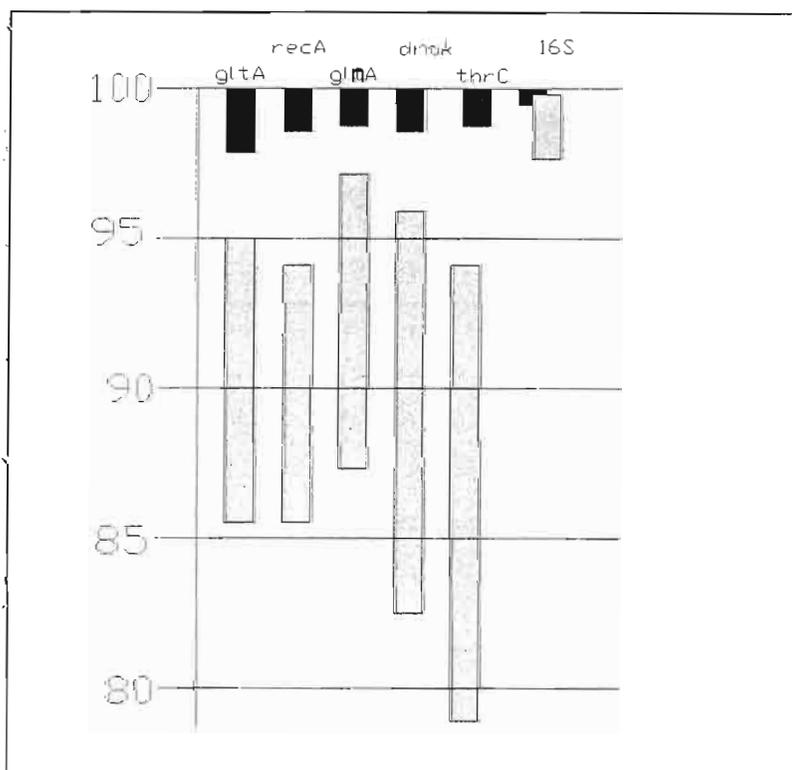


Figure 12 : Schéma montrant le degré d'homologie de séquence de six gènes de ménage entre les différentes espèces connues de *Ensifer*

(d'après Martens *et al.*, 2007)

- Similarité des séquences intra-espèce de *Ensifer*
- Similarité des séquences inter-espèce de *Ensifer*

1.5.2.2 Les puces à ADN :

La mesure simultanée du niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes, voire d'un génome entier, dans un grand nombre de conditions est actuellement possible grâce au développement de la technologie des puces à ADN. Les puces à ADN permettent aussi de détecter la présence ou l'absence d'un gène et donc de caractériser les différences de contenu génétique entre deux isolats d'une même espèce. Les puces à ADN reposent sur le principe d'hybridation moléculaire entre deux acides nucléiques simples brins. Cette hybridation moléculaire s'effectue lorsque deux brins sont complémentaires. Les quelques centaines de séquences d'ADN recherchées sont déposées sur un support. Les fragments d'ADN fixés à la surface de la puce sont appelés « sondes » ou « probe » en anglais, et les séquences nucléiques contenues dans l'échantillon à analyser sont appelés « cibles » ou « target » en anglais (Bowtell et Sambrook, 2003). Cet ensemble constitue la puce à ADN. La détection de ces hybridations, après lavage de l'ADN hybridé de manière non spécifique, s'effectue soit par détection de la fluorescence soit de la radioactivité (Glasser, 2005).

Les puces à ADN sont largement utilisées pour des applications variées telles que l'analyse du transcriptome, la détection de mutation, la génomique comparative ou l'identification des bactéries (Cho et Tiedje, 2001 ; Koide *et al.*, 2004 ; Lockhart et Winzeler, 2000). Cependant cette approche est marginalisée dans la détection de gènes environnementaux particuliers dû à la variabilité considérable entre un gène donné d'un génome à l'autre ce qui rend impossible la représentation sur une puces de tous les allèles possibles d'un même gène.

Cette méthode fournit un grand nombre d'informations pour un grand nombre d'applications (Wang *et al.*, 1998 ; Drmanac *et al.*, 2002). L'utilisation des puces ADN pour des discriminations avec un seul mismatch ont récemment été décrites (Zwick *et al.*, 2005). Les contraintes budgétaires et la difficulté de réalisation de cette technique limite son utilisation à un nombre restreint d'organismes. Néanmoins, des méthodes de microarrays plus simples et moins onéreuses ont été récemment adaptées pour des études de diversité (Avarre *et al.*, 2006). Une application de cette nouvelle méthode simplifiée par l'utilisation de deux oligonucléotides qui se fixent sur des loci spécifiques et qui ne demandent pas de marquage radioactif a été appliquée pour le génotypage de 33 souches de *E. medicae*/ *E. meliloti* (Bailly *et al.*, 2006). Les puces à ADN ont également été utilisées pour la détection et le typage du gène *nodC* chez des rhizobia. Cette analyse du gène *nodC* obtenu d'un ADN extrait directement des bactéries présentes dans les nodules a permis non seulement la détection de séquences connues ainsi que de nouvelles séquences *nodC* qui a permis de classer les souches

en fonction de la séquence nucléotidique de ce gène mais également le typage du gène *nodC* en s'affranchissant de la culture en préalable de l'endosymbiote (Boivin-Masson *et al.*, 2006).

1. 5. 3 Performances symbiotiques :

Chez les rhizobia les performances symbiotiques avec l'hôte végétal est un critère important pour inclure une bactérie dans la famille des BNL. La proposition d'une nouvelle espèce doit comporter l'étude du spectre d'hôte présent dans la région d'isolement.

De même, l'analyse des séquences de gènes de nodulation (*nod*, *noe* ou *nol*) ou de fixation d'azote (*nif*, *fix*) peut fournir également d'importantes informations pour la description d'écotypes ou de biovars (Amarger *et al.*, 1997 ; Laguerre *et al.*, 2001 ; Silva *et al.*, 2003).

Toutes ces méthodes de caractérisation ont permis de classer les rhizobia dans un ordre hiérarchique bien défini.

1. 6 Classification actuelle des BNL:

Les BNL comportent à ce jour 13 genres et plus de 56 espèces (Willems, 2006 ; N'zoué *et al.*, 2007)(tableau 2), tous classés dans les Protéobactéries et sont réparties en 9 groupes monophylétiques. La plupart appartiennent à la subdivision alpha des Protéobactéries dans les genres : *Rhizobium* (Frank, 1889), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988), *Allorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998a), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) et plus récemment *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2003), *Blastobacter* (van Berkum et Eardly, 2002), *Ensifer* (Willems *et al.*, 2003a), *Ochrobactrum* (Ngom *et al.*, 2004) et *Phyllobacterium* (Mantelin *et al.*, 2006). Au cours des dernières années, des BNL ont été aussi découvertes dans les beta Protéobactéries, dans les genres *Burkholderia* sp. (Moulin *et al.*, 2001) et *Ralstonia* (Chen *et al.*, 2001). Récemment, Benhizia *et al.* (2004), ont décrit l'association entre des légumineuses du genre *Hedysarum* et des souches appartenant à la subdivision gamma des Protéobactéries comme *Pantoea*, *Enterobacter*, *Leclercia*, *Esherichia* et *Pseudomonas*. Cependant, leur aptitude à induire des nodules sur leur plante hôte n'a pas été clairement démontrée.

Dans la classification actuelle des BNL, les espèces dont la nodulation n'a pas été confirmée ont été omises car elles ne répondent pas aux critères majeurs de BNL. Néanmoins, certaines de ces espèces ont bien été isolées de nodules de légumineuses. Han *et al.* (2005) ont identifié 33 isolats de *Phaseolus vulgaris*, *Campylotropis* spp. et *Cassia* spp., comme

appartenant à l'espèce *Agrobacterium tumefaciens* et Liu *et al.* (2005) ont démontré que des isolats de la légumineuse ligneuse *Wisteria sinensis* appartiennent à l'espèce *Agrobacterium*.

Paradoxalement, certains genres de BNL peuvent contenir des espèces non effectives. Ainsi, *Bradyrhizobium betae* forme des tumeurs sur *Beta vulgaris* mais n'est pas connu pour la fixation d'azote (Rivas *et al.*, 2004). *Mesorhizobium thiogangeticum* est une bactérie sulfoxydante et ne nodule pas les légumineuses testées : *Clitoria ternatea*, *Pisum sativum* et *Cicer arietinum* (Ghosh et Roy, 2006).

Plusieurs révisions taxonomiques ont été faites avec le genre *Cupriavidus*, nommé auparavant *Wausteria* et *Ralstonia*. Le genre contient une seule espèce de BNL (*Cupriavidus taiwanensis*) qui nodule le *Mimosa* spp., les dix autres espèces sont non symbiotiques (Euzéby, 1997).

1. 6. 1 De *Sinorhizobium* à *Ensifer* : nomenclature d'un genre soumis à controverse :

Le genre *Sinorhizobium* est l'un des genres qui comporte un grand nombre d'espèces numériquement dans la famille des Rhizobiaceae. Il renferme plusieurs espèces importantes en agronomie par leur infectivité et efficacité avec une grande diversité de légumineuses ligneuses et herbacées.

Actuellement, ce genre renferme 15 espèces, la majorité décrite sur la base d'une étude de taxonomie polyphasique. Le genre *Sinorhizobium* constitue un cluster à part dans la famille Rhizobiaceae qui comporte également *Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Agrobacterium* par analyse de l'ADNr 16S.

La taxonomie du genre a subi de nombreux remaniements. Le genre a été proposé en premier par Chen et collaborateurs (1988) avec deux espèces : *S. fredii* et *S. xinjiangensis* à croissance rapide nodulant le soja sur la base d'une analyse numérique. Cette description fut réfutée par Jarvis *et al.* (1992) du fait que *S. fredii* est phylogénétiquement proche de *Rhizobium meliloti* (Jordan, 1984). *S. fredii* fut reclassé dans le genre *Rhizobium* et la validité taxonomique de *S. xinjiangensis* remise en cause. Deux ans plus tard, en 1994, de Lajudie et collaborateurs, démontrent par une analyse polyphasique incluant des tests phénotypiques (galeries API), profils protéiques par SDS-PAGE et des tests génotypiques (séquençage de l'Hybridations ADN-ADN) que des isolats de différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania* constituaient deux espèces génomiques rattachées à la branche phylogénétique *R. fredii*-*R. meliloti*. Cette branche phylogénétique a été individualisée par la création d'un nouveau genre, répondant aux règles de nomenclature et de taxonomie et le nom *Sinorhizobium* a été

confirmé. *R. fredii* et *R. meliloti* ont été reclassées dans le genre *Sinorhizobium* avec deux chemovars pour *S. fredii* (chemovar *fredii* et *siensis*, de Scholla et Elkan, 1984). Ce genre renferme aussi d'autres espèces *S. saheli* (biovars *acaciae* et *sesbaniae* de Haukka *et al.*, 1998) et *S. teranga* (biovar *acaciae* et *sesbaniae* de Lortet *et al.*, 1996) rectifiées ultérieurement en *S. sahelense* et *S. terangae* de Trüper et de Clari, 1997, nodulant les espèces du genre *Sesbania* et *Acacia* (de Lajudie *et al.*, 1994).

D'autres espèces ont été ensuite décrites : *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996) associée au genre *Medicago*, *S. arboris* et *S. kostiense* (Nick *et al.*, 1999) associées à *Prosopis chilensis* et *Acacia senegal*. *S. kummerowiae* a été isolée de *Kummerowia stipulacea* au Nord-Ouest de la Chine (Wei *et al.*, 2002), *S. morelense* (Wang *et al.*, 2002) et *S. americanum* (Toledo *et al.*, 2003) isolées d'*Acacia* spp. du Mexique et plus récemment *S. mexicanum* isolée d'*Acacia angustissima* (Lloret *et al.*, 2007). Deux espèces de *Sinorhizobium* ont été décrites par Ogasawara *et al.*, 2003 : *S. abri* et *S. indiaense*, isolées de légumineuses tropicales mais qui n'ont pas été encore validées par l'International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

Le genre *Sinorhizobium* a été récemment reclassé en *Ensifer* sur la base de similarité des séquences d'ADN (Willems *et al.*, 2003a, Young, 2003). *Ensifer adhaerens* est une bactérie tellurique qui adhère à d'autres cellules bactériennes et peut causer leur lyse dans le cas d'absence de nutriments dans le sol (Casida, 1982). La souche type de l'espèce ATCC 33499 qui est à l'origine non effective avec les légumineuses, peut par acquisition du plasmide symbiotique de *Rhizobium tropici* devenir infective avec *Phaseolus vulgaris* et *Leucaena leucocephala*. (Rogel *et al.*, 2001), démontrant ainsi sa capacité à devenir une BNL. Depuis, d'autres souches de *E. adhaerens* infectives ont été identifiées. L'analyse de l'ADNr 16S et des séquences *recA* montrent que ces souches forment une seule branche avec *Ensifer* (Willems *et al.*, 2003a) et par conséquent ces auteurs proposent de renommer ces souches en *Sinorhizobium adhaerens*. Cependant, *Ensifer* (Casida, 1982) est la première nomenclature donnée à l'espèce *E. adhaerens* et de ce fait est prioritaire à *Sinorhizobium adhaerens* (Young, 2003).

Ainsi, en application des lois de la nomenclature bactérienne (Lapage *et al.*, 1990) toutes les espèces de *Sinorhizobium* spp., doivent être renommées en *Ensifer* spp.

Dans notre travail, *Ensifer* est utilisée pour désigner les souches anciennement nommées *Sinorhizobium*.

Tableau 2 : Classification de bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses

Espèces	Plantes hôtes	Références
<i>Rhizobium</i>		Frank, 1889
<i>R. leguminosarum</i>		Frank, 1889; Jordan, 1984
biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>	Frank, 1889 ; Jordan, 1984
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Frank, 1889 ; Jordan, 1984
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Frank, 1889; Jordan, 1984
<i>R. tropici</i>		
Type II A	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
Type II B	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
<i>R. etli</i>		Segovia <i>et al.</i> , 1993;
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>	Hernandez-Lucas <i>et al.</i> , 1995
<i>R. etli</i>		
biovar <i>mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999a
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> , <i>Stylosanthes</i> , <i>Centrosema</i> , <i>Tephrosia</i> , <i>Acacia</i> , <i>Zornia</i> , <i>Macroptilium</i> .	Chen <i>et al.</i> , 1997
<i>R. gallicum</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	van Berkum <i>et al.</i> , 1998
<i>R. galegae</i>		Lindström, 1989
biovar <i>orientalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Radeva <i>et al.</i> , 2001
biovar <i>officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	Radeva <i>et al.</i> , 2001
<i>R. giardinii</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini <i>et al.</i> , 2002
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> , <i>Lespedeza</i>	Wei <i>et al.</i> , 2003
<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla</i> , <i>Amphicarpaea</i> , <i>Gueldenstaedtia</i>	Tan <i>et al.</i> , 2001
<i>R. daejeonense</i>	<i>Medicago</i>	Quan <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhizobium lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2006

<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	isolated from sawdust of <i>Populus alba</i>	García-Fraile <i>et al.</i> , 2007
<i>Mesorhizobium</i>		
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Anthyllis</i> , <i>Leucaena</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Acacia spp.</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
biovar <i>loti</i>		Turner <i>et al.</i> , 2002
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> , <i>Sophora</i> , <i>Caragana</i> , <i>Halimodendron</i> , <i>Swainsonia</i> , <i>Glycine</i>	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velasquez <i>et al.</i> , 2001
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao <i>et al.</i> , 2004
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao <i>et al.</i> , 2004
<i>M. thioanganeticum</i>	<i>Rhizosphère de Clitoria ternatea</i>	Ghosh et Roy, 2006
<i>Ensifer (Sinorhizobium)</i>		Young, 2003.
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>	Young, 2003
biovar <i>meliloti</i>		Villegas <i>et al.</i> , 2006
biovar <i>acaciae</i>		Bâ <i>et al.</i> , 2002
biovar <i>medicaginis</i>	<i>M. lasciniata</i> , <i>M. sauvagei</i>	Bena <i>et al.</i> , 2005; Villegas <i>et al.</i> , 2006
<i>E. fredii</i>		Scholla et Elkan, 1984; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
chemovar <i>fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
chemovar <i>siensis</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
<i>E. xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i> ,	Chen <i>et al.</i> , 1988
<i>E. sahelense</i>	<i>Sesbania spp.</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia spp.</i>	Boivin et Giraud, 1999
biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania spp.</i>	Boivin et Giraud, 1999
<i>E. terangae</i>		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Trüper et de Clari, 1997
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia spp.</i>	Lortet <i>et al.</i> , 1996
biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania spp.</i>	Lortet <i>et al.</i> , 1996
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago spp.</i>	Rome <i>et al.</i> , 1996

<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>E. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i> spp.	Toledo <i>et al.</i> , 2003
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002
<i>E. adhaerens</i>	<i>Sesbania, Medicago</i>	Casida, 1982
<i>E. mexicanum</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret <i>et al.</i> , 2007
<i>Ensifer abri</i>		Ogasawara <i>et al.</i> , 2003
<i>Ensifer indiaense</i>		Ogasawara <i>et al.</i> , 2003
<i>Allorhizobium</i>		de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
<i>Devosia</i>		
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2003
<i>Azorhizobium</i>		
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Azorhizobium</i> sp.	<i>Sesbania rostrata</i>	Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Moreira <i>et al.</i> , 2006
<i>Bradyrhizobium</i>		Jordan, 1982
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Kirchner, 1896; Jordan, 1984
biovar <i>genistearum</i>		Vinuesa <i>et al.</i> , 2004
biovar <i>glycinearum</i>		Vinuesa <i>et al.</i> , 2004
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
biovar <i>glycinearum</i>		Vinuesa <i>et al.</i> , 2004
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i> spp.	Yao <i>et al.</i> , 2002
<i>B. betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2004
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae et Loteae plants</i>	Vinuesa <i>et al.</i> , 2005c
biovar <i>genistearum</i>		Vinuesa <i>et al.</i> , 2005c
biovar <i>glycinearum</i>		Vinuesa <i>et al.</i> , 2005c
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna, Lupinus, Mimosa</i>	Jordan, 1982
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Acacia</i>	Dupuy <i>et al.</i> , 1994
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Aeschynomene</i>	Alazard, 1985; Young <i>et al.</i> , 1991
<i>Blastobacter</i>		
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>	van Berkum et Eardly, 2002
<i>Methylobacterium</i>		
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i> spp.	Sy <i>et al.</i> , 2001; Jourand <i>et al.</i> , 2004
<i>Burkholderia</i>		

<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Machaerium lunatum, Aspalatus</i>	Moulin <i>et al.</i> , 2001
<i>B. caribensis</i>		
<i>B. cepacia</i>		
<i>B. tuberum</i>		Vandamme <i>et al.</i> , 2003
<i>B. phymatum</i>		Vandamme <i>et al.</i> , 2003
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i> spp.	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Cupriavidus (Ralstonia)</i>		
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i> spp.	Chen <i>et al.</i> , 2001; Vaneechoutte <i>et al.</i> , 2004
<i>Ochrobactrum</i> sp.		Ngom <i>et al.</i> , 2004
<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	Trugillo <i>et al.</i> , 2005
<i>Herbaspirillum</i>		
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2003
<i>Phyllobacterium</i>		
<i>P. lupini</i>	<i>Trifolium pratense ; Lupinus</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2005
<i>P. trifolii</i> <i>P. ifriqiense</i> <i>P. leguminum</i>		Mantelin <i>et al.</i> , 2006
<i>Gamma-Proteobacteria</i>	<i>Hedysarum carnosum, Hedysarum spinosissimum</i> subsp. <i>capltatum</i> , <i>Hedysarum pallidum</i>	Benhizia <i>et al.</i> , 2004

1. 7 La rhizobiologie au Maghreb :

Les études sur les légumineuses et leurs microsymbiotes se sont multipliées ces dernières années au Maghreb (Tunisie, Maroc, Algérie) en raison de l'endémisme de certaines espèces et leur présence spontanée dans différents milieux. Ces légumineuses représentent un potentiel intéressant à exploiter dans des projets réhabilitation des terres dégradées, la lutte contre la désertification, leur intérêt fourrager et/ou pastoral, Agronomique et pour la sécurité alimentaire.

La Tunisie est le leader dans les études sur la diversité des rhizobia associés à de nombreuses légumineuses notamment les espèces fourragères présentes dans les zones infra-arides. Ben Romdhane *et al.* (2006) ont identifié génétiquement les microsymbiotes d'*Acacia tortillis* ssp. *raddiana* présentes en Tunisie et démontrent une grande diversité des rhizobia associés, proches d'*Ensifer* ssp., *Rhizobium tropici* et *Agrobacterium tumefaciens*. Jebara *et al.* (2001) ont identifié les partenaires symbiotiques de différentes variétés de *Medicago*

cultivées en Tunisie dont *Medicago ciliaris*, *M. sativa* cv. Gabes et *M. scutellata* cv. Kelson dont les microsymbiotes s'apparentent à *Ensifer*. Ces mêmes auteurs rapportent que les régions IGS situées entre les gènes *nifD* et *nifK* permettent une nette discrimination entre *E. medicae* et *E. meliloti*, les deux espèces du genre les plus proches phylogénétiquement. La diversité de ces deux espèces a également été étudiée sur trois sols en Tunisie par piégeage avec 4 variétés de *Medicago truncatula* (Zribi *et al.*, 2005). Ces études ont montré la dominance de l'espèce *Ensifer medicae* dans les différents sols. D'autres auteurs (Zakhia *et al.*, 2004) ont focalisé leur études sur les rhizobia associées aux légumineuses spontanées de la zone infra-aride de la Tunisie et peu étudiées (*Argyrobium uniflorum*, *Coronilla*, *Astragalus*, *Anthyllis*, *Ebenus*, *Genista* et *Lotus*) et rapportent la présence de *Rhizobium galegae* associé à *Astragalus crutiatus*, *Lotus creticus* et *Anthyllis henoniana*. Mantelin *et al.* (2006) ont enrichi la taxonomie des rhizobia avec deux espèces de *Phyllobacterium* : *P. leguminum* isolée des nodules racinaires d'*Argyrobium uniflorum* et *Astragalus algerianus* et *P. ifriqiyense* isolée des nodules racinaires d'*Astragalus algerianus* et *Lathyrus numidicus*.

La diversité des rhizobia des légumineuses alimentaires de Tunisie a également été étudiée, notamment ceux associés aux haricots (*Phaseolus vulgaris*) et aux pois chiche (Chickpea) (Mhamdi *et al.*, 2002 ; Aouani *et al.*, 2001). Mhamdi *et al.* (2005) ont démontré la présence de souches d'*Agrobacterium* non infectives dans les nodules des haricots co-inoculés avec une souche infectieuse de *Rhizobium*. Ils ont démontré que cette co-inoculation (*Agrobacterium/Rhizobium*) n'améliore pas la nodulation ou le rendement des haricots, comparé au témoin inoculé juste avec la souche de *Rhizobium*. Plus tard, Mrabet *et al.* (2006) démontrent qu'une inoculation de haricot cultivé sur du sol non stérile avec un mélange de souches d'*Agrobacterium* isolées de nodules de haricot augmente significativement la nodulation de ces plantes et leur croissance. Cette inoculation semble favoriser l'infection de la légumineuse avec des souches de *E. medicae* et exerce par contre un effet antagoniste vis-à-vis des souches de *Rhizobium gallicum*.

Au Maroc, beaucoup d'études ont été réalisées sur la tolérance à la salinité et les mécanismes d'osmorégulation chez les rhizobia isolés de différentes légumineuses. Brhada *et al.* (1997) ont étudié le transport de la glycine bêtaïne et de la choline chez trois souches isolées de nodules de *Vicia faba* var. Major et une souche isolée de *Cicer arietinum* L. en zone semi-aride. Ces auteurs ont montré que dans des conditions de stress salin l'ajout de Glycine bêtaïne ou Choline dans le milieu de culture joue un rôle bénéfique dans la croissance de ces souches et montrent que les deux substances sont transportées par la cellule à faible osmolarité avec une stimulation de transport de la Glycine bêtaïne à 0,15 M NaCl.

Ben Khaled *et al.* (2003) ont montré que l'application d'un stress salin en milieu hydroponique à des plantules de trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) inoculées avec des souches de *Rhizobium* affecte la nodulation à partir de 2 g/L de NaCl alors que la croissance n'est affectée qu'à une double dose de NaCl et montrent que le stress salin est accompagné de modifications biochimiques et ultrastructurales chez la plante. Abdelmoumen *et al.* (1999) ont démontré la haute tolérance d'isolats de *Trigonella foenum greacum* à des concentrations élevées de NaCl pouvant atteindre 10 % et de 14 %. Ces souches semblent avoir la capacité d'accumuler le glutamate, la proline et la Glycine betaine mais non le CaCl₂. Bouhmouche *et al.* (2001) démontrent que des souches osmotolérantes isolées de *Phaseolus vulgaris* dans des zones salées du Maroc avaient une viabilité différente lorsqu'elles étaient cultivées en présence de concentration minimale inhibitrice de sel. Ils recommandent fortement de prendre en considération le critère de viabilité des souches, notamment celles destinées à l'inoculation destinée en zones salées.

Plusieurs études sur la diversité des rhizobia isolés de légumineuses ligneuses comme les *Acacia* présentes dans les zones arides et sahariennes ont été réalisées (Zerhari *et al.*, 2000 ; Khbaya *et al.*, 1998). Certaines souches isolées de ces légumineuses peuvent tolérer jusqu'à 1 M de NaCl et semblent accumulé le glutamate et le mannosucrose dans leur cytoplasme pour ajuster leur osmolarité (Essendoussi *et al.*, 2007).

En Algérie, beaucoup d'études ont été réalisées sur les légumineuses spontanées et endémiques (Quezel et Santa, 1962), notamment celles sur les *Medicago* annuelles et cultivées (Abdelguerfi, 1978 ; Abdelguerfi *et al.*, 1988 ; Abdelguerfi *et al.*, 2000 ; Yahiaoui et Abdelguerfi, 1995) et sur le trèfle (Issolah et Abdelguerfi, 1995).

Parallèlement, moins d'études ont été réalisées sur leurs partenaires symbiotiques. Les travaux les plus importants sont ceux de Benhizia *et al.* (2004) qui ont démontré pour la première fois que des BNL de la classe des gamma Proteobacteriaceae étaient isolées de nodules de *Hedysarum* (*H. carnosum*, *H. spinosissimum* et *H. pollidum*). Dans la littérature, les BNL spécifiques à *Hedysarum coronarium* ont été identifiées comme *Rhizobium sullae* (Squartini *et al.*, 2002).

Sebbane *et al.* (2006) ont réalisé une étude de caractérisation des bactéries isolées des espèces annuelles de *Medicago* dans la vallée du Soummam et découvrent que l'espèce *Medicago orbicularis* est associée à une souche STM 966 proche de *R. galegae*. Dans la littérature, les partenaires connus de *Medicago orbicularis* appartiennent aux espèces *E. medicae* ou *E. meliloti* (Rome *et al.*, 1996). Quand aux souches de *R. galegae*, sont généralement spécifiques

de *Galega orientalis* et *Galegae officinalis* dans le Caucase (Lindström, 1989) et découvertes aussi en Italie, Bulgarie et Tunisie (Radeva *et al.*, 2001 ; Zakhia *et al.*, 2004).

Certains auteurs se sont plus intéressés aux légumineuses spontanées de quelques zones salées de l'Algérie et ont étudié la diversité des bactéries associées (Bekki, 1986 ; Bekki *et al.*, 1987 ; Bekki, 1994 ; Bekki, 1996 ; Bekki, 1997 ; Bekki *et al.*, 1999). Ces chercheurs ont essayé de comprendre les mécanismes qui ont permis l'établissement et le maintien de l'association rhizobial/ *Medicago* présentes dans les Sebkhas. Les recherches dans ce sens sont encore entreprises.

Dans les zones arides du sud de l'Algérie, Kaci *et al.* (2005) ont identifié des nouvelles molécules d'exopolysaccharides (EPS) produites par la souche KYGT207 identifiée comme *R. sultae* et qui semble favoriser l'acquisition de l'eau et des nutriments dans la rhizosphère de *Triticum durum* L. la présence de cette souche dans le sol et sa production d'EPS joue également un rôle dans l'agrégation des particules du sol.

Prenant conscience de l'intérêt de la symbiose dans les pays du Maghreb, les études sur les deux partenaires de la symbiose se sont multipliées ces dernières années afin de mieux comprendre ces associations et de ce fait de mieux l'exploiter notamment en zones à stress pédoclimatique.

1. 8 L'inoculation pour l'agriculture et l'environnement :

Dans les écosystèmes semi-arides et arides, la sécheresse et le manque de nutriments notamment l'azote et le phosphore assimilables rendent les sols peu fertiles, ajouté au problème de salinité (Zahran, 1997). Ces facteurs rendent la récolte médiocre et détruisent le couvert végétal.

Il existe des moyens pour pallier à cette médiocrité et tenter d'augmenter la fertilité de ces sols et les rendre plus productifs.

Parmi les solutions proposées, celle de l'utilisation de variétés de plantes à rendement élevé. Mais qu'attendre d'elles sur un sol peu fertile et dans des conditions climatiques peu propices. Il est possible de penser à l'apport d'engrais chimiques, mais ces derniers en plus de leur coût élevé notamment pour les pays pauvres, présentent également des risques de pollution de l'environnement. L'emploi de boues des eaux d'épuration et les déjections d'animaux peut également améliorer les rendements agricoles et présentent l'avantage d'être moins onéreux que les engrais chimiques et riches en azote et en phosphore (Fahmy *et al.*,

1997 ; Ferreira et Castro, 1995), mais ils présentent également l'inconvénient de contenir généralement des taux élevés de métaux lourds toxiques, rendant leur utilisation dangereuse.

S'orienter vers les végétaux capables symbiotiquement de fixer l'azote de l'air semble une voie prometteuse car elle permet de s'affranchir de l'utilisation des engrais azotés chimiques. Néanmoins, pour l'établissement de ces légumineuses dans ces sols pauvres, il est important qu'elles puissent s'associer efficacement avec des rhizobia adaptées aux contraintes du milieu et spécifiques à la légumineuse. Hélas, les souches effectives ne préexistent pas toujours dans ces sols. Il convient alors d'inoculer soit le sol, soit les graines qu'on lui confie. Obaton et Blachère (1965) estimaient que l'inoculation peut être raisonnablement conseillée lorsque l'on veut établir une luzernière en sol acide, chaulé depuis peu. La bactérisation des semences a fait de gros progrès dans les pays développés.

Les Premières méthodes d'inoculation comprenaient l'apport dans les nouveaux champs de tonnes de sol des terrains où poussaient les légumineuses en question. Cette méthode encombrante de transfert de sol fut probablement responsable de la naissance de l'industrie actuelle de production d'inoculums. C'est dès la fin du dix-neuvième siècle que les bactéries symbiotiques des légumineuses ont été commercialisées et utilisées à grande échelle pour améliorer la fixation de l'azote des plantes fourragères comme le trèfle et la luzerne.

80 % à 90 % des surfaces cultivées en luzerne sont ensemencées chaque année, aux Etats Unis, avec des souches effectives de *E. meliloti* et environ 10000 ha en France sur terres acides (Davet, 1996).

Dans de nombreux essais, l'inoculation a augmenté considérablement le rendement des cultures. Van der Heijden *et al.* (2006) ont montré que l'inoculation du microcosme avec un mélange de rhizobia augmente la production des légumineuses et d'autres plantes présentes dans les prairies ainsi que leur teneur en azote comparé au témoin non inoculé. L'inoculation de semences de luzernes par des souches de *E. meliloti* sensibles à l'acidité a permis le développement de la bactérie dans la rhizosphère et l'implantation de la légumineuse dans un sol acide. L'inoculation de cultivars de *M. truncatula* et *M. polymorpha* originaires de la zone semi-aride de Tunisie avec une souche de *E. meliloti* indigène a augmenté le rendement en poids sec et la teneur en azote de ces plantes (Mezni et Sifi, 1996). Récemment, il a été suggéré d'inoculer les légumineuses herbacées spontanées telles que *Argyrolobium flaccidum*, *Astragalus graveolens* et *Indigofera gangetica* pour augmenter la production de couverture végétale et la fertilité du sol (Jha *et al.*, 1995). Des études montrent que les rhizobia isolées de légumineuses sauvages semblent performantes avec d'autres légumineuses. Ainsi, des souches de *Rhizobium* isolées d'*Astragalus cicer* sont effectives

avec *Medicago sativa* et *Phaseolus vulgaris* (Zhao *et al.*, 1997) de même que des rhizobia isolés de régions désertiques en Egypte sont effective avec *Vicia faba* et *Pisum sativum*.

Dans les zones arides et salées, la sélection de rhizobia tolérantes au stress pour l'inoculation est importante. Des rhizobia qui établissent une symbiose fixatrice d'azote avec une viabilité dans des conditions de stress ont été identifiés (Fuhrmann *et al.*, 1986 ; Jenkins *et al.*, 1989). D'autres compétitifs et capables de tolérer des températures élevées (35-40°C) et une sécheresse forte (Wadisirisuk *et al.*, 1989). Des souches de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* tolérant des températures élevées, forment une symbiose effective avec leur plante hôte (Hungria *et al.*, 1993 ; Michiels *et al.*, 1994).

Une autre voie d'amélioration de la production végétale est la double inoculation des légumineuses avec des rhizobia et des champignons mycorhiziens. Cette méthode qui a fait ses preuves dans l'adaptation des légumineuses aux régions arides. Ainsi il a été démontré que des *Acacia* et de *Leucaena* mycorhizées tolèrent plus le stress hydrique (Robson et Bottomley, 1991) que celles qui sont juste inoculées avec des rhizobia. Requena *et al.* (2001) ont montré que l'introduction de plantes indigènes associées à un inoculum microbien (rhizobia / champignon mycorhizien) augmentent significativement la teneur en azote du sol, la matière organique et améliore la texture de sols désertifiés dans les écosystèmes méditerranéens.

Pour la réussite d'une inoculation, la sélection de souches effectives avec la plante cible est donc primordiale. Les souches destinées à l'inoculum doivent en plus des propriétés symbiotiques présenter un certain nombre de caractéristiques :

Les souches doivent être compétitives avec les souches indigènes. Athar et Johnson, (1996) rapportent que l'utilisation de deux mutants de *E. meliloti* compétitives avec les souches indigènes de la luzerne, se sont avérées efficaces sous stress hydrique. Ces résultats montrent que la nodulation, la croissance et la fixation de l'azote chez la luzerne comme pour d'autres légumineuses peuvent être améliorées par l'inoculation avec des souches compétitives. Les souches inoculum doivent être résistante à l'action létale de divers facteurs physiques (température élevée, dessiccation) chimiques (pH, substances toxiques dont les produits fongicides) et biologiques (phages). Elles doivent entre autre avoir un niveau d'adaptation important du niveau de fertilité du sol (il a été démontré que certaines souches sont plus aptes que d'autres à la fixation en présence de fortes doses d'azote combiné ou dans des sols carencés en potassium). Les souches doivent aussi être persistantes dans le sol et avoir un bon taux de survie pendant la préparation de l'inoculum et dans le sol. A ce sujet, il est important de rappeler que les normes françaises exigent la présence d'un nombre élevé de la souche spécifique dans l'inoculum (environ 1 million de bactéries /g pour le soja et 5000

bactéries/g pour la luzerne) (Le Tacon et Obaton, 1984) des doses moins importantes réduiraient la chance de nodulation de la souche introduite notamment en présence de souches autochtones.

Pour leur commercialisation, les inoculums se présentent sous trois formes : solide, liquide ou lyophilisés. Les plus utilisés sont les inoculums sous forme solide, notamment ceux utilisant un support de tourbe. D'autres inclus dans des billes d'alginate sont également efficaces. Sarr *et al.* (2005) démontrent que l'inoculation d'*Acacia* (*Acacia nilotica* et *Acacia senegal*) avec un inoculum dans des billes d'alginate a augmenté considérablement la croissance de ces deux arbres. Le plus important dans le choix du support de l'inoculum est celui qui permet de maintenir le plus grand nombre de cellules vivantes.

Les inoculums commercialisés doivent contenir une date d'expiration, indiquant les risques d'une diminution du nombre viable de rhizobia dans l'inoculum au-delà de la date indiquée (Erker et Brick, 2006). Enfin il est très important de vérifier l'innocuité de l'inoculum avant son application dans le sol et l'absence de contaminants. Les enquêtes sur la qualité d'inoculums de *Rhizobium* formulés sur tourbes sont inquiétantes (Olsen *et al.*, 1995). Sur 40 échantillons prélevés dans des lots non périmés vendus au Canada par des compagnies américaines, 39 contenaient davantage (des fois jusqu'à 1000 fois plus !) de contaminants que des cellules de *Rhizobium*. Plusieurs de ces contaminants étaient fortement inhibiteurs de *Rhizobium in vitro* et l'un deux *Pseudomonas aeruginosa*, était une bactérie potentiellement pathogène pour l'homme. La réglementation à ce sujet est stricte et exige un contrôle de qualité.

Chapitre II

Matériels & Méthodes

2. Matériels et Méthodes

2. 1 Isolement des bactéries à partir de nodules :

Les nodules récoltés à partir de racines de plantes *in-natura* ou par piégeage au laboratoire ont été soit directement utilisés pour l'isolement ou conservés secs dans des tubes contenant du gel de silice ou du CaCl_2 (Date, 1982) surmonté de coton cardé. Au laboratoire, les nodules sont réhydratés dans de l'eau distillée stérile (pendant une demi-heure) dans des tubes Eppendorf. Après avoir éliminé l'eau, les nodules sont stérilisés en surface par immersion dans de l'hypochlorite de calcium à 3 % (m/v) pendant 3 min. Ensuite, ils sont rincés 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace d'hypochlorite de calcium. Chaque nodule est écrasé dans un tube Eppendorf stérile dans deux gouttes d'eau stérile à l'aide d'un bâton stérile en plastique. Une goutte du broyat obtenu est étalée à l'aide d'une öse sur milieu YMA en boîte de Pétri (Vincent, 1970).

▪ Milieu YM (Vincent, 1970)

Utilisé pour la culture courante des souches de BNL, et pour l'obtention de cellules en vue d'une préparation d'ADN. La composition en g/L : mannitol : 10 g ; glutamate de sodium : 0,5 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g ; NaCl : 0,05 g ; CaCl_2 : 0,04 g ; FeCl_3 : 0,004 g ; extrait de levure: 1 g.

Le pH du milieu est ajusté à 6,8 avec du HCl 0,1 N.

Le milieu gélosé (YMA) correspondant est obtenu par addition de 20 g/L d'agar-agar.

Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120°C.

2. 2 Vérification de la pureté des souches :

2. 2. 1 Vérification de la pureté des souches par repiquage et microscopie :

La pureté des souches est vérifiée par épuisement sur milieu YMA jusqu'à l'obtention de colonies isolées. Il est conseillé d'observer les colonies à l'aide d'une loupe binoculaire afin de vérifier leur pureté après épuisement. La pureté des cultures est vérifiée par observation au microscope optique des préparations de cultures entre lame et lamelle à l'état

frais ce qui permet de vérifier l'homogénéité des cellules, les différentes formes présentes, et leur mobilité.

2. 2. 2 Coloration de Gram :

Un contrôle supplémentaire par la coloration de Gram permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries qui sont à Gram négatif (comme les rhizobia) et les autres bactéries à Gram positif. La coloration de Gram doit son nom au médecin danois Hans Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884 (Microsoft® Encarta® 2006. © 1993-2005 Microsoft Corporation. Tous droits réservés).

Les étapes du protocole sont les suivantes : Les cellules sont fixées à la flamme. Ensuite le violet de Gentiane est ajouté (1-2 min). Les bactéries se colorent alors en violet. Le colorant est par la suite fixé à l'aide du lugol (iodure de potassium KI) (2 x 30 sec). La préparation est abondamment rincée à l'eau distillée afin d'évacuer l'excès de colorant. La préparation est décolorée (éthanol 95 %, 5 sec) et rincée de nouveau abondamment à l'eau distillée. Puis, une deuxième coloration avec de la fuschine ou safranine est réalisée (1-2min). De nouveau, la préparation est rincée à l'eau et séchée à température ambiante. L'observation microscopique au grossissement X1000 avec huile à immersion permet de voir si les cellules sont colorées en violet (Gram-positif) ou bien en rose (Gram-négatif).

2. 3 Conservation des isolats :

Les isolats purifiés sont conservés selon les deux procédés suivants :

- Pour une courte durée, on les repique sur le milieu YMA incliné après une incubation de 48 heures à 28°C, les tubes sont ensuite conservés au réfrigérateur à 4°C.
- Pour une conservation de longue durée, les isolats sont conservés dans des cryotubes contenant 0,750 mL de glycérol (50 % v/v) additionné de 0,750 mL de suspension bactérienne de *Rhizobium* en phase exponentielle. Le mélange homogénéisé et conservé à -80°C.

2. 4 Test de nodulation :

Les isolats extraits des nodosités de légumineuses ne peuvent être identifiés comme rhizobia qu'après avoir effectué le test de nodulation, montrant leur capacité à former des

nodosités sur leur plante hôte, en conditions bactériologiques contrôlées. Pour réaliser ce test les étapes suivantes sont effectuées :

Nous avons utilisé les graines disponibles au LSTM citées ci-dessous et de deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*) provenant de la Sebkhah de Misserghin en Algérie.

2. 4. 1 Stérilisation des graines :

Stérilisation des graines de *Retama raetam*, *Argyrolobium uniflorum* (Tunisie), *Lotus creticus* (LSTM) et *Lotus arabicus* (Sénégal).

- Tremper les graines 15 à 20 min dans l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4 à 96 %).
- Rincer 7 fois avec de l'eau stérile
- Laisser gonfler une nuit à 4°C
- Transférer les graines sur de l'eau gélosée à 1 % pour la pré-germination (chambre noire, à 22°C)
- Il faut compter 3 à 5 jours avant de transférer les plantes en tubes Gibson.

Stérilisation des graines de (*Medicago ciliaris*, *Medicago polymorpha*, *Acacia tortillis* sub sp. *raddiana*) (Algérie) et *Medicago arabica* (collection du LSTM, Montpellier)

- Tremper les graines 5 min dans de l'hypochlorite de calcium (poudre 70 %, solution à 3 g/L fraîchement préparée et filtrée après complète dissolution).
- Rincer 7 fois.
- Scarifier manuellement à l'aide d'une aiguille flambée jusqu'à incandescence.
 - Alternativement, les graines sont scarifiées par traitement à l'acide sulfurique 98 %, pendant 10 à 20 min (selon l'espèce), suivie de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile. Une goutte d'eau du dernier rinçage est étalée sur une boîte YMA, pour vérifier l'absence de contaminants.
- Mettre les graines 24 h à 4°C et les laisser 48 h à 22°C et à l'obscurité pour la germination.

2. 4. 2 Culture des plantes :

Après germination (3 à 5 jours selon l'espèce) les jeunes plantes sont transférées dans des tubes Gibson (Gibson, 1980) et placées dans une chambre de culture en conditions de lumière continue (20 W/m^2) à 28°C .

Préparation des tubes Gibson : les tubes contenant 25 mL de milieu de culture (Bertrand, 1997) sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 120°C . A la sortie de l'autoclave ils sont disposés de façon inclinée le temps que la gélose se fixe en pente et ensuite remplis avec le même milieu liquide (60 mL par tube).

▪ Milieu de culture pour légumineuses méditerranéennes (Bertrand, 1997)

Dans un litre de solution : 1 mL de KH_2PO_4 (solution à 13,609 g/L), 1 mL de KCl (solution à 223,65 g/L), 1 mL de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$, (solution à 294,04 g/L), 1 mL de $\text{MgSO}_4 (\text{H}_2\text{O})_7$ (solution à 246,48 g/L). 0,04 mL d'une solution de micro éléments (Cette solution contient : H_3BO_3 (6,25 g/L), $\text{MnSO}_4 (\text{H}_2\text{O})$ (25 g/L), $\text{ZnSO}_4 (\text{H}_2\text{O})_7$ (6,25 g/L), $\text{CuSO}_4, (\text{H}_2\text{O})_5$ (6,25 g/L), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 (\text{H}_2\text{O})_2$ (0,625 g/L), CaCO_3 1 g/L).

1 mL de séquestrène de fer (solution à 16,6 g/L). 1 mL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (82 g/L).

Qsp : 1000 mL H_2O .

Ajouter du CaCO_3 : 1 g/L. Ajuster le pH à 7. Ajouter de l'agar : 20 g/L. Le milieu est stérilisé pendant 20 min à 120°C .

2. 4. 3 Inoculation :

L'inoculation des plantes est réalisée 48 heures après la mise des plantes en tube avec 1 mL de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, en effectuant cinq répétitions par souche. Chaque essai comprend un témoin négatif non inoculé.

2. 5 Extraction de l'ADN génomique :

L'ADN utilisé est obtenu selon plusieurs méthodes d'extraction :

2. 5. 1 Préparation de l'ADN génomique « à la protéinase K » :

Une colonie pure, fraîchement isolée sur milieu gélosé YMA, est repiquée en masse, sur milieu YMA gélosé sur boîte de Pétri. Après 48 heures, d'incubation, le tapis bactérien est lavé 2 fois à l'eau distillée stérile et la densité optique est mesurée.

A 100 μL de suspension cellulaire de DO (620nm) = 2, sont ajoutés 100 μL de Tris-HCl (10 mM, pH 8,3) puis 20 μL de protéinase K à 1 mg/mL d'eau milliQ stérile (Boehringer).

Le mélange est mis à incuber 2 heures à 55°C, puis 10 min dans l'eau bouillante pour dénaturer la protéinase K. Les tubes sont stockés à -20°C.

Pour les souches très muqueuses le milieu TY est utilisé pour la culture bactérienne.

▪ **Milieu TY (Beringer, 1974)**

Il contient par litre : tryptone (oxoid) : 5 g ; extrait de levure (oxoid) : 0,75 g ; KH_2PO_4 : 0,454 g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 (\text{H}_2\text{O})$: 2,388 g ; $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (13,4 g / 100 mL) : 5 mL (ou $\text{CaCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ à 20g /100 mL : 5 mL); Le pH est ajusté à 6,8 – 7,0. agar LabM : 20 g.

2. 5. 2 Extraction de l'ADN génomique par choc thermique :

Nous avons aussi utilisé une technique rapide pour l'extraction de l'ADN génomique par éclatement des cellules. Le protocole est le suivant : des colonies fraîchement cultivées sur milieu solide (YMA) sont déposées dans 50 μL d'eau milliQ stérile et soumises au programme de traitement thermique suivant : chauffage initial : 96 °C pendant 2 min, puis 7 cycles de : chauffage pendant 2 min à 96 °C, refroidissement jusqu'à 4 °C pendant 10 sec. Un refroidissement final : 4°C pendant 25 min. Les cycles sont réalisés dans un thermocycleur de type Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/d Ijssel, Hollande).

2. 5. 3 Extraction Alcaline de l'ADN (EK) (Baele *et al.*, 2000) :

Une à deux colonies obtenues sur milieu TY d'une culture jeune sont mises en suspension dans 20 μL de tampon de lyse contenant : 2,5 μL de SDS 10 % ; 5 mL NaOH 1 M et 92,5 mL eau milliQ.

Le mélange est incubé dans un bain-marie sec à 95°C pendant 15 min et refroidi rapidement dans de la glace. Les tubes sont ensuite centrifugés en speed down et additionnés de 180 μL d'eau distillée stérile. Le mélange est encore centrifugé pendant 5 min à 13000 rpm et conservé à -20°C (cette dernière étape est très importante car elle permet de retenir les débris cellulaires).

2. 6 Amplification par PCR :

La PCR (Mullis et Faloona, 1987), de l'anglais Polymerase Chain Reaction ou en français : Réaction de Polymérisation en Chaîne, permet l'amplification sélective *in vitro* de séquences d'acides nucléiques.

- Nous avons amplifié plusieurs gènes au cours de cette thèse : l'ADNr 16S, ITS, cinq gènes de ménage (*atpD*, *recA*, *glnA*, *thrC* et *gltA*) et un gène symbiotique de nodulation *nodA*.
- La composition du tampon pour la PCR diffère selon les amorces utilisées et le gène à amplifier, le programme d'amplification est spécifique à chaque gène.
- Pour l'ADNr 16S et ITS (espace intergénique) l'ADN matrice est purifié selon la méthode à la protéinase K.
- Pour les gènes de ménage (*atpD*, *recA*, *glnA*, *thrC* et *gltA*) et le gène symbiotique *nodA*, l'ADN matrice est purifiée selon la méthode d'extraction alcaline (EK).

L'amplification est réalisée sur 2 μL d'ADN obtenu par traitement à la protéinase K ou par extraction alcaline. Le volume du mélange réactionnel est de 50 μL et contient : 2 μL d'ADN, 5 μL de tampon de réaction 10X (Invitrogen, Etats Unis), 1,5 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de dNTPs chacun à 10 mM (Sigma –ALDRICH, Allemagne), 1 μL de chacune des deux amorces à 20 μM (Biotech AG), 1 unité de *Taq* polymérase (Invitrogen, Etats Unis) et 33,2 μL d'eau milliQ stérile. Un contrôle négatif contenant 2 μL d'eau milliQ stérile au lieu de l'ADN est inclus dans chaque réaction PCR. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/d Ijssel, Hollande) avec le programme qui correspond.

Les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse (cuve à électrophorèse 15,5 x 24,5 cm, Easy Cast, Electrophoresis system, Model #B1, OWI Scientific, Inc.) en prenant 4 μL d'ADN amplifié de chaque souche avec une goutte de bleu de charge (bleu de bromophénol 0,025 %, glycérol 3 %, EDTA 1 mM) sur un gel d'agarose 1 % (Agarose type II : Medium EEO, Sigma, Allemagne, 12 x 13 cm) mélangé avec 2 gouttes de Bromure d'Ethidium (solution à 0,625 mg/mL). La migration se fait dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8,3). Le gel est photographié (perfect image V-5.3 Clara Vision). La taille du produit d'amplification attendu varie suivant le gène amplifié.

La totalité de l'amplifiat est visualisé et découpé après migration sur gel d'agarose à 1 %. La bande correspondant à la taille du gène amplifié est découpée et purifiée à l'aide d'un kit QIAquick Extraction Qiagen (annexe 1). La quantité de l'ADN élue est ensuite évaluée sur un gel de 1% agarose dans du TAE 1X (1%, mêmes conditions de gel que pour découper les bandes), visuellement en le comparant aux bandes du Smart Ladder. Le Smart Ladder est un marqueur de poids moléculaire qui sert d'étalon puisqu'il est composé de fragments d'ADN double-brin linéaires de tailles connues, régulièrement réparties respectivement entre 200 et 10000 pb. De plus il permet après migration, de quantifier approximativement la quantité d'ADN déposé en fonction de l'intensité des bandes puisque le mélange est composé d'une quantité connue de chaque fragment.

2. 7. Séquençage :

Les amorces utilisées pour le séquençage des différents gènes sont regroupées sur l'ADNr 16S (figure 13).

2. 7. 1. Séquençage de l'ADNr 16S :

L'étude de l'opéron ribosomique (codant pour les ARNr 5S, 16S et 23S) constitue un outil de choix pour étudier les relations phylogénétiques grâce à sa présence chez toutes les bactéries, sa fonction constante et la présence de zones très conservées ainsi que de parties à séquence variable (Woese, 1987 ; Schleifer et Ludwig, 1989 ; Stackebrandt et Goebel, 1994). Actuellement la plus importante base de données pour le développement de la classification des BNL et de l'ensemble des bactéries est constituée par les séquences du gène codant pour l'ARNr16S. Notre étude porte dans un premier temps sur la partie centrale de 591 pb de l'ADNr 16S (annexe 2) qui permet une discrimination entre les différentes espèces de *Ensifer* ainsi que l'identification d'autres rhizobiums (Gilles BENA, communication personnelle). Le séquençage du gène total est complété pour les représentants des groupes obtenus par le séquençage partiel.

Après l'amplification par PCR du gène codant pour l'ARNr16S. L'ADN est utilisé (40 à 50 ng) pour une réaction de séquence en utilisant le kit de ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). La réaction de séquence est ensuite analysée dans un séquenceur (Applied Biosystems model 310 DNA sequencer). Les séquences d'ADN sont obtenues sous forme de pics colorés avec 4 couleurs différentes correspondant chacune à une base de l'ADN. Elles sont ensuite corrigées à l'aide de différents logiciels.

2. 7. 2. Séquençage de l'espace intergénique ITS:

Pour les souches à croissance lente, nous avons procédé à la détermination de la séquence de l'espace intergénique (ITS) qui sépare l'ADNr 16S de l'ADNr 23S. Les amorces utilisées pour la réaction d'amplification sont : *SM et BR2, trois autres amorces ont été rajoutées pour la réaction de séquence *BR5, BR4 et *BR4 (voir position des amorces sur figure (13)) et les séquences des amorces sont données dans le tableau (4).

Les conditions de la PCR sont données dans le tableau (3)

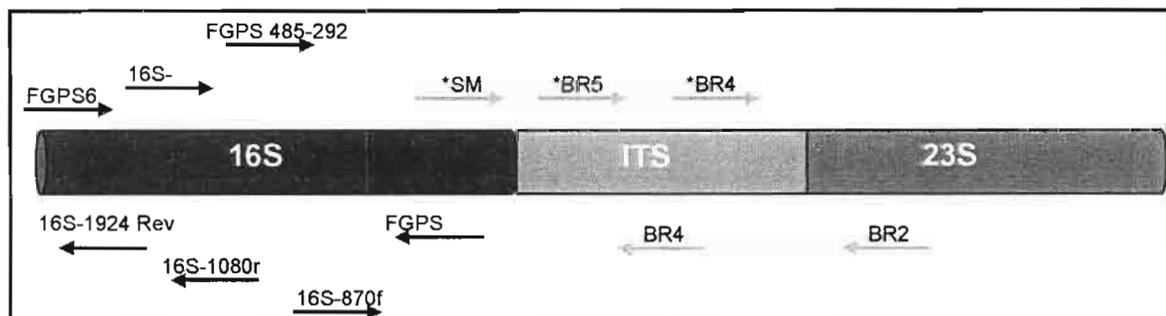


Figure 13 : Position des amorces internes du gène ADNr 16S et de l'espace intergénique ITS employées dans cette étude.

2. 7. 3 Séquençage des gènes de ménage :

Stackebrandt *et al.* (2002) recommande l'évaluation de cette méthode pour son utilisation en taxonomie et ceci par l'analyse d'au moins cinq gènes de ménage sélectionnés. Ces gènes doivent être situés à différents loci du chromosome et largement distribués entre les taxons. Les séquences obtenues sont analysées par différentes méthodes d'analyses phylogénétiques afin de confirmer la solidité des clusters obtenus avec les différents gènes. Le niveau de diversité renseignera également sur le nombre de gènes à analyser.

Pour notre étude, nous avons choisi d'amplifier 5 gènes de ménage : *atpD*, *recA*, *glnA*, *thrC* et *gltA*, sélectionnés par nos partenaires belges du projet BACDIVERS (Martens *et al.*, 2007) et qui apportent l'information satisfaisante pour discriminer les différentes espèces connues de *Ensifer*.

Cette étude concerne 4 groupes de BNL formant des clusters séparés des espèces connues dans le genre *Ensifer* et *Rhizobium*. Les programmes d'amplification spécifiques à chaque gène sont regroupés dans le tableau (3)

Les séquences partielles des différents gènes sont identifiées d'abord par Blast et sont analysées ensuite phylogénétiquement.

2. 7. 4 Séquençage du gène symbiotique *nodA* :

Nous avons recherché les gènes symbiotiques *nodA*, d'un (s) représentant (s) de chaque groupe supposé nouveau, considérant aussi sa plante hôte.

Pour le gène symbiotique *nodA*, l'amplification a été réalisée suivant le programme « Touch down ». Ce type de programme est souvent nécessaire lorsque les couples d'amorces utilisés sont dégénérés. Le « Touch down » regroupe deux séries de cycles, ce qui permet de tester toute une gamme de températures pour l'hybridation des amorces lors d'une première série de cycles, puis une seconde série permet d'amplifier les fragments d'ADN obtenus lors de la première série.

Le premier cycle comprend une hybridation à différentes températures décroissantes de 0.5°C.

Tableau 3 : Programmes d'amplification PCR de différents gènes étudiés

Gene	16SrDNA	<i>atpD</i>	<i>recA</i>	<i>gltA</i>	<i>thrC</i>	<i>glnA</i>
Programme	05 min 94°C	05 min 95°C	05 min 95°C	05 min 95°C	05 min 95°C	10 min 95°C
	30 sec 94°C	02 min 94°C	45 sec 94°C	02 min 94°C	02 min 94°C	02 min 94°C
	30 sec 55°C	01 min 64.3°C	01 min 60°C	02 min 50°C	02 min 55°C	02 min 62°C
	07 min 72°C	01 min 72°C	1,5 min 74°C	01 min 72°C	01 min 72°C	01 min 72°C
	07 min 72°C	30 sec 94°C	5 min 72°C	30 sec 94°C	30 sec 94°C	30 sec 94°C
	Pause 15°C	01 min 64.3°C	Pause 15°C	01 min 50°C	01 min 55°C	01 min 61°C
		01 min 72°C		01 min 72°C	01 min 72°C	01 min 72°C
		5 min 72°C		05 min 72°C	05 min 72°C	10 min 72°C
		Pause 15°C		Pause 15°C	Pause 15°C	Pause 15°C

Suite du tableau 3

Gene	IGS (ITS)	<i>nodA</i>
Programme	05 min 94°C	05 min 96°C
	02 min 94°C	30 sec 94°C
	01 min 59°C	30 sec 65°C
	01 min 30 sec 72°C	01 min 72°C
	05 min 72°C	30 sec 94°C
	Pause 15°C	30 sec 50°C
	X 30	X20
		X25
		01 min 72°C
		07 min 72°C
		Pause 15°C

Tableau 4 : Amorces utilisées dans l'amplification et le séquençage des différents gènes étudiés

Gène	Amorce	Réaction	Direction	Longueur de l'amorce (bases)	Séquence de l'amorce (5'-3')	Référence
16S	FGPS 6	PCR, séquence	forward	22	GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G	Normand <i>et al.</i> , 1992
16S	FGPS 1509	PCR, séquence	reverse	20	AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA	Normand <i>et al.</i> , 1992
16S	FGPS 484-292	Séquence	forward	15	CAG CAG CCG CGG TAA	Normand <i>et al.</i> , 1996
16S	16S-1080r	Séquence	reverse	19	GGG ACT TAA CCC AAC ATC	Sy <i>et al.</i> , 2001
16S	16S-870f	Séquence	forward	21	CCT GGG GAG TAC GGT CGC AAG	Sy <i>et al.</i> , 2001
16S	16S-1924	Séquence	reverse	20	GGC ACG AAG TTA GCC GGG GC	Sy <i>et al.</i> , 2001
<i>recA</i>	A555	PCR, séquence	reverse	26	CGR ATC TGG TTG ATG AAG ATC ACC AT	Gaunt <i>et al.</i> , 2001
<i>recA</i>	A36	PCR, séquence	forward	23	ATC GAG CGG TCG TTC GGC AAG GG	Gaunt <i>et al.</i> , 2001
<i>atpD</i>	273	PCR, séquence	forward	21	SCT GGG SCG YAT CMT GAA CGT	Gaunt <i>et al.</i> , 2001
<i>atpD</i>	771	PCR, séquence	reverse	23	GCC GAC ACT TCC GAA CCN GCC TG	Gaunt <i>et al.</i> , 2001
<i>glnA</i>	144	PCR, séquence	forward	21	GTC ATG TTC GAC GGY TCY TCG	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>glnA</i>	1142	PCR, séquence	reverse	21	TGG AKC TTG TTC TTG ATG CCG	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>glnA</i>	572F	Séquence	forward	20	GGA CAT GCG YTC YGA RAT GC	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>glnA</i>	572R	Séquence	reverse	20	GCA TYT CRG ARC GCA TGT CC	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>thrC</i>	577F	PCR, séquence	forward	21	GGC AMK TTC GAC GAY TGC CAG	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>thrC</i>	1231R	PCR, séquence	reverse	20	GGR AAT TTD GCC GGR TGS GC	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>thrC</i>	766F	Séquence	forward	17	GGC AAT TTC GGC GAY AT	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>thrC</i>	766R	Séquence	reverse	17	ATR TCG CCG AAA TTG CC	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>thrC</i>	925R	Séquence	reverse	20	GAS GAR AYC TGG ATR TCC AT	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>gltA</i>	428F	PCR, séquence	forward	19	CSG CCT TCT AYC AYG ACT C	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>gltA</i>	1111R	PCR, séquence	reverse	20	GGG AAG CCS AKC GCC TTC AG	Martens <i>et al.</i> , 2007
<i>nodA</i>	NodA1 forward	PCR, séquence	forward	24	TGC RGT GGA ARN TRB VYT GGG AAA	Haukka <i>et al.</i> , 1998
<i>nodA</i>	NodAB1 reverse	PCR, séquence	reverse	23	GGN CCG TCR TCR AAW GTC ARG TA	Haukka <i>et al.</i> , 1998
ITS	*SM	PCR, séquence	forward	19	AAG TCG TAA CAA GGT AGC C	Willems <i>et al.</i> , 2001
ITS	BR2	PCR, séquence	reverse	19	CAC CTT TCC CTC ACG GTA C	Willems <i>et al.</i> , 2001
ITS	*BR5	Séquence	forward	20	CTT GTA GCT CAG TTG GTT AG	Willems <i>et al.</i> , 2001
ITS	*BR4	Séquence	forward	19	GCA TGA GGT CGT CGG TTC G	Willems <i>et al.</i> , 2001
ITS	BR4	Séquence	reverse	19	CGA ACC GAC GAC CTC ATG C	Willems <i>et al.</i> , 2001

2. 8 Construction phylogénétique :

Pour l'exploitation des données de séquences, ces dernières sont tout d'abord corrigées grâce à certains logiciels disponibles sur Internet tels que CLUSTALX ou CHROMAS-Pro et comparées avec d'autres séquences stockées dans des bases de données GENE BANK. Cette recherche est dite par « BLAST », du nom du programme informatique (Altschul *et al.*, 1997) et se fait via l'internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Le résultat est donné sous forme d'une liste des 100 séquences les plus proches de celle que l'on a soumis.

Les séquences corrigées doivent être ensuite alignées avec celles de souches de référence pour le même gène. Cet alignement peut être réalisé automatiquement par CLUSTALX et amélioré manuellement avec GENDOC software.

Le fichier d'alignement doit être transféré sous un format reconnaissable par le logiciel de construction d'arbre phylogénétique. Les formats possibles sont FASTA, NEXUS ou PIR.

Les logiciels de construction d'arbres phylogénétiques les plus utilisés sont PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2002) et MEGA 3.1 software. Avant d'utiliser ces logiciels, il convient de choisir la méthode de construction phylogénétique adéquate. Trois méthodes sont les plus utilisées en phylogénie : celle de distance (Algorithmique), de parcimonie (Minimum Evolution) et de vraisemblance (Maximum-Likelihood).

- Pour les méthodes de distance, il s'agit tout d'abord de choisir le critère de distance entre les futures feuilles de l'arbre. Dans le cas où les feuilles sont des séquences d'ADN, on peut choisir comme distance le nombre de nucléotides qui diffèrent. Pour déterminer cette valeur, on est amené à effectuer un alignement. Puis on peut utiliser la méthode UPGMA ou celle du Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) pour en déduire l'arbre.
- Les méthodes de parcimonie consistent à trouver l'arbre qui minimise le nombre de mutations, délétions, ou insertions ponctuelles pour passer d'une séquence à l'autre. C'est une méthode très lente si l'on génère tous les arbres possibles pour en calculer la parcimonie.

Les méthodes de vraisemblance sont plus probabilistes. En ce basant sur le taux de substitution pour chaque élément de base (nucléotide pour les séquences d'ADN) au cours du temps, on estime la vraisemblance de la position et de la longueur des branches.

En taxonomie actuelle, les méthodes de maximum de vraisemblance et de Bayesian permettent la meilleure optimisation des données de séquences et l'obtention de résultats de

phylogénie les plus robustes. Plusieurs études actuelles de diversité des rhizobia ont utilisé ces méthodes pour la construction d'arbres phylogénétiques (Vinuesa *et al.*, 2005a ; Stepkowski *et al.*, 2003).

2. 9 Les hybridations ADN-ADN :

L'homologie ou la parenté génétique ADN-ADN est évaluée par réassociation ou hybridation de l'ADN monobrin d'une souche avec l'ADN monobrin d'une autre souche. Cette réassociation est une réaction spécifique, étroitement dépendante des conditions physico-chimiques de l'expérience, en particulier de la température optimale d'hybridation dite encore de renaturation et qui est de 25 à 30°C inférieur à la température de dénaturation.

Les hybridations ADN-ADN, ont été réalisées dans le laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gand (Belgique).

2. 9. 1 Extraction d'ADN par la méthode de Marmur (Marmur, 1961) :

Principe :

La méthode d'extraction d'ADN de Marmur (1961) a été décrite comme une méthode utilisable pour différentes espèces de microorganismes en résolvant des problèmes liés à la physiologie des bactéries, tels que la résistance de la paroi cellulaire, le taux de polysaccharides cellulaires (difficiles à séparer de l'ADN) et la séparation des protéines de l'ADN.

Les étapes principales de la méthode d'extraction de l'ADN de Marmur (1961) sont les suivantes : lyse des cellules, élimination des débris cellulaires et des protéines par dénaturation et centrifugation, élimination de l'ARN par traitement à la RNase et précipitation sélective de l'ADN à l'isopropanol.

Protocole :

a) Culture des bactéries :

Les souches de BNL sont cultivées sur milieu TY en boîte de Pétri à 28°C pendant 3 jours. D'une culture pure vérifiée par observation à la loupe, trois tubes de milieu TY incliné sont ensemencés par souche et incubés 3 jours à 28°C. La culture bactérienne est récoltée dans 90 mL de TY liquide et mise en culture sous agitation pendant 3 jours. La croissance est

observée par l'apparition de trouble et sa pureté vérifiée par repiquage sur une boîte de TY gélosé.

Les 90 mL de culture bactérienne sont transférés dans un volume supérieur de 900 mL de TY et mis en agitation pendant 3 jours à 28°C. Avant la récolte des cellules, la pureté de la culture est encore une fois vérifiée par ensemencement sur milieu gélosé.

b) Récolte des bactéries :

Les cellules bactériennes sont lavées dans du tampon phosphate 0,01 M. La suspension bactérienne est homogénéisée au vortex et par agitation à l'aide d'un barreau magnétique. Afin d'éliminer le maximum de mucus produit par les bactéries et les débris de gélose. Les cellules sont lavées plusieurs fois et centrifugées à 9000 rpm/min pendant 20 min à +4°C.

c) Lyse des cellules bactériennes :

1 à 4 g de culot bactérien obtenu sont mis en suspension dans 50 mL de tampon TEK 1X (Tris-EDTA) à pH 8. Le pH élevé et l'EDTA inhibent l'activité des désoxyribonucléases (DNases). Le volume de tampon à utiliser varie en fonction du poids du culot cellulaire. Le volume de tampon TEK peut varier en fonction de la concentration de la suspension bactérienne, celle - ci devant rester fluide.

L'étape de la lyse est très critique pour l'obtention de l'ADN. En effet, une concentration trop faible en cellules entraînera des pertes d'ADN lors de l'étape de précipitation avec l'éthanol. En revanche, si la suspension cellulaire est trop épaisse, on obtiendra une émulsion compacte et grumeleuse après la première étape de déprotéinisation au chloroforme. Cette émulsion "en bloc" correspond aux protéines dénaturées emprisonnant une grande quantité d'ADN et forme une interphase volumineuse lorsque le mélange est centrifugé. C'est pourquoi, il est préférable de tester si la dilution des cellules bactériennes est suffisante ou non, en ajoutant du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) sur un petit volume (1 à 2 mL) de la suspension et incubé à 60°C quelques minutes pour observer la vitesse à laquelle la solution devient visqueuse. Le SDS est un détergent anionique qui inhibe l'action des enzymes et dénature certaines protéines.

Ensuite, 200 µl de solution de protéinase K (20 mg/mL) et 4 mL d'une solution de SDS à 20 % sont ajoutés pour 50 mL de suspension bactérienne (l'ajout du SDS, initie la lyse cellulaire). La suspension est agitée doucement et incubée 10 min minimum au bain-marie à 60°C, puis refroidie à température ambiante. La lyse des cellules bactériennes entraîne la

libération de quelques débris cellulaires et des acides nucléiques, qui s'accompagne d'une augmentation de la viscosité. L'ajout de TEK est nécessaire si le mélange est trop visqueux.

Après la lyse, le mélange doit être refroidi dans de la glace.

L'addition de 6,75 mL d'une solution de NaCl 5M pour 25 mL de mélange, permet de dissocier les protéines des acides nucléiques (du fait de la forte concentration en sel). La suspension est agitée vigoureusement jusqu'à ce que le mélange devienne mousseux et homogène (Nous avons suivi les modifications apportées par Willems *et al.*, 2001a pour la séparation des acides nucléiques des protéines, utilisant le NaCl à la place du perchlorate de sodium utilisé dans la procédure standard de Marmur, 1961).

d) Déprotéinisation :

Un demi-volume de chloroforme est ajouté à la suspension et le mélange est agité doucement pendant 30 min. Le chloroforme dénature les protéines. Après centrifugation à 12000 rpm/min pendant 20 min à +4°C, la phase supérieure limpide contenant l'ADN est récupérée délicatement à l'aide d'une pipette coudée. L'étape de déprotéinisation est répétée une fois.

e) Précipitation :

A l'issue de la seconde étape de déprotéinisation, l'ADN est précipité avec deux volumes d'Ethanol glacé 95 %, enroulé autour d'une baguette en verre et séché à l'air. L'ADN séché est dissous dans 9 à 18 mL (selon la quantité d'ADN obtenu) d'une solution de SSC 0,1X (Solution Saline de Citrate), et une à deux gouttes de chloroforme sont ajoutées pour neutraliser les éventuelles désoxyribonucléases contaminants. La solution est agitée à 45°C jusqu'à dissolution complète de l'ADN (12 à 24 heures environ selon la quantité d'ADN). La solution de SSC maintient la concentration ionique de l'ADN dissout.

f) Traitement à la ribonucléase :

Pour chaque 9 mL de solution ADN nous avons ajouté $1/10^{\text{ème}}$ du volume de SSC 10X et mélangé doucement. 0.04 mL de RNase 0.2 % sont ensuite ajoutés pour chaque 10 mL de solution ADN ; mélanger doucement, puis incubé à 37°C pendant 40 min.

0.5 volume de chloroforme sont ajoutés, la solution est centrifugée 12000 rpm/20 min. la phase aqueuse est ensuite transférée et l'ADN est précipité avec deux volumes d'Ethanol 95 % et enroulé sur une baguette en verre.

L'ADN est dissout dans 9 mL de SSC 0,1X

g) Purification finale :

L'ADN est précipité dans 1 mL d'une solution d'acétate-EDTA 3 M et 0,54 V d'isopropanol ajoutés, goutte à goutte. L'acétate-EDTA 3 M fournit un environnement ionique adapté pour séparer l'ADN de l'ARN ou de ses produits de digestion. L'isopropanol permet la précipitation sélective de l'ADN, ainsi l'ARN reste en solution. L'ADN est enroulé autour d'une baguette en verre, puis séché à l'air et lavé pendant 1 minute dans des bains successifs de solutions d'éthanol de concentrations croissantes (75 %, 80 %, 85 %, 90 % et 95 %).

L'ADN est séché à l'air et dissout dans 0,1 à 0,5 mL d'une solution de SSC 0,1X additionnée de quelques gouttes de chloroforme. A ce stade, l'ADN est conservé à +4°C jusqu'à dissolution complète, puis conservé à -20°C avant d'être utilisé. La pureté de l'ADN est contrôlée par mesure de la densité optique (DO) à différentes longueurs d'onde comme décrit par Willems *et al.* (2001).

h) Contrôle de la pureté et de la qualité de l'ADN :

Une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose est effectuée, afin de vérifier que l'ADN obtenu est non dégradé et de haut poids moléculaire : 5 µL de la solution d'ADN additionnée de 2 µL de bleu de charge sont chargés sur un gel d'agarose à 2 % dans du TAE 1X et contenant 0,05 mg de Bromure d'Ethidium. La migration dure 30 min à 70 volts.

La pureté de l'ADN est contrôlée par dosage sur dilution de la solution d'ADN dans SSC 0,1 X au spectrophotomètre ultraviolets. La densité optique (DO) est prise à 234 nm, 260 nm et 280 nm.

L'ADN est considéré comme pur si le rapport $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$ est compris entre 1,8 et 2 et si le rapport $DO_{234\text{ nm}} / DO_{260\text{ nm}}$ est à peu près égal à 0,5.

2. 9. 2 Hybridations ADN-ADN en micro plaque :

Principe

Le principe de la méthode d'hybridation en micro plaque est le suivant : l'ADN de référence est immobilisé sur une micro plaque puis hybridé avec une sonde d'ADN marquée, et la quantité de sonde ADN hybridée est quantifiée.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser la méthode décrite par Ezaki *et al.* (1989), où l'ADN de référence est immobilisé de façon non-covalente par des interactions non spécifiques avec le polystyrène de la micro plaque et la sonde d'ADN est marquée non radioactivement à la photobiotine (Forster *et al.*, 1985). La réaction est développée par un

complexe streptavidine-enzyme qui convertit un substrat en un produit coloré. La quantification est obtenue par analyse fluorimétrique.

Solutions :

Tampon phosphate 0,01M, pH 7,0:

Préparer deux solutions :

Une solution (a) de KH_2PO_4 à 0,2 M (27,218 g de KH_2PO_4 dans 1 litre d'eau distillée)

Une solution (b) de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 (\text{H}_2\text{O})$ à 0,2 M (71,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 (\text{H}_2\text{O})$ dans 1 litre d'eau distillée)

Préparer une solution à 0,1 M contenant : 195 mL de solution (a), 305 mL de solution (b) et 500 mL d'eau distillée, puis diluer la solution 10 fois pour obtenir une concentration de 0,01 M.

Tampon TEK 10X (concentré) (250 ml)

Tris base 40 mM

EDTA 2 mM

Ajuster à pH 8,0 et stériliser 20 min à 120°C

Tampon TEK 1X:

Diluer TEK 10X au TEK 1X

Stériliser 20 min à 120°C

Sodium Dodécyl Sulfate (SDS 20 %) :

SDS 20 g

Eau distillée 100 mL

Ne pas stériliser la solution mais il est recommandé d'utiliser de l'eau distillée stérile pour la préparation de la solution.

Protéinase K :

Protéinase K (Merck) 20 mg

Tampon TEK 1X 1 mL

SSC 10X :

NaCl 1,5 M

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,15 M

NaOH 18 g

Eau distillée 250 mL

Ajuster le pH à 7,0.

Stériliser la solution pendant 20 min à 120°C

SSC 0,1X (250 mL)

Diluer le SSC 10X au SSC 0,1X

Stériliser la préparation pendant 20 min à 120°C

Solution de ribonucléase à 0,2 % (20 mL):

0,2 % de la Ribonucléase dans 0,15 M NaCl, pH 5

Faire chauffer le mélange à 80°C pendant 10 min, pour désactiver les contaminants DNase.

Stériliser la solution par filtration.

Acétate-EDTA :

Acétate de sodium 3 M

EDTA 1 mM

Eau distillée 50 mL

Ajuster le pH à 7,0.

Stériliser la solution pendant 20 min à 120°C

2. 10 *nod A* microarrays :

Les puces ADN dédiées aux gènes *nodA*, ont été construites dans le but de :

- Détecter et identifier les gènes *nodA* des différentes espèces de *Ensifer* de notre collection directement à partir de l'ADN des cultures bactériennes, des nodules ou des échantillons de sol.
- Etudier la diversité symbiotique des *Ensifer*, par la recherche de gène de nodulation.

Les gènes *nodA* sont amplifiés par des amorces spécifiques des positions (13-35 et 518-500), marqués radioactivement et hybridés sur membrane de nylon contenant les oligonucléotides spécifiques aux différents gènes *nodA* identifiés chez des souches de référence de *Ensifer*.

Pour tester l'efficacité de cette méthode, nous avons testé, huit souches de *Ensifer* de notre collection groupées dans le cluster *E. meliloti* et *E. medicae* par séquençage partiel de l'ADNr 16S. Les souches sont isolées de différentes espèces de *Medicago* et STM 1066 d'*Acacia tortilis* susp. *raddiana*.

Cette méthode a été développée et testée dans le cadre du projet BACDIVERS par le Dr J-C. Avarre.

2. 11 Tests auxanographiques :

Les tests auxanographiques miniaturisés API 100 (Biomerieux) permettent l'étude du métabolisme de différents substrats carbonés (carbohydrates, acides aminés et acides organiques) par les microorganismes. Ces tests ont été élaborés pour l'identification des Entérobactéries mais sont également utilisés dans le typage épidémiologique, la caractérisation des souches industrielles, et comme critère phénotypique dans la description de nouvelles espèces.

Protocole d'utilisation des API 100 :

A) Suspension bactérienne :

Les souches étudiées sont cultivées sur YMA incliné pendant 36 à 72 heures et suspendues dans 3 mL d'eau bidistillée stérile, la turbidité de la suspension bactérienne doit être comprise entre 5 et 6 sur l'échelle de Mc Farland (tableau 5).

Cette suspension bactérienne sert à inoculer des flacons de 120 mL contenant (55 mL de tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (0,04 M, pH 7) et 200 mg d'agar bactériologique, préalablement stérilisé à 120°C pendant 20 min et 5 mL de solution YNB+YE (600 mg Extrait de levure (oxoid, L21) ; 8,04 g Yeast Nitrogen Base (Difco, 0392-15), 100 mL eau bidistillée stérile), filtrée sur Sartorius (Ministart NML, SM 16534, 0,2 μm).

La suspension ainsi préparée doit être maintenue à une température de 41°C pour l'inoculation des galeries API 100 qui se fait suivant ces instructions :

- Travailler près de la flamme, sous la hotte à flux
- Incliner la boîte en posant le bord supérieur sur l'angle du couvercle
- Placer l'extrémité de la pipette Pasteur à l'angle de la cupule et du tube
- Eviter la formation d'un ménisque soit concave, soit convexe
- Eviter d'emprisonner des bulles d'air, pour éviter cela, remplir les cupules en deux temps : déposer 2-3 gouttes dans chaque cupule, qui tomberont au fond pendant que l'on remplit les autres, compléter ensuite à ras de la cupule. S'il existe une bulle, ré-aspirer le liquide avec une pipette Pasteur et refaire

l'opération. En dernier recours, piquer à l'endroit de la bulle à l'aide d'une aiguille montée chauffée.

Après inoculation, nous avons déposé deux gouttes de la suspension bactérienne qui a servi à l'inoculation des galeries API 100 sur une boîte de YMA pour contrôler la viabilité de la culture.

Les Galeries sont incubées à 28°C, et la lecture est faite 1, 2, 3, 4 et 7 jours après inoculation.

L'utilisation du substrat est estimée par la comparaison de la croissance bactérienne au niveau des différentes cupules avec le témoin et noté par + (croissance), +/- (faible croissance) et - (pas de croissance), cependant le métabolisme de 4 substrats (Esculin, Hydroxyquinoline β -glucuronide, L-Tryptophane et L-Histidine) est indiqué par le virage de couleur.

Tableau 5 : Echelle de Mc Farland

Tubes	Chlorure de Baryum 1 %	Acide sulfurique 1 %
n°1	0,1 mL	9,9 mL
n°2	0,2 mL	9,8 mL
n°3	0,3 mL	9,7 mL
n°4	0,4 mL	9,6 mL
n°5	0,5 mL	9,5 mL
n°6	0,6 mL	9,4 mL

2. 12 Tolérance à la salinité :

2. 12. 1 Tolérance des souches à différentes concentrations de NaCl :

Nous avons testé la tolérance à différents degrés de salinité de toutes les souches de notre collection dans un premier temps sur milieu YM solide en boîte de Pétri en trois répétitions additionné de différentes concentrations de NaCl : 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM.

A partir des résultats obtenus par cette première méthode, six souches de *Ensifer* et une souche de *Phyllobacterium* de la collection d'Oran tolérantes à 600 et 800 mM de NaCl ont été sélectionnées pour suivre leurs cinétique de croissance sur milieu M9 additionné ou pas de 600 et 800 mM de NaCl.

❖ M9 (g/L) :

100 mL (**10X salts**) : 60 g Na₂HPO₄ ; 30 g KH₂PO₄ ; 5 g NaCl (soit 0,028 M final) ;
10 g NH₄Cl ; 880 mL H₂O

Ajuster à pH7, puis autoclaver 30 min à 120°C et ajouter :

20 mL mannitol 20 %; 1 mL MgSO₄ 1 M (1 mM final); 1 mL CaCl₂ 0,25 M (0,25 mM final); 1 mL biotine à 1 g/L (1 µg/mL final)

Pour la préparation du M9 avec NaCl, ajouter la quantité requise de NaCl puis ajuster le pH avant autoclavage et ajout des compléments.

Les cultures sont ajustées au départ à une DO (620 nm) de : 0,1.

La cinétique de croissance avec ou en absence de NaCl a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm deux fois par jour.

2. 12. 2 Utilisation des microarrays pour l'identification de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité chez *Ensifer meliloti* :

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de K. Lindström (l'Université de la Finlande).

La recherche de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité de la souche STM 1064 de *E. meliloti* d'Algérie comparée à la souche de référence *E. meliloti* 1021 a été étudiée grâce aux puces à ADN.

En 1992, Kallioniemi et ses collaborateurs décrivent une nouvelle technique de cytogénétique moléculaire appelée « hybridation génomique comparative » CGH. Cette méthode permet d'aborder avec une bonne efficacité la caractérisation des gains ou pertes de segments généralement chromosomiques observés au niveau constitutionnel ou tumoral. Mais elle a été également utilisée pour l'analyse des génomes des procaryotes.

Son principe consiste à cohybrider une même quantité d'ADN d'une souche à analyser avec celle d'une souche de référence dont les fragments d'ADN constituent la base de la puce. Les deux ADN sont marqués par un fluorochrome.

Cette méthode est utilisée dans les recherches basiques, incluant le séquençage du génome entier, la détection du polymorphisme d'un seul nucléotide, la découverte de mutation, les profils d'expression de gène et l'analyse de la composition du génome (Charbonnier *et al.*, 2005 ; Lucchini *et al.*, 2001). La présence, l'absence ou la divergence d'un gène peut être déterminée par la comparaison de l'intensité du signal numérisé des spots.

La CGH est une méthode hautement sensible, la réussite de cette méthode dépend de plusieurs paramètres à différents stades du protocole. Jusqu'à la fin du projet BACDIVERS, l'optimisation de la technique n'était pas terminée, des problèmes de concentrations, de pureté de l'ADN, du temps de marquage...etc ont affecté l'intensité des spots et ont empêché l'aboutissement de cette analyse. Le marquage au cy5 tend à décolorer plus rapidement que celui au cy3, en plus son intensité pour certaines raisons est plus faible avec la souche testée comparée à la souche de référence. Compte tenu de ces observations, le cy5 a été utilisé pour le marquage de l'ADN de la souche de référence et le cy3 pour celui de la souche testée (STM 1064). Les ADN génomiques ont été marqués pour deux souches de *E. meliloti* (AK 23 et STM 1064) et *E. arboris* et hybridés. Deux répétitions/membrane ont été utilisées pour chaque souche. Les souches ont été sélectionnées pour leur haute tolérance à de fortes concentrations de NaCl supérieures à 800 mM.

2. 12. 3 Tolérance de la légumineuse à différentes concentrations de NaCl :

Les graines de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* ont été désinfectées et cultivées (comme décrit en 2. 4. 1 et 2. 4. 2).

Nous avons choisi de tester la tolérance au NaCl de ces deux espèces de *Medicago* car elles sont abondantes dans la zone salée de Misserghin, et peuvent selon leur tolérance au sel être sélectionnées pour la revégétalisation des zones salées.

Les jeunes plants ayant développées deux feuilles, sont transférées dans la même solution (Bertrand, 1997), additionnée de différentes concentrations de NaCl (25, 50, 100 et 150 mM), elles sont cultivées dans une chambre de culture (SANYO référence MLR-350), à 25°C, une photopériode de 16 heures et une intensité lumineuse de 2000 lux. Cinq répétitions sont utilisées pour chaque espèce de plante et pour chaque concentration de sel.

La croissance des plantes est surveillée quotidiennement.

2. 13 Préparation de l'inoculum et test de la tolérance des souches à la dessiccation :

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de R. S. Smith (Nitragin Society, Inc., USA, Liphag) et réalisé aux USA .

a) Préparation de l'inoculum

Dix souches bactériennes de *Ensifer* ont été cultivées dans 100 mL du bouillon YM

(Somasegaran et Hoben, 1994), dans des flacons de 250 mL dans une chambre de culture sous agitation. A la phase stationnaire de croissance, un volume de 10 mL de chaque culture est utilisé pour inoculer des flacons de plus grande capacité (1000 mL) contenant 500 mL de milieu de culture YM. Les cultures arrivées au stade stationnaire de croissance sont prêtes pour être mélangées à un support d'argile. Le nombre de cellules doit être déterminé au préalable par dénombrement sur boîtes de Pétri contenant du milieu YMA.

b) Production et contrôle de l'inoculum:

Les supports :

Le support est un mélange de montmorillonite délicatement saupoudré et kaolinite, mélangé dans un rapport de 1:2 (Kosanke *et al.*, 1997)

Production de l'inoculum :

La méthode de production de support d'argile de l'inoculum est détaillée dans le brevet de la société Nitragin (Kosanke *et al.*, 1997)

Pour la production de l'inoculum, 100 μ L de culture liquide est mélangée délicatement à l'aide d'une spatule à 300 g de support de poudre d'argile. L'inoculum ainsi préparé est incubé pendant 48 heures dans une chambre de culture.

La culture a été énumérée et le taux d'humidité déterminé. L'inoculum est ensuite séché sur un plateau qui laisse passer l'air dans une chambre de culture, jusqu'à ce que l'humidité atteigne environ 3,6 %. Le séchage de l'inoculum dure environ 12 jours.

NB : Selon la température ambiante et l'humidité de l'air environnant, une période de séchage plus ou moins longue est exigée. La température devrait être comprise entre 20 et 30°C. Le taux d'humidité du produit final doit être inférieur

à 4.6 %.

Le support argile de l'inoculum est réduit en poudre fine dans un mortier et disposé dans des sacs en plastique (ZipLock).

Le nombre de cellules dans le support sec est exprimé en nombre par gramme d'argile sèche, le jour de la production et après 7 et 34 jours et dans certains cas après 57 jours de stockage à 23°C.

2. 14 Estimation du potentiel fixateur d'azote (essais en serre) :

Les graines de *Medicago ciliaris*, *Medicago polymorpha*, *Argyrolobium uniflorum* et *Lotus creticus* ont été désinfectées et mises à germer comme décrit dans la partie (2-4-1). Après germination, les graines dont la longueur de la radicule atteint 3 à 4 cm sont

transférées dans des pots neufs à Muguet (0.40 mL volume, diamètre 8 cm et hauteur 11,3 cm) remplis d'Attapulgite (Silicate d'aluminium Al_2SiO_2).

Les plantes sont inoculées avec 1 mL de suspension bactérienne de turbidité équivalente au niveau 1 sur l'échelle de Mc Farland, trois jours après la mise en pots des graines. Pour chaque essai, nous avons inclus un témoin négatif non inoculé.

Les pots sont arrosés, selon besoin, directement dans les bacs supportant les pots, pour éviter toute contamination survenue par arrosage en superficie. Les pots reçoivent également une quantité de solution nutritive pour plante (Bertrand, 1997) sans d'azote tous les 15 jours environ.

Les essais ont été conduits dans une serre réglée aux conditions climatiques méditerranéennes avec des répétitions de 10 plants/souche pour *M. polymorpha*, et seulement 8 plants/souches pour *M. ciliaris*, en raison du manque de graines de cette espèce.

Après 6 semaines de culture pour les *Medicago*, la fixation biologique de l'azote a été estimée par observation du phénotype des plants inoculés et la comparaison des poids secs des parties aériennes et estimée par mesure de l'ARA (Activité Réductrice d'Acétylène).

Les résultats ont fait l'objet d'une étude de variance, utilisant le logiciel SUPERANOVA.

2. 14. 1 Observation du phénotype des plants inoculés :

L'observation de la couleur verte des plantes inoculées et de leur croissance (racines et parties aériennes) en comparaison à des plantes non inoculées et placées dans les mêmes conditions de culture (avec des feuilles généralement jaunâtres et limitées dans leur croissance) est une première indication de l'activité fixatrice d'azote des isolats testés.

2. 14. 2 Comparaison des poids secs des parties aériennes :

Cette méthode, fréquemment utilisée, consiste à peser après séchage (4 jours à une semaine à température ambiante et atmosphère aérée ou 24 heures à 70°C à l'étuve), les parties aériennes de plantes ayant subi différents traitements.

Simple et peu coûteuse, cette méthode est cependant assez grossière car elle ne rend pas compte de la quantité d'azote dans la plante (concentration pouvant varier de 1 à 4 % d'azote dans les parties aériennes, suivant l'importance de la fixation) ; de plus des facteurs autres que la fixation peuvent provoquer les différences observées. (Elle peut néanmoins, dans certaines conditions, permettre une première approche satisfaisante, par exemple pour la

comparaison de l'efficacité des souches inoculées sur des plantes poussant sur un milieu sans azote) (Domenach et Wery, 1989).

L'analyse statistique se fait grâce au logiciel SUPERANOVA.

2. 14. 3 Mesure de l'activité réductrice d'acétylène :

Cette mesure apprécie l'activité de la nitrogénase (enzyme responsable de la fixation) qui reconnaît au moins deux substrats : N_2 et C_2H_2 , par sa capacité à réduire l'acétylène en éthylène selon une réaction analogue à la réduction de N_2 en NH_3 .

Cette méthode est utilisée pour mesurer la fixation d'azote au laboratoire ou *in situ*. Elle mesure la fixation potentielle à un instant précis et dans des conditions déterminées.

Le principe du calcul de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) est basé sur le rapport (dit facteur de conversion) C_2H_4/N_2 fixé. Il est généralement admis que ce rapport est de 3/1 bien qu'il soit très variable, car, la réduction de l'azote est couplée d'une production d' H_2 , utilisant une partie de l'énergie destinée à la fixation d'azote. Ce rapport varie également suivant les conditions d'incubation et l'expérience montre qu'il peut être compris entre 0,6 et 6,2 sans qu'on puisse l'expliquer (Minchin *et al.*, 1983). Pour minimiser l'incertitude et obtenir des résultats les plus comparables possible, toutes les mesures d'ARA sont effectuées dans des conditions standardisées et aux mêmes heures de la journée.

Les plantes de *Medicago*, *Argyrolobium* et *Lotus* sont introduites dans des flacons fermés de façon étanche. L'acétylène est injecté dans le flacon à une concentration finale de 10 %. L'activité réductrice de l'acétylène étant linéaire pendant une heure, des échantillons gazeux de 0,5 mL sont prélevés à $t=0$ et après 30 min, et la quantité d'éthylène présent dans l'échantillon est mesurée par chromatographie en phase gazeuse en utilisant un chromatographe de type Varian Aerograph série 1400, équipé d'une colonne de spherosil XOB hydrogène 075 en acier inoxydable 120 cm x 0,02 cm.

Cette méthode n'est toutefois pas une mesure exacte de l'activité réductrice effective de l'azote par la nitrogénase. En effet, dans l'air contenant 78 % d'azote et 21 % d'oxygène environ, seule une fraction des électrons est transférée effectivement à l'azote atmosphérique, l'autre fraction servant à produire de l'hydrogène. Cette fraction varie d'ailleurs largement.

D'autre part, la quantité d'énergie nécessaire à la réduction de l'acétylène par la nitrogénase ne serait pas aussi élevée que celle exigée par la réduction de N_2 .

Malgré ces imperfections, la méthode de réduction de l'acétylène est largement employée en rhizobiologie pour sa relative facilité, l'information immédiate qu'elle fournit

sur l'activité de la nitrogénase, sa possibilité d'application à des mesures au champ, la possibilité de comparer différents traitements (Drevon, 1989).

Mode de calcul de la quantité d'éthylène

L'ARA est la moyenne du nombre de moles d'éthylène dégagées par unité de temps entre divers prélèvements. On peut l'obtenir également en calculant la pente de la courbe de régression entre les diverses quantités d'éthylène obtenues en fonction du temps de prélèvement.

n=nombre de moles d'éthylène dans l'incubateur

h=hauteur du pic d'éthylène de l'échantillon

he=hauteur du pic d'éthylène de l'étalon

ve=volume d'éthylène injecté dans l'étalon

v=volume d'incubation

V=volume de l'étalon

22400= volume d'une mole de gaz à 20°C

$$n = (h/he) \times (ve/22400) \times (v/V)$$

Si le volume v est inconnu, il peut être évalué à l'aide d'un gaz traceur qui est soit le propane, soit l'acétylène. Dans ce dernier cas on a :

$$v = (a/a_c) \times (hae/ha) \times V \quad \text{d'où} \quad n = (ve/22400) \times (a/a_c) \times (hae/ha) \times (h/he)$$

a = ml d'acétylène injecté dans l'incubateur

ac = ml d'acétylène injecté dans le volume étalon V

hae= hauteur du pic d'acétylène de l'étalon

ha= hauteur du pic d'acétylène de l'échantillon

L'ARA peut être exprimée sous différentes formes :

Dans notre cas, nous avons mesuré l'ARA globale : qui mesure l'activité fixatrice de l'ensemble des nodosités ; elle dépend du nombre total de nodosités et de l'activité de chaque nodosité. Elle est exprimée en micromoles (10^{-6} mole) de C_2H_2 réduit par heure et par plante.

2. 15 Essais d'inoculation au champ :

Nous avons choisi de tester l'inféctivité et l'efficacité au champ (figure 14) de trois souches de notre collection sélectionnées en serre. Le champ choisi se situe dans la localité de Aïn el Hadjar une région semi-aride (3545 :119 Nord, 00047 6410 W, A139) appartenant à la wilaya de Saida et située à 200 Km d'Oran. Une parcelle de 900 m² a été aménagée et préparée pour les essais et séparée du reste du champ par une clôture. Des blocs de 2 m² ont été préparés en double par inoculum (figure 14), chacun contenant 4 rangées de 1m comportant 10 puits peu profonds pour disposer les graines. Deux variétés de *Medicago sativa* ont été testées, une locale et l'autre de Tunisie, les deux variétés sont originaires des régions arides.

Medicago sativa a été choisie pour ces essais car elle est appréciée par les moutons comme fourrage, certaines variétés locales semblent assez résistantes au sel et sont très recherchées par les agriculteurs des oasis (Abdelguerfi et Laouar, 2002), et enfin c'est une espèce disponible dans le commerce contrairement à *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* rarement commercialisées et présentes uniquement à une période de l'année.

Les semis sont mis au sol à raison de 10 graines par puits, pour augmenter les chances d'obtenir au moins une plante/puits, et inoculés au moment du semis avec 1 mL de suspension bactérienne de turbidité équivalente au n°1 sur l'échelle de Mc Farland, les puits sont aussitôt refermés.

La croissance des plantes a été étudiée qualitativement par observation du tallage, de la couleur et de la forme des feuilles et quantitativement par comparaison des poids secs des parties aériennes des plantes inoculées et témoins.

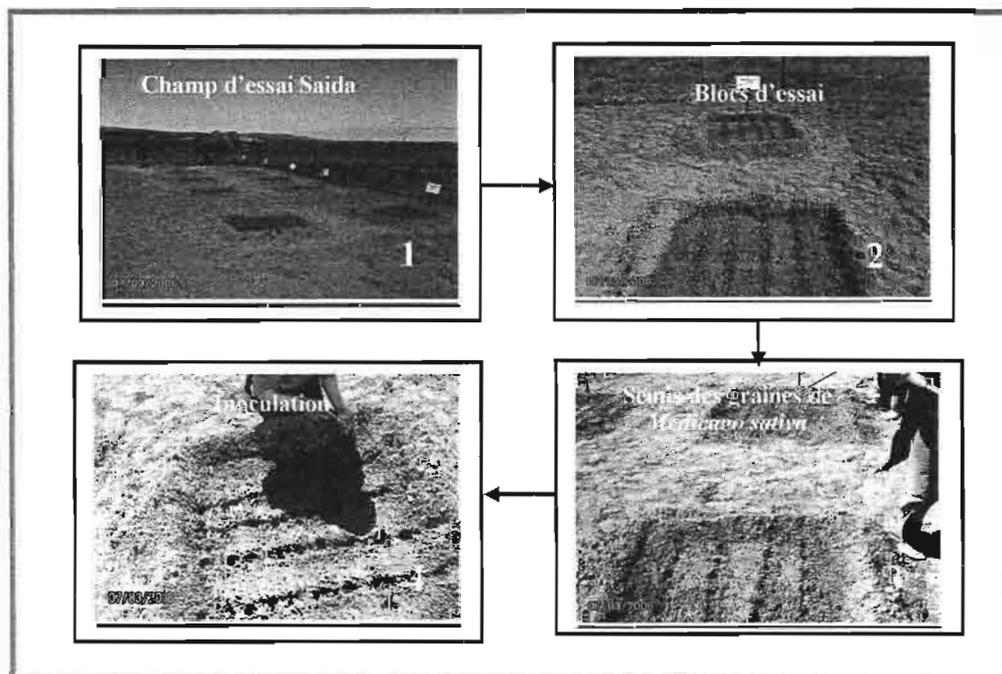


Figure 14 : Mise en place de l'essai et inoculation de graines de *Medicago sativa* au champ

- 1 : Parcelle d'essai
- 2 : Bloc d'essai
- 3 : Semis
- 4 : Inoculation par puits

Chapitre III

Résultats et Discussions

Diversité des rhizobia des régions salées et arides d'Algérie et de certains pays du sud de la méditerranée (Tunisie et Liban) et de l'Afrique de l'ouest (Sénégal)

3. Résultats et Discussion

3.1 Diversité des rhizobia des zones salées et arides d'Algérie et de quelques pays du sud de la Méditerranée (Tunisie et Liban) et d'Afrique de l'Ouest (Sénégal) :

3.1.1 Introduction :

Bien que le bassin méditerranéen soit riche en espèces végétales, les conditions climatiques et les pratiques humaines menacent cette richesse de diminution à cause de nombreux facteurs abiotiques, dont la sécheresse qui touche en particulier les zones arides et semi-arides accompagnée par la salinisation du sol. Ces facteurs limitent sérieusement la production végétale. Par ailleurs les mauvaises pratiques culturales en cours dans ces pays tendent à réduire les terres de parcours au profit de la céréaliculture et de l'arboriculture fruitière, ce qui a conduit à l'éradication de nombreuses espèces ligneuses et le surpâturage abusif à l'abandon de certaines traditions pastorales.

Dans le but de renforcer le potentiel fourrager dans les zones arides et semi-arides d'Algérie, et de réhabiliter les zones affectées par la salinité et la sécheresse, nous avons effectué des prospections dans des régions de l'Algérie soumises aux contraintes pédoclimatiques où nous avons recensé les légumineuses spontanées les plus abondantes, susceptibles de jouer un rôle écologique et économique dans ces zones et entrepris une étude de caractérisation des BNL associées. Le but final de l'étude est de sélectionner les meilleurs couples symbiotiques légumineuse /rhizobia bien adaptés au stress pour introduire et renforcer la présence de ces légumineuses dans les zones salées et arides. La sélection des partenaires microbiens effectifs permettra une meilleure croissance et survie des légumineuses d'intérêt. Dans cette étude, en plus des rhizobia isolés de légumineuses d'Algérie, nous avons inclus des rhizobia isolés d'autres légumineuses spontanées présentes dans des zones arides, salées ou dégradées de Tunisie, du Sénégal et du Liban. Au total ce sont 88 isolats qui ont été identifiés par étude de leurs caractéristiques moléculaires et phénotypiques.

L'aspect morphologique des isolats a été examiné, ainsi que leur infectivité vis-à-vis de la plante d'isolement en conditions contrôlées sur tubes Gibson.

La caractérisation génotypique comportait l'étude des séquences de l'ADNr 16S, de cinq gènes de ménage (MLSA), l'étude de l'ITS pour les *Bradyrhizobium* et les hybridations ADN-ADN. L'étude des groupes nouveaux mis en évidence par analyse génotypique a été complétée par des tests auxanographiques.

3. 1. 2 Prospection :

Nous avons effectué deux campagnes de prospection dans des régions salées (Sebkha et Littoral) et deux zones arides de l'Algérie.

Au cours de ces prospections nous avons identifié et prélevé des échantillons de légumineuses entières (racines et tiges) spontanées les plus dominantes dans ces régions et susceptibles de jouer un rôle dans la réhabilitation de sols pauvres, son enrichissement par de l'azote issu de la fixation symbiotique, dans la lutte contre la désertification et comme fourrage pour les troupeaux. Nous avons également prélevé des échantillons de sols et des gousses.

Cependant, nous avons choisi comme zone modèle d'étude « la Sebkha de Misserghin », qui est une dépression saline de l'ouest algérien, comportant un gradient de salinité des bords vers le centre. Dans cette Sebkha, nous avons remarqué en dépit de la haute salinité de la région, la présence de légumineuses appartenant principalement au genre *Medicago*, les plus abondantes étant *M. ciliaris* et *M. polymorpha* ainsi que d'autres espèces végétales. Nous avons effectué des échantillonnages de ces deux légumineuses (Plante entière pendant le mois de mars, du sol et des gousses au mois de mai), dans dix zones d'échantillonnage identifiées le long du gradient de salinité et en prenant soin de quantifier autant que possible leur présence et leur dispersion. La majorité de notre échantillonnage (> 50 %) a été prélevé de cette région.

Nous avons également prospecté des régions salées du littoral algérien où il existe une diversité considérable de légumineuses. Nous avons récolté des plantes de *Lotus creticus*, des arbustes de *Retama* dont *R. monosperma* contrairement à *R. raetam*, endémique principalement des écosystèmes arides (région de Djanet, où nous avons également fait des prélèvements de racines nodulées). Sur le littoral, on ne retrouve plus que l'espèce *R. monosperma*. Ces arbustes jouent le rôle de fixateurs de dunes de sables, empêchant leur avancée vers les terres fertiles et forêts voisines. Dans ces régions sableuses du littoral d'autres légumineuses sont également présentes : *M. marina*, *M. littoralis*, *M. minima*, *Medicago marina* qui ont été prélevées ainsi que *Scorpiurus vermiculatus* présente en bordure de la route et associée généralement à des medics. Sur les hauteurs de la plage de Madegh en

zone non sableuse, nous avons remarqué la présence d'un petit arbuste *Astragalus* sp., présent dans une zone riche en lavande et d'autres espèces florales.

Au cours de nos prospections, nous nous sommes également intéressés à certaines espèces d'*Acacia* des régions arides et salées (*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* et *Acacia* sp.) au pied desquelles nous avons récolté des échantillons de sol qui ont servi pour piéger les rhizobiums correspondants.

Étant un des plus grands pays producteurs d'hydrocarbures mondiaux, plusieurs régions d'Algérie sont polluées par le pétrole, dont la région de Batewa^{Bethia}, où nous avons prélevé des échantillons de sols pour étudier les rhizobia qui y sont présents et voir si elles appartiennent aux espèces de rhizobia connues pour leur rôle en bioremediation des sols pollués.

Les échantillons ont été collectés au cours de deux campagnes de prospections en 2003 et 2004 (figure 15).

3. 1. 3 Constitution d'une collection de souches :

Collection de l'Algérie

L'isolement des bactéries à partir des nodules racinaires récoltés *in natura* ou par piégeage, nous a permis d'obtenir une collection de 100 isolats (tableau 6). La majorité des isolats sont issus des nodules de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* originaires de la Sebkhha de Misserghin (56 isolats), le reste des isolats sont répartis comme suit : 28 isolats des régions du littoral, 7 isolats des zones arides, 3 isolats de la zone polluée de Batewa, 4 isolats de la région salée d'Es-Senia et 2 isolats d'Oran.

Collection du LSTM

Dans le cadre du projet européen BACDIVERS, 15 souches de *Ensifer* (*Sinorhizobium*) et une souche de *Phyllobacterium* provenant de la zone infra-aride de la Tunisie, du Liban et du Sénégal ont été incluses.

Ces souches ont été isolées de nodules des légumineuses suivantes : *Argyrolobium uniflorum*, *Lotus creticus*, *Medicago sativa*, *Trigonella monspeliaca*, *Trigonella foenum graecum*, *Trifolium subterraneum* et *Lotus arabicus* (tableau 7).

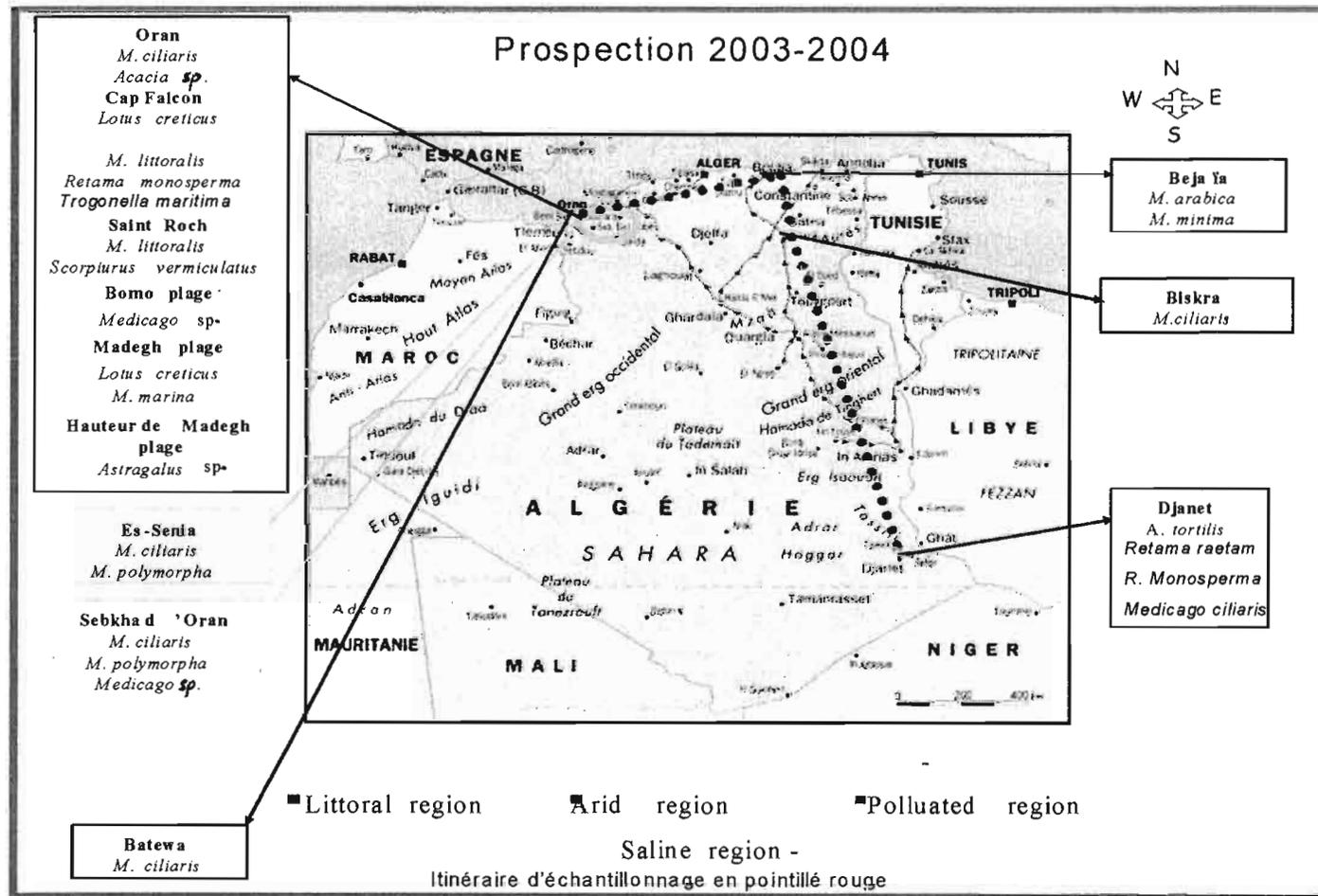


Figure 15 : Provenance des isolats (Carte d'Algérie).

Tableau 6 : Isolats bactériens obtenus à partir de nodules récoltés *in natura* (*) ou par piégeage (*) à partir des échantillons de sols prélevés dans différentes régions salées et arides d'Algérie (2003- 2004)**

70x20 Km Misserghin ↔ Ain Temouchent

Souches	Origine géographique	Plante d'isolement	Coordonnées (GPS) L, A (pieds)	Date d'isolement
STM 986*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 987*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 988*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 989*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 993*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 995*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 997*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1004*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1006*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1007*	Sebkha de Misserghin	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1815**	Centre de la Sebkha de Misserghin	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 990*	20 mètres du milieu de la Sebkha	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 2210*	20 mètres du milieu de la Sebkha	<i>Medicago ciliaris</i>	3535° 241 N, 00044 865 W, A 265	2004
STM 1816**	A 22 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 1817**	A 22 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 991*	A 22 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 992*	A 22 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 2212*	40 mètres du milieu de la Sebkha	<i>Medicago sp.</i>	3535° 240 N, 00044 874 W, A272	2004
STM 2213*	//	//	//	2004
STM 2214*	//	//	//	2004
STM 2218*	//	//	//	2004
STM 2219*	//	//	//	2004
STM 1819**	A 42 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 1818	//	//	//	2003
STM 994*	//	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 2220*	60 mètres du milieu de la Sebkha	<i>Medicago ciliaris</i>	3535° 258N, 00044 886 W, A 233	2004
STM 2221*	60 mètres du milieu de la Sebkha	//	//	2004
STM 2223*	80 mètres du milieu de la Sebkha	<i>Medicago ciliaris</i>	3535° 265 N, 00044 896 W, A274	2004
STM 2224*	//	<i>Medicago ciliaris</i>	//	2004
STM 2225*	//	<i>Medicago ciliaris</i>	//	2004
STM 2227*	//	//	//	2004
STM 996*	//	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 998*	//	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 999*	//	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1000*	//	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1001*	//	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1081**	//	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1082**	//	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 2229*	120 mètres du milieu de la Sebkha	<i>Medicago ciliaris</i>	3535° 273 N, 00044 919 W, A 264	2004
STM 1003*	//	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 2231*	130 mètres du milieu de la Sebkha	<i>Medicago ciliaris</i>	//	2004
STM 2233*	//	//	//	2004
STM 2234*	//	//	//	2004
STM 2235*	//	//	//	2004
STM 1820**	A 182 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1821**	A 222 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 1822**	A 222 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 1823**	A 282 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1824**	A 282 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 1825**	A 302 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1826**	A 302 m. du milieu de la Sebkha	<i>M. polymorpha</i>	-	2003
STM 2236*	Début de la Sebkha (> 300 m)	<i>Medicago sp.</i>	3535° 252 N, 00044 858 W	2004
STM 2237*	//	//	//	2004
STM 2238*	Bordure de la Sebkha (>400m)	<i>Medicago ciliaris</i>	3535° 292 N, 00044 858	2004

Diversité des rhizobia des zones salées et arides d'Algérie et de certains pays du sud de la méditerranée (Tunisie et Liban) et de l'Afrique de l'Ouest (Sénégal)

			W	
STM 2239*	Bordure de la Sebkha	//	//	2004
STM 2240*	Bordure de la Sebkha	<i>Medicago polymorpha</i>	//	2004
STM 1067*	Oran	<i>Medicago ciliaris</i>	//	2003
STM 1068*	//	<i>Acacia sp.</i>	//	2003
STM 2242*	Es-Senia (ouest) sol noir	<i>Medicago ciliaris</i>	//	2004
STM 2243*	//	//	//	2004
STM 2244*	Es-Senia (est) sol rouge	<i>Medicago polymorpha</i>	//	2004
STM 2247*	Es-Senia (est) sol rouge	<i>Medicago ciliaris</i>	-	2004
STM 1061*	Cap Falcon	<i>Lotus creticus</i>	-	2003
STM 1062*	Cap Falcon	<i>M. littoralis</i>	-	2003
STM 1063*	Cap Falcon	<i>Trigonella maritima</i>	-	2003
STM 1072**	Cap Falcon	<i>Retama monosperma</i>	-	2003
STM 1073**	Cap Falcon	<i>Retama raetam</i>	-	2003
STM 2253*	Cap Falcon	<i>Lotus creticus</i>	-	2004
STM 2254*	//	//	-	2004
STM 2255*	//	//	-	2004
STM 2257*	Cap Falcon	<i>Retama monosperma</i>	-	2004
STM 2258*	//	//	-	2004
STM 2259*	Cap Falcon	<i>Medicago littoralis</i>	-	2004
STM 2260*	//	//	-	2004
STM 2282*	Cap Falcon	<i>Lotus creticus</i>	-	2004
STM 2283*	Cap Falcon	<i>Lotus creticus</i>	-	2004
STM 2284*	Cap Falcon	<i>Lotus creticus</i>	-	2004
STM 2285*	Cap Falcon	<i>Retama monosperma</i>	-	2004
STM 2248*	Saint Roch	<i>Medicago littoralis</i>	-	2004
STM 2250*	//	//	-	2004
STM2251*	//	<i>Scorpiurus vermiculatus</i>	-	2004
STM 2252*	//	//	-	2004
STM 2262*	Bomo-plage	<i>Medicago sp.</i>	-	2004
STM 2266*	Madègh-plage	<i>Medicago marina</i>	-	2004
STM 2267*	//	//	-	2004
STM 2268*	//	//	-	2004
STM 2270*	Hauteur de Madègh-plage	<i>Astragalus sp.</i>	-	2004
STM 1064*	Bejaïa	<i>M. minima</i>	-	2003
STM 2265*	//	//	-	2004
STM 1065*	Bejaïa	<i>M. arabica</i>	-	2003
STM 1066*	Djanet	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	-	2003
STM 1070**	Djanet	<i>Retama raetam</i>	-	2003
STM 1071**	Djanet	<i>Retama monosperma</i>	-	2003
STM 1078**	Djanet	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	-	2003
STM 1079**	Djanet	<i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	-	2003
STM 1827**	Biskra	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 1828**	Biskra	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 2272**	Batewa	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 2274**	Batewa	<i>M. ciliaris</i>	-	2003
STM 2278**	Batewa	<i>M. ciliaris</i>	-	2003

M.: *Medicago*
A.: *Acacia*
L : longitude
A : Altitude (pieds)
W : OUEST
N : NORD
- : non déterminée

Tableau 7 : Souches originaires de Tunisie, Liban et Sénégal de la collection LSTM incluses dans cette étude.

Souches	Autre désignation	Plante d'isolement	Origine géographique	Référence
ORS 1444	RAT 022	<i>Argyrobium uniflorum</i>	Tunisie	Zakhia <i>et al.</i> , 2004
ORS 1410	RAT 101	<i>Lotus creticus</i>	Tunisie	Zakhia <i>et al.</i> , 2004
ORS 1407	RAT 011	<i>Argyrobium uniflorum</i>	Tunisie	Zakhia <i>et al.</i> , 2004
ORS 1400	RAT 001	<i>Argyrobium uniflorum</i>	Tunisie	Zakhia <i>et al.</i> , 2004
ORS 1401	RAT 002	<i>Argyrobium uniflorum</i>	Tunisie	Zakhia <i>et al.</i> , 2004
STM 354	RAT 1100a	<i>Medicago sativa</i>	Tunisie	Zakhia <i>et al.</i> , 2004
ORS 2154		<i>Lotus arabicus</i>	Sénégal	Sy, 2001
ORS 2133		<i>Lotus arabicus</i>	Sénégal	Sy, 2001
ORS 529		<i>Lotus arabicus</i>	Sénégal	Sy, 2001
STM 1086		<i>Trigonella foenum graecum</i>	Liban	Zakhia, 2004
STM 1098		<i>Trigonella foenum graecum</i>	Liban	Zakhia, 2004
STM 1093		<i>Medicago sp.</i>	Liban	Zakhia, 2004
STM 1087		<i>Trigonella foenum graecum</i>	Liban	Zakhia, 2004
STM 1723		<i>Trigonella monspeliaca</i>	Liban	Zakhia, 2004
STM 1731		<i>Trifolium subterraneum</i>	Liban	Zakhia, 2004
ORS 2126		<i>Lotus arabicus</i>	Sénégal	Zakhia <i>et al.</i> , 2004

3. 1. 4 Etude de la diversité des isolats :

Les isolats ont été caractérisés par des méthodes phénotypiques et génotypiques.

3. 1. 4. 1 Caractéristiques morphologiques :

3. 1. 4. 1. 1 Caractéristiques macroscopiques :

Toutes les souches étudiées présentent les caractéristiques morphologiques des rhizobia (Dommergues et Mangenot, 1970), elles forment sur YMA des colonies de couleur blanchâtre à crème, opaque ou d'aspect marbré dont la mucosité varie selon les souches (figure 16). Selon Upchurch et Elkan (1977), Bekki, (1986), Tao *et al.* (1992) et Zahran *et al.* (1994), la richesse en exopolysaccharides de certaines souches participe à leur tolérance à la salinité.

D'autres colonies sont au contraire blanchâtres à centre opaque ou légèrement jaunâtres et non muqueuses.

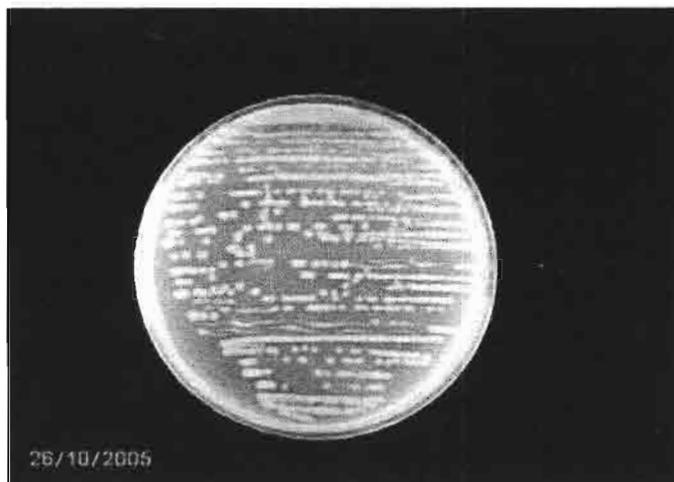


Figure 16 : Aspect macroscopique des colonies de rhizobia après 72 heures de culture sur YMA à 28°C.

3. 1. 4. 1. 2 Caractéristiques microscopiques

L'aspect microscopique des isolats est visualisé après coloration de Gram : Les isolats présentent des formes bâtonnets généralement isolés à Gram-négatif (figure 16). Les caractères morphologiques observés sont en accord avec ceux décrits pour des rhizobiums (Vincent, 1970; Dommergues et Mangenot, 1970 ; Jordan, 1984 ; de Lajudie *et al.*, 1994 ; Rome *et al.*, 1996).

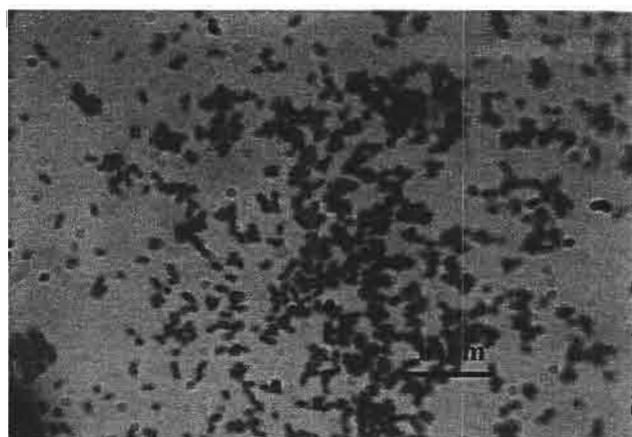


Figure 17 : Caractéristiques microscopiques des isolats étudiés après coloration de Gram. [Grossissement x1000]

3. 1. 4. 2 Caractéristiques génotypiques :

3. 1. 4. 2. 1 Séquençage de l'ADNr 16S

3. 1. 4. 2. 1. 1 Séquençage partiel de l'ADNr 16S :

Selon Grimont (1998), il est préférable de faire un premier screening des souches par des méthodes de séquençage partiel ou par des profils de restriction, moins onéreuses et assez rapides pour établir une première identification des isolats sauvages.

Dans notre échantillonnage, la majorité des isolats sont issus de nodosités racinaires de différentes espèces de *Medicago*, principalement de *M. ciliaris* et *M. polymorpha* connues comme plantes hôtes de plusieurs espèces de *Ensifer* dont *E. meliloti* et *E. medicae* (de Lajudie *et al.*, 1994; Rome *et al.*, 1996 ; Bailly *et al.*, 2006). On présume alors qu'une grande partie de nos isolats pourrait être affiliés à ce genre de rhizobia.

Notre stratégie, pour un premier criblage des isolats était de séquencer une partie de l'ADNr 16S, la plus discriminante entre les espèces de *Ensifer*. Cette partie de 591 pb située entre les positions 440 et 1031 du gène a été obtenue par alignement des séquences complètes de l'ADNr 16S des différentes souches de référence de *Ensifer* (Gilles Béna, communication personnelle), mais elle permet également d'identifier les autres espèces de rhizobia.

Le segment choisi est séquencé après amplification par PCR du gène codant pour l'ARNr 16S (figure 18).

Cette première analyse, nous a permis de rapprocher nos isolats de cinq genres de BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuses) sur la base de la comparaison des séquences obtenues par blast (Altschul *et al.*, 1997), suivie par la construction d'un arbre phylogénétique de distance par la méthode de Neighbor-Joining. Le dendrogramme obtenu montre la position des souches à l'intérieur de BNL connues (figure 19).

Ainsi différents groupes ont été identifiés.

Le premier groupe de souches est relié à l'espèce *E. medicae*. Il rassemble 35 souches isolées des nodules de *M. ciliaris*, *M. polymorpha*, *Medicago* sp., *M. littoralis*, *M. marina* et *Scorpiurus vermiculatus*, et qui sont principalement (27 souches) originaires de la zone d'étude « la Sebkhah de Misserghin » ainsi que de certaines régions du littoral (Bomo-plage, Madegh plage et Saint Roch) et d'autres régions (Oran, Es-Senia et Batewa). L'espèce *E. medicae* a été décrite comme le partenaire symbiotique de différentes espèces de *Medicago* dont *M. polymorpha*, contrairement à *E. meliloti* son plus proche voisin phylogénétique (ADNr 16S) qui induit sur cette espèce de *Medicago* la formation de nodules rudimentaires inefficaces (Rome *et al.*, 1996).

Le deuxième groupe, proche de l'espèce *E. meliloti* comporte 11 souches provenant également de différentes espèces de *Medicago* (*M. arabica*, *M. ciliaris*, *M. marina*, *M. minima*, *M. littoralis*), présentes dans les zones du littoral (Cap Falcon, Bejaïa, Madegh plage) ainsi que d'autres souches STM 2282 et STM 2254 isolées de *Lotus creticus*. Nous retrouvons également et contrairement au groupe précédent (*E. medicae*) des souches isolées de zones arides (Biskra et Djanet) dont la souche STM 1066 isolée des nodules d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* (Djanet) et STM 1827 et STM 1828 isolées de *M. ciliaris* (Biskra). Plusieurs auteurs

rapportent la tolérance de souches de *Ensifer* à des fortes températures pouvant atteindre 45°C (Maâtallah *et al.*, 2002), notamment celle appartenant à l'espèce *E. meliloti*. C'est ce qui explique leur présence dans des zones arides où les températures sont très élevées. La souche STM 2225 isolée de *M. ciliaris*, forme une branche à part dans ce groupe.

Le troisième groupe, proche du genre *Rhizobium*, compte 11 souches. Quatre de ces souches provenant de la Sebkha de Misserghin forment un groupe séparé proche de *Rhizobium sullae*. Trois d'entre elles STM 1819, STM 1818 et STM 1815 sont isolées de *Medicago polymorpha* et la quatrième STM 1823 de *Medicago ciliaris*.

Le quatrième groupe (12 souches) est proche du genre *Agrobacterium* groupe. Trois souches ont été isolées de *Retama monosperma* et *Lotus creticus* du littoral (Cap Falcon) et groupent avec *A. radiobacter* avec une valeur bootstrap de 86 %. Deux autres souches (STM 1000 et STM 1001) sont affiliées à l'espèce *A. rubi* (96 % de valeur bootstrap) et un séparé à l'intérieur de la branche *Agrobacterium* est formé de 6 souches dont quatre souches qui ont été isolées de *Medicago ciliaris* et *M. polymorpha* de la Sebkha de Misserghin et deux souches (STM 1078 et STM 1079) isolées d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* de la zone aride de Djanet.

Les souches STM 999 et STM 1068 sont proches respectivement de *Phyllobacterium myrsinacearum* (Blast, 97 %) et de *Bradyrhizobium japonicum* (Blast, 98 %), leur position taxonomique exacte sera confirmée par le séquençage total de l'ADNr 16S.

Le reste des isolats forment un groupe à part en majorité proche du genre *Pseudomonas*. Certaines bactéries appartenant à ce genre ont déjà été décrites comme associées à des légumineuses (Zakhia *et al.*, 2006b ; Benhizia *et al.*, 2006).

Il a été démontré par certains auteurs que des souches de *Pseudomonas putida* peuvent favoriser la nodulation et la fixation d'azote chez la fève en facilitant la nutrition phosphatée (De Freitas *et al.*, 1993). D'autres populations de *Pseudomonas fluorescens* jouent un rôle favorable dans l'établissement de la symbiose entre des arbres et des champignons ectomycorhiziens ce qui favorise l'implantation d'arbres tels que des *Acacia* australiens (*A. holosericea*) dans les régions du Sahel (Founoune *et al.*, 2002). Ces dernières années, la caractérisation de certaines souches capables de noduler certaines légumineuses tropicales ont été identifiées comme *Burkholderia* et *Ralstonia*, deux genres qui font partie de la sous-classe des beta-protéobactéries et issus de la subdivision du genre *Pseudomonas* (Moulin *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2001). Les souches de notre collection d'Algérie appartenant à ce groupe de bactéries pourraient donc constituer d'intéressantes perspectives sur le plan fondamental et appliqué.

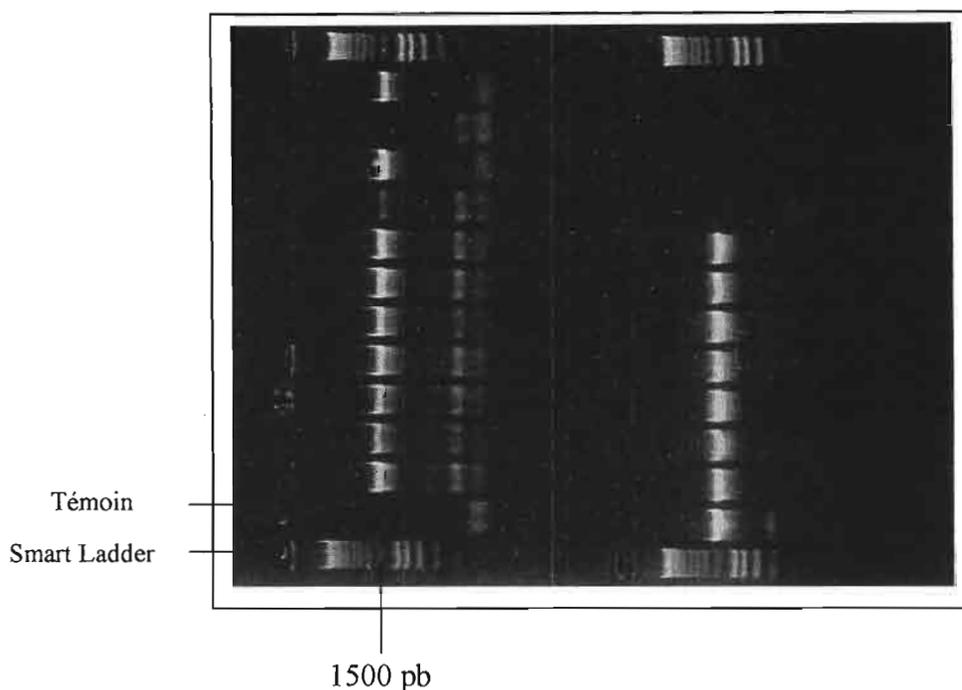


Figure18 : Segment d'ADN codant pour l'ARNr 16S amplifié par PCR.

Smart Ladder : (marqueur de taille moléculaire de gauche à droite : 10000 8000 6000 5000 4000 3000 2500 2000 1500 1000 800 600 400 200 pb).

Ces résultats préliminaires montrent une grande diversité des rhizobiums au sein de notre collection : ainsi nous trouvons que l'espèce *Medicago ciliaris* en Algérie est associée à plus de trois genres de BNL (*Ensifer*, *Rhizobium* et *Phyllobacterium*), alors que dans la littérature, elle n'est décrite comme l'hôte que de certaines espèces de *Ensifer* (Rome *et al.*, 1996 ; de Lajudie *et al.*, 1994) ou récemment de *Bradyrhizobium yuanmingense* (Yao *et al.*, 2002).

Parmi les souches isolées de la zone polluée de Batewa, deux souches sont proches de *E. medicae* (STM 2272, STM 2278) et une souche proche de *E. meliloti* (STM 2274). Ces souches ont été isolées par piégeage en l'absence de la plante hôte dans le site d'échantillonnage. Dans la littérature, des bactéries appartenant aux rhizobia dans le genre *Cupriavidus* (*Ralstonia*) dont certaines souches de *Cupriavidus taiwanensis* (Vanechoutte *et al.*, 2004) peuvent avoir ou acquérir des propriétés de bioremediation dans la dépollution de sols ou des eaux pollués par des métaux lourds ou des composés organiques chloridriques. Hancock *et al.* (1998) rapportent qu'une bactérie apparentée au *Rhizobium* peut oxyder le bromure de methyl (MeBr) dans un sol additionné de fumure en CO₂ ce qui suggèrent que dans le futur les rhizobia joueront en plus de leur rôle dans la revégétalisation de sites dégradés et enrichissement de sol en azote, un rôle écologique important aidant à la dépollution de certaines zones polluées et leur réhabilitation (N'zoué *et al.*, 2007 ; Zahran, 1999). Dans la littérature, il a été rapporté également que des espèces du genre *Burkholderia*

peuvent dégrader plusieurs composés dont le méthylterbutylester, le toluène, l'hexane, éthanol, acétone, et le pétrole. Le genre *Burkholderia* renferme des espèces fixatrices d'azote associées aux plantes mais dont certaines sont reconnues aussi comme pathogènes de l'homme (*B. cepacia*) (N'zoué *et al.*, 2007). Néanmoins, les souches identifiées dans la zone polluée de Batewa ont été affiliées à l'espèce *E. meliloti* et *E. medicae* dont on n'a pas reconnu jusqu'à ce jour des propriétés de bioremediation. Il serait intéressant en perspectives d'investir des recherches dans ce sens, en augmentant l'échantillonnage dans cette zone et en essayant d'identifier ces propriétés si elles existent chez des BNL de cette région.

Ce criblage sur la base du séquençage partiel de l'ADNr 16S, nous a permis de sélectionner des 100 souches de départ, 72 souches appartenant aux BNL et qui sont regroupées dans différents genres.

Pour compléter la collection des souches tolérantes aux conditions de salinité et d'aridité, nous nous sommes intéressés à des isolats de la collection STM (Montpellier) provenant de la zone infra aride de la Tunisie (23 isolats), d'une région du sahel sénégalais (7 isolats) et de régions dégradées du Liban (10 isolats) et qui peuvent donc renfermer des souches tolérantes au stress pédoclimatique de ces régions. Un criblage de ces isolats sur la base du séquençage partiel de l'ADNr 16S, montre que la majorité des souches appartiennent au genre *Ensifer*. Cependant le statut taxonomique exact de certaines de ces souches reste à confirmer. Ainsi des 40 souches de la collection STM nous nous sommes intéressés à 16 souches formant des groupes séparées dans le genre *Ensifer* et dont certaines sont isolées de légumineuses dont le partenaire symbiotique est mal connu, comme *Argyrolobium uniflorum* et à une souche appartenant au genre *Phyllobacterium*.

Pour compléter la caractérisation des souches d'Algérie, de Tunisie, du Liban et du Sénégal, nous avons choisi de compléter le séquençage de l'ADNr 16S de un ou plusieurs représentants des groupes obtenus en séquençage partiel. Les groupes choisis sont délimités par un encadré coloré (figure 20)

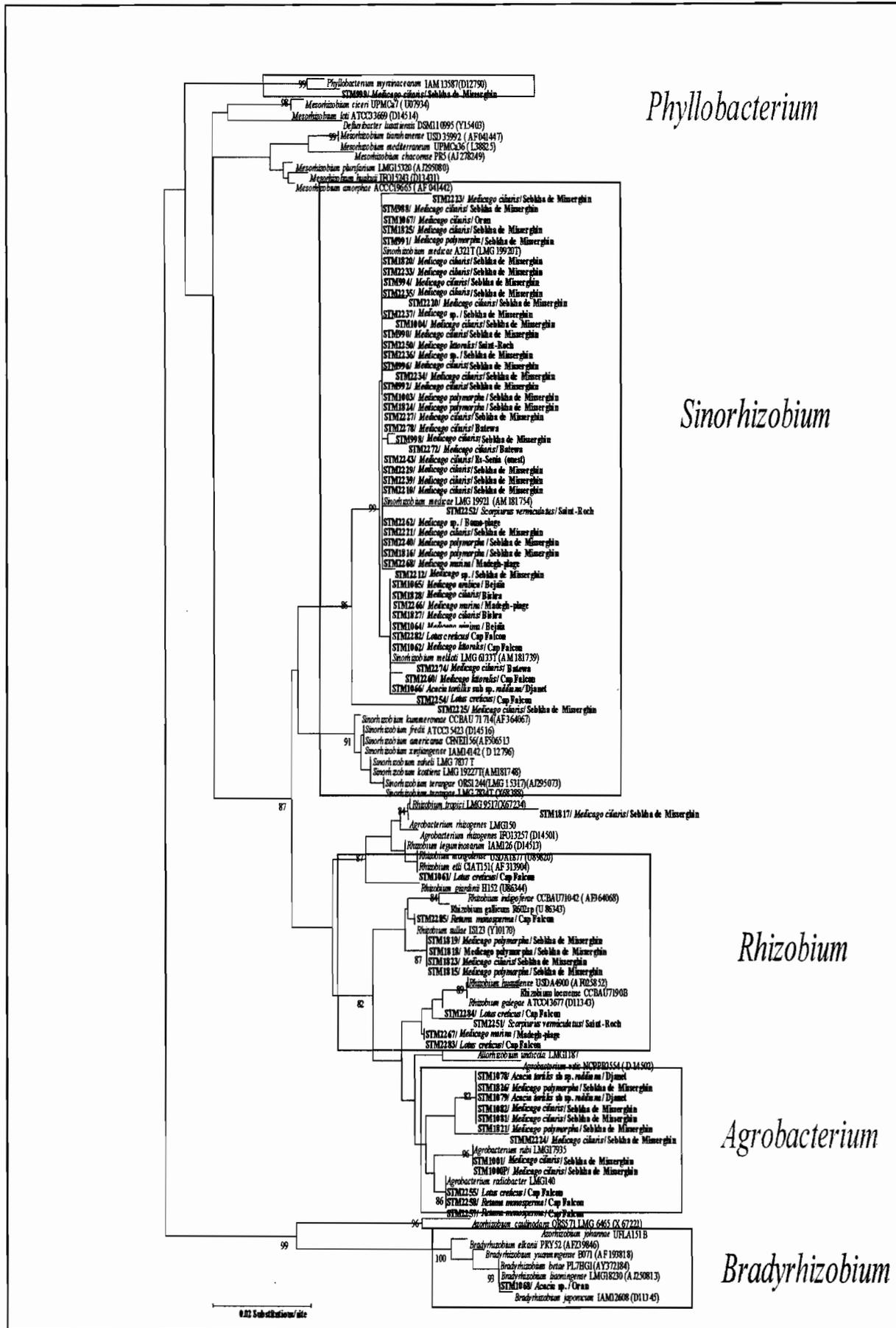


Figure 19: Dendrogramme basé sur la comparaison des séquences de la région 440-1031 du gène codant pour l'ARNr 16S, obtenu par la méthode du Neighbor-Joining et montrant la position phylogénétique de différentes souches d'Algérie. Les groupes sont encadrés en couleurs. Les nouvelles séquences sont en gras. Les valeurs bootstrap > 80 % qui dérivent de 1000 répétitions sont indiquées dans les branchements.

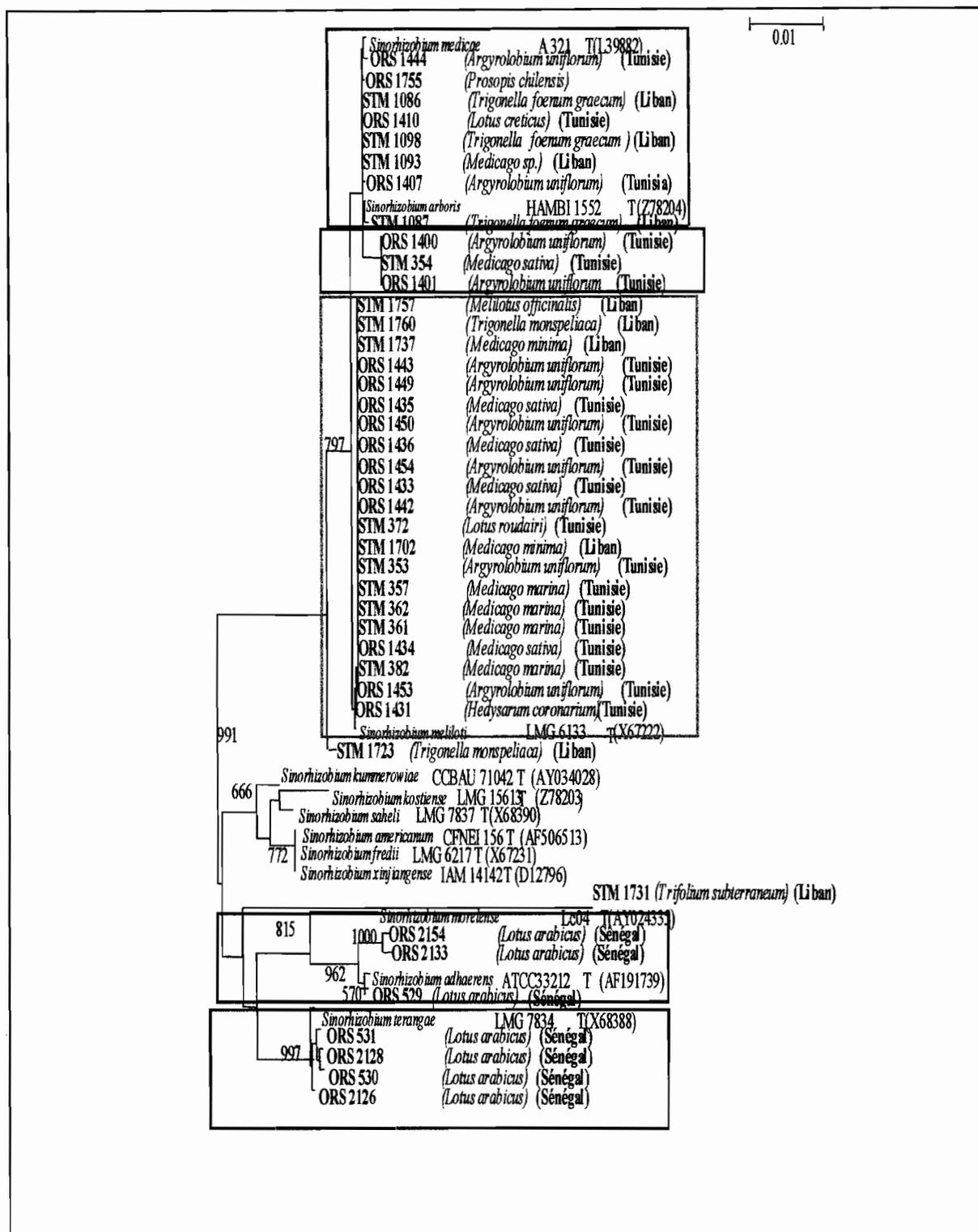


Figure 20 : Dendrogramme comparant les séquences partielles de l'ADNr 16S (413 pb, positions 497-910) et montrant la position phylogénétique des souches originaires du Sénégal, de Tunisie et du Liban.

3. 1. 4. 2. 1. 2 Séquençage total de l'ADNr 16S :

Nous avons choisi de compléter le séquençage de l'ADNr 16S (figure 21) de représentants des différents groupes obtenus précédemment par séquençage partiel (figures 19, 20) ainsi que toutes les souches formant des groupes distincts des espèces de rhizobia connues ou isolées de légumineuses dont le microsymbiote est mal connu.

L'alignement obtenu avec les différentes séquences de l'ADNr 16S des souches sélectionnées et qui a servi à la reconstruction de l'arbre phylogénétique s'étend sur 1340 pb.

Dans le groupe de *E. meliloti*, nous avons séquencé le gène ARNr 16S des souches STM 1062 (*Medicago littoralis*/Cap Falcon), STM 1064 (*Medicago minima*/Bejaia) d'Algérie et ORS 1449 (*Argyrolobium uniflorum*/Tunisia) ainsi que STM 1723 (*Trigonella monspeliaca*/Liban). Le résultat obtenu indique que ces souches sont affiliées à cette espèce.

Dans le groupe de *E. medicae*, nous avons choisi des souches isolées de différentes plantes. Les résultats montrent que des souches de *E. medicae* peuvent être les microsymbiotes de différentes légumineuses. Ainsi, les souches STM 1003 et STM 1816 affiliées à cette espèce sont isolées de *M. polymorpha*, l'hôte principal de la souche de référence de *E. medicae* A 321^T (Rome *et al.*, 1996), mais d'autres souches isolées de *M. ciliaris* (STM 990, STM 994)/Algérie, de *Medicago* sp. (STM 1093)/Liban et de *Trigonella foenum graecum* (STM 1086, STM 1098)/Liban groupent également avec cette espèce. Ces résultats rejoignent ceux de Brunel *et al.* (1996), Rome *et al.* (1996) qui ont observé que les souches de *Ensifer medicae* présentent un spectre d'hôte plus large que celui de *E. meliloti*. Concernant les souches originaires de Tunisie et du Sénégal, nous avons observé en séquençage partiel la présence de trois groupes séparés dans le genre *Ensifer* des souches de référence connues. Le séquençage de l'ADNr 16S de l'ensemble de ces souches montre qu'elles forment bien trois groupes homogènes, séparés, monophylétiques avec des valeurs bootstrap de 99-100 % et des homologies de séquences intragroupes de 100 %.

Le premier cluster (cluster A), regroupe les souches ORS 1444, ORS 1407 isolées d'*Argyrolobium uniflorum* et ORS 1410 isolée de *Lotus creticus*. Zakhia *et al.* (2004) ont montré que des isolats d'*Argyrolobium uniflorum* étaient proches de *E. meliloti*/*E. medicae* ainsi que de *Rhizobium* par la technique PCR-RFLP de l'ADNr 16S. Les mêmes auteurs ont identifié des souches isolées de *Lotus creticus* comme affiliées à *Ensifer*, *Bradyrhizobium* et *Rhizobium galegae*, une espèce endosymbiote réputée spécifique de *Galega orientalis* et *Galega officinalis* (Lindström, 1989 ; Radeva *et al.*, 2001).

La comparaison des séquences d'ADNr 16S des trois souches montre qu'elles sont identiques à 100 % et forment un **groupe séparé** parmi les espèces de *Ensifer*. Les

représentants du cluster A ont été comparés en homologie de séquence avec les souches de référence de *Ensifer* les plus proches du cluster A. Les valeurs d'homologie de séquences sont de 99,7 % avec chacune des souches type de *E. medicae* LMG 19920^T, *E. meliloti* LMG 6133^T et *E. arboris* LMG 1419^T. Cette même valeur correspond à l'homologie entre l'espèce *E. medicae* A321^T et l'espèce *E. meliloti* (Rome *et al.*, 1996). Ceci suggère que le cluster A peut représenter une espèce séparée.

Le deuxième groupe (cluster B), représenté par les souches ORS 2133, ORS 529 et ORS 2154, présentent la même séquence d'ADNr 16S, proche de *E. adhaerens* gvA et plus éloignée de celles des deux autres genomovars B, C de cette espèce (Willems *et al.*, 2003a). Cependant, en terme d'homologies de séquences, on constate que le cluster B est plus proche de *E. adhaerens* gv C (valeur de 99,8 %) que de *E. adhaerens* gvA (99,7 %). La position taxonomique de ce groupe reste incertaine.

Les souches ORS 1400, ORS 1401 et STM 354 forment un groupe homogène (cluster C) proche de l'espèce *E. teranga* LMG 7834^T (53 % de valeur de bootstrap). La comparaison de séquences entre les membres du cluster C et la souche de référence de *E. teranga* indique une valeur d'homologie de 98,8 %. Ce niveau d'homologie correspond à celui qui existe entre les deux espèces *E. medicae* A321^T et *E. fredii* USDA 205^T (Rome *et al.*, 1996). Ceci suggère fortement que ce cluster pourrait représenter une autre nouvelle espèce.

Nous avons observé que le cluster C est par ailleurs proche de la nouvelle espèce *Ensifer mexicanum* (LMG 23932^T) (Lloret *et al.*, 2007) ; cependant par comparaison des séquences entre cette souche et les membres du cluster, nous avons relevé 13 différences, ce qui indique que les souches du cluster C n'appartiennent pas à cette espèce.

Dans notre étude, nous avons également complété le séquençage de l'ADNr 16S des autres groupes de BNL.

Dans le groupe des *Rhizobium* et *Agrobacterium*, nous avons distingué deux clusters séparés des espèces connues. Le Cluster D composé de six souches : STM 1079, STM 1078, STM 1081, STM 1082, STM 1826 et STM 1821, se rapproche des groupes G2 et G9 d'*Agrobacterium tumefaciens*. La valeur de bootstrap qui relie ce groupe aux souches de référence d'*Agrobacterium* est de 98 %.

Le cluster E regroupe quatre souches, STM 1815, STM 1818, STM 1823 qui présentent la même séquence d'ADNr 16S et forment un groupe avec la souche STM 1819. Cette dernière souche présente 99,07 % d'homologie de séquence avec *R. sulae* IS 123^T.

Ceci indique qu'elle peut également à ce stade représenter une nouvelle espèce dans le genre *Rhizobium*.

Le reste des souches représentant les autres groupes de BNL se situent à l'intérieur des espèces de *Ensifer* (*E. meliloti* et *E. medicae*), de *Rhizobium* (*R. tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum*), de *Phyllobacterium ifriqiyense* (100 % d'homologie de séquence avec STM 999 isolée de *Medicago ciliaris* et STM 1731 isolée de *Trifolium subterraneum* avec *Phyllobacterium ifriqiyense* STM 370^T), *Bradyrhizobium* (STM 1068 présente une homologie de séquence d'ADNr 16S de 99,9 % avec *B. liaoningense* LMG 1823Ot1).

Il est de plus en plus souvent remarqué que le seul marqueur ribosomique ADNr 16S présente des limites pour définir la relation phylogénétique exacte entre les taxa, notamment en raison de possibilité de transferts horizontaux et de phénomènes de mutations (Ueda *et al.*, 1999 ; Schouls *et al.*, 2003). Il est recommandé que les résultats obtenus par cette analyse soient confirmés par les phylogénies d'autres gènes marqueurs (Vinuesa *et al.*, 2005a, 2005b).

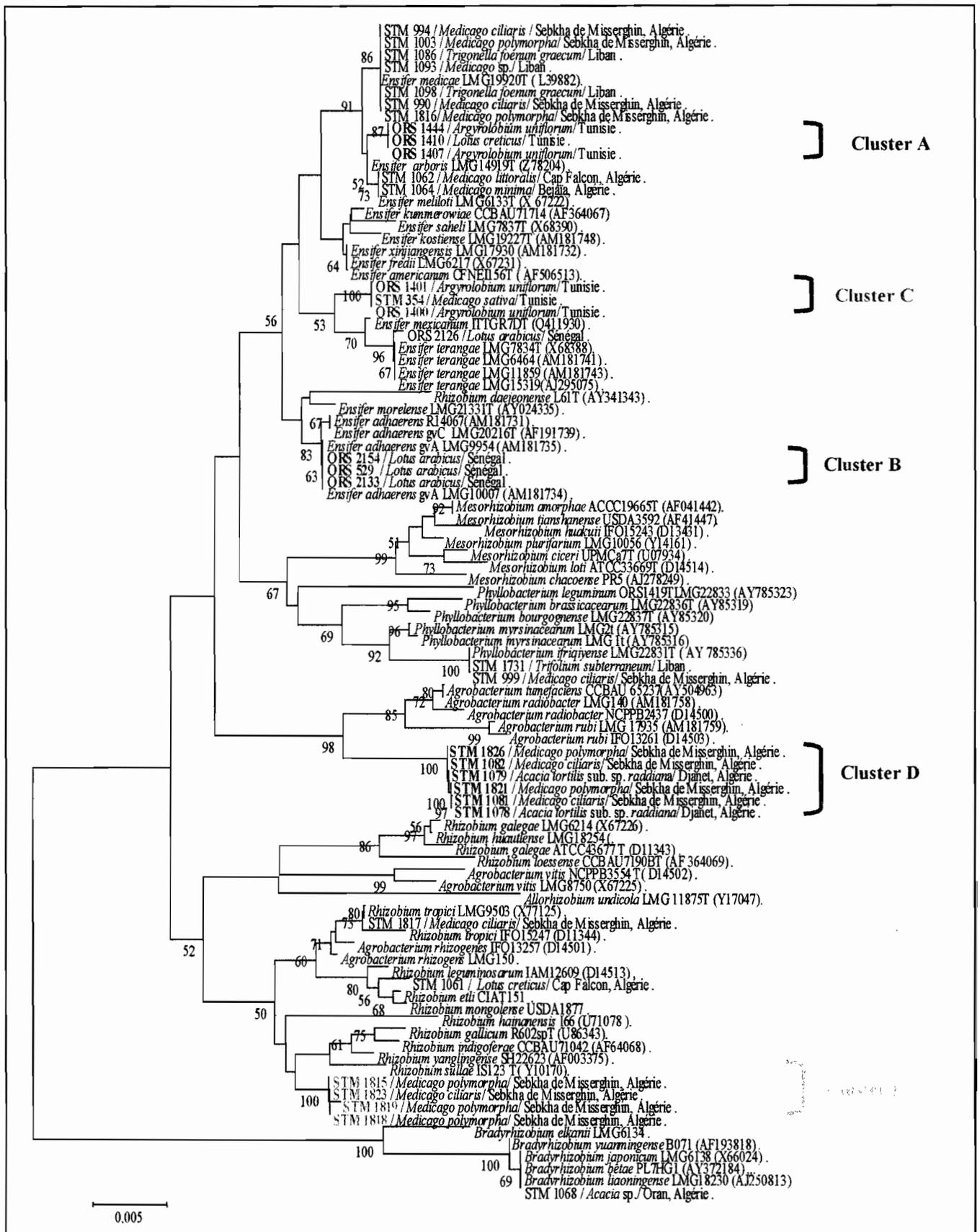


Figure 21 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S obtenu par la méthode du Neighbor-Joining, en utilisant la distance de Kimura 2. Les groupes séparés sont en couleurs. Les valeurs données sont des valeurs bootstrap issues de 1000 répétitions.

3. 1. 4. 2. 2 MLSA (Multilocus Sequence Analysis) :

Actuellement, le critère majeur pour la délimitation des espèces, l'hybridation ADN-ADN présente de nombreux inconvénients qui remettent en question son caractère incontournable.

La technique est fastidieuse à mettre en œuvre, les résultats, de nature comparative, ne sont pas toujours simples d'interprétation ni comparables entre les laboratoires du fait de l'absence d'une technique universelle. La nature même du génome des BNL, pour une grande part composé de plasmides soumis à variations, fait douter de ce que les valeurs d'hybridations représentent en réalité (Zakhia et de Lajudie, 2006). Toutes ces contraintes, ont poussé les taxonomistes à réfléchir à d'autres méthodes de caractérisation dont la technique d'analyse de séquences de gènes codant pour des protéines (MLSA).

La technique MLSA a été proposée par Maiden *et al.* (1998) et employée d'abord pour des études épidémiologiques. Cette technique repose sur le choix d'un certain nombre de gènes ancillaires (housekeeping gènes) afin de déterminer leur séquence. Chaque souche est ainsi caractérisée par un ensemble de séquences correspondant aux gènes choisis. Les dendrogrammes construits à partir de matrices de similarité par la MLSA sont généralement concordants avec ceux obtenus par la MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis).

La classification actuelle des rhizobia est fortement influencée par la phylogénie obtenue avec le séquençage de l'ADNr 16S (Young *et al.*, 2004). On sait cependant que ce seul gène ne peut refléter l'évolution de l'ensemble du génome. Le comité *ad hoc* pour la réévaluation de la définition de l'espèce en bactériologie (Stackebrandt *et al.*, 2002), recommande de séquencer en plus de l'ADNr 16S, au moins cinq gènes de ménage et de comparer les phylogénies obtenues. Des applications de la MLSA pour des études populationnelles et de taxonomie sont de plus en plus utilisées (Gaunt *et al.*, 2001, Stepkowski *et al.*, 2003 ; Vinuesa *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c).

Dans notre étude, nous avons complété la caractérisation des trois groupes séparés en ADNr 16S (clusters A, B, C) par le séquençage de cinq gènes de ménage: *atpD*, *recA*, *glnA*, *gltA* et *thrC* choisis sur la base d'une étude comparative effectuée sur l'ensemble des espèces de *Ensifer* et *Rhizobium* connues (Martens *et al.*, 2007 ; Gaunt *et al.*, 2001).

Pour les clusters D et E la comparaison des séquences des membres de ces clusters avec les souches de référence auxquelles ils se rapprochent le plus en ADNr 16S (*R. sultae* et *Agrobacterium*) n'a pas été faite en raison de l'absence de séquences disponibles de souches de référence pour les cinq gènes.

Pour les groupes (A, B et C), la taille des amplifiats de chaque gène a été vérifiée en comparaison avec le Smart Ladder (figure 22).

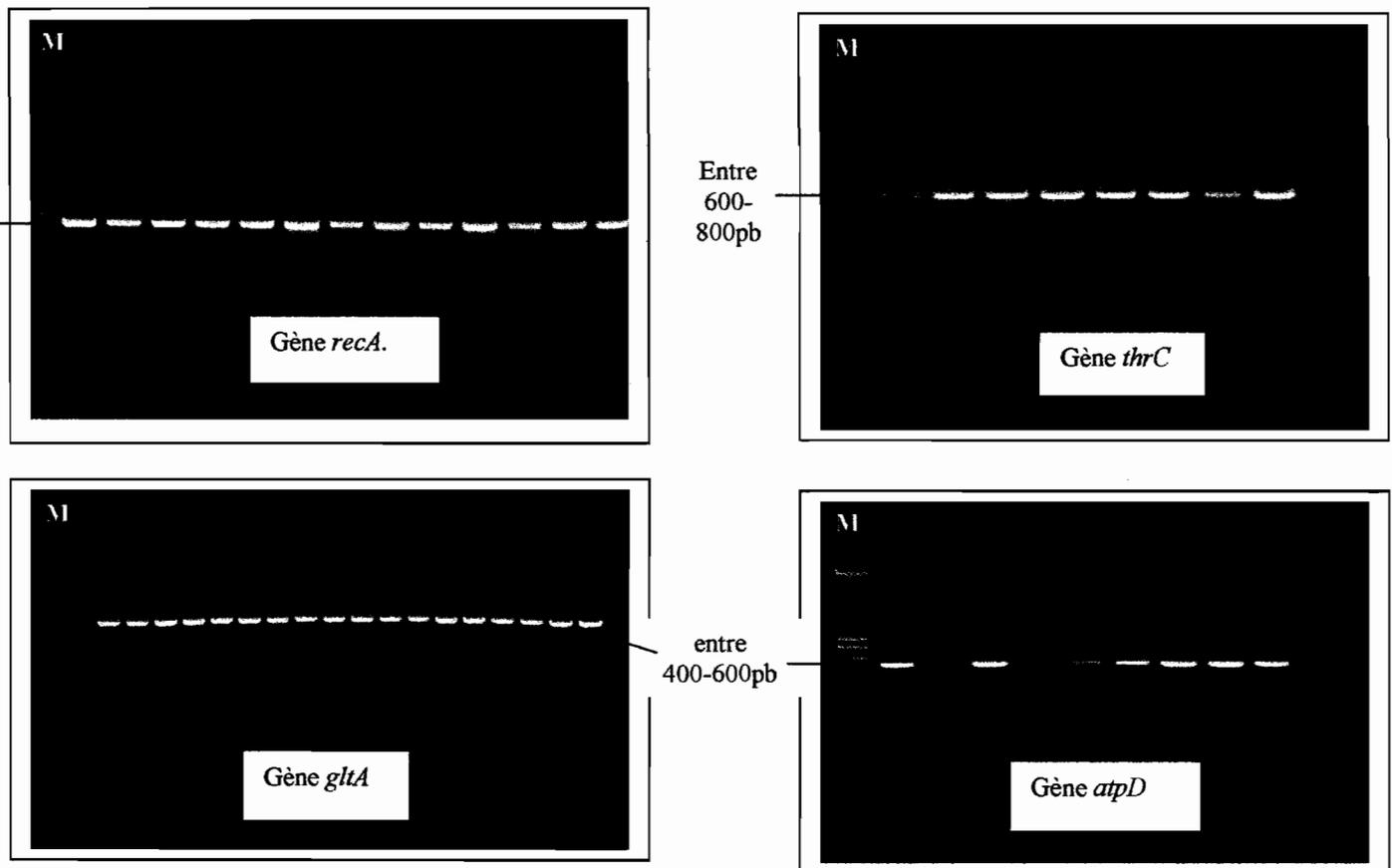


Figure 22 : Amplifiats des différents gènes de ménage, comparés au marqueur de taille moléculaire le Smart Ladder (M) sur gel d'agarose.

Nous avons obtenu différentes longueurs d'alignement des séquences partielles de gènes qui ont servi à la construction d'arbres phylogénétiques : *glnA* (977 pb), *gltA* (681 pb), *recA* (550 pb), *atpD* (461 pb) et *thrC* (636 pb).

Les séquences de différents gènes des membres des trois clusters ont été analysées individuellement puis regroupées dans un seul dendrogramme par concaténation.

Nous avons choisi pour les reconstructions phylogénétiques trois méthodes algorithmiques. La méthode du Neighbor-Joining a été pendant de nombreuses années la plus utilisée car elle permettait une analyse rapide d'un grand nombre de séquences en un temps très court (quelques secondes). Cependant cette méthode simple est remise en question par les phylogénéticiens qui lui préféreraient les autres algorithmes mathématiques la ML (Maximum Likelihood) et MP (Maximum Parsimony) plus complexes et qui nécessitent de longs calculs mais permettent des phylogénies plus robustes. Pour réduire le temps de calcul, nous avons réduit le nombre de souches de référence à quelques représentants d'espèces de *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* en groupe séparé. Comme représentative de

l'analyse phylogénétique des séquences de rhizobia nous avons retenu la combinaison des séquences de différents gènes en un seul arbre phylogénétique construit par concaténation.

L'information délivrée par les trois méthodes algorithmiques MP (Maximum Parsimony), NJ (Neighbour-Joining) et ML (Maximum Likelihood) est quasiment identique. La constitution et la position phylogénétique des différents clusters sont sensiblement les mêmes dans tous les arbres obtenus par ces trois méthodes de calcul. De ce fait, nous ne présentons ici que les phylogénies obtenues avec une seule méthode, celle de Maximum de vraisemblance (ML) (figures 23, 24).

Dans l'ensemble des phylogénies, les trois clusters (A, B, C) révélés par analyse de ADNr 16S se placent à l'intérieur du genre *Ensifer* avec une similarité intra-espèce élevée entre 99-100 % de valeur bootstrap calculée sur une répétition de 100.

Les phylogénies des gènes *recA*, *glnA*, *thrC* et *gltA* représentent une bonne congruence entre elles et permettent une meilleure discrimination inter-espèce comparée à celle obtenue avec l'ADNr 16S. Cette congruence a été calculée par le test ILD et donne des valeurs très significatives p-valeur entre 0,0120 et 0,6288. Ces gènes ont été utilisés pour la reconstruction d'un arbre regroupant l'ensemble de ces gènes.

Par contre le gène *atpD* et l'ADNr 16S sont incongruents avec le reste des autres gènes. Des résultats comparables ont été obtenus par Martens *et al.* (2007).

La non congruence entre les phylogénies de certains gènes peut s'expliquer par la possibilité d'une évolution différente de ces gènes. En effet, des gènes codant pour des protéines différentes peuvent évoluer différemment et indépendamment. Par exemple, un gène *glnA* codant pour la glutamine synthétase type I qui intervient dans la fixation de l'azote peut évoluer indépendamment du gène *atpD* codant pour une protéine impliquée dans la synthèse d'ATP car ils sont sujets à des pressions de sélection différentes. En, plus de cette possibilité de vitesses d'évolution différentes, il y a aussi possibilité d'événements de transferts horizontaux entre les souches. L'ensemble de ces éléments peut expliquer la non congruence des phylogénies de certains gènes au sein d'un même organisme.

Le cluster A forme dans l'ensemble des phylogénies des gènes de ménage, un groupe séparé à l'intérieur d'*Ensifer*. Sa position varie en fonction du gène étudié.

Dans la phylogénie *atpD*, le cluster A est proche de la branche *E. meliloti/E. medicae*. Dans l'arbre *glnA*, le cluster est proche de *E. medicae*, et se place plutôt à proximité de l'espèce *E. terangaie* en *gltA*. En *thrC* le cluster est proche de *E. kostiense* et ne se groupe avec aucune espèce de *Ensifer* en phylogénie *recA*.

Les homologies de séquence entre les membres du cluster A et les souches de référence les plus proches varient de 86,9 % (valeur la plus basse obtenue avec *E. saheli* et *E. kostiense* en *thrC*) et 94,3 % (valeur la plus élevée obtenue avec *E. meliloti* et *E. medicae* en *atpD*). Ces valeurs, si on retient les conclusions de Martens *et al.* (2007) et la figure (12) page 40, correspondent à des valeurs inter-espèces. Dans l'analyse de l'arbre construit par concaténation de quatre gènes de ménage les plus congruents, le cluster A se rapproche plus de *E. teranga*e et du cluster C.

Cette analyse phylogénétique du cluster A et les résultats obtenus confirment que ce groupe pourrait représenter une nouvelle espèce dans le genre *Ensifer*.

Concernant le cluster B, les résultats des différentes analyses phylogénétiques tendent à montrer qu'il forme un groupe séparé proche de *E. adhaerens* gvA.

Dans les arbres phylogénétiques *recA*, *atpD*, *glnA*, *thrC* et *gltA*, le cluster B se rapproche de *E. adhaerens* gvA avec des valeurs bootstrap comprises entre 95-98 % et des homologies de séquence de 96,8 % entre les représentants de ce cluster et la souche de référence en *thrC* et 98,4 % en *recA*. La valeur d'homologie de séquence la plus élevée entre les membres du cluster B et la souche de référence de *E. adhaerens* gvA (98,4 %) a été obtenue en phylogénie *recA*. Cette valeur selon l'analyse de Martens *et al.* (2007) et figure (12) page 40, place le cluster B dans l'espace séparant les valeurs inter et intra-espèces. Dans l'analyse regroupée des quatre gènes les plus congruents, le cluster B se place à proximité de *E. adhaerens* gvA (valeur bootstrap de 100 %).

Avec une majorité de résultats qui tendent à regrouper le cluster B avec *E. adhaerens* gvA, il est probable que ce cluster appartient effectivement à ce genomovar. Néanmoins, les résultats de l'analyse *atpD* montrent que ce cluster est séparé des trois genomovars. Pour confirmer sa position taxonomique, des essais d'hybridations ADN-ADN ont été réalisées.

Le cluster C forme un groupe séparé dans la branche *E. teranga*e/ *E. mexicanum* dans la majorité des phylogénies étudiées.

Ce groupe est proche de *E. teranga*e LMG 7834^T dans les phylogénies de quatre gènes de ménage (*glnA*, *gltA*, *thrC* et *recA*) et dans l'arbre construit avec les gènes congruents avec des valeurs de bootstrap élevées de 100 % et des homologies de séquence avec la souche de référence de *E. teranga*e LMG 7834^T comprises entre 92,2 % avec les séquences du gène *recA* et 96,2 % en séquences *glnA*. Cependant, comme dans le reste des analyses phylogénétiques des autres groupes, la phylogénie *atpD* est différente du reste des autres gènes et place le cluster C dans la branche *E. medicae*/ *E. meliloti*.

Le cluster C est aussi proche de *E. mexicanum* LMG 23932^T dans l'analyse phylogénétique des gènes *glnA*, *recA* et *gltA*. La comparaison des homologies de séquences entre les représentants du cluster C et de la souche de référence de *E. mexicanum* sont compris entre 92,2 % comme valeur la plus basse obtenue avec les séquences *recA* et 95,8 % avec les séquences *glnA*. Sachant que la souche de référence de *E. mexicanum* présente une homologie de séquence en gène *recA* de 96,6 % avec la souche de référence *E. teranga*. Ceci indique bien selon Martens *et al.* (2007), figure (12) page 40, que le cluster C est séparé de ces deux espèces. Cette supposition est encore confirmée avec les homologies de séquence entre les membres du cluster C et la souche de référence de *E. mexicanum* et qui est de 93,7 % en séquences *gltA* et cette même valeur est obtenue entre les deux souches de référence *E. mexicanum* et *E. teranga*, indiquant que le cluster C est séparé de ces deux souches de référence et forme probablement une nouvelle espèce.

En plus des groupes séparés, nous avons également comparé les gènes de ménage de certaines souches séparées dans le groupe des *Rhizobium* afin de confirmer leur position taxonomique. Les souches STM 1817 proche en ADNr 16S de *Rhizobium tropici* et STM 1061 proche de *Rhizobium leguminosarum*, ont été comparées avec les souches de référence de ces deux espèces en phylogénie des séquences du gène *dnaK*. L'analyse phylogénétique construite à partir des séquences de ce gène permet une meilleure discrimination dans ce groupe de rhizobia (Eardly *et al.*, 2005 ; Stepkowski *et al.*, 2003). Les résultats de l'analyse des séquences de ce gène confirment que la souche STM 1817 est proche de *R. tropici* LMG 9503^T et de *R. rhizogenes* LMG 150^T quant à la souche STM 1061 elle est proche de *Rhizobium leguminosarum* LMG 14904^T avec 95,8 % d'homologie de séquence.

En fin de cette partie d'analyse phylogénétique (ADNr 16S et la MLSA), il apparaît clair que certains groupes nouveaux représentent probablement des nouvelles espèces dans les genres *Ensifer*, *Rhizobium* et *Agrobacterium* et cette déduction devraient être confirmée par d'autres tests d'hybridations ADN-ADN pour certains groupes et des tests auxanographiques.

Ainsi, le cluster A est nommé *Ensifer maghrebium* sp. nov.

Le cluster C est nommé *Ensifer xericitiae* sp. nov.

Le cluster B est sûrement apparenté à *Ensifer adhaerens* gVA.

Pour les clusters D et E, l'analyse MLSA n'a pas été complétée et donc le cluster D portera le nom provisoire de *Agrobacterium* sp., et celui du groupe E de *Rhizobium* sp.

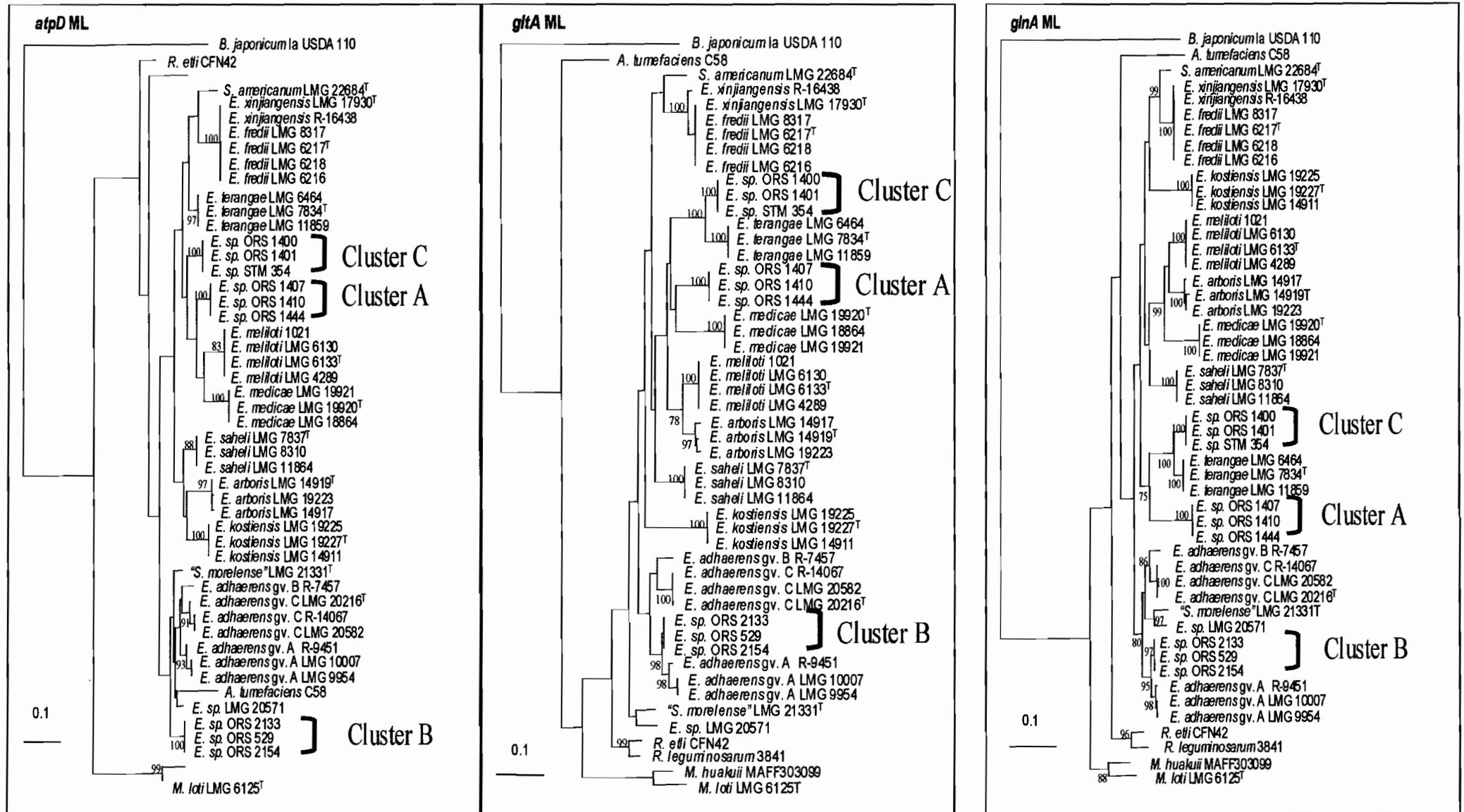


Figure 23 : Arbres phylogénétiques de trois gènes de ménage (*atpD*, *gltA* et *glnA*) des isolats de Tunisie et du Sénégal comparés aux espèces de référence de *Ensifer*. Les arbres ont été construits par maximum de vraisemblance (ML). Les valeurs de bootstrap supérieures ou égales à 70 % sont issues de 100 répétitions.

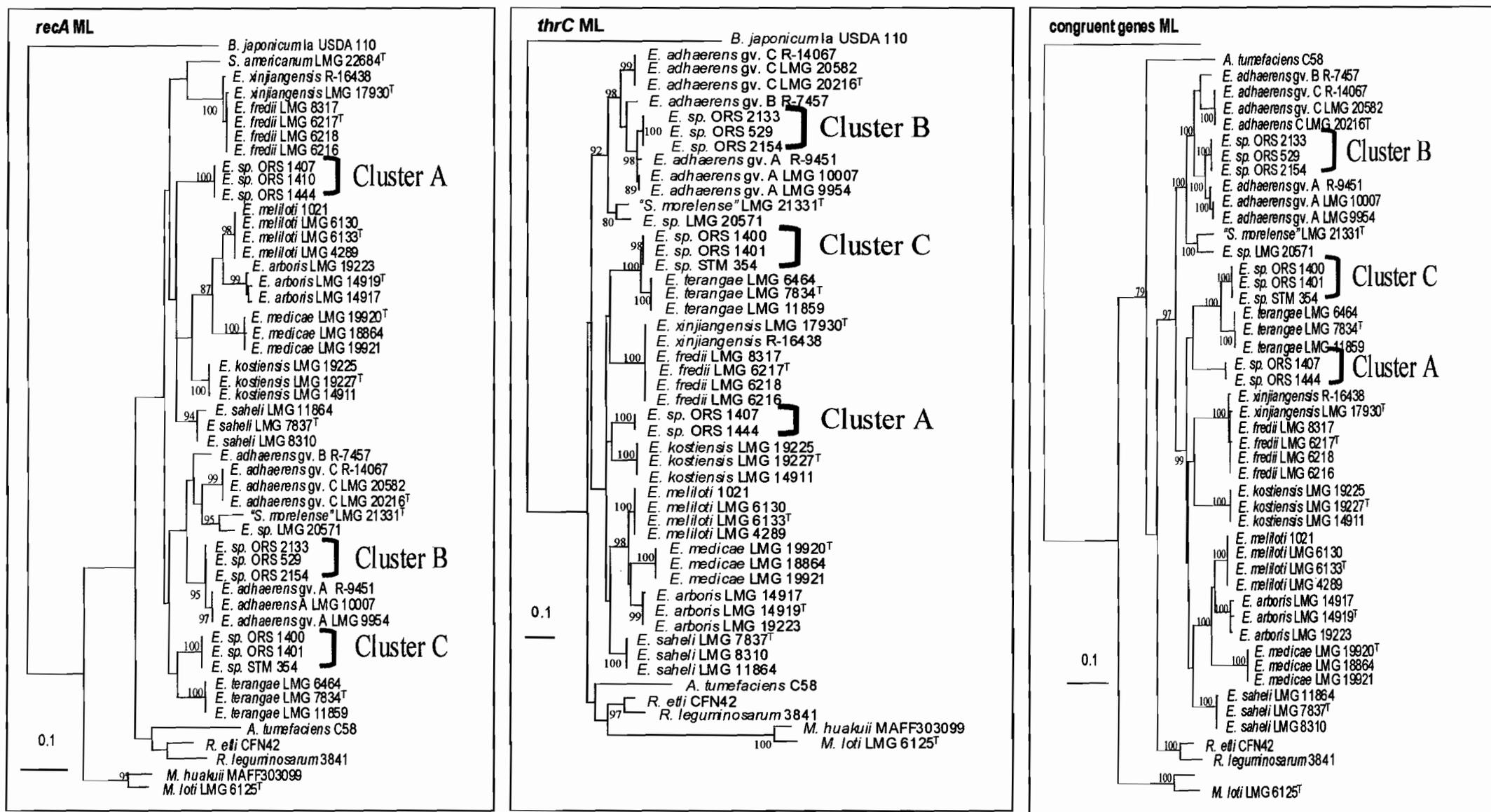


Figure 24 : Arbres phylogénétiques de deux gènes de ménage (*recA*, *thrC*) et arbre regroupant l'analyse de quatre gènes les plus congruents (*recA*, *thrC*, *gltA*, *glnA*) des isolats de Tunisie et du Sénégal comparés aux souches de référence d'*Ensifer*. Les arbres ont été construits par maximum de vraisemblance (ML). Les valeurs de bootstrap indiquées sont supérieures à 70 % issues de 100 répétitions.

3. 1. 4. 2. 3 Séquençage de l'ITS :

L'espace intergénique entre les gènes ARNr 16S et ARNr 23S présente une variation en longueur et en séquence, entre des souches proches phylogénétiquement (Gürtler et Stanisich, 1996) supérieure à celui observé pour l'ARNr 16S. Il renseigne sur les relations inter et intra spécifiques entre taxa proches (Söller *et al.*, 2000 ; Hamid *et al.*, 2002 ; Gonçalves et Rosato, 2002). L'analyse de l'ITS par séquençage ou par RFLP a ainsi été utilisé pour caractériser plusieurs populations de *Bradyrhizobium* (Doignon-Bourcier *et al.*, 2000 ; van Berkum et Fuhrmann, 2000 ; Willems *et al.*, 2001a . Krasova-Wade *et al.*, 2003).

Willems et collaborateurs (2001b) ont montré que les informations obtenues par le séquençage de l'ITS étaient en accord avec ceux de la technique AFLP et des hybridations ADN-ADN chez les bradyrhizobia.

Une seule souche d'Algérie a été trouvée dans le genre *Bradyrhizobium* (par le séquençage de l'ADNr 16S). L'ITS de cette souche a été séquencé pour confirmer sa position taxonomique. Les résultats obtenus montrent que la souche STM 1068 présente une homologie de séquence ITS égale à 97,42 % avec la souche *Bradyrhizobium liaoningense* LMG 1823Ot1. Selon Willems *et al.* (2003b) les souches présentant une homologie de séquence ITS d'au moins 95,5 % dans le genre *Bradyrhizobium* appartiennent à la même espèce génomique. On peut donc conclure que la souche STM 1068 appartient à *Bradyrhizobium liaoningense*.

3. 1. 4. 2. 4 Les hybridations ADN-ADN :

Les hybridations ADN-ADN sont jusqu'à ce jour incontournables pour la description d'une nouvelle espèce (Wayne *et al.*, 1987 ; Stackebrandt *et al.*, 2002).

Couramment, des souches appartiennent à une même espèce bactérienne lorsqu'elles présentent une valeur d'hybridation supérieure ou égale à 70 % et une stabilité de l'hybride mesuré par une $\Delta T_m(e)$ inférieure ou égale à 5°C (Stackebrandt et Goebel, 1994).

Pour préciser la position taxonomique des représentants du cluster B dans l'espèce *E. adhaerens*, nous avons réalisé des hybridations ADN-ADN de deux représentants de ce groupe avec les trois genomovars de cette espèce (Willems *et al.*, 2003)(Tableau 8).

Les valeurs d'hybridation des deux souches ORS 529 et ORS 2133 avec les deux genomovars *E. adhaerens* B et C sont respectivement de 58,9-57,8 % et 49,7-49,8 %. Ces valeurs inférieures à 70 %, confirment que ces deux souches n'appartiennent ni à *E. adhaerens* gvB ni à *E. adhaerens* gvC.

Cependant, aucun résultat significatif n'a été obtenu avec la souche de référence *E. adhaerens* gvA. Les valeurs réciproques sont différentes (valeurs soulignées dans le tableau (8). Les autres essais d'hybridations ADN-ADN des représentants de ce groupe avec des souches de référence du genomovar A ont abouti au même résultat qui ne permet pas de conclure.

Table 8 : Valeurs d'hybridation ADN-ADN entre les trois genomovars de *E. adhaerens* et les représentants du cluster B.

Source d'ADN non marqué	(%) d'hybridation avec l'ADN des souches marqué					
	ORS 529	ORS 2133(1)	<i>Ensifer adhaerens</i> gvA LMG 1007	<i>Ensifer adhaerens</i> gvB R-7457	<i>Ensifer adhaerens</i> gvC LMG 20216	ORS 2133(2)
ORS 529	100.0	99.7	<u>80.9</u>	63.8	43.5	94.9
ORS 2133(1)	103.7	100.0	<u>83.2</u>	62.4	44.4	92.8
<i>Ensifer adhaerens</i> gvA LMG 1007	<u>68.0</u>	<u>66.4</u>	100.0	56.0	40.9	66.1
<i>Ensifer adhaerens</i> gvB R-7457	58.9	57.8	66.7	100.0	45.2	50.9
<i>Ensifer adhaerens</i> gvC LMG 20216	49.7	49.8	59.2	53.9	100.0	48.6

3. 1. 4. 3 Spécificité d'hôte :

L'infectivité de 88 souches (72 isolats de la collection d'Algérie et 16 isolats de la collection du LSTM) a été testée soit sur leur plante d'isolement (pour les plantes dont les graines étaient disponibles) soit sur *Medicago polymorpha*, *Medicago ciliaris* ou *Medicago sativa* pour les souches isolées de plantes dont nous ne disposons pas de graines. Ce test a été réalisé en tubes Gibson contenant du milieu nutritif pour plante (Bertrand, 1997) en conditions bactériologiques contrôlées et avec un minimum de cinq répétitions/souche et un témoin non inoculé.

Des 57 souches isolées des différentes espèces de *Medicago*, 36 souches sont effectives avec *Medicago ciliaris* ou *Medicago polymorpha* dont STM 994 et STM 990 qui infectent à la fois les deux espèces de *Medicago* citées. 32 de ces isolats sont identifiés soit comme *Ensifer meliloti* (STM 2227, STM 1062, STM 1064, STM 1827, STM 1828, STM 2274, STM 1065) ou *Ensifer medicae* (STM 988, STM 990, STM 991, STM 992, STM 994,

STM 998, STM 1003, STM 1004, STM 1816, STM 1824, STM 1825, STM 2210, STM 2220, STM 2221, STM 2223, , STM 2233, STM 2234, STM 2235, STM 2236, STM 2237, STM 2239, STM 1067, STM 2243, STM 2268, STM 2272)

Chez ces plantes, la nodulation survient 7 à 16 jours après inoculation, mais bien avant pour les plantes inoculées avec les souches *E. medicae* STM 990 (figure 25) et *E. medicae* STM 2220. Dans une étude réalisée par Heinrich *et al.* (2001), certaines souches de *E. meliloti* et *R. leguminosarum* bv. *viciae* capables de métaboliser la rhizopine L-3-O-méthylscyllo-inoasamine (3-0-MSI) profitait d'un avantage considérable dans la nodulation qui survient 14 jours après inoculation.

Certaines souches de la collection ont également été testées en inoculation croisée avec *M. sativa*.

La forme des nodules formés par *E. medicae* est très variable selon les souches. Ainsi, sur *M. ciliaris*, la souche *E. medicae* STM 994 induit la formation de nombreux nodules de forme indéterminée alors que la souche *E. medicae* STM 1003 forme sur la même espèce de plante juste quelques nodules de forme polylobée.

Les premières études sur la nodulation de souche de *E. adhaerens* montraient que cette espèce de bactérie à l'origine décrite non effective pouvait le devenir par acquisition de plasmide symbiotique. Rogel *et al.* (2001) démontrent que certaines souches de cette espèce peuvent effectivement noduler *Phaseolus vulgaris* et *Leucaena leucocephala* par acquisition de plasmide symbiotique de *Rhizobium tropici*. Depuis d'autres souches de *E. adhaerens* isolées de nodules de légumineuses ont été décrites (Willems *et al.*, 2003).

Dans notre étude, les trois souches *E. adhaerens* cluster B (ORS 2133, ORS 2154, ORS 529) sont capables d'infecter leur plante d'isolement *Lotus arabicus* en conditions contrôlées (figure 26). Nous avons également recherché le gène de nodulation *nodA* d'un représentant de ce groupe.

Les souches *E. maghrebium* (ORS 1444 et ORS 1407) sont effectives avec *Argyrolobium uniflorum* (Zakhia, 2004). La troisième souche de ce groupe ORS 1410 ne forme que peu de nodules sur sa plante hôte *Lotus creticus* (Zakhia, 2004).

Quant aux autres souches isolées des espèces d'*Acacia*, de *Retama* et de *Lotus* elles n'ont pas formé de nodules dans ces conditions expérimentales.

Plusieurs souches affiliées à *Agrobacterium* forment des pseudonodules sur leurs plantes hôtes (figure 27). Dans la littérature, aucune souche d'*Agrobacterium* n'a été rapportée comme effective (de Lajudie *et al.*, 1999). Néanmoins, Mhamdi *et al.* (2005) ont identifié la présence d'une population mixte de *Rhizobium* et de *Agrobacterium*-like dans des

nodules de haricot possédant une activité GUS. La présence de ces *Agrobacterium* non effectifs dans les nodules résulte probablement de la co-infection avec un rhizobium infectif. Mrabet *et al.* (2006) ont montré à la fois l'effet bénéfique de certaines souches d'*Agrobacterium* sur la nodulation et la croissance des haricots ainsi que l'effet antagoniste qu'exercent certaines souches sur l'infectivité de *R. gallicum* dans le cas d'inoculation mixte. Ces souches seraient-elles capables d'infecter la plante-hôte ? Plusieurs études ont montré que des bactéries non symbiotiques étaient capables d'infecter la plante hôte par l'acquisition d'un plasmide symbiotique. Ainsi *Phyllobacterium myrsinacearum* après acquisition du plasmide symbiotique (pSym) de *Rhizobium leguminosarum* est capable d'induire des nodules sur *Vicia sativa* (van Veen *et al.*, 1988). Valverde *et al.* (2005) ont décrit l'isolement de souches de *Phyllobacterium* capables d'infecter *Trifolium pratense*.

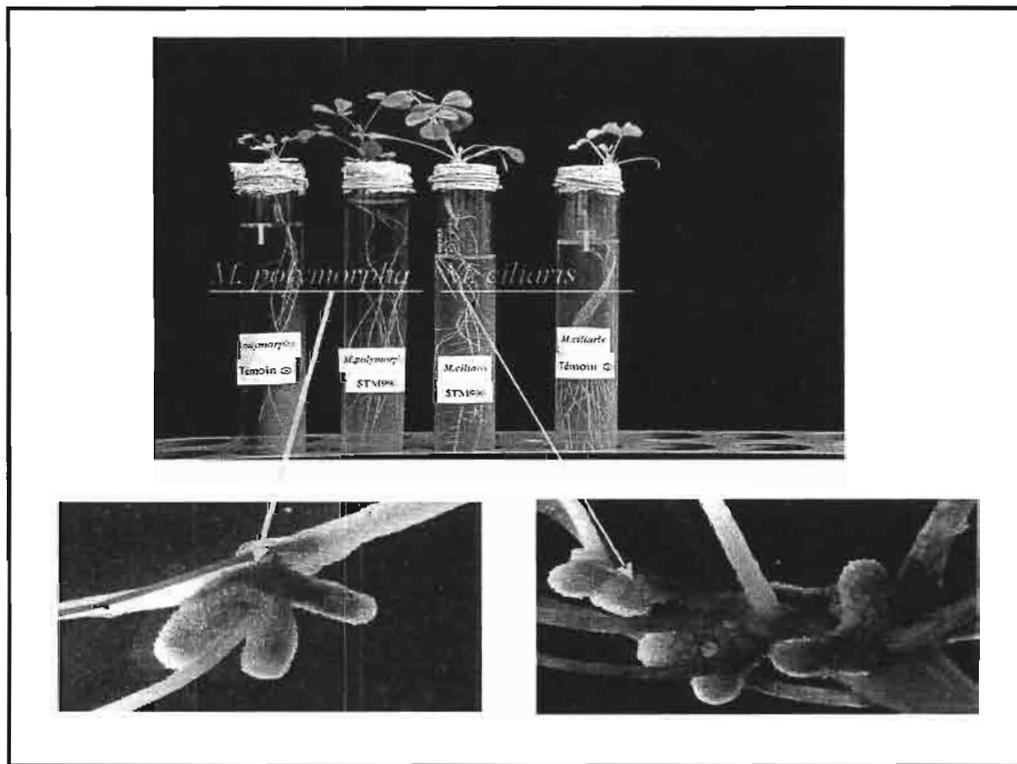


Figure 25 : *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* nodulées par *E. medicae* STM 990.

(30 jours après l'inoculation).

- T) Témoin non inoculé
- A) Nodules de *M. polymorpha*
- B) Nodules de *M. ciliaris*

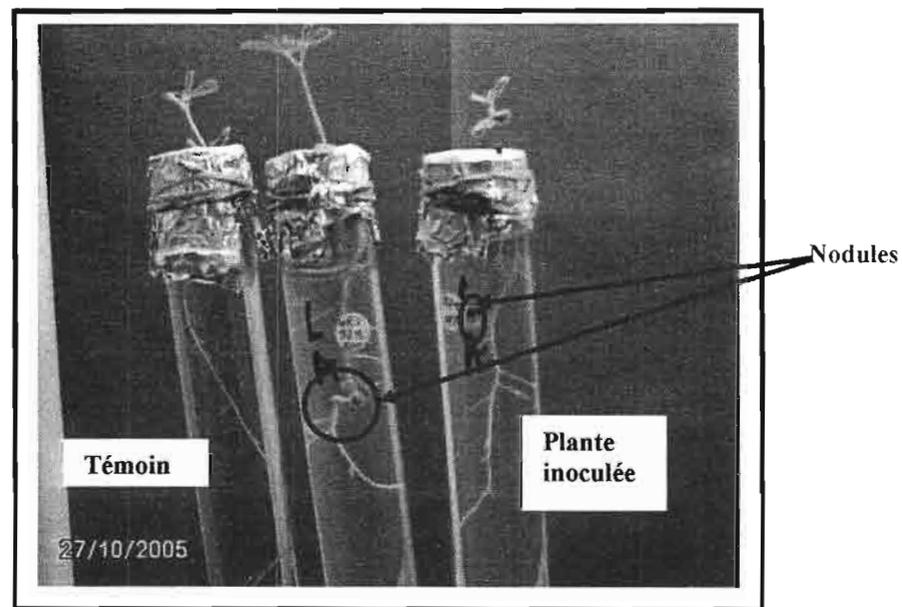


Figure 26: Nodules obtenus sur *Lotus arabicus* inoculés avec *E. adhaerens* ORS 529.

(20 jours après l'inoculation)

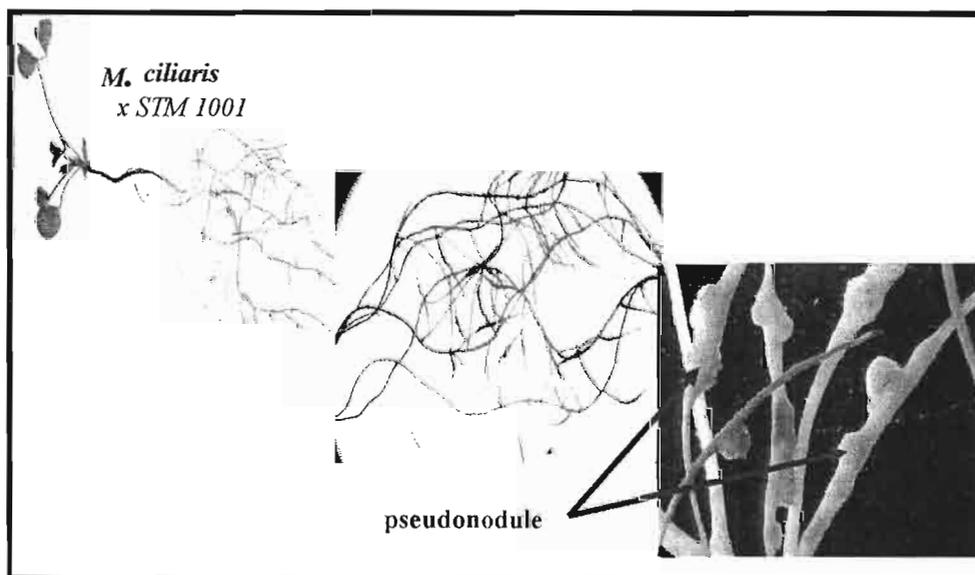


Figure 27 : Pseudonodules de *Medicago ciliaris* obtenus in-vitro avec *Agrobacterium rubi* STM 1001.

(30 jours après l'inoculation)

3. 1. 4. 4 Recherche et identification des gènes de nodulation *nodA* :

La capacité des rhizobia à synthétiser les facteurs Nod les distinguent des autres bactéries endophytes des plantes. La biosynthèse de ces facteurs Nod survient suite à l'induction des gènes de nodulation, dont environ 60 différents ont été décrits (*nod*, *nodI*, *nodJ*) et qui peuvent être classés en deux catégories (Perret *et al.*, 2000); les gènes nod commun *nodABC* pour la synthèse du squelette des facteurs Nod (NF), *nodIJ* pour l'exportation des facteurs Nod et *nodD* dans la régulation des facteurs Nod, et d'autres gènes plus spécifiques qui existent en combinaison variable selon la souche, *nodPQ* ou *nodHLZUS*.

Ces gènes de nodulation participent à la synthèse et la régulation de molécules de lipochito-oligosaccharides, signaux qui permettent à la bactérie d'être reconnue par la plante et de s'introduire dans les poils racinaires de la légumineuse (Viprey *et al.* 2000).

Parmi eux, le gène *nodA* est présent en une seule copie et possède une taille constante (590-660 pb) chez tous les rhizobia décrits jusqu'à présent (Moulin *et al.*, 2004). Actuellement de nombreuses séquences du gène *nodA* sont disponibles pour des études de comparaison dans la banque de données GenBank.

Dans notre étude des gènes *nodA*, nous avons ciblé deux objectifs :

Le premier était de caractériser ces gènes chez les représentants des groupes nouveaux (*E. maghrebium* (cluster A), *E. xericitae* (cluster C), *E. adhaerens* (Cluster B)) notamment ceux isolées de légumineuses peu étudiées.

Dans un deuxième temps, nous avons testé le pouvoir discriminatif de puces à ADN dédiées aux gènes *nodA* sur les différentes espèces de *Sinorhizobium* (*Ensifer*) de la collection d'Algérie, notamment celles identifiées par le séquençage partiel et/ ou total comme appartenant aux deux espèces de *Ensifer* les plus proches *E. medicae* et *E. meliloti*.

3. 1. 4. 4. 1 Séquençage du gène *nodA* :

Nous avons focalisé cette étude sur l'amplification et l'analyse des séquences du gène *nodA* de *E. maghrebium* ORS 1444 (cluster A), *E. xericitae* ORS 1400 et STM 354 (cluster C) et *E. adhaerens* ORS 529 (cluster B). Nous avons choisi des représentants de chaque groupe, en considérant aussi la plante hôte.

L'analyse des séquences *nodA* (longueur d'alignement 587 pb) par Neighbour-Joining (figure 28), montre que les souches isolées de *Argyrolobium uniflorum*, *Lotus arabicus* et *Medicago sativa* forment un groupe proche mais séparé des *nodA* de *E. meliloti* et de *E. medicae*. Les gènes *nodA* de ce groupe codent probablement pour des facteurs Nod $\alpha\beta$ -

insaturés. C'est la première fois que les gènes *nodA* de souches isolées d'*Argyrobium uniflorum* sont ainsi caractérisés.

La littérature rapporte que la phylogénie des gènes *nodA* renseigne sur le spectre d'hôte des rhizobia et correspond à la division taxonomique des légumineuses (Dobert *et al.*, 1994 ; Young et Johnston, 1989). En conclusion de cette étude, nous pouvons prédire du *nodA* de *E. adhaerens* ORS 529 qu'il peut représenter un nouveau biovar, pour lequel nous proposons le nom de *E. adhaerens* biovar *arabicus* car il forme une branche à part ainsi que celui des souches isolées de *Argyrobium uniflorum* et qui forment des branches à part (figure 28) et qui pourraient représenter un autre nouveau biovar *E. maghrebium* biovar *argyrobium* et *E. xericitae* biovar *argyrobium*.

Les essais pour amplifier le gène *nodA* des représentants de *Rhizobium* sp. (cluster E) (STM 1815, STM 1818, STM 1819 et STM 1823) ont été infructueux. Les séquences *nodA* obtenues étaient inexploitable (double pics); toutes les souches ayant donné ce même résultat, il est probable que les amorces utilisées dans cette réaction s'hybridaient à deux endroits différents, d'où la nécessité de refaire ce test en utilisant d'autres amorces plus spécifiques.

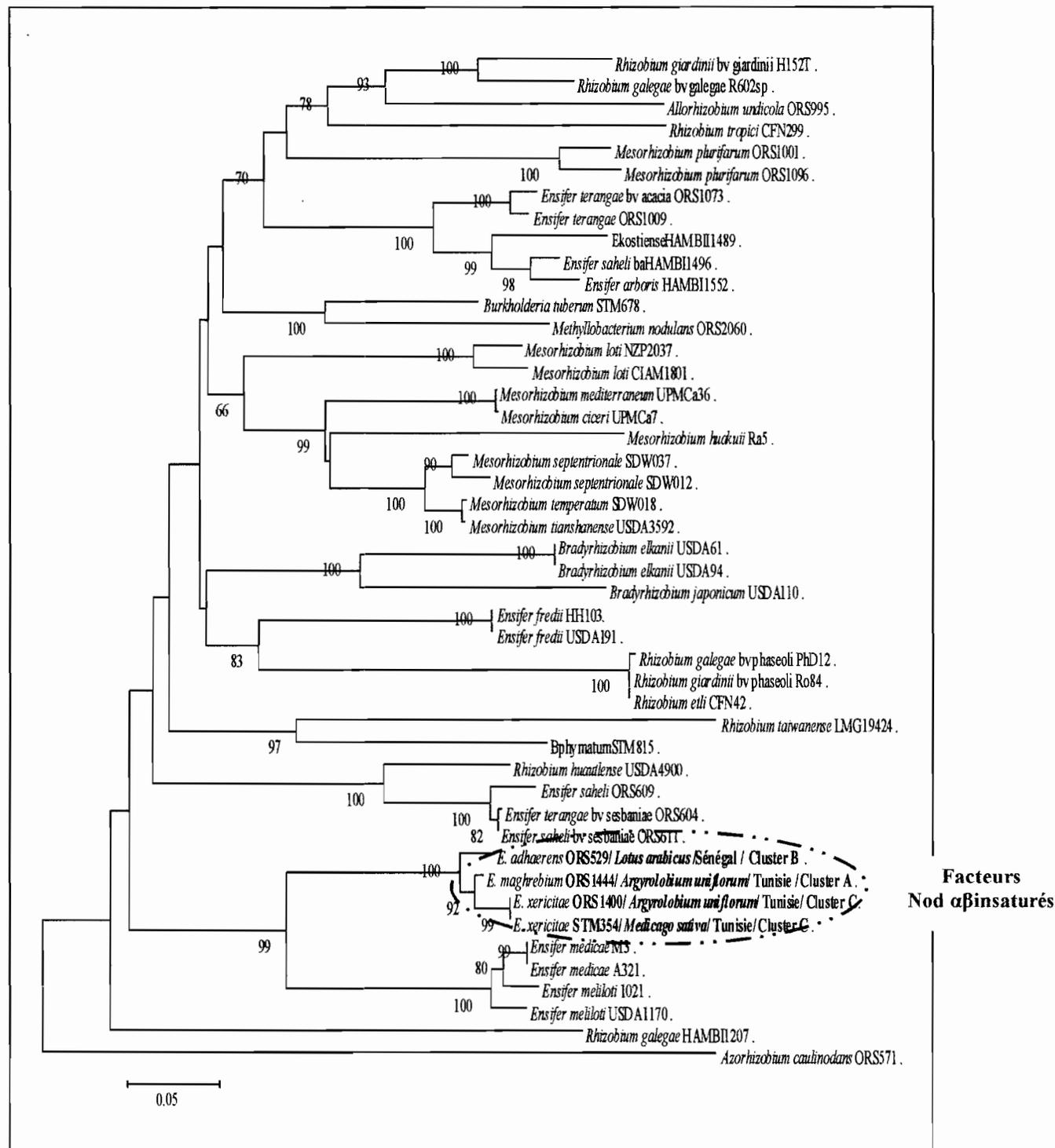


Figure 28 : Arbre phylogénétique des séquences du gène *nodA* (longueur d'alignement 587 pb) obtenu par la méthode du Neighbor-Joining, et montrant la position des représentants des groupes séparés suivant leur plante d'isolement.

3. 1. 4. 4. 2 Microarrays dédiées aux gènes *nodA* :

Des puces dédiées au gène *nodA* portant des oligonucléotides représentant la diversité des gènes *nodA* ont été élaborées pour identifier quel type de gène *nodA* est présent dans un isolat inconnu, ou un échantillon d'ADN au LSTM (Montpellier) par le Dr J.-C. Avarre. D'autres biopuces dédiées aux gènes de nodulation ont été fructueusement utilisées dont celles utilisant le gène *nodC* (Boivin *et al.*, 2006) et qui a permis de classer les souches en fonction de la séquence nucléotidique de ce gène et le typage du gène *nodC* des bactéries présentes dans une nodosité en s'affranchissant de la culture préalable de l'endosymbiote.

Néanmoins, la principale limite de la technique d'hybridation spécifique sonde-cible (Bodrossy et Sessitsch, 2004 ; Zhou, 2003) est qu'il est difficile de représenter sur une seule puce tous les allèles possibles d'un même gène. Sachant que les séquences nucléotidiques codant une protéine équivalente partagent communément 40 à 100 % d'identité entre elles.

Nous avons utilisé les puces *nodA* pour classer huit de nos souches qui groupaient ensemble avec *E. medicae* et *E. meliloti* par séquençage partiel de l'ADNr 16S en fonction de la séquence nucléotidique de leur gène *nodA* et confronter les résultats à ceux de leur spectre d'hôte.

Les résultats nous ont permis d'affilier cinq souches (STM 994, STM 1067, STM 1066, STM 1828 et STM 1816) aux *nodA* de l'espèce *E. medicae* et trois autres (STM 1827, STM 1064 et STM 1065) à ceux de l'espèce *E. meliloti* (figure 29)

Cependant en comparant les résultats obtenus avec ceux de l'analyse phylogénétique, on note certaines différences dans le groupage des souches.

Ainsi les souches STM 1828 et STM 1066 groupent en phylogénie 16S avec *E. meliloti* alors que leurs gènes *nodA* groupent avec ceux de *E. medicae*.

Néanmoins, plusieurs espèces de *Medicago* sont nodulées par les deux espèces de *Ensifer*, d'où probablement l'acquisition par ces deux espèces de *Ensifer* des mêmes gènes *nodA* conférant la spécificité vis à vis de certains *Medicago*.

Or il est surprenant que la souche STM 1066 isolée de nodules d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana*, possède des gènes *nodA* de *E. medicae*. *E. medicae* est décrit comme spécifique des espèces de *Medicago* et non d'*Acacia*. D'autres espèces de *Ensifer*, comme *E. americanum* (Toledo *et al.*, 2003) ou *E. arboris* (Nick *et al.*, 1999) ont été identifiées comme partenaires de cette légumineuse (*Acacia*).

La souche STM 1066 aurait-elle acquis des gènes symbiotiques spécifiques à *E. medicae* lui permettant d'infecter des espèces de *Medicago*. Le transfert de gènes de nodulation entre différents genres phylogénétiquement distants a été rapporté (Moulin *et al.*, 2004).

Il est possible de vérifier cette hypothèse par simple test de nodulation de cette souche avec une espèce de *Medicago* hôte de *E. medicae* comme *M. polymorpha*.

La figure (29) illustre le fait que les oligonucléotides de 25 mers sont plus spécifiques que ceux de 50 mers ce qui résulte en un signal plus fort commun aux *nodA* des deux espèces de *E. medicae* et *E. meliloti*. Néanmoins, ceux de 25 mers donnent des signaux plus faibles comme c'est indiqué sur la figure mais sont plus sensibles pour distinguer entre les *nodA* de *E. medicae* et les *nodA* de *E. meliloti*.

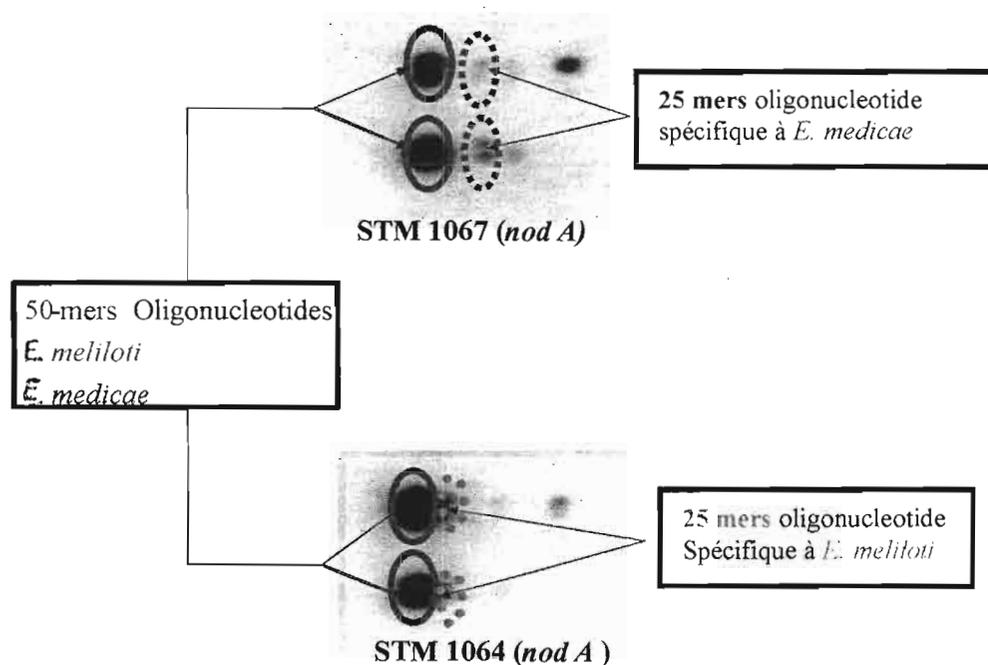


Figure 29 :
Hybridation avec des produits PCR de gène *nodA* de *E. meliloti* et *E. medicae*

3. 1. 4. 5 Tests auxanographiques :

Les caractères phénotypiques distinctifs sont utiles pour la description de nouvelles espèces (de Lajudie *et al.*, 1994 ; Rome *et al.*, 1996 ; Zakhia et de Lajudie, 2006) et pour l'identification courante. Ce sont des tests simples qui permettent la comparaison avec les données anciennes.

Ayant mis en évidence cinq nouvelles espèces potentielles, nous avons complété la caractérisation de quatre espèces *E. maghrebium* (clusters A), *E. adhaerens* (cluster B), *E. xericitae* (cluster C) et *Rhizobium* sp. (cluster E) par l'étude de leurs caractéristiques auxanographiques en utilisant des galeries API Biotype 100 qui permettent de tester différents

substrats carbonés pour la croissance. Les résultats sont présentés dans le tableau (9). Dans ce tableau, nous n'avons indiqué ni les substrats métabolisés par l'ensemble des souches testées ni ceux métabolisés par aucune souche. Leur liste suit:

Les substrats utilisés par toutes les souches étudiées sont : D(+) Galactose, β -D (+) Fructose , D(+) Trehalose, D(+) Mannose, Sucrose (Saccharose), Maltose, α -Lactose, Lactulose , 1-0-Methyl- β -galactopyranoside, 1-0-Methyl- α -galactopyranoside, D(+)Xylose, Palatinose, α -L-Rhamnose, D(+) Arabitol, Glycerol, myo-Inositol, D-Mannitol, Maltitol, D(+)Turanose , D- Sorbitol, L-Glutamate, L-Proline, Betain.

Les substrats utilisés par aucune des souches étudiées sont : D-Saccharate, Mucate, L(+) Tartrate, meso-Tartrate, Tricarballylate, Gentisate, m-Hydroxybenzoate, 3-Phenylpropionate, m-Coumarate, Histamine, Tryptamine.

Chaque groupe a été comparé aux souches de référence des espèces phylogénétiquement les plus proches.

Les souches de *E. maghrebium* (cluster A) ont été comparées aux souches de référence de *E. meliloti*, *E. medicae* et *E. arboris*, dont le groupe se rapproche le plus par séquençage de l'ADNr 16S. Les résultats montrent que toutes les souches du cluster A sont incapables de métaboliser le Xylitol, contrairement aux souches de référence.

Le DL-Glycérate n'est pas métabolisé par les membres du cluster A mais l'est avec la souche de *E. arboris* LMG 1419^T et faiblement par les deux autres souches de référence. Nos résultats rejoignent ceux de de Lajudie *et al.* (1994). Pour le reste des substrats, des similitudes et des différences de métabolisme sont observés entre les différentes souches. La comparaison entre les substrats utilisés de façon identique entre tous les membres de *E. maghrebium* et les trois souches de référence citées ci-dessus, montre que (dans ce qui suit, les numéros de substrats correspondent à ceux indiqués dans le tableau (9) :

Tous les représentants de *E. maghrebium* se rapprochent le plus de *E. meliloti* LMG 6133^T avec seulement deux substrats utilisés différemment (17 et 84) comparé à *E. medicae* LMG 19920^T avec six substrats utilisés différemment (7, 17, 25, 26, 76, 88) et *E. arboris* avec huit substrats utilisés différemment (49, 51, 54, 56, 58, 82, 84 et 95). Les souches de *E. adhaerens* (cluster B) métabolisent toutes la putrécine, même faiblement par la souche ORS 2154, contrairement aux trois genomovars A, B, C de *E. adhaerens*. A l'inverse, sept substrats : (L(+)) Sorbose, Dulcitol, D-Tagatose, Citrate, 5-Keto-D-Gluconate, D-Gluconate, Glutarate) ne sont pas métabolisés par les membres du cluster B mais diversement utilisés par les trois genomovars de *E. adhaerens*.

En comparant les trois souches de *E. adhaerens* (cluster B) et les trois genomovars de l'espèce, il apparaît que *E. adhaerens* cluster B est plus proche en métabolisme de l'espèce *E. adhaerens* gvB R7457 avec seulement 4 substrats (82, 83, 84 et 85) différemment métabolisés entre ces deux espèces. La différence est plus grande entre les substrats métabolisés par *E. adhaerens* cluster B et *E. adhaerens* gvA LMG 9954 avec 10 substrats utilisés différemment (17, 30, 31, 42, 43, 58, 61, 64, 79, 82) pourtant la plus proche phylogénétiquement et aussi le cluster B est différent en métabolisme avec *E. adhaerens* gvC avec 9 substrats (6, 20, 30, 31, 52, 54, 61, 64 et 87) différemment utilisés.

Une différence de métabolisme des sources carbonées est aussi observée entre les trois genomovars connus de *E. adhaerens*, comme indiqué dans le tableau (9). Le sorbose et L-tyrosine sont uniquement utilisés par *E. adhaerens* gvC LMG 20216 et le 5-Keto-D-gluconate et 3-O-Methyl-D-glycopyranose sont utilisés par *E. adhaerens* gvA LMG 9954 et le p-Hydroxybenzoate utilisé seulement par *E. adhaerens* gvB R 7457. Le reste des substrats sont métabolisés diversement par les différents genomovars.

Le cluster C bien que proche de *E. teranga* dans les phylogénies (ADNr 16S et gènes de ménage) de *E. teranga*, diffère dans le métabolisme des carbohydrates. Dix substrats sont ainsi utilisés par la souche type de *E. teranga* LMG 7834^T et non par les trois souches du cluster C. Cependant le malonate est faiblement métabolisé par tous les représentants du cluster C mais pas par la souche type de *E. teranga* LMG 7834^T.

Les membres du cluster E ont été comparés aux deux souches de *Rhizobium sllae* LMG 23764^T et *R. sllae* LMG 23765 les plus proches phylogénétiquement. Cette analyse montre que les souches du cluster métabolisent sept substrats : (D(+)) Melezitose, 3-O-Methyl-D-Glucopyranose, D (+) Tartrate, Citrate, D-Glucuronate, D- Gluconate, Ethanolamin) contrairement aux souches de référence.

Des différences de métabolisme de sources carbonées sont également observées entre les deux souches de *R. sllae*. Six substrats sont métabolisés par *R. sllae* LMG 23764^T contrairement à *R. sllae* LMG 23765. Ces résultats montrent une diversification du métabolisme entre ces deux souches.

Les résultats du métabolisme des différentes sources de carbones par les trois nouveaux groupes dans le genre *Ensifer* ont été analysés numériquement en comparaison avec des souches de référence des différentes espèces les plus proches. Les résultats sont notés de 1 à 7, selon le nombre de jour du métabolisme d'un substrat. Ainsi, les substrats utilisés 24 heures après l'ensemencement seront désignés par le chiffre 7 et ceux non métabolisés par le chiffre 1.

Le dendrogramme phénotypique obtenu (figure 30) montre que les trois nouveaux clusters définis dans l'analyse phylogénétique forment également les mêmes clusters en analyse phénotypique. Les clusters A et C sont monophylétiques et séparés du reste des souches de référence, indiquant encore par cette analyse qu'il pourrait s'agir de nouvelles espèces. Dans la littérature, l'analyse auxanographique a permis de distinguer des nouvelles espèces *E. saheli* et *E. terangae* (de Lajudie *et al.*, 1994) et *E. medicae* (Rome *et al.*, 1996) des autres espèces connues. Sur le dendrogramme, le cluster B forme un groupe avec la souche de référence *E. adhaerens* R 7457 gvB.

Tableau 9: Tests auxanographiques montrant les différences du métabolisme des carbohydrates et acides aminés entre les souches du cluster A comparées aux souches de référence de *Ensifer* les plus proches en séquençage de l'ADNr 16S, des souches du cluster B comparées aux trois genomovars de *E. adhaerens* connues et des membres du cluster C comparé à *E. teranga* la souche type de l'espèce la plus proche. Les représentants du groupe séparé dans la branche des *Rhizobium* a été comparé aux souches de référence de *R. sultae* la plus proche en phylogénie. Les numéros des substrats dans le tableau (9) correspondent aux numéros des cupules des galeries Biotype 100.

Substrat	<i>E. meliloti</i> IMG 6133T	<i>E. medicae</i> IMG 19920T	<i>E. arboris</i> IMG 1419T	Cluster A: ORS 1444	Cluster A: ORS 1410	Cluster A: ORS 1407	<i>E. adhaerens</i> qvA	<i>E. adhaerens</i> gvB	<i>E. adhaerens</i> gvc	Cluster B: ORS 2133	Cluster B ORS 2154	Cluster B: ORS 529	<i>E. teranga</i> IMG 7834T	Cluster C: ORS 1400	Cluster C: ORS 1401	Cluster C: STM 354	Cluster D: STM 11815	Cluster D: STM 1819	Cluster D: STM 1823	Cluster D: STM 1818	<i>R. sultae</i> IMG 23764T	<i>R. sultae</i> IMG 23765
0. control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1. α-D (+)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
Glucose																						
6. L(+) Sorbose	+	+/-	-	-	+	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-
7. α-D Melibiose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	-
9. D(+)	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	+/-	+	-	+/-	-
Raffinose																						
10. Maltotriose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	-
16. D(+)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-
Cellobiose																						
17. β-	+	+/-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	-	-	-
Gentiobiose																						
18. 1-O-Methyl-β-D-	+	+	+	+	-	+/-+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-
glucopyranoside																						
19. Esculin*	-N	-N	-	-N	-N	-	-N	-N	-N	-N	-N	-N	-N	-N	-N	-N	+	-N	-N	-N	-N	-
20. D(-) Ribose	+	+	+	+	-	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+	+/-	+	+/-	-	-
21. L(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+/-	+	+/-	+/-	-
Arabinose																						
25. α-L(-) Fucose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
26. D(+)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Melezitose																						
28. L(-)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-
Arabitol																						
29. Xylitol	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	+/-
30. Dulcitol	+	+	+	-	-	+/-	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+/-	+
31. D-Tagatose	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	+/-
38. Adonitol	+	+/-	+	+	+	-i	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
39. Hydroxyquinol	+	-	-i	-i	-	+	-i	-	-i	-	-	-	-	-	-	-i	-	-i	-	-	-i	-
ine-β-																						
glucuronide*																						
40. D-Lyxose	-i	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	-

Diversité des rhizobia des zones salées et arides d'Algérie et de certains pays du sud de la méditerranée (Tunisie et Liban) et de l'Afrique de l'Ouest (Sénégal)

41.i-Erythritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-
42.1-O-Methyl- α -D-glucopyranoside	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
43.3-O-Methyl-D-Glucopyranose	+	+/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
47. D (+) Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	-	-	-
48. meso-Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49. D(+) Malate	-	-	+	-	-	+	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-
50. L(-) Malate	+	+	+	+/-	-	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	-	+	+	+	-	-
51. cis-Aconitate	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
52. trans-Aconitate	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
54. Citrate	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	-	-
55. D-Glucuronate	-	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-
56. D-Galacturonate	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57. 2-Keto-D-Gluconate	+	+	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-	-
58. 5-Keto-D-Gluconate	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59. L-Tryptophan*	-1	-	-1	-c	-	-c	+/-	+c	+/-	+/-	+c	+c	-1	-1	-	-j	-c	-c	-c	-c	-j
60. N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+/-	+	+/-+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	-	+
61. D- Gluconate	-	-	+	-	-	+/-	+	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	+	+/-	+/-
62. Phenylacetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63. Protocatechuate	+	-j	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
64. p-Hydroxybenzoate	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	-	-
65. (-) Quinate	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
68. Benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71. Trigonelline	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
73. Putrescine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
74. DL- α -Amino-n-Butyrate	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
76. DL-Lactate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	-	+/-	+	+	-	-	+/-
77. Caprate	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78. Caprylate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
79. L.Histidine*	+	+	+	-	-	+/-1	-	+	+	+i	+i	+i	+/-	+i	+	+/-	+	+/-	+1	-	-
80. Succinate	+	+	-	-	+/-	+i	+	+/-	+	+	+	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
81. Fumarate	+	+	+	-	-	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
82. Glutarate	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Diversité des rhizobia des zones salées et arides d'Algérie et de certains pays du sud de la méditerranée (Tunisie et Liban) et de l'Afrique de l'Ouest (Sénégal)

83. DL-Glycerate	+/-	+/-	+	-	-	-	+	-	+/-	+/-	+	+/-	-	-	+/-	-	+	-	+	+	-	-
84. DL- α -Amino-n-Valerate	+/-	-	+	-	-	-	+	-	+/-	+/-	+	+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
85. Ethanolamine	-	+/-	+	-	-	+/-	+	-	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
87. D-Glucosamine	+	+	+J	+j	-	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+j	+/-	-	+	+/-	+	+	+/-	-
88- Itaconate	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89. DL- β -Hydroxybutyrate	-	+	+	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+/-
90. L-Aspartate	+	+	+	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
93. D-Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94. L-Alanine	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
95. L-Serine	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+	-	+
96. Malonate	-	+/-	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-
97. Propionate	+	-	+	-	-	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98. L-Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
99. α -Ketoglutarate	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cluster A= *E. maghrebium* ; Cluster B= *E. adhaerens*; Cluster C= *E. xericiatae*

+ : croissance ; +/-: faible croissance ; - pas de croissance

*: réaction colorée (Esculin "brun foncé/ noir", Hydroxyquinoline β -glucuronide "points noirs ou dépôt noir", L- Tryptophan "orange foncé", L-Histidine "rose ou pourpre dans la cupule »).

N: coloration noire; J: coloration jaune; I: incolore; C: coloré

Les différences d'utilisation de substrat entre les souches sont indiquées en couleur et en gras.

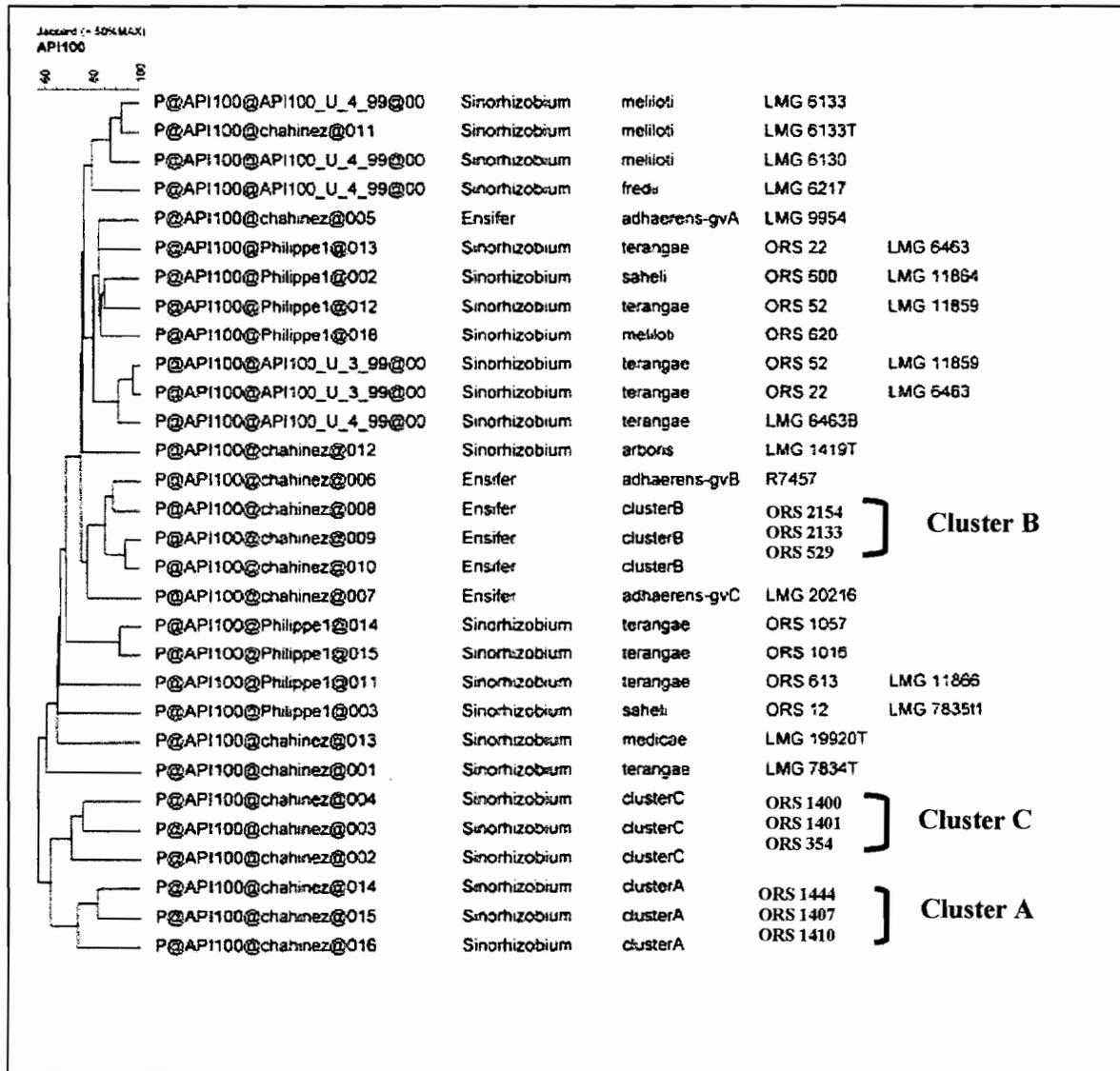


Figure 30 : Dendrogramme montrant la position des Cluster A (*E. maghrebium*) ; Cluster B (*E. adhaerens*) et Cluster C (*E. xericitae*) d'après leur profil de métabolisme de 100 sources de carbone.

3. 1. 5 Discussion et conclusion :

Une centaine d'isolats bactériens ont été obtenus directement des nodules récoltés *in natura* ou par piégeage au laboratoire sur différentes légumineuses provenant d'Algérie (*Medicago polymorpha*, *M. ciliaris*, *M. littoralis*, *M. marina*, *M. minima*, *M. arabica*, *Lotus creticus*, *Acacia tortillis*, *Acacia* sp., *Trigonella maritima*, *Retama raetam*, *Retama monosperma*, *Astragalus* sp. et *Scorpiurus vermiculatus*.

Dans notre étude nous avons inclus seize isolats potentiellement intéressants originaires de Tunisie, du Liban et du Sénégal et qui ont été isolés de légumineuses spontanées présentes dans des zones infra-arides, salées et dégradées. Ces isolats sont répertoriés dans la collection STM du laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes de Montpellier mais n'étaient que partiellement caractérisés.

L'ensemble des isolats ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique et génotypique, comme recommandé traditionnellement (Vandamme *et al.*, 1996, Graham *et al.*, 1991).

Du point de vue morphologique, les souches présentent des caractéristiques macroscopiques et microscopiques semblables à celles des rhizobia décrits (Jordan, 1984, Dommergues et Mangenot, 1970). La majorité des isolats tolèrent des concentrations élevées de NaCl pouvant atteindre 800 mM NaCl sur YMA ; la majorité de ces isolats proviennent de la zone salée de Misserghin.

Concernant la nodulation, 32 souches issues de nodules d'espèces de *Medicago* et qui ont été décrites plus tard comme *Ensifer* spp., se sont avérées effectives avec leurs plantes hôtes, néanmoins celles appartenant aux autres genres renferment des souches effectives et des souches non effectives. Les tests de nodulation *in vitro* réalisés sur *Retama*, *Acacia* et *Lotus* ont été infructueux, peut être à cause de la méthode utilisée ou alors du milieu pour plante qui n'est peut être pas adapté à ces plantes.

La caractérisation génotypique des isolats a d'abord consisté en un criblage de toutes les souches sur la base du séquençage de 591 pb de la région la plus discriminante de l'ADNr 16S entre les espèces de *Ensifer*.

Ce premier criblage a permis de retenir 72 souches de la collection d'Algérie identifiées comme *Ensifer*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium* et *Agrobacterium* dont quatre souches forment un groupe séparé dans le genre *Rhizobium* et six souches forment

un groupe séparé dans le genre *Agrobacterium*. Le reste des souches qui n'ont pas été retenues (28 souches) pour la suite de la présente étude appartiennent principalement au genre *Pseudomonas* et seront étudiés ultérieurement.

L'étude des séquences partielles de l'ADNr 16S des souches de BNL d'Algérie, nous a montré que *M. ciliaris* est associée à trois genres de BNL, *Ensifer*, *Rhizobium* et *Phyllobacterium* ainsi qu'au genre *Agrobacterium*. Dans la littérature, cette légumineuse n'est rapportée que comme l'hôte que de certaines espèces de *Ensifer* ou récemment d'une espèce de *Bradyrhizobium*, montrant ainsi la diversité des partenaires symbiotiques de cette légumineuse en Algérie.

Nous avons également observé qu'il peut exister une influence de la pression de sélection particulière au lieu du site d'échantillonnage sur la diversité bactérienne. Ainsi les souches isolées de la zone polluée de Batewa se trouvent uniquement dans le groupe des *Ensifer*, de même pour les souches des zones arides (Biskra et Djanet), qui se regroupent uniquement dans *E. meliloti* et forment pour certains un groupe séparé dans la branche *Agrobacterium*. A l'opposé, les souches isolées de la zone salée de Misserghin se retrouvent dans la plupart des groupes de BNL (*Ensifer*, *Rhizobium*, et *Phyllobacterium*) et *Agrobacterium*.

Nous avons également identifié les isolats de légumineuses peu étudiées. Ainsi les souches STM 2251 et STM 2252 isolées de *Scorpiurus vermiculatus* se regroupent respectivement dans une branche à part proche de *R. loessense/R. galegae* et dans la branche de *E. medicae*. Les souches STM 2258, STM 2257 isolées de *Retama monosperma* se regroupent avec *Agrobacterium radiobacter*, tandis que la souche STM 2285 isolée la même plante et de la même région (Cap Falcon) du littoral groupe avec *R. sullae* IS123 espèce décrite comme spécifique de *Hedysarum* (Squartini *et al.*, 2002).

Le séquençage partiel de l'ADNr 16S des souches STM (collection LSTM) révèle que la majorité appartient au genre *Ensifer* et une souche proche de *Phyllobacterium*. Certaines souches forment des groupes séparés dans le genre *Ensifer* et dont le statut taxonomique sera confirmé par les autres techniques de caractérisation.

Pour confirmer la position phylogénétique des différents clusters mis en évidence par le séquençage partiel de l'ADNr 16S, nous avons alors complété le séquençage du segment entier de ce gène pour un ou plusieurs représentants de ces différents groupes.

Le séquençage total de l'ADNr 16S révèle que certaines souches se regroupent effectivement dans des espèces connues de BNL, tandis que dix-neuf d'entre elles forment cinq groupes séparés, représentant peut être des nouvelles espèces.

Ainsi, neuf souches originaires de Tunisie et du Sénégal forment trois groupes séparés (A, B, C) dans le genre *Ensifer*, quatre souches d'Algérie forment un groupe séparé dans le genre *Rhizobium* et six souches, aussi originaires d'Algérie forment un groupe séparé dans le genre *Agrobacterium*.

Pour confirmer l'originalité des trois nouveaux groupes (A, B, C) de *Ensifer*, nous avons employé la technique MLSA et étudié les phylogénies obtenues avec cinq gènes de ménage, choisis sur la base d'une étude comparative entre les différentes souches de référence de *Ensifer* (Martens *et al.*, 2007) et en utilisant trois méthodes de reconstruction phylogénétique (NJ, ML, MP). Actuellement plusieurs études sur la MLSA (Zeigler, 2003 ; Wertz *et al.*, 2003) ont confirmé son utilité pour l'identification des espèces.

L'analyse par le séquençage de l'ADNr 16S, de la MLSA, et des tests auxanographiques combinés avec ceux obtenus auparavant par Zakhia *et al.* (2004) montrent que le cluster A forme une nouvelle espèce pour laquelle nous proposons le nom. *Ensifer maghrebium* sp. nov. pour les souches ORS 1444, ORS 1407 isolées de *Argyrolobium uniflorum* et ORS 1410 isolée de *Lotus creticus*.

Pour compléter cette étude, nous avons rapporté pour la première fois l'analyse des séquences du gène *nodA* du partenaire microbien d'*Argyrolobium uniflorum*. Les résultats montrent que le *nodA* de la souche ORS 1444 forme une branche proche mais séparée de ceux de *E. medicae* et *E. meliloti*, et code probablement pour des facteurs Nod $\alpha\beta$ insaturés.

Le cluster B constitué des souches ORS 2154, ORS 529 et ORS 2133 isolées de *Lotus arabicus* et originaires du Sénégal, forme un groupe monophylétique dans toutes les phylogénies (ADNr 16S et gènes de ménage *recA*, *glnA*, *gltA* et *thrC*), proche mais séparé de *E. adhaerens* gvA.

Les valeurs d'homologie de séquences se situent dans l'espace séparant les valeurs intra et inter-espèces (Martens *et al.*, 2007). Néanmoins, pour séparer les trois genomovars de cette espèce, Willems *et al.* (2003a) ont eu recours aux hybridations ADN-ADN. Ainsi, pour confirmer le statut de ce groupe, nous avons réalisé des hybridations ADN-ADN avec des souches de référence des trois genomovars.

Les résultats obtenus confirment que le cluster B est bien distinct des deux genomovars B et C de *E. adhaerens* mais aucune conclusion n'a pu être donnée vis à vis du genomovar A en raison de la différence observées entre les valeurs d'hybridations réciproques.

Nous avons par ailleurs testé l'aptitude des souches de ce groupe à utiliser différents substrats carbonés pour leur croissance. Les résultats traduits en dendrogramme montrent que ce cluster est groupé effectivement dans la branche de *E. adhaerens* mais séparé des trois genomovars

sauf pour la souche ORS 2154 plus proche de *E. adhaerens* gvB R-7457. Tous les membres du cluster B sont effectifs avec leur plante hôte. Nous avons séquencé le gène *nodA* d'un représentant du groupe, la souche ORS 529/*Lotus arabicus* : il s'est avéré proche des gènes *nodA* de la souche ORS 1444 isolée de *Argyrolobium uniflorum* avec lequel il forme avec elle un groupe séparé proche des *nodA* de *E. medicae*/*E. meliloti*. Ce gène *nod A* code probablement pour des facteurs Nod $\alpha\beta$ insaturés.

En conclusion de l'ensemble de ces tests, on peut considérer le cluster B comme proche de *E. adhaerens* gvA, mais nous ne pouvons pas conclure à ce stade s'il est confondu avec lui.

Le troisième cluster C, est composé des trois souches ORS 1401, ORS 1400 isolées de *Argyrolobium uniflorum* et STM 354 isolée de *Medicago sativa*, originaires de Tunisie. Le cluster C forme un groupe monophylétique dans toutes les analyses phylogénétiques, proche mais séparé des souches de référence de *E. terangae* et *E. mexicanum*.

En séquençage de l'ADNr 16S, le cluster C se rapproche de *E. terangae* LMG 7834^T, cependant avec une valeur bootstrap non significative (55 %), et une homologie de séquence de ses membres avec cette souche de référence de 98,8 %. Le même niveau d'homologie de séquence sépare les deux espèces *E. medicae* A321^T et *E. fredii* USDA 205^T (Rome *et al.*, 1996). Par ailleurs, le cluster C est aussi proche de la souche de référence de *E. mexicanum* mais l'alignement des séquences d'ADNr 16S et de quatre gènes de ménage (*glnA*, *gltA*, *thrC* et *recA*) des souches du cluster C avec celle de *E. mexicanum* révèlent plus de différences. Les valeurs d'homologie de séquences entre les membres du cluster C, *E. terangae* et *E. mexicanum* correspondent à des valeurs inter-espèces (Martens *et al.*, 2007), indiquant que ce cluster forme une espèce séparée de celles connues. Les tests génotypiques ont été complétés par l'analyse auxanographique comparative des représentants du groupe C et de la souche de référence de *E. terangae* LMG 7834^T.

L'analyse numérique des résultats montre que le groupe C est séparé des autres espèces de *Ensifer* et se rapproche le plus du groupe A. Il est indiqué que toutes les souches du groupe C peuvent métaboliser le malonate, contrairement à *E. terangae* LMG 7834^T.

Nous avons complété cette étude par le séquençage du gène *nodA* de deux souches ORS 1400 et STM 354 isolées de deux plantes différentes (*Argyrolobium uniflorum* et *Medicago sativa*). Les gènes *nodA* de ces deux souches forment un groupe séparé proche des *nodA* des souches ORS 1444/*Argyrolobium uniflorum* représentant du cluster A et du *nodA* de la souche ORS 529/*Lotus arabicus* représentant du cluster B. Ces *nodA* sont séparés des *nodA* de *E. medicae* et *E. meliloti*.

Ces gènes codent probablement comme pour le reste des représentants des clusters A et B pour des facteurs Nod $\alpha\beta$ insaturés.

En regroupant les résultats de l'analyse MLSA, du séquençage de l'ADNr 16S, des tests auxanographiques et de la phylogénie *nodA* de ce groupe, avec ceux obtenus par Zakhia *et al.* (2004) avec les mêmes souches par analyse des protéines totales par SDS-PAGE et le profil de restriction de l'ADNr 16S par la technique PCR-RFLP, il est clair que le cluster C forme également une nouvelle espèce proche de *E. terangae* et *E. mexicanum* que nous avons nommée : *Ensifer xericitae* sp. nov., avec la souche ORS 1400 isolée de *Argyrolobium uniflorum* comme souche type de l'espèce.

Pour les deux autres groupes de souches d'Algérie qui forment des branches séparées dans *Rhizobium* et *Agrobacterium*, l'analyse par la technique MLSA du cluster E est en cours. Les séquences des différents gènes de ménage obtenues pour ce groupes n'ont pas pu être confrontées à celles des deux souches de référence de *R. sulae* (*R. sulae* LMG 23764^T et *R. sulae* LMG 23765) dont nous ne disposons pas au moment de l'étude.

Le cluster D, inclus dans la branche *Agrobacterium*, sera étudié ultérieurement, en utilisant d'autres gènes de ménage plus discriminants dans le genre *Agrobacterium* comme le gène *rpoB*.

Dans cette étude, nous avons également testé le pouvoir discriminant des puces *nodA*. Les résultats de ce test restent néanmoins préliminaires et devront être confirmés par d'autres tests.

Dans le sous-chapitre suivant, les souches identifiées sont testées pour leur tolérance à la salinité afin de sélectionner les plus tolérantes à la salinité destinées à l'inoculation en zones salées.

Dans ce chapitre, nous étudions la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobia / *Medicago* dans la zone modèle d'étude et comment la salinité des sites influence cette répartition. Cette étape constitue un pas vers la compréhension des mécanismes qui permettent aux deux organismes et à la symbiose de se maintenir en conditions de stress salin.

Impact de la salinité sur la croissance et la
répartition des deux partenaires de la
symbiose rhizobia/*Medicago* dans la
Sebkha de Misserghin

3. 2 Impact de la salinité sur la croissance et la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobia/ *Medicago* dans « la Sebkhah de Misserghin »

3. 2. 1 Introduction :

Les lacs salés ("chotts, sebkhas") comptent parmi les plus grandes zones humides du Bassin méditerranéen. Les plus importants se trouvent en Afrique du Nord où l'effet conjugué de pluies torrentielles subites et d'un ruissellement rapide dans des paysages quasi désertiques entraîne parfois la formation de vastes étendues d'eau dans des dépressions continentales. Dans les chotts, la végétation permanente est éparse avec des îlots de verdure chaque fois que l'eau est présente. Les invertébrés y sont limités à une poignée d'espèces adaptées aux conditions xériques et les oiseaux d'eau sont rares. La proportion d'eau retenue dans les lacs salés (0,008 %) représentative des régions arides est étonnamment semblable à celle des lacs d'eau douce (0,009 %) représentatifs des autres régions sur la planète (Ramsar, 1971).

Cependant, les zones humides de régions arides et semi-arides subissent un certain nombre d'impacts graves parmi lesquelles on peut citer la pollution (qui comprend le ruissellement des régions agricoles, la pollution par les déchets industriels et ménagers provenant des villes voisines), le surpâturage, l'érosion et le changement climatique qui peuvent affecter la structure des crues.

En Algérie, comme dans les autres pays du Maghreb, l'étendue de ces lacs salés est importante. Ces zones peuvent être réhabilitées, protégées et également exploitées. La mise en valeur des terres salées pour le pâturage et tout autre système de production est un objectif essentiel pour ces pays.

Dans cette partie de travail, nous nous sommes intéressés à la Sebkhah de Misserghin qui est une prolongation de la grande Sebkhah d'Oran et qui renferme une richesse floristique intéressante. En plus des halophytes généralement colonisant des terres à salinité élevée d'autres plantes sont également présentes dont les légumineuses. Nous avons jugé intéressant de commencer par la description de la grande Sebkhah d'Oran avant d'aborder notre étude sur la Sebkhah de Misserghin.

Nous avons observé la présence de certaines espèces de *Medicago*, de *Melilotus* et d'*Acacia* dans la Sebkhah de Misserghin. Connaissant l'intérêt des légumineuses sur le plan écologique et économique, la sélection de couples symbiotiques rhizobia/ *Medicago* capables de s'installer dans ces régions et de créer un couvert végétal protégeant ces sols de l'érosion est

un des objectifs de notre travail. Ces associations peuvent également contribuer à l'enrichissement du sol en azote, utilisable par d'autres cultures et peuvent aussi être utilisées comme fourrage aux ovins.

Dans un premier temps, nous avons mesuré la salinité des 10 sites d'échantillonnage choisis dans la Sebkha de Misserghin et étudié la dispersion des deux espèces de *Medicago* les plus abondantes identifiées le long du transect, en quantifiant autant que possible leur nombre dans 1 m² et leur dispersion (continue, discontinue). Nous avons ensuite étudié la distribution du partenaire microbien préalablement identifié (sous chapitre 3.1) le long du même transect.

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication Merabet *et al.* (2006): **Distribution of *Medicago* Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria**, paru dans la revue *Arid Land Research and Management*, volume 20, Number 3: 1-13.

Dans une deuxième étape, nous avons fait un criblage de toutes les souches isolées de l'Algérie au cours de cette thèse sur la base de leur tolérance à différentes concentrations de NaCl et étudié la tolérance à la salinité également de deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*).

Dans une dernière étape, nous avons sélectionné une souche de *E. meliloti* STM 1064 qui présente une forte tolérance à la salinité comme souche modèle pour rechercher les gènes impliqués dans la tolérance à la salinité. Ce travail a été réalisé en collaboration avec nos partenaires Finlandais du projet BACDIVERS.

3. 2. 1. 1 Présentation de la Sebkha d'Oran (Localisation et origine) :

La Sebkha d'Oran est l'une des plus grandes Sebkha de l'Algérie et du Maghreb (Figure 31) qui s'étend sur 56.870 hectares. C'est une dépression fermée située au Sud de la ville d'Oran, à 110 mètres d'altitude, limitée au Nord par le massif du Mordjadjo dont l'altitude maximale est de 589 m, et, au Sud, par le massif de Tessala dont l'altitude maximale est de 1.061 m. Alimentée par les eaux de ruissellement du bassin hydrographique, l'eau de la sebkha est toutefois salée.

D'origine tectonique, la Sebkha d'Oran est apparue à la fin du pliocène et au début du quaternaire, époque où dominait dans le Tell oranais une topographie en bassins fermés (les deux anticlinaux du Merdjadjo au Nord et le Tessala au Sud). Les eaux qui s'écoulent de ces deux massifs se sont rassemblées dans le synclinal qui forme aujourd'hui la grande Sebkha. Les dépôts continentaux du pliocène et du quaternaire ont contribué à combler et à niveler la plus grande partie de la plaine de la M'Leta. Ces dépôts ont été repris et entraînés

dans la cuvette de la Sebkhha dont le nivellement est à 80 m d'altitude au dessus du niveau de la mer (http://www.algeria.strabon.org/portal/article.php?id_article=72).

Malgré sa proximité de la mer, la Sebkhha d'Oran jouit d'un climat semi-aride, la valeur des précipitations varie entre 378 et 473 mm. L'étude des deux transects a montré que les pseudo-sables qui prennent naissance dans la sebkhha se mobilisent et se déplacent selon la direction des vents dominants qui sont du Nord et du Nord-Ouest. L'étude sédimentologique semi profonde a montré des sédiments très fins en dépit de quelques éléments plus gros. Ces sédiments sont homogènes, leurs indices de classements font penser à l'intervention de plusieurs agents une décantation lente dans un milieu fluvial à faible énergie, repris par une action éolienne. La fraction argileuse est constituée d'une part d'un héritage sédimentaire et d'autre part de minéraux néoformés.

Pendant la saison humide la sebkhha submergée est recouverte d'argile limoneuse apportée en suspension par les troubles. Les oueds (cours d'eau temporaires) perdent de leur vitesse et la décantation s'effectue sur un matériel de plus en plus fin. Par contre en saison sèche elle se vide par évaporation et subit une intense déflation éolienne du fait de la cristallisation du sel (Ahmane et Rognon, 1990).

3. 2. 1. 2 Caractéristiques écologique de la Sebkhha d'Oran :

Très peu d'études ont été réalisées sur la végétation de la Sebkhha d'Oran. Tremblin (2000) montrent dans une étude écologique de trois plus grande Sebkhhas de l'ouest algérien dont celle d'Oran la présence d'une halophyte annuelle *Halopeplis amplexicaulis*. Cette plante pionnière des lacs salés colonisent les rives des lacs bien avant les autres plantes et joue un rôle important dans l'amélioration des caractéristiques physicochimiques de ces sols, elles laissent place ensuite à une végétation halophytes moins éphémère servant essentiellement de pâture aux ovins. D'autres halophytes sont aussi présentes dans ces Sebkhhas, telles que *Sueda* sp., *Juncus* sp. et certaines petites touffes de *Chamaerops humilis* ainsi que quelques rares spécimens de tamaris se trouvent près des rives.

Contrairement à la flore, la faune de la Sebkhha d'Oran est remarquable, on compte un nombre important de flamants roses et de tadorne de Belon, les effectifs de ces deux espèces dépassent souvent le 1 % international.

Les Sebkhhas peuvent être exploitées pour l'extraction de sel mais elle représente également une menace écologique importante tant pour l'agriculture que pour les agglomérations urbaines limitrophes du fait de leur progression et de leur élargissement constants, plusieurs tentatives d'assèchement et de drainage ont été effectuées dans la Sebkhha

d'Oran. Actuellement certaines rives sont utilisées comme décharge par les riverains et quelques petits industriels contribuant ainsi à leur pollution. Un autre danger de la Sebkha et le risque de salinisation des terres agricoles limitrophes car en période d'été, la Sebkha se dessèche après l'évaporation des eaux et les croûtes de sel formées s'effritent, sont emportées par le vent, contribuant ainsi à la salinisation des terres voisines.

La Direction de Conservation des Forêts en Algérie œuvre actuellement pour la sauvegarde de cette zone humide, plusieurs tentatives auprès des autorités locales ont été menées pour stopper ces phénomènes. Des essais d'aménagements intégrés proposés par la Direction des Etudes et des Aménagements Hydrauliques du Ministère des Ressources en Eau et exécutés par le groupe Français Sogreah pour assainir cette zone humide et limiter sa progression. En dehors de leur utilisation comme parcours pour l'élevage intensif souvent surexploité, une meilleure organisation de la pâture pourrait être envisagée en favorisant le développement d'espèces de groupement primitif à valeur pastorale satisfaisante (légumineuses et graminées).

Des essais agronomiques de mise en valeur de trois Sebkhas de l'ouest algérien et des steppes salées voisines ont été réalisés dans les années 50. Des essais d'irrigation dans des sols relativement perméables ont été entrepris et ont abouti à l'installation de prairies à fétuques à valeur pastorale satisfaisante mais relativement instables. Une mise en valeur plus poussée des terrains salés après drainage conséquent a permis d'obtenir des résultats intéressants au niveau des cultures de plantes industrielles comme le cotonnier, le lin et la betterave à sucre (Simonneau, 1952). De même des rendements satisfaisants ont été obtenus avec le riz et l'artichaut (Quézel et Simonneau, 1960) après une longue période d'assainissement. Ces essais n'ont pas été poursuivis et l'arrêt des arrosages et des techniques culturales spécifiques s'est traduit très rapidement par la réinstallation de la végétation halophile primitive.

3. 2. 1. 3 La zone d'étude « la Sebkha de Missrghin » :

La Sebkha de Misserghin (figure 30), est une prolongation de la grande Sebkha d'Oran évoquée ci-dessus. Elle est caractérisée par la présence d'un gradient de salinité des bordures vers le centre et où nous avons observé en dépit de la forte salinité du site la présence de plusieurs *Medicago* annuelles dont nous avons pu identifier deux espèces les plus abondantes dans le site (*Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha*) ainsi que d'autres espèces halophiles du genre *Atriplex* et *Arthrocnemum* et des *Acacia* appartenant à deux espèces *A. seyal* et *A. horrida* et des *Melilotus*.

3. 2. 2 Impact de la salinité sur la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobia/ *Medicago* dans « la Sebkha de Misserghin »

3. 2. 2. 1 Echantillonnage:

Au départ, nous avons choisi 13 sites d'échantillonnage le long du transect, mais pour l'étude de l'impact de la salinité sur la distribution des deux partenaires de la symbiose, nous avons gardé que dix sites dans lesquels nous avons quantifié le nombre de plantes présentes et le degré de salinité. Le niveau de salinité des 10 sites d'échantillonnage le long du transect salin a été mesuré par conductivité électrique, la salinité des sites a été estimée par comparaison des résultats à l'échelle de salure internationale INRA (ISS, http://www.iges-stb.org/pdf/dico_donesol2.pdf). Les résultats sont indiqués dans le tableau (10). La mesure de la conductivité électrique montre que le taux de salinité augmente des bords vers le centre de la dépression (2,5 à 20 mS/cm), correspondant au niveau 1 à 4 dans l'échelle de salure internationale. Toutefois, la majorité des échantillons proviennent des sites correspondant aux niveaux 2 de salinité sur l'échelle ISS (moyenne de conductivité de 4-8 mS/cm) et 3 (moyenne de conductivité de 8-16 mS/cm). Aucune végétation n'est présente dans le centre de la Sebkha où le sol est envahi en été par les croutes de sel (20 mS/cm) ou complètement inondé en saison humide.

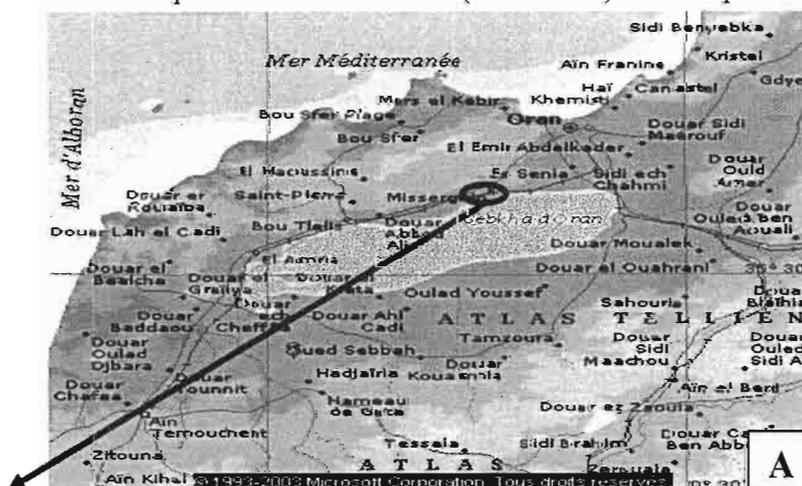
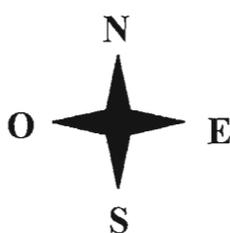


Figure 31 : Localisation de la Sebkha d'Oran (A) et celle de Misserghin (B)

3. 2. 2 Croissance et distribution spatiale des *Medicago* dans la zone d'étude:

Les observations effectuées sur le terrain, montrent que le gradient de salinité induit une sélection chez les plantes du genre *Medicago*, notamment chez *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha*.

Medicago ciliaris est prédominante dans les zones les moins salées (180 plantes/m² à 302 m du centre de la Sebkhah), par contre *Medicago polymorpha* est majoritaire dans les zones les plus salées (100 plantes/m² à 22 m du centre de la Sebkhah) avec la présence d'une zone intermédiaire où les deux espèces se mélangent en proportions équivalentes (figure 32). Des observations similaires ont été rapportées par Quézel et Santa (1962) qui signalent la présence de l'espèce *Medicago ciliaris* au niveau des pâturages et des prairies plus ou moins salées.

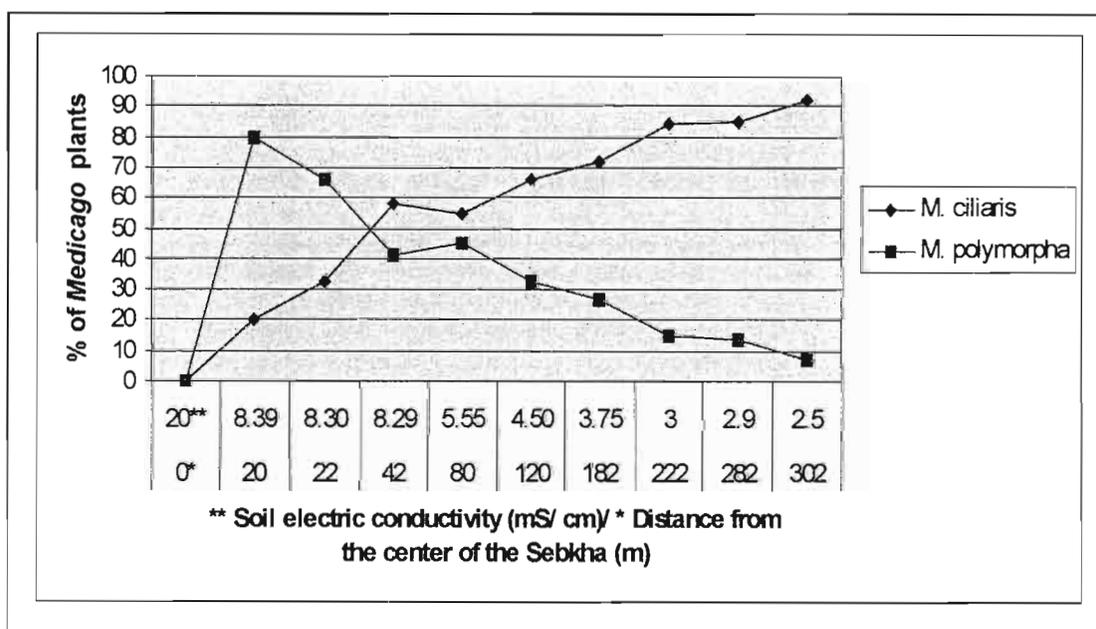


Figure 32: Distribution de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* le long du transect salin dans la Sebkhah de Misserghin

Le système racinaire des plantes récoltées à différents sites de la Sebkha montre que ce dernier est affecté par la concentration en sel (figure 33). Le système racinaire des *Medicago* en zones moins salées est plus profond avec plus de développement des racines secondaires, contrairement à celui des plantes présentes dans des zones plus salées dont les racines des plantes sont courtes et portent moins de racines secondaires. Selon Nei (1987) une proportion importante de sel dans le sol affecte donc le développement de la racine.

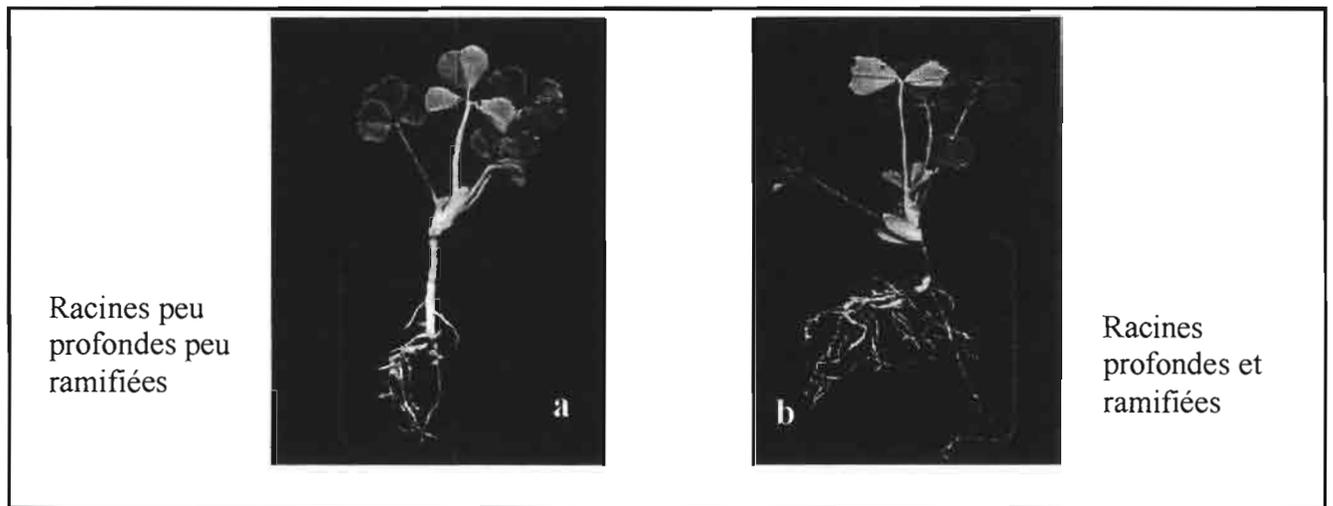


Figure 33 : Systèmes racinaires de *Medicago ciliaris* récoltés dans deux sites différents de la Sebkha de Misserghin.
a) à 42 mètre du centre de la Sebkha (zone salée)
b) à 120 mètre du centre de la Sebkha (zone légèrement salée)

Nos observations sur le terrain suggèrent que l'espèce *Medicago polymorpha* est plus tolérante à la salinité que *Medicago ciliaris* car elle est plus dominante dans les zones les plus salées de la Sebkha de Misserghin. Cependant, les tests effectués *in-vitro* montrent que les deux espèces sont équivalentes en tolérance à la salinité, les deux meurent en moins d'une semaine après leur transfert dans une solution nutritive additionnée de 50 mM de NaCl. Cependant, une meilleure croissance que celle du témoin est obtenue à 25 mM NaCl (figure 34). Abdely *et al.* (1995) rapportent une tolérance plus élevée à la salinité des deux espèces de *Medicago* : *M. ciliaris* et *M. polymorpha* avec une chute du taux de croissance relative (RGR) approximativement de 70 à 90 % comparé au control, quand le milieu contient entre 6 et 12 g/L (100-200 mM NaCl) de NaCl. D'où nos interrogatoires sur la survie, la croissance et la symbiose de ces plantes dans la nature où les concentrations de sel sont assez élevées notamment dans la région étudiée ? Il est cependant fortement observé que dans le champ, les *Medicago* sont le plus souvent associées aux halophytes qui les entourent, notamment avec

l'espèce « *Arthrocnemum indicum* », quand aux peu de plantes isolées elles sont généralement présentes dans les lits de rivière où la salinité est inférieure aux autres sites mais la taille de ces plantes est inférieure à celles des plantes entourées d'halophytes.

Robinson et Jones (1986) montrent que la présence des halophytes dans les régions salées est due à leur forte capacité d'ajustement osmotique. Ces plantes par leur capacité à absorber et à accumuler les sels et les substances organiques, d'une part, résistent aux conditions extrêmes de salinité et d'autre part aident à la diminution locale de la concentration de sel dans ces zones, permettant ainsi le développement des *Medicago* présents. Chaudhri *et al.* (1964) ont rapportées l'utilisation de *Suaeda fruticosa* (L.), pour sa capacité à accumuler les sels dans sa partie aérienne, réduisant ainsi la concentration de sel dans le sol. Abdely *et al.* (1999) montrent que les halophytes présentes dans les sols salés jouent un rôle dans la désalinisation locale des sites où sont implantées des plantes annuelles et augmentent leur fertilité. La biomasse d'espèces de *Medicago* à l'intérieure des touffes de halophytes étaient supérieure à celle de plantes présentent à l'extérieure. Ce qui est en accord avec nos observations sur le terrain.

D'autres auteurs suggèrent que les halophytes jouent non seulement un rôle dans la croissance des légumineuses mais également dans celui des microsymbiotes associés dans un milieu salé. Bekki *et al.* (2000) ont montré que la croissance de la souche ABS7 de *E. meliloti* dont la croissance est inhibée à 800 mM de NaCl dans le milieu de culture pouvait être rétablie par ajout de 5 ml d'extrait de feuilles de *Limonium delicatulum* (plante halophytes des zones salées en Algérie) ou de suspension de sol provenant de la rhizosphère de cette plante. Il est connu que les halophytes sont riches en solutés compatibles (Poljacoff-Mayer *et al.*, 1987 ; Larguet, 1998). Plusieurs solutés compatibles sont accumulés par la cellule bactérienne en milieu salé.

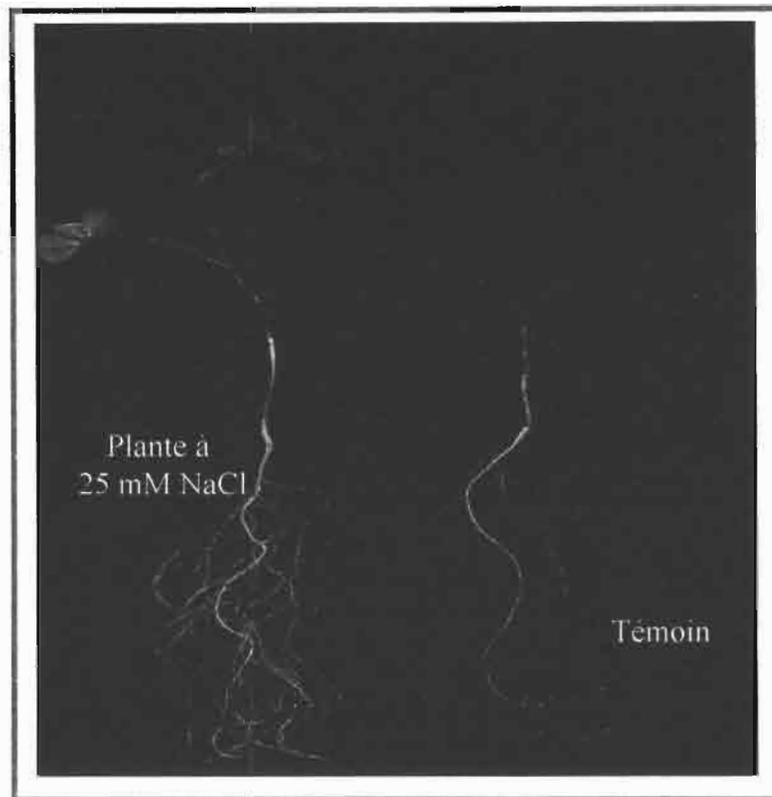


Figure 34 : Croissance de *Medicago ciliaris* à 25mM NaCl comparée à un témoin sans NaCl

3. 2. 2. 3 Distribution spatiale des rhizobia dans la zone d'étude :

La distribution spatiale des rhizobia est elle aussi influencée par le gradient de salinité ?

Nous avons isolé et identifié vingt six souches de rhizobia des nodules de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* prélevées le long du transect salin. Dans le tableau (10) sont présentées uniquement les souches appartenant aux BNL et *Agrobacterium*. Les autres souches appartenant aux non BNL n'ont pas été mentionnées.

Le séquençage de l'ADNr 16S (tableau 10), montre une diversité des souches isolées de ces deux plantes. Les deux espèces de *Medicago* sont associées à quatre genres de rhizobia : *Ensifer*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* et *Phyllobacterium*. Cependant la majorité est proche de *E. medicae*.

Contrairement à leur plante hôte, la distribution des souches de rhizobia ne semble pas fortement influencée par le gradient de salinité présent dans la zone d'étude. Les souches appartenant aux genres *Ensifer* et *Rhizobium* sont présentes dans tous les sites le long du gradient (tableau 10). Quand aux souches appartenant au genre *Agrobacterium*, elles sont plus

présentes dans les sites moyennement salés à pas salés, avec la souche de *Phyllobacterium* STM 999.

Néanmoins, les résultats obtenus restent préliminaires et devront être confirmés par une étude statistique des deux partenaires de la symbiose rhizobia / *Medicago* présents dans les 10 sites avec un plus grand nombre d'échantillonnage.

Il est important pour compléter cette étude, de connaître si la salinité du milieu induit une sélection des rhizobia par rapport à leur tolérance à la salinité. En d'autres termes, les rhizobia les plus tolérantes à la salinité *in-vitro* sont elles celles présentes dans les zones les plus salées de la Sebkha de Misserghin.

Pour répondre à cette question, nous avons testé la tolérance à différentes concentrations de sel de toutes les souches originaires d'Algérie de notre étude.

Tableau 10: Distribution des rhizobia et de leurs hôtes *M. ciliaris* et *M. polymorpha* le long du transect salin dans la Sebkha de Misserghin

Distance à partir du centre de la Sebkha (m)	Conductivité électrique mS/ cm	Salinié	Nombre de <i>M. ciliaris</i> et <i>M. polymorpha</i> (plant /m ²)	Souches	Séquençage partiel de l'ADNr 16S
Centre de la Sebkha	20	Très salée	<i>Medicago ciliaris</i> 0 <i>Medicago polymorpha</i> 0	STM1815**	<i>Rhizobium</i> sp.
20 m	8,39	Salée	<i>Medicago ciliaris</i> 20 <i>Medicago polymorpha</i> 80	STM 2210*	<i>Ensifer medicae</i>
				STM 990*	<i>Ensifer medicae</i>
22 m	8,30	Salée	<i>Medicago ciliaris</i> 50 <i>Medicago polymorpha</i> 100	STM1816**	<i>Ensifer medicae</i>
				STM1817**	<i>Rhizobium tropici</i>
				STM 991*	<i>Ensifer medicae</i>
				STM 992*	<i>Ensifer medicae</i>
42 m	8,29	Salée	<i>Medicago ciliaris</i> 100 <i>Medicago polymorpha</i> 70	STM1818**	<i>Rhizobium</i> sp.
				STM1819**	<i>Rhizobium</i> sp.

Impact de la salinité sur la croissance et la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobia/ *Medicago*

				STM 994*	<i>Ensifer medicae</i>
80 m	5,55	Moyennement salée	<i>Medicago ciliaris</i> 110 <i>Medicago polymorpha</i> 90	STM 2223*	<i>Ensifer medicae</i>
				STM 2227*	<i>Ensifer medicae</i>
				STM 996*	<i>Ensifer medicae</i>
				STM 998*	<i>Ensifer medicae</i>
				STM 999*	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>
				STM 1000*	<i>Agrobacterium rubi</i>
				STM 1001*	<i>Agrobacterium rubi</i>
				STM1081**	<i>Agrobacterium sp.</i>
				STM1082**	<i>Agrobacterium sp.</i>
				120 m	4,50
STM 1003*	<i>Ensifer medicae</i>				
182 m	3,75	Légèrement salée	<i>Medicago ciliaris</i> 130 <i>Medicago polymorpha</i> 50	STM1820**	<i>Ensifer medicae</i>
222 m	3	Légèrement salée	<i>Medicago ciliaris</i> 160 <i>Medicago polymorpha</i> 30	STM1821**	<i>Agrobacterium sp.</i>

Impact de la salinité sur la croissance et la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobiale *Medicago*

282 m	2,9	<i>Légèrement salée</i>	<i>Medicago ciliaris</i> 165 <i>Medicago polymorpha</i> 29	STM1823**	<i>Rhizobium sp.</i>
				STM1824**	<i>Ensifer medicae</i>
302 m	2.50	<i>Légèrement salée</i>	<i>Medicago ciliaris</i> 180 <i>Medicago polymorpha</i> 15	STM1826**	<i>Rhizobium sp.</i>
USA (Virginia) 1919	NT		NT	ORS 665, NZP 4027 LMG 6133 ^T	<i>Ensifer meliloti</i>

NT : non testé
M. *Medicago*
m : mètre

3. 2. 3 Tolérance des rhizobia de la collection d'Algérie à la salinité :

Les 72 souches d'Algérie ont été testées pour leur tolérance à différentes concentrations de NaCl sur deux milieux de culture :

Le milieu YMA a été utilisé pour un premier criblage des souches de la collection du laboratoire de Rhizobiologie d'Oran (Algérie). Ce milieu a été utilisé dans de nombreuses études sur la tolérance des rhizobia à la salinité (Beunard et Montange, 1994 ; Bouhmouche *et al.*, 2001). Le milieu M9 spécifique pour l'étude de la salinité sera ensuite utilisé pour suivre la cinétique de croissance des meilleures souches tolérantes à la salinité sélectionnées sur YMA. Le grand nombre des isolats étudiés ne permet pas de faire une cinétique de croissance de l'ensemble des souches.

3. 2. 3. 1 Sur milieu YMA

Les souches ont été cultivées sur YMA additionné de NaCl, des concentrations allant de 200 jusqu'à 800 mM (figure 35).

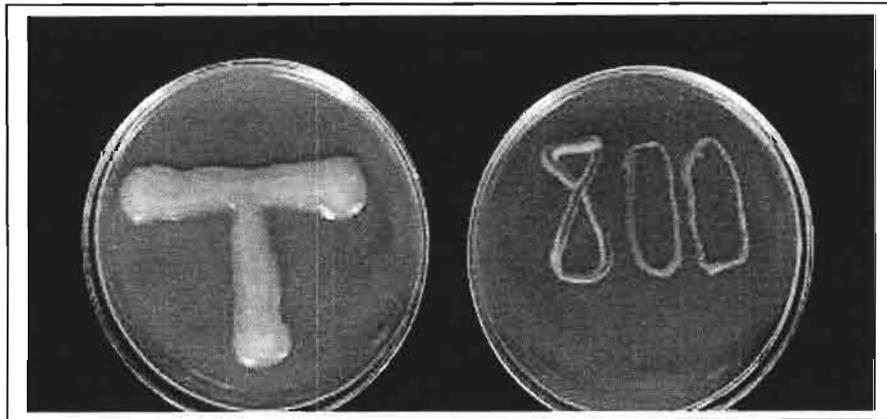


Figure 35: Croissance de *E. meliloti* STM 1064 sur milieu YMA avec et sans NaCl.

Toutes les souches testées se développent normalement en présence de 200 et 400 mM de NaCl .

La croissance de certains souches commence à être affectée à partir de 600 mM NaCl, mais reste possible jusqu'à 800 mM NaCl pour 23 souches (figure 35)(STM 990, STM 991, STM 999, STM 1000, STM 1001, STM 1003, STM 1004, STM 1082, STM 1819, STM 2229, STM 2236, STM 2240, STM 2243, STM 1062, STM 2257, STM 2283, STM 2250, STM 2252, STM 1064, STM 1078, STM 1828, STM 22274, STM 2278), la majorité des souches

tolérant 800 mM de NaCl sont originaires de la région salée de Misserghin. La tolérance des souches locales a été aussi démontrée dans les travaux de Bekki *et al.*, 1987 et Bekki, 1997.

Néanmoins si on rapporte les résultats de tolérance à la salinité des souches isolées de différents sites de la Sebkhia de Misserghin, on remarque que les souches présentes dans les sites les plus salées ne sont pas forcément les plus tolérantes à la salinité. Ainsi *E. medicae* STM 2210 qui est présente à 20 m du centre de la Sebkhia de Misserghin tolère 600 mM de NaCl sur YMA alors que *E. medicae* STM 2229 présente à 120 m du centre de la Sebkhia (zone moyennement salée) tolère jusqu'à 800 mM de NaCl. Ainsi dans différents sites on retrouve des rhizobia à tolérance à la salinité différente.

La tolérance à la salinité des *Ensifer*, genre auquel la majorité de nos souches sont reliées a été rapportée par plusieurs chercheurs. Mashady *et al.* (1998) montrent que certaines souches tolèrent jusqu'à 1000 mM de NaCl (Mashady *et al.*, 1998). D'autres chercheurs au contraire, rapportent la tolérance des *Ensifer* à 500 mM de NaCl. (Mohammad et Campbell, 1985 et Rome *et al.*, 1996).

On remarque également par ce test sur YMA que les souches tolérantes à la salinité présentaient des colonies muqueuses or cette mucosité qui est due à la production d'exopolysaccharides diminue à fortes concentrations de NaCl tel qu'il est démontré dans la figure (36). Nos résultats rejoignent ceux de Lloret *et al.* (1998) qui ont observé une diminution de la mucosité des colonies de *E. meliloti* EFBI1 en présence de 0,3 M NaCl comparé au témoin sans sel et que leur production d'exopolysaccharides diminuée de 40 % sur milieu liquide salé.

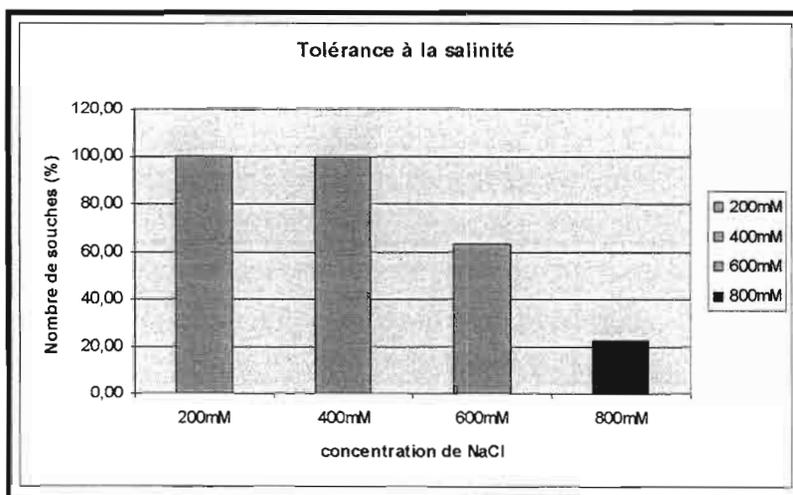


Figure 36 : Pourcentage de souches tolérant différentes concentrations de NaCl sur milieu YMA.

3. 2. 3. 2 Sur milieu M9 :

Nous avons choisi six souches de *Ensifer* (STM 1064, STM 1062, STM 990, STM 994, STM 1003) parmi celles qui tolèrent 600 et 800 mM NaCl sur YMA pour suivre leur cinétique de croissance sur milieu M9 ajusté à 600 et 800 mM NaCl, que nous avons comparé avec la souche de référence de *E. meliloti* RCR 2011. Nous avons également suivi la cinétique de croissance de la seule souche de *Phyllobacterium ifriqiyense* de notre collection (STM 999) et qui tolère 800 mM de NaCl sur YMA.

Six souches de *Ensifer* ont pu croître à 600 mM NaCl en milieu M9 mais pas à 800 mM NaCl, contrairement aux résultats obtenus avec la même concentration sur milieu YMA. La composition du milieu de culture aurait-elle une influence sur la croissance et la survie des rhizobia en présence de concentrations élevées de NaCl?!

Nous avons pensé en premier au mannitol, car Le Rudulier (2005) rapporte que ce composé polyols présent dans la composition du milieu YM est connu pour son rôle osmoprotecteur chez les rhizobia. Cependant ce composé est également présent dans la composition du milieu M9 ainsi que dans d'autres milieux utilisés pour des tests de tolérance à la salinité (Smith *et al.*, 1988 ; Boncompagnie *et al.*, 1999). Dans d'autres études Brhada *et al.* (1997) et Bernard *et al.* (1986) ont même remplacé le Lactate du milieu LAS par le mannitol pour favoriser la croissance des Rhizobia.

L'agar-agar, pourrait aussi être responsable d'une protection contre le sel puisqu'il est présent dans le milieu YMA et non dans le milieu M9. Toutes ces suppositions devront être confirmées par des tests plus approfondis et avec un plus grand nombre de répétitions.

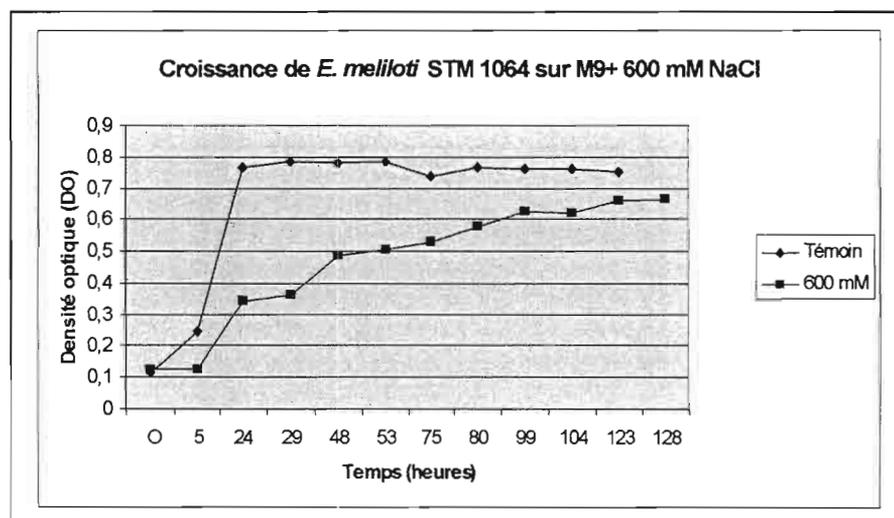


Figure 37 : Cinétique de croissance de *E. meliloti* STM 1064 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.

Les résultats de la cinétique de croissance sur M9, montrent également que les souches de *Ensifer* d'Algérie sont plus tolérantes au sel que la souche de référence de *E. meliloti* RCR 2011 (figure 37, 38, 39, 40, 41, 42), ce qui rejoint les observations de G. Alloing, (communication personnelle) d'une concentration minimale inhibitrice de croissance est de 300 mM NaCl, et d'aucune croissance n'est obtenue à 500 mM NaCl.

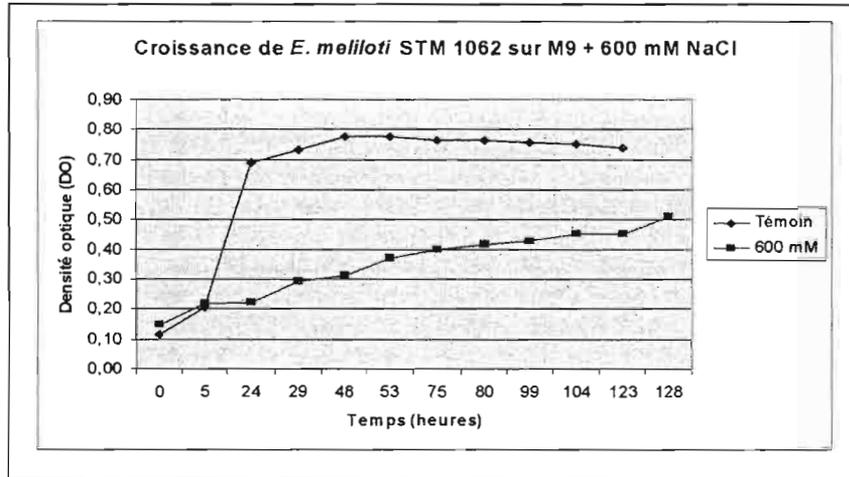


Figure 38 : Cinétique de croissance de *E. meliloti* STM 1062 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.

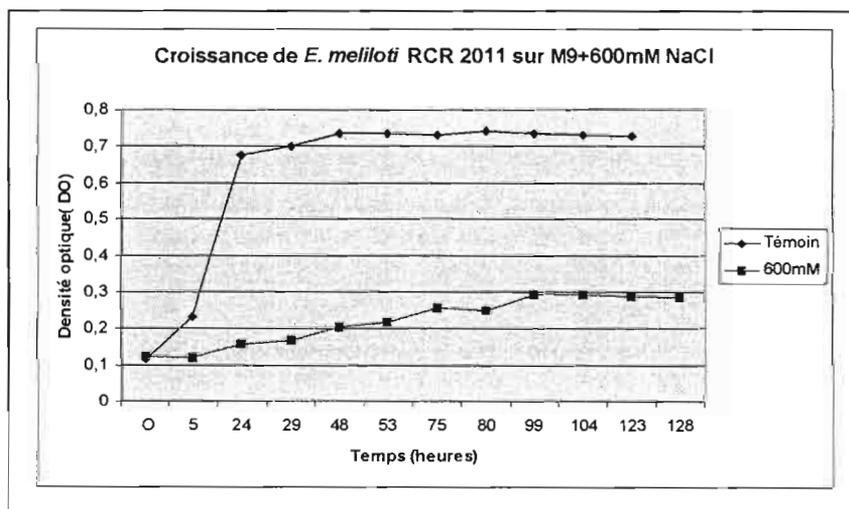


Figure 39 : Cinétique de croissance de *E. meliloti* RCR 2011 (souche de référence de l'espèce) sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.

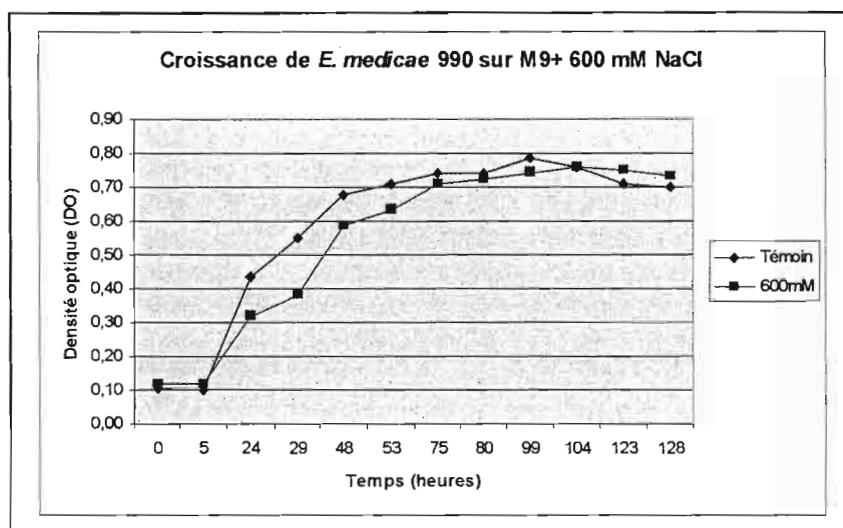


Figure 40 : Cinétique de croissance de *E. medicae* STM 990 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.

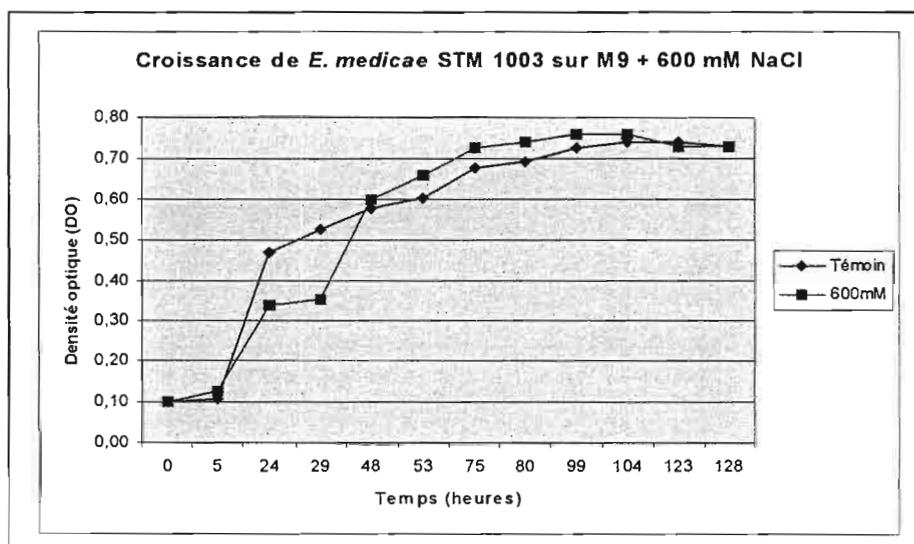


Figure 41 : Cinétique de croissance de *E. medicae* STM 1003 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.

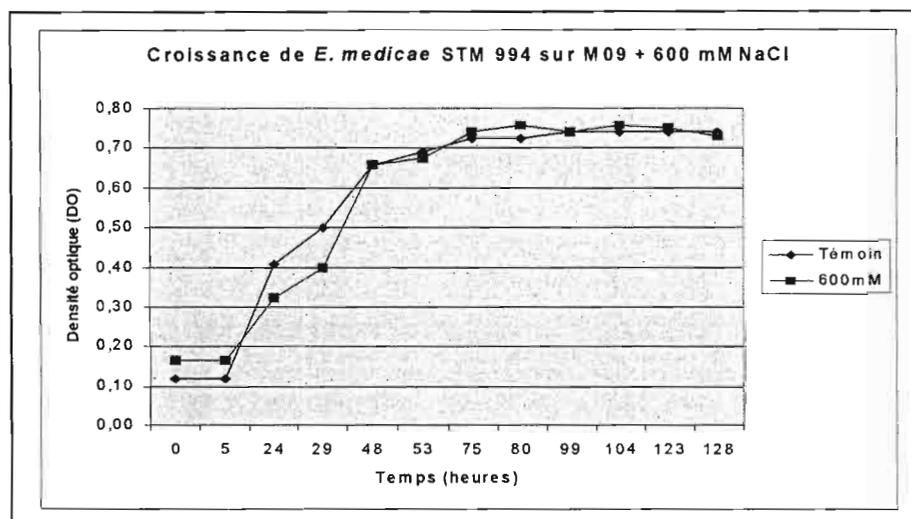


Figure 42 : Cinétique de croissance de *E. medicae* STM 994 sur M9 additionné ou non de 600 mM de NaCl.

Cependant, bien que la croissance des souches de *Ensifer* d'Algérie reste possible à des concentrations élevées de NaCl, la cinétique de croissance est néanmoins affectée par le stress engendré par la salinité du milieu. Nous avons remarqué une augmentation du temps de génération de la croissance des souches testées. Le temps de génération de *E. meliloti* STM 1064 augmente de 5 heures ($G=6\text{h } 41\text{min}$) sur M9+600 mM NaCl comparé au témoin $G=1\text{ h } 42\text{ min}$. La croissance des souches de *E. medicae* est également affectée par la salinité et leur croissance en présence de sel est ralentie. Le temps de génération de *E. medicae* STM 1003 est de 3h 75min pour le témoin et atteint 7 heures en présence de 600 mM de NaCl. Néanmoins et contrairement aux souches de *E. meliloti*, la croissance des trois souches de *E. medicae* (STM 990, STM 994 et STM 1003) qui est ralentie au départ à 600 mM NaCl, augmente clairement pour atteindre ou surpasser la croissance du témoin après 48h de croissance (figures 40, 41, 42). Serait-il le temps (phase de latence) nécessaire à l'adaptation de ses souches à la salinité du milieu ?

Pour la souche de *Phyllobacterium* aucune croissance n'a été observée sur le milieu M9.

La tolérance remarquable de la souche de *E. meliloti* STM 1064 à la salinité (600 et 800 mM) dans les deux milieux de culture, nous a conduit à la retenir pour la recherche de gènes impliqués dans les mécanismes impliqués dans cette halotolérance. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de K. Lindström (Finlande).

3. 2. 4 Recherche de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité chez *Ensifer meliloti* :

Remarque : Cette étude a été réalisée en collaboration avec K. Lindström et Z. Terefework, de l'Université de Helsinki (Finlande) dans le cadre du projet européen BACDIVERS ;

Plusieurs souches de rhizobium adaptés et tolérants des conditions extrêmes d'aridité et de salinité ont été isolées au cours de ce travail. Pour survivre aux changements environnementaux, les bactéries doivent répondre par l'expression de gènes liés à la tolérance à la salinité.

Les tentatives du groupe Finlandais de développer des puces dédiées à l'identification et la sélection de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité et à la sécheresse chez des souches de *Ensifer* ont été réalisées au cours du projet européen BACDIVERS. Plusieurs gènes impliqués dans la réponse au stress salin ont été identifiés et d'autres essais sont en cours.

Pour la recherche de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité, deux souches de *E. meliloti* ont été sélectionnées, la souche STM 1064 de *E. meliloti* d'Algérie et la souche AK 23 de Russie.

Ces souches ont été sélectionnées sur la base de leur ressemblance avec la souche de référence *E. meliloti* Rm 1021 ainsi que leur haute tolérance à des concentrations de NaCl supérieures à 800 mM. Les souches testées ont été cultivées sous stress salin afin de permettre l'expression de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité.

Les résultats de l'analyse montrent que sur 6028 gènes portés par la puce de la souche *E. meliloti* Rm1021, 510 gènes soit 8,2 % des gènes totaux diffèrent avec la souche STM 1064 de *E. meliloti*. La divergence entre *E. meliloti* Rm1021 et la souche *E. meliloti* STM 1064 est plus forte au niveau des gènes plasmidiques pSymA avec 357 gènes différents soit (27 %) en comparaison avec la souche de référence, un taux de divergence plus faible a été observé avec les gènes du pSymA de la souche *E. meliloti* AK23 de Russie (tableau 11). La majorité des spots divergents sont probablement des gènes codant pour des protéines dont les fonctions n'ont pas encore été décrites.

Il est à noter que le plasmide pSymA contient la majorité des éléments d'insertion et de transposition et son origine acquis par transfert horizontal (Galibert *et al.*, 2001). Un plus petit nombre de gènes sur le plasmide pSymB sont divergents. Capela *et al.* (2001) montrent que le plasmide pSymB a des propriétés similaires à celles du chromosome et son origine peut être chromosomique.

L'identification des gènes divergents mis en évidence sur puces est en cours.

Tableau 11 : Distribution des gènes divergents ou absents dans trois réplicons

<i>E. meliloti</i> Rm1021 gènes sur puce		<i>E. meliloti</i> AK23	<i>E. meliloti</i> STM1064
Total= 6028	Les gènes divergents	345 (5,6 %)	510 (8,2 %)
pSymA =1310	pSymA	233 (18 %)	357 (27 %)
pSymB =1603	pSymB	22 (1,3 %)	64 (3,6 %)
Chromosome=3487	Chromosome	90 (2,6 %)	89 (2,6 %)

3. 2. 5 Conclusion:

Dans cette étude, nous avons suivi la répartition de deux partenaires de la symbiose rhizobia / *Medicago* les plus répandus dans notre zone d'étude salée la Sebkha de Misserghin.

Nous avons remarqué dans les dix sites d'échantillonnage que la présence et la dispersion de *M. ciliaris* et *M. polymorpha* suit le gradient de salinité présent naturellement dans ce site avec dominance de *M. polymorpha* dans les zones les plus salées et de *M. ciliaris* dans les zones moins salées et la présence d'une zone intermédiaire où les deux espèces se mélangent dans les mêmes proportions. Nous avons testé la tolérance à la salinité des deux espèces de *Medicago in vitro*. Contrairement aux observations sur le terrain, la croissance des deux espèces est complètement inhibée à 50 mM de NaCl. Ceci pose des interrogations sur leur stratégie d'adaptation pour leur survie dans des zones à salinité élevée dans la nature.

Une des réponses à cette question, est la présence dans ces zones salées de halophytes généralement associées aux *Medicago*. Nous avons remarqué que les légumineuses présentes à l'intérieur des touffes d'halophytes étaient plus robustes que les individus isolés. Plusieurs études ont montré le rôle que jouent ces halophytes dans le dessalement des sites, la fertilisation des sols salins et leur rôle dans la création de micro-habitats favorables pour le développement de plusieurs plantes annuelles dont les *Medicago* (Abdelly, 2006).

Du côté du partenaire microbien, et contrairement à son hôte, la distribution des rhizobia semble moins affectée par la salinité du milieu. Des souches de *E. medicae* sont présentes dans tous les sites, les souches de *Rhizobium* aussi, l'unique souche STM 999 de *Phyllobacterium* est présente dans une zone à salinité moyennes et exception des souches d'*Agrobacterium* qui se retrouvent plus dans les zones à salinité moyenne à légèrement salée.

Nous nous sommes interrogés sur la tolérance à la salinité des rhizobia présents dans différents sites d'échantillonnage et en particulier constater si les souches les plus tolérantes sont celles présentes dans les zones les plus salées.

Pour répondre à cette question, nous avons testé *in-vitro* la tolérance à différentes concentrations de NaCl des 72 souches originaires de l'Algérie. Sur milieu YMA, la tolérance à la salinité de certaines souches peut atteindre 800 mM NaCl alors que sur milieu M9 la tolérance des mêmes souches ne dépasse pas 600 mM NaCl avec ralentissement de la vitesse de croissance. La majorité des souches tolérantes aux concentrations les plus élevées de sel (800 mM) sont originaires de la Sebkhia de Misserghin.

Cependant si on rapporte cette étude sur le terrain et plus particulièrement dans les différentes zones d'échantillonnage de la Sebkhia, nous constatons que les souches les plus tolérantes à la salinité ne sont pas toujours celles présentes dans les sites les plus salées.

Des souches tolérant 800 mM NaCl sont présentes dans tous les sites, notamment dans les zones intermédiaires où la salinité est comprise entre 8,39 et 4,50 mS/cm.

La tolérance à la salinité implique aussi l'expression de plusieurs gènes qui peuvent être identifiés grâce à l'emploi de macro et micro-arrays. Nous avons recherché par la méthode d'hybridation génomique comparative (CGH) sur puces les gènes impliqués dans la tolérance à la salinité de la souche *E. meliloti* STM 1064 en comparant son profil avec ceux de la souche de référence de l'espèce *E. meliloti* Rm 1021 et d'une souche de Russie de la même espèce également tolérante à la salinité. Toutes les souches ont été cultivées sur milieu salé afin de permettre l'expression des gènes impliqués dans la tolérance à la salinité. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une grande divergence de gènes exprimés entre les différentes souches. Les gènes divergents sont principalement portés par le plasmide pSymA. Ces gènes candidats impliqués dans les mécanismes de tolérance à la salinité sont en cours d'identification par l'équipe de Finlande.

Notre objectif était de sélectionner des couples symbiotiques performants en conditions de stress.

Dans le sous chapitre suivant, nous présentons nos résultats concernant les tests en conditions contrôlées, sur support inerte en serre, l'efficacité des différentes souches retenues vis-à-vis de la fixation d'azote et leur infectivité en tubes Gibson (sous chapitre 3.1) et leur tolérance à des concentrations élevées de sel (sous-chapitre 3.2).

Les souches pour ce test appartiennent soit à l'espèce *E. medicae* soit à l'espèce *E. meliloti* ont été sélectionnées sur la base de leur efficacité avec leur plante hôte et leur tolérance à 600 mM NaCl sur milieu M9.

Les souches qui ont donné les résultats les plus satisfaisants en serre ont ensuite été testées au champ dans une zone semi-aride de l'ouest de l'Algérie, afin de suivre leur comportement dans les conditions réelles qui prévalent dans cette zone et leur compétitivité avec les souches locale du sol.

Actualisation de l'Article (Merabet *et al.*, 2006)

Dans ce présent travail, nous avons étudié la distribution des deux partenaires de la symbiose rhizobia et *Medicago* dans une dépression salée de l'Ouest Algérien. Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans ALARM en 2006, l'intégralité de l'article est donnée à la fin de la thèse. Cependant ce travail a été prolongé depuis sa parution dans le journal ALARM nous avons jugé utile d'indiquer ici les données les plus récentes obtenues dans ce quatrième chapitre qui peuvent se résumer comme suit :

- Le séquençage partiel de l'ADNr 16S a été complété pour les représentants de chaque groupe, La souche STM 990 par séquençage total de l'ADNr 16S et le séquençage partiel du *glnA* groupe avec *E. medicae* à 100 % d'homologie de séquence.
- Le séquençage total de la souche STM 999 groupe celle-ci avec une homologie de 100 % avec la nouvelle espèce de *Phyllobacterium ifriqiyense*.

Sélection d'inoculum

3.3 Sélection d'inoculum :

3.3.1 Introduction :

Les régions salées ainsi que les zones arides ont été souvent ignorées et abandonnées car considérées comme terres non productives. Les écosystèmes désertiques se caractérisent par une faible végétation et un manque d'azote dans le sol, cependant la sécheresse et le stress salin sont probablement les facteurs environnementaux les plus importants qui inhibent la croissance des organismes dans les régions arides et semi-arides (Zahran, 1999). La fixation biologique de l'azote est la voie principale pour l'introduction de l'azote dans les écosystèmes désertiques et salées. La fixation biologique dans ces régions est effectuée grâce aux bactéries hétérotrophes, symbiotiques, par les cyanobactéries et les plantes actinorhiziennes et les légumineuses. La contribution des bactéries hétérotrophes libres serait moins importante dans les zones arides (Abdel-Ghafar, 1989 ; Zahran *et al.*, 1995). Les associations symbiotiques fixatrices d'azote adaptées à ces contraintes semblent potentiellement importantes dans l'apport d'azote chez les plantes fourragères dans les zones arides (Wullstein, 1989)

Cependant, dans beaucoup de ces sols, la symbiose rhizobia / légumineuses peut être ineffective, du fait de l'absence de rhizobia spécifiques à la légumineuse ou leur inefficience.

Pour augmenter la production et améliorer la croissance des légumineuses d'intérêt sans apport d'engrais chimiques ou autres fertilisants, il est souvent nécessaire d'inoculer les légumineuses avec des souches de rhizobia compatibles et en nombre suffisant pour l'établissement de la symbiose. Le nombre de rhizobia présents dans le sol avant l'inoculation influence la concentration de l'inoculum nécessaire. Meade *et al.* (1985) ont montré que des souches de *R. leguminosarum* inoculées avec des concentrations de 4×10^7 UFC/ml sont compétitives avec des souches de la même espèce locales présentes à une concentration de 3×10^4 rhizobia/g dans ce sol. Les souches de *R. leguminosarum* inoculées se retrouvent à cette concentration dans 73 % des nodules de petits pois.

Il est également important de sélectionner pour les légumineuses des zones sous stress des partenaires microbiens tolérant à la sécheresse et à la salinité qui permettent une symbiose efficace dans ces contraintes pédoclimatiques.

Les souches destinées à l'inoculation devront donc répondre à plusieurs critères mais leur pouvoir infectif et leur efficacité vis-à-vis de la ou les légumineuse (s) cible(s), restent premiers.

Ce sont ces caractères que nous allons tester dans ce chapitre en serre puis en grandeur nature, pour la sélection des meilleures souches inoculum pour les régions salées et arides.

Nous avons sélectionné trois souches de *E. medicae* et deux souches de *E. meliloti*, efficaces avec leur plante hôte et tolérantes à 600 mM de NaCl en milieu M9. Ces souches seront testées dans une première étape sur support inerte en serre en conditions contrôlées et les souches les plus performantes en serre seront testées en conditions naturelles au champ.

3. 3. 2 Test en Serre :

Nous avons testé l'infectivité et l'efficacité de trois souches de *Ensifer medicae* (STM 990, STM 994, STM 1003) d'Algérie et de huit souches de *Ensifer meliloti* dont deux souches d'Algérie (STM 1064 et STM 1062), une souche de référence de *E. meliloti* (ORS 634) et cinq souches commerciales de la compagnie de production d'inoculum Nitragin, USA (STM 2350, STM 2354, STM 2349, STM 2349 et STM 2348). Ces souches ont été testées sur deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*) majoritaires dans la Sebkhia de Misserghin. L'inoculation a été évaluée par comparaison avec un témoin non inoculé.

Les essais ont été conduits dans une serre réglée aux conditions climatiques méditerranéennes avec des répétitions de 10 plants/souche pour *M. polymorpha* et 8 plants/souche pour *M. ciliaris*.

Après six semaines de culture en serre, nous avons mesuré la longueur des tiges de chaque plante, estimé la quantité d'azote fixée par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de trois plantes/souche et comparé les poids secs des parties aériennes de toutes les plantes. L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée à l'aide du logiciel Superanova et présentée dans le tableau (12) et annexe (3).

3. 3. 2. 1 Analyse du phénotype des plants inoculés :

Comparés aux plantes témoins, les plantes inoculées sont plus vertes, présentent un tallage plus développé (figure 43). On constate de plus un effet souche. Les plantes inoculées avec des

souches de *E. medicae* présentent une meilleure croissance comparées aux plantes inoculées avec des souches de *E. meliloti* (figure 44).

3. 3. 2. 2 Comparaison des poids secs des parties aériennes et mesure de l'ARA :

L'analyse de variance effectuée sur de nombreux paramètres de croissance confirme les observations visuelles.

L'effet de l'inoculation et l'effet souche sont significatifs selon le test de Newman & Keuls $P < 0,05$.

Les deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*) inoculées ont une meilleure croissance que le témoin non inoculé et ceci est confirmé par la mesure du poids sec des parties aériennes. Le poids sec des parties aériennes de *Medicago ciliaris* inoculé avec *E. medicae* STM 994 (1,190 g) est deux fois supérieur à celui du témoin (0,443 g) et de la même plante inoculée avec *E. meliloti* STM 1064 (0,566 g) (figure 45b). Ces résultats montrent que *Medicago ciliaris* répond mieux aux inoculations avec les souches de *E. medicae*. Les résultats de mesure de l'ARA vont dans le même sens (figure 45c). Ainsi *M. ciliaris* inoculé avec *E. medicae* STM 990 fixe environ sept fois plus que la même plante inoculée avec *E. meliloti* STM 1064.

L'effet de l'inoculation sur la croissance de *M. polymorpha* est aussi manifeste que pour *M. ciliaris* avec également une meilleure réponse à l'inoculation avec des souches de *E. medicae* (figure 46, a, b, c), ce qui est tout à fait en accord avec les observations de Rome *et al.* (1996) et Brunel *et al.* (1996).

Tableau 12 : Effet de l'inoculation sur la croissance (hauteur des tiges, poids sec des parties aériennes et racinaires) de *Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha* cultivés en serre pendant 6 semaines et estimation de l'efficacité des souches par mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA).

	Souches	<i>Medicago ciliaris</i> (8 répétitions)						<i>Medicago polymorpha</i> (10 répétitions)					
		(1) Nombre de plants nodulés/ nombre de plants inoculés.	(2, 3) Nombre de nodules/ plante	(2, 3) Poids sec des racines + nodules (g)	Poids sec des parties aériennes (g)	Hauteur des tiges (mm)	(3, 4) ARA (µmoles/heure/plant)	(1) Nombre de plants nodulés/ nombre de plants inoculés.	(2, 3) Nombre de nodules/ plante	(2, 3) Poids sec des racines + nodules (g)	Poids sec des parties aériennes (g)	Hauteur des tiges (mm)	(3, 4) ARA (µmoles/heure/plant)
<i>Ensifer medicae</i>	STM 994	08/08	276,667 +/- 64,893	0,303 +/-0,034	1.190 +/-0,096	338,13 +/-13,159	5,172 +/-0,786a	10/10	97,3 +/- 6,9	0,349 +/-0,029	1,258 +/-0,098	403,00 +/-5,385	4,953 +/- 0,324 a
	STM 990	08/08	163,333 +/- 18,559	0,287 +/-0,028	1.101 +/-0,087	318,13 +/-8,288	4,046 +/-0,401a	10/10	116,0 +/- 6,7	0,308 +/-0,023	0,954 +/- 0,062	372,00 +/- ,717	3,686 +/- 0,554 a
	STM 1003	03/08	1,333 +/- 0,667	0,199 +/-0,016	0,450 +/-0,034	281,25 +/-17,054	0,325 +/- 0,171b	02/10	1,7 +/- 1,2	0,219 +/-0,08	0,318 +/-0,014	318,5 +/- 6,585	1,126 +/- 0,578 b
<i>Ensifer meliloti</i>	STM 1064	08/08	ND	0,188 +/-0,016	0,566 +/-0,031	272,50 +/-16,744	0,585 +/- 0,342b	10/10	ND	0,158 +/-0,09	0,289 +/-0,011	335,00 +/-8,028	0
	STM 1062	01/08	0,333 +/- 0,333	0,226 +/-0,020	0,460 +/-0,040	341,88 +/-17,059	0,031 +/- 0,031b	10/10	ND+ NPL	0,215 +/- 0,012	0,289 +/-0,028	309,500 +/-,845	0,638 +/- 0,582 b
	ORS 634	08/08	ND	0,243 +/-0,011	0,599 +/-0,021	315,00 +/-21,527	0,119 +/-0,077b	01/10	0,7 +/- 0,7	0,207 +/-0,06	0,360 +/- 0,053	312,00 +/- 7,717	0,084 +/- 0,084 b
	STM 2348	08/08	ND	0,186 +/-0,018	0,551 +/-0,024	338,75 +/-18,559	0	10/10	ND	0,232 +/-0,010	0,343 +/- 0,012	351,00 +/-8,459	0
	STM 2349	08/08	ND	0,195 +/-0,008	0,356 +/- 0,014	306,250 +/- 21,459	0,029 +/- 0,008	09/10	ND	0,239 +/- 0,012	0,309 +/- 0,015	298,889 +/-,235	0,012 +/-0,007
	STM 2347	05/08	ND	0,207 +/-0,018	0,353 +/-0,016	358,75 +/-20,039	0,0075 +/- 0,007	10/10	ND	0,251 +/- 0,019	0,324 +/-0,024	314,00 +/-3,679	0
	STM 2354	07/08	ND	0,210 +/-0,013	0,476 +/- 0,034	383,750 +/- 19,267	0	09/10	ND	0,300 +/- 0,015	0,329 +/- 0,015	236,20 +/-3,809	0,042 +/-0,010
	STM 2350	08/08	ND	0,228 +/-0,015	0,442 +/- 0,040	316,250 +/- 17,621	0,025 +/- 0,017	10/10	ND	0,265 +/- 0,009	0,302 +/- 0,013	252,778 +/-0,401	0,020 +/-0,013
	Témoin	00/08	00	0,20 +/-0,016	0,443 +/-0,044	266,43 +/-20,549	-	00/10	00	0,235 +/-0,09	0,275 +/-0,012	262,500 +/- ,738	-

(1) : Rapport nombre de plantes nodulées sur plants inoculés

(2)ND: nombre indéterminé (n > 500 nodules/plant)

(3) : Les moyennes +/- erreur standard ont été calculées à raison de 3 répétitions par souche.

(4) : Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de classement des microorganismes de Newman & Keuls à P=0.05

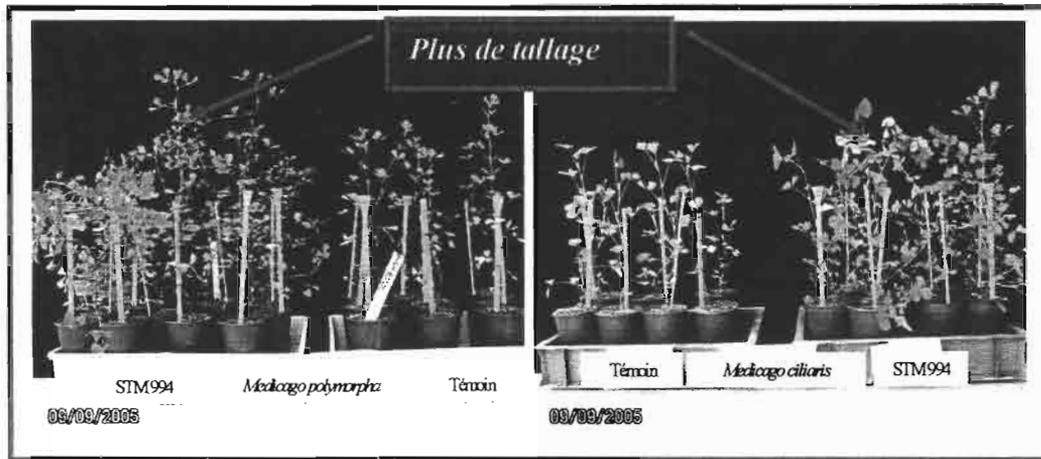


Figure 43 : Effet de l'inoculation avec la souche *Ensifer medicae* STM 994 sur la croissance de deux espèces de *Medicago* (*Medicago ciliaris* et *Medicago polymorpha*) en comparaison avec un témoin non inoculé

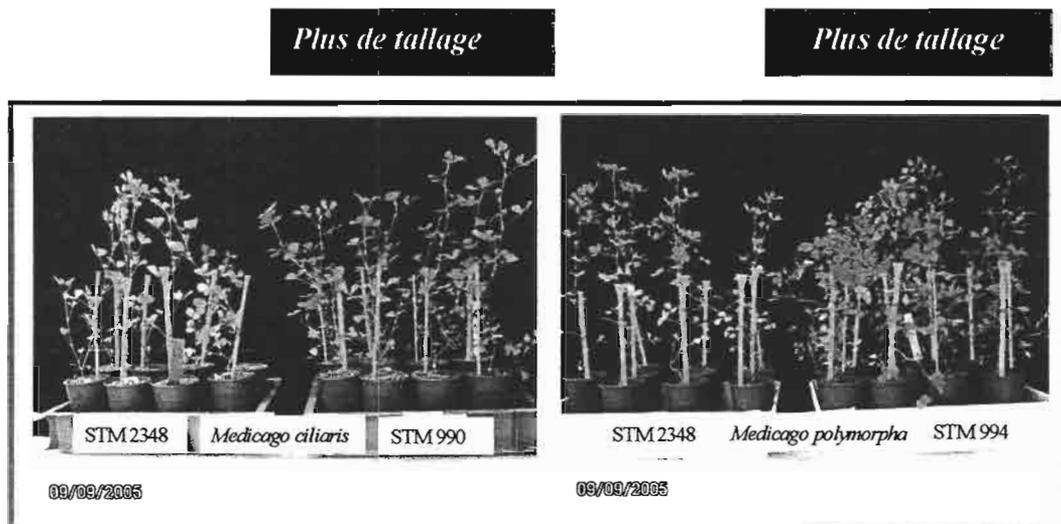


Figure 44 : Effet de l'inoculation avec une souche de *Ensifer medicae* (STM 990, STM 994) et une souche Nitragin de *Ensifer meliloti* STM 2348 sur la croissance de deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*).

Les tests d'inoculation sur *M. ciliaris* et *M. polymorpha* montrent que l'inoculation est plus efficace avec des souches de *E. medicae* (STM 994, STM 990 et STM 1003).

Dans la littérature, les deux espèces de *Ensifer* : *E. medicae* et *E. meliloti* sont très proches phylogénétiquement avec une homologie de séquence ADNr 16S de 99,7 % (Rome *et al.*, 1996) mais la différence est plus marquée dans leur spectre d'hôte. Ainsi *E. meliloti* est caractérisée par un spectre d'hôte plus restreint que celui de *E. medicae*, cette dernière est connue pour former une symbiose efficace avec *Medicago polymorpha* (Provorov, 1994 ; Rome, 1996) contrairement à l'espèce *E. meliloti* qui forme sur la même plante des nodules rudimentaires et inefficients (Brunel *et al.*, 1996 ; Rome *et al.*, 1996).

Nous avons remarqué également que la fixation de l'azote peut être considérable même avec la formation de peu de nodules. C'est le cas de *E. medicae* STM 1003 qui forme juste quelques nodules polylobés (figure 47) sur *M. polymorpha* mais qui fixe une quantité d'azote estimée à 1, 126 μ moles/heure/plant.

Les souches commerciales Nitragin se sont avérées nettement moins efficaces que celles d'Algérie selon l'analyse statistique de variance du poids sec des parties aériennes et de l'ARA et qui donne des valeurs non significatives par le test de Newman-Keuls $P > 0,05$.

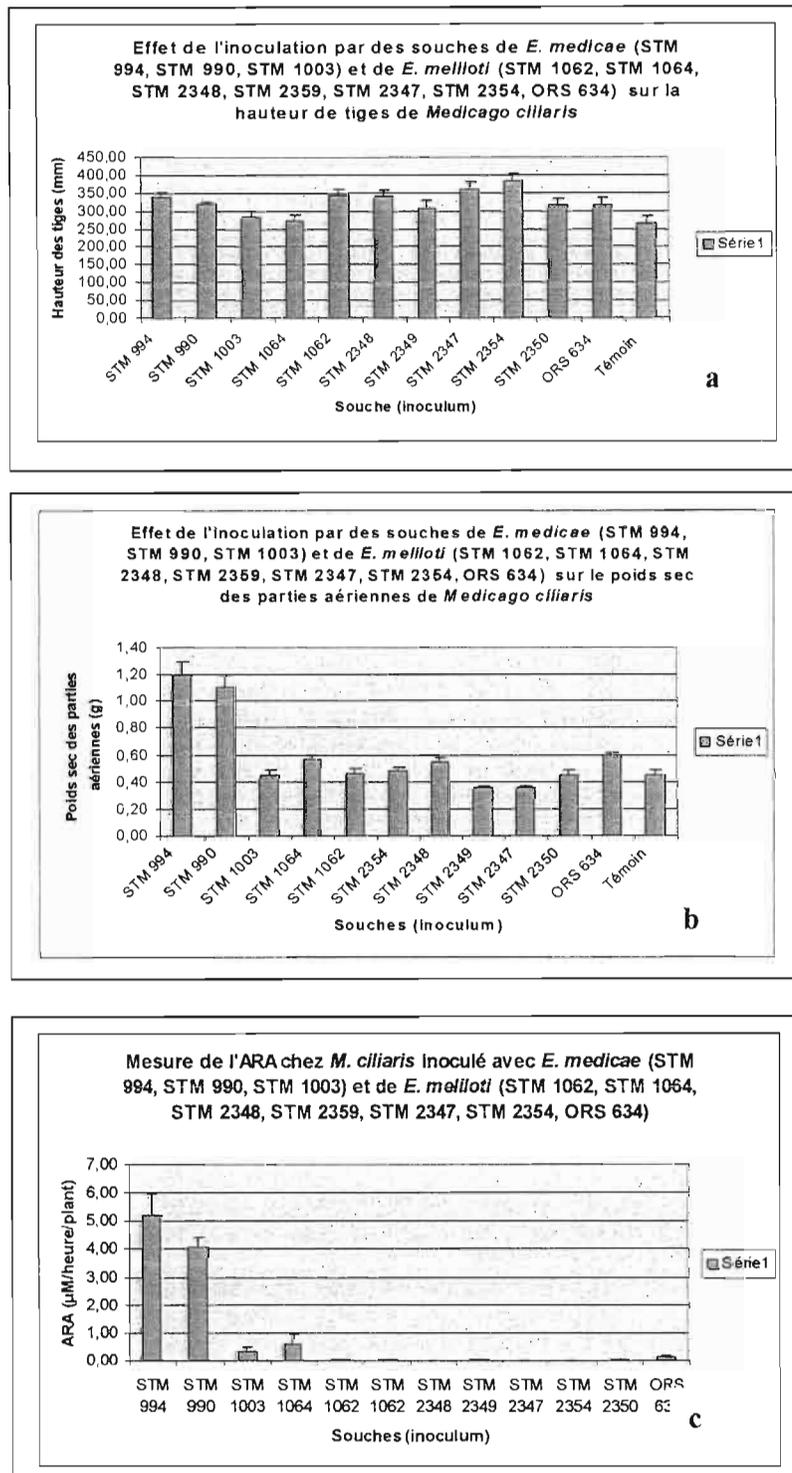


Figure 45 : Effet de l'inoculation sur la croissance de *M. ciliaris* inoculé avec des souches de *E. medicae* (STM 994, STM 990, STM 1003) et *E. melloti* (STM 1064, STM 1062, ORS 634, STM 2347, STM 2348, STM 2350, STM 2354).

a) Hauteur des tiges b) Poids sec des parties aériennes c) Mesure de l'ARA.

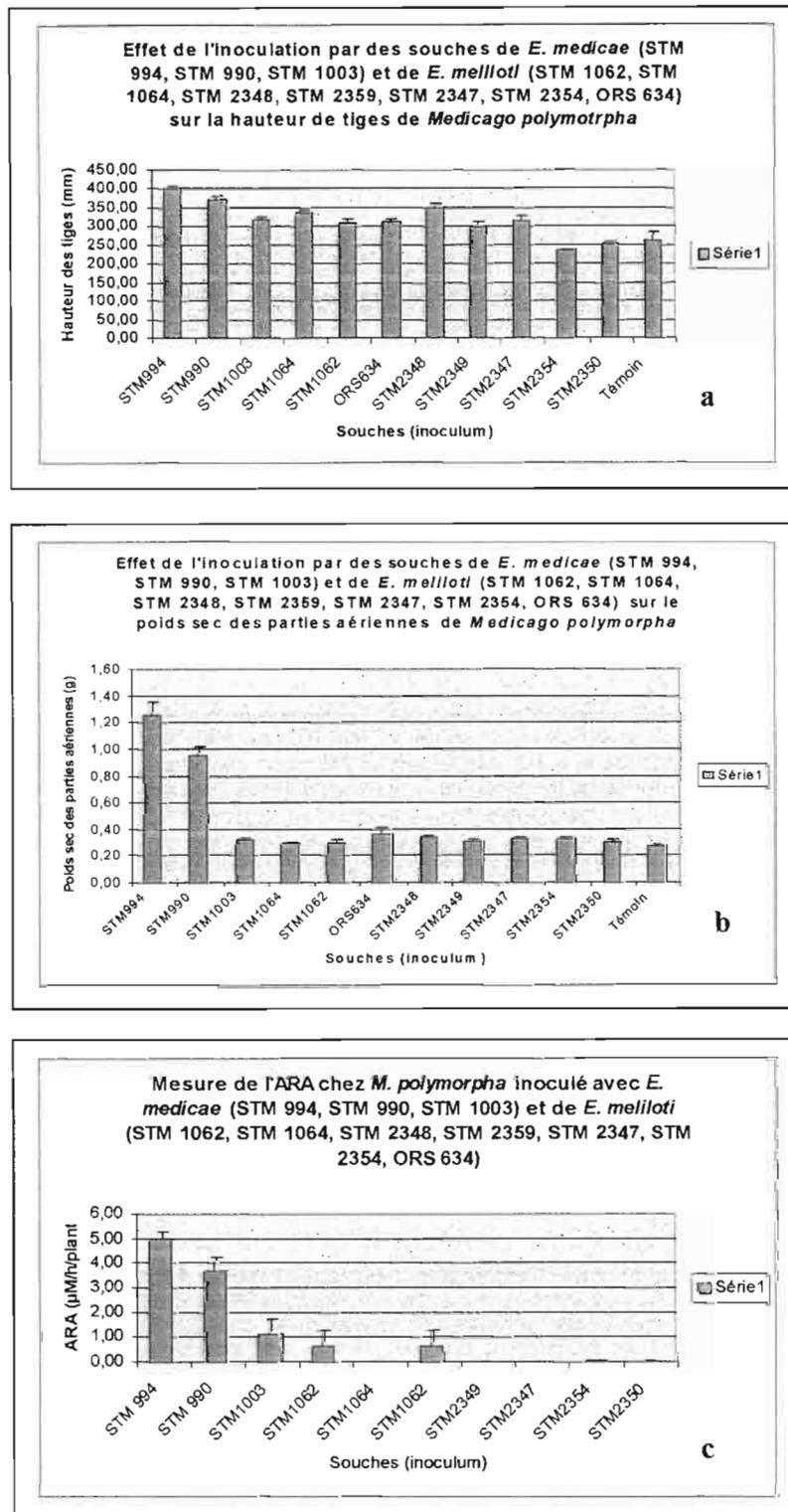


Figure 46 : Effet de l'inoculation sur la croissance de *Medicago polymorpha* inoculés avec des souches de *E. medicae* (STM 994, STM 990, STM 1003) et *E. melliloti* (STM 1064, STM 1062, ORS 634, STM 2347, STM 2348, STM 2350, STM 2354).

a) Hauteur des tige b) Poids sec des parties aériennes c) Mesure de l'ARA.

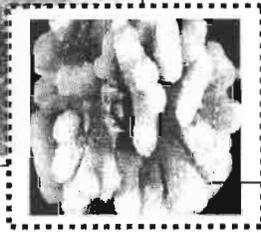


Figure 47 : Aspect des nodules obtenus sur *Medicago polymorpha* inoculée en serre par la souche *E. medicae* STM 1003.

→ nodule polylobé.

L'inoculation des plantules de *M. ciliaris* avec des souches de *E. medicae* et *E. meliloti* a induit un effet significatif sur la croissance des deux plantes et une bonne fixation de l'azote estimée par la mesure de l'ARA, notamment avec les souches STM 994, STM 990 et un peu moins important avec STM 1064.

En ce qui concerne *M. polymorpha* l'inoculation avec les souches de *E. medicae* STM 990, STM 994 et STM 1003 améliore la croissance, estimée par le poids sec des parties aériennes.

Un effet faible de l'inoculation a été néanmoins observé avec la souche de *E. meliloti* STM 1062. Dans la littérature, la légumineuse *M. polymorpha* est connue pour être spécifique de *E. medicae* avec lequel elle forme une symbiose effective contrairement à sa symbiose avec *E. meliloti* (Rome *et al.*, 1996).

L'objectif suivant est de tester l'inféctivité et l'efficacité des meilleures souches sélectionnées en serre et de tester leur compétitivité avec les souches autochtones présentes dans le sol et nécessaires à leur utilisation comme inoculum.

3. 3. 3 Essais au Champ :

Pour les tests au champ, deux souches de *Ensifer medicae* (STM 990 et STM 994) ont été choisies et nous avons préféré pour la comparaison, remplacer la souche STM 1003 de *E.*

medicae par la souche STM 1064 de *E. meliloti* moins effective que la STM 1003 mais appartenant à une autre espèce pour la comparaison. Ces souches ont été testées avec *M. sativa* (les souches sélectionnées sont effectives avec *M. ciliaris*, *M. polymorpha* et *M. sativa* par tests en tubes Gibson en conditions contrôlées).

Nous avons utilisé dans cet essai la luzerne *Medicago sativa* dont nous avons pu nous approvisionner en graines dans le commerce et pour laquelle nous avons accès à une collection de cultivars de la région semi-aride qui nous a été gracieusement offerte par Mr Aouissat M (I.T.ELV.).

Pour les deux autres espèces de medics (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*), nous ne disposions pas d'assez de graines des deux espèces pour lancer les essais au champ. Il est utile de rappeler que la luzerne (*M. sativa*) est la première légumineuse fourragère utilisée dans le monde. Elle joue un rôle important dans l'alimentation des ruminants et des chevaux et peut être utilisée comme foin en fourrage stocké (Prosperi *et al.*, 1995).

Remarque : les essais au champ devaient être réalisés dans la Sebkhah de Misserghin, cependant faute de moyens nous avons transféré ce test dans la région semi-aride de Saida et utilisé les graines de *Medicago sativa* locales de la région disponibles et comparé avec une variété de Tunisie.

3. 3. 3. 1 Présentation de la zone d'étude :

La zone d'étude se situe dans la ferme de démonstration de l'institut technique des élevages (I.T. ELV.) à vocation « intégration céréales, légumineuses fourragères, élevage).

La ferme se situe dans la commune de HAIN EL HADJAR à une altitude de 1015 m à l'ouest de la Daïra de HAIN EL HADJAR et à 10 Km de la Wilaya de Saïda dans l'ouest algérien.

Des analyses physico-chimiques du sol de la région ont été effectuées avant de lancer notre expérimentation. Les résultats de ces analyses nous ont été fournis par Mr Aouissat et Mlle Fares avant le semis. Des analyses de sol après semis et récolte ont également été réalisées.

3. 3. 3. 2 Analyses du sol avant le semis :

Les analyses pédologiques et physico-chimiques (tableau 13, 14) d'un sol donné sont très importantes dans un but cartographique afin de renseigner sur son aptitude à recevoir tel ou tel mode de culture ou de reboisement. Ces analyses permettent d'un autre côté d'apprécier la fertilité naturelle d'un sol, d'expliquer les déficiences de rendements et d'orienter vers le choix des cultures (Soltner, 2005).

a) Caractéristiques pédologiques du sol de la ferme expérimentale :

Dans la ferme expérimentale où se trouve la parcelle d'essai, le type de sol est Argilo limoneux avec une profondeur de 50 cm par endroits et occupent en moyenne 60 % de la S. A. U.

a.1) Analyse physique :

Tableau 13 : Analyses granulométriques de sol

Texture du sol	Pourcentage dans le sol
Sables grossiers	01.08 %
Sables fins	15.93 %
Limons grossiers	15.99 %
Limons fins	25.00 %
Argile	42.00 %

Résultats d'analyses laboratoire I.T.G.C Tiaret (2005)

Le pH eau du sol est de 8,5. Ce pH indique que le sol est alcalin et donc il convient à la culture irriguée de la luzerne qui tolère des pH de sol entre 7 et 9 avec irrigation. Cheng *et al.* (2002) indiquent que *M. sativa* forme peu de nodules lorsqu'elle est cultivée sur sol acide et les nodules apparaissent bien plus tard qu'à pH 7. le pH du sol affecte également la survie des rhizobia, partenaire de *M. sativa* et diminue leur survie notamment dans les systèmes à plantes pérennes (Ballard *et al.*, 2003).

b) Caractéristiques agronomiques du sol :

- Sols moyennement calcaires (taux de calcaire actif tolérable pour les céréales)
- Sur le plan de la fertilité, sols à teneur faible en matière organique, suffisamment pourvus en azote total et très pauvres en phosphore assimilable.
- Ce type de sol permettra une croissance de la luzerne et l'application de l'inoculation.

b.1) Analyses chimiques

Tableau 14 : Composition du sol de la zone d'essai à Saida

Substrat	Pourcentage dans le sol
Carbone organique	0.95 %
Matière organique	1.64 %
Azote total	1.16 %
Phosphore assimilable (en ppm)	2.00 %
Calcaire total	25.00 %
Calcaire actif	10.00 %

Résultats d'analyses laboratoire I.T.G.C Tiaret année (2005)

c) Caractéristiques climatiques:

Les caractéristiques climatiques enregistrées dans la région entre les mois de septembre 2005 et de mars 2006 sont les suivantes :

- **Vents** : surtout ceux du Sud (Sirocco) avec des fréquences à craindre à partir du mois d'avril entraînant respiration et transpiration intense du feuillage avec des influences thermiques sur les sols (dessèchement)
- **Gelées** : des températures de l'ordre de -5°C à -10°C en moyenne sont à craindre avec des risques de gelées importantes en hiver et printemps (jusqu'au mois de mai) étant donné l'altitude de **1015 m**
- **Pluviométrie** : la moyenne annuelle enregistrée sur une période de 20 ans est de **351.73 mm** ; mais la répartition est très irrégulière.

c.1) Caractéristiques climatiques de la campagne 2005-2006 :

- **Pluviométrie** (précipitations enregistrées 2005-2006 jusqu'à février)

	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mars
Moyenne mensuelle	33.7	37.7	60.6	68.5	16.0	42.6	-
Nbre de jours de pluie	07	09	10	05	04	08	-
Répartition par Saison (mm)	Automne : 132 mm			Hiver : 127.1 mm			-

- **Températures :**

	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mars
Temp Min (°C)	08.6	06.4	0.1	-12.0	-15.0	-13.2	-
Temp Max (°C)	38.4	33.7	23.3	20.4	20.2	18.4	-
Sirocco Nbre de Jours	04	08	-	-	-	-	-

Les températures négatives ont été importantes en Dec. Jan. Fev. avec un maximum de (-15°C)

- **Gelées et neige :**

	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mars
Nbre de jours de neige	-	-	-	03	02	02	-
Nbre de jours de gelées	-	05	12	07	26	25	-

Durant la période décembre à février nous avons relevé 58 jours de gelées

Il a été remarqué que les gelées ont affecté la couche du sol jusqu'à une profondeur de 3 à 4 cm ; où il est apparu un glaçage de cette profondeur pendant la nuit, c'est pour cette raison que nous avons décidé de lancer les essais en saison printanière (la luzerne est une plante qu'on peut cultiver deux fois par an en automne et au printemps) où le climat devient plus doux, absence de périodes de gelées et températures plus élevées.

3. 3. 3 Mise en place de l'essai :

Durant le printemps une parcelle d'environ 900 mètres carrés (30 m x 30 m) a été préparée et clôturée pour la mise en place des essais. Le champ choisi est homogène, d'où la non nécessité d'établir des blocs d'essai à différents endroits. Des tentatives de culture de céréales ont été effectuées dans cette parcelle et n'ont pas donné de bons rendements. D'où l'idée d'introduire dans cette parcelle une légumineuse qui va enrichir le sol en azote organique et refaire un essai de culture de céréales après plusieurs coupes de la récolte de la légumineuse. Les systèmes Blé / *Medicago* ont été développées depuis longtemps dans le monde afin d'exploiter les jachères et augmenter la production de fourrage. Notamment en Australie du sud où les couples céréales / *Medicago* ont été cultivées sur sols alcalins et céréales / *Trifolium* sur sols acides ont permis à ce pays de figurer parmi les premiers exportateurs de laine de viande et même de céréales (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Berrekia, 1987). En conditions climatiques difficiles la première coupe de la luzerne peut être ensilée (Prosperi *et al.*, 1995). Les carrés de 1 m x 1 m ont été préparés avec des espacements de plus de 2 m entre les différents inoculums. Un essai avec urée et un témoin négatif non inoculé ont été préparés et éloignés des autres blocs inoculés.

Nous avons testé nos souches avec deux variétés de *Medicago sativa*. Cette espèce de *Medicago* est réputée nodulée par les deux espèces de *Ensifer* (*E. meliloti* et *E. medicae*) (Béna, 1998) auxquelles appartiennent nos souches. Deux lots de graines ont été testés, les graines provenant d'une région aride de Tunisie et l'autre acquis localement, spécifique des régions semi-arides.

L'itinéraire technique a été bien maîtrisé pour nous épargner toutes contraintes par :

- Léger arrosage avant le semis
- Semis et inoculation par puits.
- Recouvrement léger avec de la terre légèrement mouillée.
- Légère irrigation pour chasser l'air des puits et pour un meilleur contact des graines inoculées avec le sol ; ceci a eu lieu le 16 mars 2006.

La première irrigation a eu lieu légèrement 03 jours après le semis afin d'éviter l'infiltration des inoculums à savoir le 19 mars au soir. Puis des irrigations avec un intervalle de 02 à 03 jours à savoir :

- le 23 / 25 / 27 / 30 mars 2006

Les premières observations de germination ont eu lieu le 30 mars 2006 (figure 48).

Début levée 25 % Graines locales	Début levée 26 % Graines locales	Début levée 30 % Graines locales	Aucune levée	Début levée 28 % Graines locales
STM 990	STM 994	STM 1064	Témoin + Urée	Témoin sans Urée
Début levée 28 % Graines Tunisie	Début levée 24 % Graines Tunisie	Début levée 24 % Graines Tunisie	Aucune levée	Début levée 20 % Graines Tunisie

Figure 48 : Premiers résultats de la levée après 14 jours du semis

Dans la figure (48), on note une germination des deux variétés de graines (d'Algérie et de Tunisie) à des proportions presque équivalentes mais qui reste relativement faible étant toutes inférieures à 50 % sauf dans les deux carrés additionnés d'Urée où aucune levée n'a été observée après 14 jours de la date du semis.

La croissance des jeunes plants était faible durant le mois de mars et avril, ceci étant dû probablement à la faible pluviométrie ; cependant ce retard de croissance a été ensuite compensé grâce aux pluies survenues vers la fin du mois d'avril et au cours du mois de mai.

3. 3. 3. 4 Mesure du poids sec des parties aériennes des plantes inoculées:

Les plantes ont été récoltées neuf semaines après le semis. La croissance a été estimée par mesure du poids sec des parties aériennes des échantillons inoculés et du témoin.

L'échantillonnage a été réalisé d'une manière aléatoire à raison de 10 plantes / bloc.

L'analyse de variance à deux facteurs montre un effet très significatif ($P < 0,01$) du facteur variété de *Medicago sativa*, et un effet significatif du facteur souche ($P < 0,05$), mais pas d'effet de l'interaction entre les deux facteurs.

La variété *Medicago sativa* de Tunisie présente une meilleure croissance que celle d'Algérie (figure 49), et les deux variétés inoculées présentent une meilleure croissance que le témoin non inoculé.

On observe également un effet souche sur le développement des variétés de *Medicago*. Le classement de moyenne de Newman & Keuls montre que les souches STM 990 et STM 1064 augmentent de manière significative le poids sec des parties aériennes des deux variétés de *Medicago*, supérieure à celui de la souche STM 994 (figure 50)

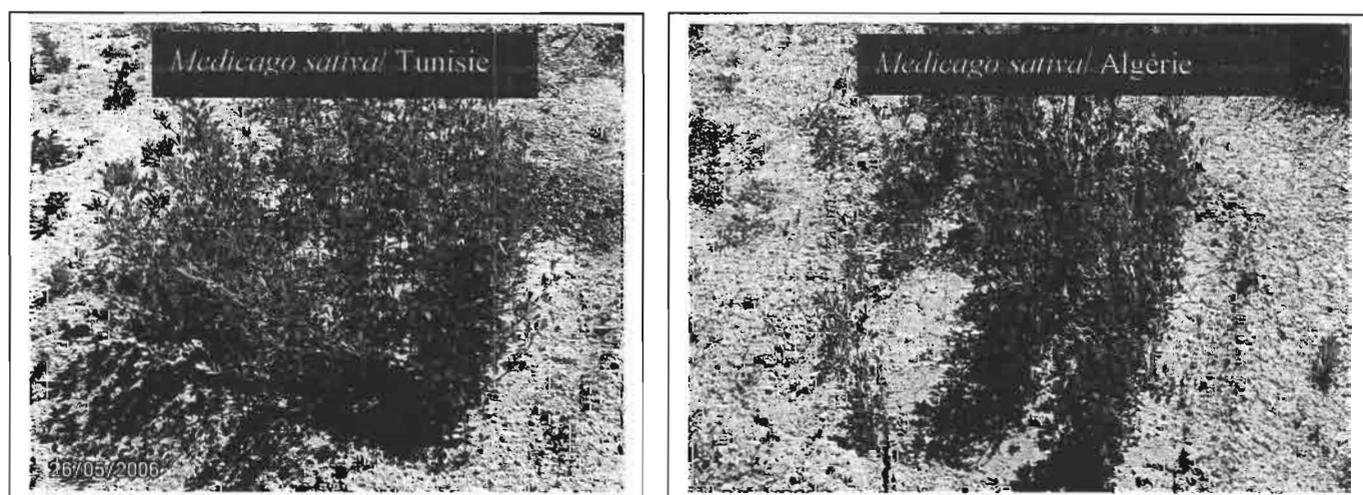


Figure 49 : *Medicago sativa* (variété d'Algérie et de Tunisie) inoculé avec la souche STM 994 de *E. medicae*

Les résultats obtenus au champ montrent qu'il est important que la souche sélectionnée en conditions contrôlées en serre et qui présentait de bonnes caractéristiques symbiotiques puisse conserver ces propriétés une fois introduite dans le sol en plus de son pouvoir compétitive vis-à-vis des souches indigènes.

Dans notre essai, nous avons remarqué que les souches de *E. medicae* étaient plus efficaces avec les deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*) en serre sous

conditions contrôlées et sur support inerte que les souches de *E. meliloti* qui présentaient également des propriétés d'infectivité et d'effectivité importantes mais inférieures à celles de *E. medicae*.

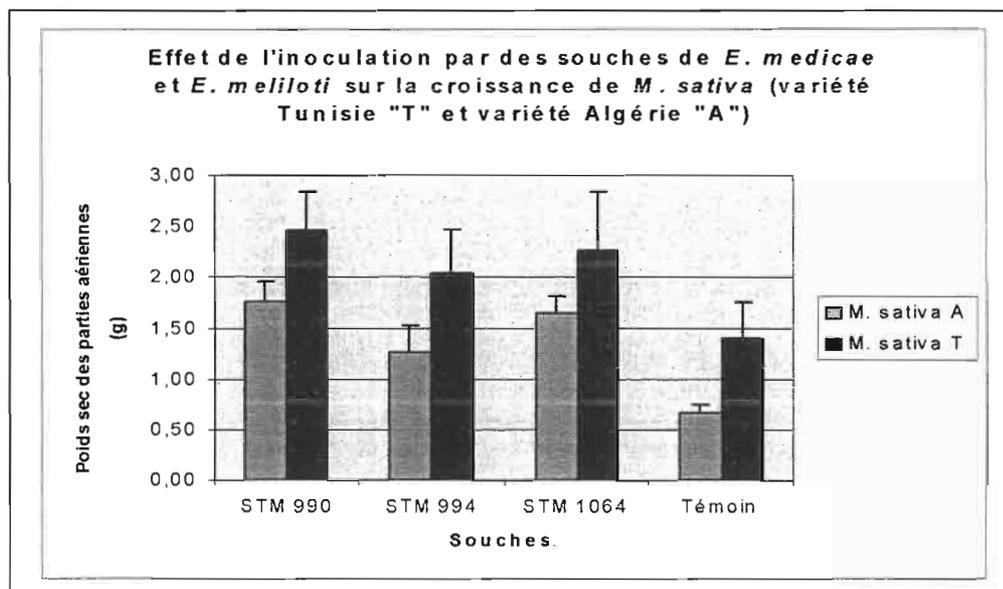


Figure 50 : Effet de l'inoculation par *E. meliloti* STM 1064 et *E. medicae* (STM 990 et STM 994) sur la croissance de deux variétés de *Medicago sativa* (Algérie et Tunisie).

Pour les essais au champ nous avons choisi les deux meilleures souches de *E. medicae* (STM 990, STM 994) et nous les avons comparé à une souche de *E. meliloti* STM 1064, en vraie grandeur.

Les analyses statistiques sur 10 plantes / souche montrent un effet souche et variété significatifs selon le test de Newman-Keuls (annexe 4).

La variété de Tunisie présente en moyenne un poids sec supérieur à celui d'Algérie. Les valeurs sont respectivement 2,039 g +/- 0,223 pour *Medicago sativa* de Tunisie et 1,319 g +/- 0,120 pour *Medicago sativa* d'Algérie.

L'effet souche est également visible. Les trois inoculums testés augmentent considérablement le poids sec des plantes comparé au témoin non inoculé (tableau 15) chez les deux variétés. Ainsi la souche STM 990 augmente environ de deux fois le poids sec des parties aériennes des deux variétés, locale et Tunisienne de *Medicago sativa* comparé aux deux

témoins. Les deux autres inoculums, la souche *E. medicae* STM 994 et *E. meliloti* STM 1064 sont également effectifs mais inférieurs à la souche STM 990 (tableau 15, figure 50).

Il est important que les inoculums utilisés gardent leur niveau d'efficacité au champ et être compétitives vis-à-vis des souches indigènes. Le critère de compétitivité des souches est très important lors de l'introduction d'inoculum notamment dans des champs où la légumineuse étaient déjà présente et où il y a possibilité de présence de souches indigènes même à faible efficacité mais spécifiques de la légumineuse. Plusieurs souches très efficaces se sont avérées peu compétitives au champ et l'inoculation n'a pas augmenté la production de la légumineuse cible (Erker et Brick, 2006, <http://www.ext.colostate.edu/Pubs/crops/00305.html>)

Les souches STM 990, STM 994 et STM 1064 sélectionnées en serre et testées au champ ont prouvé leur efficacité et compétitivité et elles sont considérées comme de bonnes candidates pour les inoculations de plus grandes surfaces.

Cependant, il est impératif avant de les introduire au sol, qu'elles répondent à d'autres critères nécessaires à leur utilisation comme inoculum, notamment leur survie aux étapes de préparation et de conservation de l'inoculum.

Ces souches sélectionnées sont :

- ❖ Les souches *E. medicae* STM990 et STM 994 peuvent être associées à trois espèces de *Medicago* (*M. ciliaris*, *M. polymorpha* et *M. sativa*)
- ❖ La souche *E. meliloti* STM 1064 peut être associée à deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. sativa*).

Tableau 15 : Etude statistique sur l'effet de l'inoculation avec des souches de *E. medicae* (souche 1 : STM 990, souche 2 : STM 994) et une souche de *E. meliloti* (souche 3 : STM 1064) sur la croissance de deux variétés de *Medicago sativa* (cultivar d'Algérie et cultivar de Tunisie).

Means Table				
Effect: Variété * Souche				
Dependent: PS p.a. (g)				
	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
M.sativa Algérie, Souche 1	10	1,741	,698	,221
M.sativa Algérie, Souche 2	10	1,248	,897	,284
M.sativa Algérie, Souche 3	10	1,634	,581	,184
M.sativa Algérie, Témoin	10	,654	,283	,089
M.sativa Tunis, Souche 1	10	2,459	1,217	,385
M.sativa Tunis, Souche 2	10	2,037	1,383	,437
M.sativa Tunis, Souche 3	10	2,265	1,803	,570
M.sativa Tunis, Témoin	10	1,394	1,110	,351

3. 3. 3. 5 Analyse du sol après semis et la première récolte :

Nous avons effectué des analyses physico-chimiques du sol des différents blocs d'essai après la première récolte et comparé avec les analyses effectuées avant le semis.

Les résultats sont regroupés dans le tableau (16).

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les blocs après cette première coupe. Les valeurs de la conductivité électrique indiquent que le sol n'est pas salé.

Tableau 16 : Analyses du sol des différents blocs (inoculé et témoin) après la première récolte de *Medicago sativa*.

		Blocs d'essai x inoculum bactérien							
		Bloc 1 : <i>Medicago sativa</i> de Tunisie	Bloc 2 : <i>Medicago sativa</i> d'Algérie	Bloc 3 : <i>Medicago sativa</i> de Tunisie	Bloc 4 : <i>Medicago sativa</i> d'Algérie	Bloc 5 : <i>Medicago sativa</i> de Tunisie	Bloc 6 : <i>Medicago sativa</i> d'Algérie	Bloc 7 : Témoin <i>Medicago sativa</i> de Tunisie	Bloc 8 : Témoin <i>Medicago sativa</i> d'Algérie
		X STM 990		X STM 994		X STM 1064		Sans Urée et sans inoculation	
pH- Calcimétrie	pH eau	8.59	8.54	8.54	8.59	8.55	8.64	8.72	8.52
Matière Organique	Matière organique%	1.71	1.77	1.71	1.67	1.67	1.69	1.65	1.70
	Carbone organique%	0.99	1.03	0.99	0.97	0.97	0.98	0.95	0.99
	Azote total%	1.02	1.09	1.07	1.13	1.02	1.06	1.00	1.06
	C/N	9.67	9.44	9.28	8.59	9.51	9.28	9.58	9.34
Phosphore (exprimé en P)	Phosphore assimilable Olsen mg/Kg	29.16	29.00	26.74	25.50	22.26	20.66	24.90	24.65
Complexe d'échange- Acidité	Complexe d'échange Acétate								
	Ca écha me/100g	38.30	38.77	38.93	38.87	39.00	40.33	38.36	40.01
	Mg écha me/100g	3.07	2.59	2.08	2.58	2.70	2.76	3.10	2.76
	K écha me/100g	1.10	1.11	1.08	1.06	1.05	1.09	1.22	1.31
	Na écha me/100g	0.69	0.87	0.77	1.05	0.93	0.98	0.54	1.04
	Somme me/100g	43.16	43.34	42.86	43.56	43.68	45.17	43.22	45.12
	CEC me/100g	13.99	13.62	13.11	14.40	13.55	14.79	13.89	15.70
	TS %	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Salinité- Solution de sol									
	Conductivité électrique du sol μ S/cm	303.00	362.00	300.00	362.00	374.00	302.00	217.00	423.00

Les analyses ont été effectuées au laboratoire d'analyse du CIRAD-AMIS/Agronomie de Montpellier, France

3. 3. 4 Evaluation de la survie des souches sélectionnées de *Ensifer meliloti* à la dessiccation :

Ce travail a été réalisé par l'équipe Nitragin (USA) partenaire du projet BACDIVERS.

Les inoculums bactériens utilisés dans la culture en grande surface sont commercialisés soit sous forme liquide soit en poudre.

Les souches destinées à l'inoculation des plantes, devront pouvoir, en plus de leurs propriétés symbiotiques importantes, conserver ces propriétés et garder un bon taux de survie lors des différentes étapes de production d'inoculum et de stockage.

Le taux de survie des bactéries dans les préparations inoculum diminue sérieusement avec le temps.

Une des étapes les plus critiques de la production d'inoculum en poudre est la survie de ces microorganismes à la dessiccation. Le nombre des bactéries diminue sérieusement de la surface des graines inoculées, ce qui oblige les agriculteurs à appliquer l'inoculum juste au moment du semis. Or cette étape est fastidieuse et demande beaucoup de temps notamment s'il s'agit de semer des surfaces importantes de terres.

La survie des rhizobia dans les inoculums pendant des jours voir même plus peut aider sérieusement les agriculteurs en leur permettant d'inoculer les graines à l'avance et de conserver cette préparation jusqu'au jour du semis.

Plusieurs additifs sont ajoutés au support (tourbe) pour permettre une dessiccation progressive (Mc Quilken *et al.*, 1998). Ces additifs diminuent l'évaporation de l'eau présente dans les cellules et leur permettent ainsi de s'adapter au stress hydrique. Parmi les composés, les plus utilisés chez *Ensifer*, le lactose qui favorise la résistance des cellules inoculum à la dessiccation (Bissonnette et Lalande 1988). Au-delà d'une certaine durée de stockage des produits inoculum, le taux de survie des rhizobia diminue sérieusement (Revellin *et al.* 2000).

Néanmoins, les études sur la survie des rhizobia à la dessiccation sont très peu documentées.

Dans cette étude, en collaboration avec l'équipe Nitragin (USA), nous avons testé la survie de certaines souches originaires de l'Algérie à la dessiccation. Ce test a été réalisé sur plusieurs souches de *E. meliloti* STM 1064 (sélectionnée au champ) et d'autres souches qui

n'ont pas été encore testées : STM 1062 et STM 1827 et comparé avec des souches de Russie (AK 23 et AK 89) et deux souches de la compagnie Nitragin (102F85 et 102F77D).

La souche *E. meliloti* STM 1827 est celle qui exprime le plus fort taux de survie sur support d'argile après 57 jours de culture et la plus forte résistance à la dessiccation avec $1,6 \times 10^9$ cellules/g de culture, suivie par la souche AK 23 de Russie avec $1,4 \times 10^9$ cellules/g de culture et en troisième position les deux autres souches d'Algérie STM 1062 et STM 1064 avec un taux de survie de $1,3 \times 10^9$ cellules/g de culture.

Le taux de survie des deux souches Nitragin sur argile et après dessiccation est inférieur à celui des souches d'Algérie et de Russie, le taux de survie varie de $1,1 \times 10^9$ à $9,8 \times 10^8$ cellules/g de culture.

On peut expliquer cette résistance particulière de la souche STM 1827 à la dessiccation par le fait qu'elle a été isolée de la région de Biskra dans le sud-est de l'Algérie où la température à certaines saisons peut atteindre des niveaux très élevés. Des résultats semblables ont été observés par Essendoussi *et al.* (2007) pour des rhizobia isolés du désert marocain et qui semblaient accumuler du mannosucrose ou du trehalose comme réponse à la fois osmoadaptative et de résistance à la dessiccation.

Le même test devra être réalisé également avec les souches STM 990 et STM 994 de *E. medicae*, cependant dans le cas où les souches tolèrent peu le traitement de dessiccation, des inoculums liquides peuvent être envisagés.

3. 3. 5 Conclusion

Dans cette dernière étape de travail, nous avons sélectionné des souches de *Ensifer* en se basant sur les résultats obtenus dans les deux sous-chapitres précédents (diversité et salinité) pour des essais en serre et au champ.

Nous avons testé l'infectivité et l'efficacité de 11 souches de *Ensifer* dont trois souches de *E. medicae* originaires d'Algérie et 8 souches de *E. meliloti* (deux souches d'Algérie, cinq souches Nitragin et la souche type *E. meliloti* ORS 634) en conditions contrôlées, en serre méditerranéenne.

Les souches de la collection d'Algérie avaient été au préalable sélectionnées pour leur infectivité et leur efficacité avec la plante hôte et leur haute tolérance à la salinité (600 mM sur M9).

Les mesures de croissance 6 semaines après inoculation montrent un effet significatif de l'inoculation sur la croissance des deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*).

L'inoculation avec les souches d'Algérie augmente significativement la croissance des plantes en comparaison avec le témoin non inoculé et les souches de référence. Nous avons constaté également que les souches de *E. medicae* étaient plus efficaces comparées à celles de *Ensifer meliloti*, notamment avec *M. polymorpha* ce qui concorde avec les résultats décrits dans la littérature. La fixation d'azote de ces souches est supérieure à celle des souches de *E. meliloti* se traduisant par une bonne croissance des parties aériennes confirmée par la mesure du poids sec.

De ce test en serre, trois souches ont été choisies pour des tests au champ. Les trois souches STM 990, STM 994 de *E. medicae* et la souche STM 1064 de *E. meliloti*. La souche STM 1064 a été choisie pour la comparaison entre les souches de *E. medicae* et *E. meliloti* au champ et comme inoculum à *M. sativa*.

Les plants inoculés de *M. sativa* d'Algérie et de Tunisie présentent une meilleure croissance comparée aux témoins (azotés et non inoculés). Un effet souche a été observé traduisant la compétitivité des souches vis-à-vis des souches indigènes. Néanmoins, une meilleure réponse à l'inoculation et peut être aussi une meilleure tolérance aux conditions climatiques ont été observées avec *M. sativa* cultivar de Tunisie comparé au cultivar d'Algérie.

Les souches sélectionnées (STM 990, STM 994 et STM 1064) devront subir plusieurs autres tests avant d'être utilisées comme inoculum pour de plus grandes surfaces, notamment, leur tolérance aux étapes critiques de préparation de l'inoculum et leur survie sur support d'inoculum.

La souche STM 1064 a déjà été testée pour sa tolérance à la dessiccation et semble maintenir un taux de viabilité supérieure aux normes sur support d'argile après 57 jours de stockage.

De cette étude les couples symbiotiques les plus performants que nous pouvons proposer sont les suivants :

Les souches STM 990 et STM 994 de *E. medicae* peuvent s'associer effectivement avec trois espèces de *Medicago* : *M. ciliaris*, *M. polymorpha* et *M. sativa*.

La souche STM 1064 de *E. meliloti* peut s'associer effectivement avec *M. ciliaris* et *M. sativa*.

Néanmoins, ces couples devront également être testés en zones salées pour confirmer leur efficacité sous stress salin.



**Conclusion générale
et Perspectives**

Conclusion générale et perspectives

En fin de cette thèse, il paraît important de dresser le bilan des résultats obtenus au cours de ce travail au regard des objectifs que nous nous étions fixés.

Notre objectif principal était la sélection de couples symbiotiques rhizobiums-légumineuses adaptés, compétitifs, performants et à haut potentiel fixateur susceptibles de contribuer à recréer un couvert végétal dans des zones affectées par la salinité et l'aridité en Algérie, augmenter la production fourragère et enrichir le sol en azote organique pour favoriser d'éventuelles cultures céréalières ultérieures en Algérie.

Pour cela, nous avons effectué deux campagnes de prospection (2003, 2004) dans plusieurs régions salées et deux régions arides où nous avons constaté la présence de nombreuses espèces de légumineuses spontanées d'intérêt, la majorité étant fourragères. Dans ces régions, nous avons récolté du sol rhizosphérique de ces légumineuses, des graines et des nodules racinaires de *Medicago polymorpha*, *M. ciliaris*, *M. littoralis*, *M. marina*, *M. minima*, *M. arabica*, *Lotus creticus*, *Acacia tortillis*, *Acacia* sp., *Trigonella maritima*, *Retama raetam*, *Retama monosperma*, *Astragalus* sp. et *Scorpiurus vermiculatus*. Au laboratoire, nous avons ensuite isolé 100 isolats bactériens des nodules racinaires, dont plus de la moitié provient des pourtours d'une dépression salée de la région d'Oran, la Sebkhha de Misserghin, choisie comme notre zone modèle d'étude.

Nous avons inclus dans notre étude 16 souches de la collection STM (Montpellier, France) provenant du Sénégal, de Tunisie et du Liban. Ces souches ont été isolées de légumineuses spontanées de régions infra-arides, zones dégradées et/ou salées, conditions éco-climatiques comparables de nos sites d'étude en Algérie prévalant dans leur zone d'origine dans ces divers pays. L'ensemble de notre travail a été réalisé dans le cadre du projet européen BACDIVERS.

Les isolats ont été étudiés phénotypiquement et génotypiquement. L'étude phénotypique a montré que la majorité des isolats présentent des caractéristiques morphologiques typiques de ceux décrits pour les rhizobia. Les isolats forment des colonies muqueuses sur YMA et 36 souches d'entre elles sont effectives sur *Medicago ciliaris* et/ou *Medicago polymorpha*, légumineuses endémiques de la Sebkhha de Misserghin.

Notre caractérisation génotypique des isolats a d'abord consisté en un criblage sur la base du séquençage partiel de la région centrale (500 pb) de l'ADNr 16S, zone variable qui permet la discrimination des différentes espèces de *Ensifer*. Ce criblage nous a permis de retenir 72 souches sur les 100 isolats d'Algérie et 16 souches sur 40 de la collection STM originaires de Tunisie, Liban et Sénégal. Ces souches ont été affiliées aux genres *Ensifer*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium* et *Agrobacterium*. En outre, dix souches d'Algérie formaient deux groupes séparés dans les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*, et neuf souches du Sénégal et de Tunisie formaient trois groupes séparés dans le genre *Ensifer*.

Nous avons observé une certaine spécificité des BNL liée à leurs zones d'échantillonnage d'origine. Ainsi les souches isolées de *Medicago ciliaris* à Batewa (zone polluée aux hydrocarbures) sont toutes des *Ensifer* spp., suggérant une meilleure tolérance de ces groupes à la pollution. Par contre, des souches isolées de la même légumineuse (*Medicago ciliaris*) dans la zone salée de Misserghin appartiennent à quatre genres de BNL : *Ensifer*, *Rhizobium*, *Phyllobacterium* et *Agrobacterium*. Dans la littérature cette légumineuse n'a jusqu'ici été rapportée comme associée à certaines espèces de *Ensifer* et à une espèce de *Bradyrhizobium* (Rome *et al.*, 1996 ; de Lajudie *et al.*, 1994 ; Yao *et al.*, 2002). Ainsi la diversité des rhizobia associés à cette légumineuse trouvée en Algérie était inattendue.

Nous avons par ailleurs identifié les partenaires symbiotiques de certaines légumineuses peu étudiées en Algérie. Les souches STM 2251 et STM 2252, isolées de *Scorpiurus vermiculatus* se placent respectivement dans une branche à part proche de *R. loessense* / *R. galegae* et dans la branche de *E. medicae*. Les souches STM 2258, STM 2257 isolées de *Retama monosperma* sont affiliées à *Agrobacterium radiobacter*, tandis que la souche STM 2285 isolée de la même plante et de la même région (Cap Falcon) du littoral groupe avec *R. sullae* IS123.

Les souches isolées des zones arides (Biskra et Djanet) ont été affiliées aux genres *Ensifer* et *Agrobacterium*.

Enfin 28 souches de la collection d'Algérie groupent avec des non BNL, majoritairement du genre *Pseudomonas*. Ces souches seront étudiées ultérieurement.

Nous avons réalisé des expériences préliminaires pour tester le pouvoir discriminatif de puces *nodA* sur les souches de *E. meliloti* et de *E. medicae*. Les résultats obtenus restent préliminaires et montrent que certaines souches identifiées par séquençage partiel de l'ADNr16S possèdent des *nodA* spécifiques correspondant à ces espèces. Néanmoins pour d'autres souches isolées d'autres légumineuses les résultats sont mitigés, nécessitant de refaire l'analyse sur un plus grand nombre de souches originaires d'une plus grande diversité de plantes hôte.

Dans une deuxième étape, nous avons complété le séquençage du gène ADNr 16S des représentants des groupes nouveaux et de certaines espèces génomiques potentiellement intéressantes.

Cette analyse, nous a permis de confirmer que les nouveaux groupes étaient bien monophylétiques. Trois d'entre eux (A, B et C), formés de souches originaires de Tunisie et du Sénégal, représentent probablement des nouvelles espèces dans les genres *Ensifer* ; deux autres, constitués de souches d'Algérie, pourraient représenter des nouvelles espèces dans les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*.

Les études phylogénétiques, longtemps basées sur le seul gène codant pour l'ARN 16S, tendent maintenant à prendre en compte plusieurs marqueurs pour des résultats plus solides. Ainsi nous avons employé la technique MLSA pour confirmer la position phylogénétique des groupes nouveaux de *Ensifer* et de *Rhizobium* par l'étude des phylogénies comparées de cinq gènes de ménage (*recA*, *atpD*, *thrC*, *glnA* et *gltA*). Cette étude a été complétée par des tests auxanographiques et la recherche de gènes *nodA* sur des représentants des groupes séparés.

L'ensemble des résultats confirment que les groupes A et C représentent des nouvelles espèces dans le genre *Ensifer*, pour lesquels nous avons proposé respectivement les noms *Ensifer maghrebium* sp. nov. pour les souches isolées de *Argyrobium uniflorum* et *Lotus creticus* et *Ensifer xericitae* sp. nov., pour les souches isolées de *Argyrobium uniflorum* et *Medicago sativa*. Les souches de ces groupes présentant des gènes *nodA* formant des branches à part de ceux décrits, ils pourraient également représenter de nouveaux génomovars.

Le groupe B, quant à lui, était, dans la majorité des analyses, retrouvé proche de *Ensifer adhaerens* gv. A. Les hybridations ADN-ADN, pourtant effectuées à plusieurs reprises sur des représentants de ce groupe, ne nous ont malheureusement pas permis de conclure définitivement. Néanmoins, il est à noter que tous les représentants de ce « nouveau » groupe B de *Ensifer adhaerens* nodulent leur plante d'isolement, *Lotus arabicus*, contrairement aux premières souches de *Ensifer* identifiées dans la littérature.

Pour les groupes séparés dans les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* les études de caractérisation sont en cours.

Afin de sélectionner des souches tolérantes à la salinité utilisables comme inoculum spécifique aux zones salées, nous avons testé la tolérance des 72 isolats d'Algérie à la salinité

in vitro. Les résultats montrent que le niveau de tolérance au NaCl dépend du milieu utilisé ; sur milieu M9, les souches tolèrent 600 mM NaCl, concentration inférieure à celle tolérée sur milieu YMA (800 mM). Cependant cette concentration de sel augmente le temps de génération des souches tolérantes.

L'effet de la salinité a par ailleurs été testé chez deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*) *in-vitro*. Les résultats montrent que la croissance de ces deux espèces est complètement inhibée à 50 mM NaCl, soit une concentration 15 fois inférieure à celle tolérée par les microsymbiotes de ces plantes. La question de la présence de ces plantes sensibles au sel et pourtant présentes en abondance dans la Sebkhha de Misserghin et dans différents sites d'échantillonnage, reste posée. Afin d'expliquer ce phénomène, nous avons étudié l'impact de la salinité sur la distribution des deux partenaires de la symbiose dans la zone salée de Misserghin. Cette étude révèle que la distribution des *Medicago* est influencée par la concentration de sel le long du gradient salin, avec prédominance de *M. polymorpha* dans les zones les plus salées, de *M. ciliaris* dans les régions moins salées ; dans la zone intermédiaire les deux espèces se mélangent à des taux équivalents. En revanche, la distribution des rhizobia ne semble pas être influencée par la salinité *in natura*. Des souches de *E. medicae* sont présentes dans tous les sites. Les souches les plus tolérantes à la salinité ne sont pas toujours celles originaires des zones les plus salées. Des souches tolérantes à 800 mM NaCl sur YMA sont présentes dans tous les sites. Cependant le nombre réduit d'échantillons ne permet pas de conclure de façon définitive et il est nécessaire de vérifier cette étude par un échantillonnage plus important.

Nous avons également remarqué dans cette région la présence importante de plantes halophytes principalement d'*Arthrocnemum indicum* au centre desquelles nous retrouvons les espèces de *Medicago* et qui présentaient une croissance meilleure que celles des rares plantes isolées. Les halophytes semblent avoir un impact sur la survie de ces légumineuses étant connues pour leur rôle dans le dessalement des régions salées (Abdelly, 2006).

En collaboration avec l'équipe d'Helsinki, les gènes impliqués dans la tolérance à la salinité ont été recherchés chez la souche de *E. meliloti* STM 1064 à l'aide de microarrays construits au cours du projet BACDIVERS. Cette étude a montré que la plus grande divergence de gènes est présente sur le plasmide symbiotique pSymA dont de nombreux gènes codent pour des protéines de fonctions encore inconnues, et qui pourraient être impliqués dans le mécanisme de tolérance à la salinité.

Les souches de *Ensifer* tolérantes au sel *in vitro* ont été testées sur leurs plantes-hôtes en serre, afin de sélectionner les meilleurs candidats (effectivité potentielle) pour la revégétalisation et le renforcement de ces légumineuses en zones salées et arides. Nous avons ainsi sélectionné trois souches de *E. medicae* et deux souches *E. meliloti* pour leur infectivité avec trois espèces de *Medicago* (*M. ciliaris*, *M. polymorpha* et *M. sativa*) et tolérantes à 600 mM NaCl. Ces souches qui sont destinées à l'inoculation au champ devront être au préalable testées en serre et les plus performantes seront sélectionnées.

Les souches STM 990, STM 994 et STM 1003 de *Ensifer medicae* sont les plus effectives avec les deux espèces de *Medicago* (*M. ciliaris* et *M. polymorpha*), et la souche *E. meliloti* STM 1064 sur *Medicago ciliaris*. La sélection a été effectuée sur la base de la comparaison de croissance des plantes inoculées et des témoins, par mesure du poids sec des parties aériennes et estimation de la fixation de l'azote par mesure de l'ARA. De ce test en serre, trois souches ont été choisies pour des tests au champ, dans une zone semi-aride avec deux cultivars de *M. sativa*, une d'Algérie et l'autre de Tunisie.

Les souches STM 990, STM 994 et STM 1064 ont présenté de bons résultats sur la croissance de deux variétés de *Medicago sativa* (d'Algérie et de Tunisie). Ces souches augmentent considérablement le poids sec des parties aériennes comparé au témoin non

inoculé et se sont avérées compétitives avec les souches locales. Nous avons noté également une meilleure réponse à l'inoculation de la variété de *M. sativa* de Tunisie comparée à celle de l'Algérie.

Les souches sélectionnées (STM 990, STM 994 et STM 1064) devront subir plusieurs autres tests avant d'être utilisées comme inoculum, notamment, leur tolérance aux étapes critiques de préparation de l'inoculum. Les expériences préliminaires ont montré que la souche STM 1064 semble maintenir un taux de viabilité important après dessiccation.

Cette étude devra être complétée par des essais en milieu salin, pour confirmer l'efficacité des couples *Medicago / Ensifer* dans ces zones.

Les souches devront également être testées pour leur tolérance aux hautes températures, mais aussi aux basses températures qui prévalent dans les zones semi-arides et arides, qui subissent des écarts importants de température entre le jour et la nuit.

Ainsi en fin de cette thèse, nous constatons que les **objectifs** suivants ont été **atteints** :

- ✓ Nous avons constitué une collection de souches d'Algérie provenant des zones salées et arides et de différentes légumineuses d'intérêt.
- ✓ Nous avons caractérisé phénotypiquement et génotypiquement les souches d'Algérie et d'autres souches originaires du Sénégal, de la Tunisie et du Liban. L'analyse génotypique et phénotypique nous a permis de mettre en évidence deux nouvelles espèces de *Ensifer* isolées de *Argyrolobium uniflorum*, *Lotus creticus* et *Medicago sativa*. Deux autres groupes séparés dans les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* peuvent également représenter des nouvelles espèces.
- ✓ Nous avons testé la tolérance de nos souches à la salinité ainsi que leurs partenaires végétaux et étudié l'impact de la salinité sur la croissance et la répartition de ces deux partenaires dans une région salée de l'ouest algérien.
- ✓ Nous avons finalement sélectionné en serre et au champ des couples symbiotiques performants, candidats pour des opérations de végétalisation en zones salées et arides.

Les perspectives envisagées pour compléter cette étude sont les suivantes :

- ✓ L'étude de caractérisation devra être complétée pour les souches d'Algérie qui forment les deux groupes séparés en *Rhizobium* et *Agrobacterium* par MLSA mais en testant avec les gènes de ménage utilisées dans le genre *Ensifer* d'autres gènes de ménage qui denteront peut être une discrimination plus nette dans ces deux genres tels que le *rpoB*.
- ✓ L'étude de l'impact de la salinité sur la répartition des deux partenaires de la symbiose rhizobia / *Medicago* présent au niveau de la Sebkhia de Misserghin devra être confirmé par un échantillonnage plus important et plus équilibré entre les différents sites.
- ✓ Le rôle des halophytes devra également être plus étudié dans le maintien de ces légumineuses en zones salées et surtout de la symbiose par des tests en serre en premier sur du sol salée de la région avec et sans présence de halophytes où d'extrait de halophytes.
- ✓ Les souches originaire d'Algérie de *E. Meliloti* et *E. medicae* sélectionnées comme meilleures candidates à l'inoculation au champ devront être testées en zones salées d'où leurs provenances originaires et devront subir d'autres tests en plus de la résistance à la dessiccation pour être utilisées dans d'autres champs et surtout

vérifier qu'elles ne seront pas la cause d'un déséquilibre de la flore locale de la région où elles seront introduites, si cette région possède au préalable une communauté de rhizobia effective.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- **Abdelguerfi, A., et Abdelguerfi-Laouar, M.** (2002) Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral : diversité, collecte et valorisation au niveau du Bassin Méditerranéen. *In* Proceeding « Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens », 11th Meeting of the Mediterranean Sub-Network of the FAO-CIHEAM. Djerba (Tunisie), 29/10-1/11-2002. Cahiers Options Méditerranéennes.
- **Abdelguerfi, A., Laouar, M., Tazi, M., Bounejmate, M., et Gaddes, N. E.** (2000) Présent et futur des pâturages des légumineuses fourragères en région méditerranéenne. Cas du Nord de l'Afrique et de l'ouest de l'Asie. CEHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes, 45 : 461-467.
- **Abdelguerfi, A., et Laouar, M.** (1999) Les espèces fourragères et pastorales. Leur utilisation au Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). FAO, Regional Office NEAR EAST, le Caire, Egypte, 110p.
- **Abdelguerfi, A., Chapot, J. Y., et Conesa, A.** (1988) Contribution à l'étude de la répartition des espèces de Luzernes annuelles en Algérie. Relations avec certains facteurs du milieu. *Fourrages*, 13: 89-106.
- **Abdelguerfi, A., et Abdelguerfi-Berrekia, R.** (1987) Réflexions sur la valorisation de quelques espèces fourragères adaptées aux zones arides et semi-arides. *Ann. Inst. Nat. Agron. El-Harrach*, 11(2) : 1-10.
- **Abdelguerfi, A.** (1978) Contribution à l'étude écologique des espèces de luzernes annuelles en Algérie. Mémoire de Magister. INA El Harrach.
- **Abdelly, C.** (2006) Utilisation des halophytes pour la réhabilitation et la valorisation des sols salin. *Biotech. Végét.*, 54-56.
- **Abdelly, C., Lachâal, M., et Grignon, C.** (1999) Importance of micro-heterogeneity of salinity and fertility for maintenance of the plant diversity. Halophyte uses in different climates I. Leiden, The Netherlands, 65-76.
- **Abdelly, C., Lachaâl, M., Grignon, C., Soltani, A., et Hajji, M.** (1995) Association épisodique d'halophytes strictes et de glycophytes dans un écosystème hydromorphe salé en zones semi-aride. *Agronomie*, 15 : 557-568.
- **Abdelmoumen, H., Filali-Maltouf, A., Neyra, M., Belabed, A., et EL-Idrissi, M. M** (1999) Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *J. Appl. Microbiol.* 86 (6):
- **Abdel-Wahab, H. H., et Zahran, H. H.** (1983) The effects of water stress on N₂ (C₂H₂)-fixation and growth of *Medicago sativa* L. *Acta. Agron. Acad. Sci. Hung.*, 32: 114-118.

- **Abdel-Wahab, H. H., et Zahran, H. H.** (1979) Salt tolerance of *Rhizobium* species in broth culture. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 19: 681-685.
- **Abdel-Ghaffar, A. S.** (1989) Aspects of microbial activities and dinitrogen fixation in Egyptian desert soils. *Arid Soil Res. Rehabil.*, 3: 281-294.
- **Adékambi, T., et Drancourt, M.** (2004) Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA*, and *rpoB* gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 2095-2105.
- **Afnor**, (1986) Normalisation française, qualité des sols : détermination de la conductivité électrique d'un extrait aqueux de terre. Cedex 792080, Paris la défense, X31-113.
- **Ahmane, A., et Rognon, P.** (1990) Contribution à l'étude sédimentologique de la grande Sebkhia d'Oran (Algérie). Travaux universitaires. Université de Paris 06, Paris, France.
- **Aidoud, A.** (1989) Contribution à l'étude des écosystèmes pâturés des hautes plaines algéro-oranaises. Fonctionnement, évaluation et évolution des ressources végétales. Thèse doct. Usthb, Alger, 240p.
- **Alazard, D.** (1985) Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 732-734.
- **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 1 (25): 3389-3402.
- **Al-Sherif, E. M.** (1998) Ecological studies on the flora of some aquatic systems in Beni-Suef district. M. Sc. Thesis. Cairo University, Beni-Suef, Egypt.
- **Amarger, N., Macheret, V., et Laguerre, G.** (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. Syst. Bacteriol.*, 47: 996-1006.
- **Aouani, M. E., Mhamdi, R., Jebara, M., et Amarger, N.** (2001) Characterization of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie*. 21: 577-581.
- **Athar, M., et Johnson, D. A.** (1996) Influence of drought on competition between selected *Rhizobium meliloti* strains and naturalized soil rhizobia in alfalfa. *Plant Soil*, 184: 231-241.
- **Avarre, J-C., de Lajudie, P., et Béna, G.** (2006) Hybridization of genomic DNA to microarrays: A challenge for the analysis of environmental samples. *J. Microbiol. Meth.*, 69(2): 242-8.
- **Baele, M., Baele, P., Vaneechoutte, M., Storms, V., Butaye, P., Devriese, L. A., Verschraegen, G., Gillis, M., et Haesebrouck, F.** (2000) Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 4201-4207.

- **Bailly, X., Olivieri, I., de Mita, S., Cleyet-Marel, J-C., et Béna, G.** (2006) Recombination and selection shape of the molecular diversity pattern of nitrogen-fixing *Sinorhizobium* sp. associated to *Medicago*. *Mol. Ecol.*, 15(10): 2719-2734.
- **Balkwill, D. L.** (2005) Genus VI. *Ensifer casida* 1982, 334^{VP}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 2, part C, pp: 354-358. Edited by G. M. Garrity, NY: Springer.
- **Ballard, R. A., Shepherd, B. R., et Charman, N.** (2003) Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 3. Lucerne (*Medicago sativa* L.) *Aust. J. Exp. Agr.*, 43: 135-140.
- **Bedrani, S.** (2005) Note élaborée à partir de rapport par CEHEAM par pays sur « agriculture, pêche, alimentation et développement rural durable dans la région méditerranéenne » rapport Algérie. CIHEAM, observatoire méditerranéen, p : 1-11.
- **Bekki, A., Rezki, M. A., et Gaouar, G.** (2000) Adaptation naturelle de rhizobia à la salinité des sols et rôle des plantes halophiles dans fixation de l'azote et développement durable dans le bassin méditerranéen carthage, 1998 et Montpellier 2000 ED. INRA, Paris.
- **Bekki, A., Baba Ahmed, b., H., et Gaouar, A.** (1999) Effect of soil salinity on survival and symbiotic performance between *Rhizobium meliloti* and *Medicago* in north west of Algeria. Accepted for publication in: The third symposium on biological nitrogen fixation in mediterranean bassin (FABAHED): Toward biofertiliser application for an sustainable agriculture. EL Arich, Egypte.
- **Bekki, A.** (1997) Effect of the salinity on the nitrogen fixation by the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* association. 11ème congrès international de fixation d'azote, Paris, 122p.
- **Bekki, A.** (1996) Effet de la salinité du sol sur la présence de *Rhizobium* et la propagation des *Medicago* plante symbiotique avec les bactéries dans les régions salées de l'Algérie. *Mu'tah Journal for Research and Studies*, 11(6) : 9-29.
- **Bekki, A.** (1994) Effet de la salinité sur la fixation d'azote chez l'association *Rhizobium*-*Medicago*: Sensibilité du partenaire bactérien à l'état libre et sous forme de microsymbiote. Tentative d'essais au champ. (Ed.) INRA, Paris (Les Colloques, n° 77): 139-147.
- **Bekki, A., Trinchant, J. C., et Rigand, J.** (1987) Nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol. Plant*, 71: 61-67.
- **Bekki, A.** (1986) Fixation d'azote en condition de stress salin chez *Medicago*: Sensibilité respective des partenaires symbiotiques. Thèse de Doctorat, Université des sciences et techniques de Nice, 80 p.
- **Béna, G., Lyet, A., Huguet, T., et Olivieri, I.** (2005) *Medicago*-*Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *J. Evol. Biol.*, 18 : 1547-1558.

- **Béna, G.** (1998) De la reconstruction phylogénétique aux hypothèses évolutives : Une histoire du Genre *Medicago* L. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 90p.
- **Ben Fadhel, N., Boussaid, M., et Marrakchi, M.** (1997) Polymorphisme des populations Nord Africaines de l'*Hedysarum flexuosum*. El Awamia, 96 : 77-99.
- **Benhizia, Y., Benhiziya, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., et Squartini, A.** (2004) Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*., 27 (4): 462-468.
- **Benziane, A.** (1983) Problèmes géologiques et hydrogéologiques de la Sebkhia de Benziane. Thèse Doctorat, Univ. Lyon, 223p.
- **Ben Khaled, L., Gómez, A. M., Honrubia, M., et Oihabi, A.** (2003) Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. Agronomie, 23 : 553-560.
- **Ben Romdhane, S., Nasr, H., Samba-Mbaye, R., Neyra, M., Ghorbal, M. H., et de Lajudie** (2006) Genetic diversity of *Acacia tortilis* spp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA gene analysis. J. Appl. Microbiol., 100 (3): 436-445.
- **Beringer, J. E.** (1974) R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol., 84 :188-198
- **Bernard, T., Pocard, J. A., Perroud, B., et le Rudulier, D.** (1986) Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. Arch. Microbiol., 143: 359-364.
- **Bertrand, H.** (1997) Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du Colza inoculé avec des bactéries isolées de son rhizoplan. Université Claude Bernard Lyon. Lyon I: 99p
- **Beunard, P., et Montange, D.** (1994) Appréciation de l'influence du taux de chlorure de sodium sur la croissance en milieu liquide et l'infectivité de diverses souches de rhizobiums. Proceeding AABNF, 5^{ème} conférence HARARE, Zimbabwe.
- **Bissonnette, N., et Lalande, R.** (1988) High survivality of cheese whey-grown *Rhizobium meliloti* cells upon exposure to physical stresses. Appl. Environ. Microbiol., 54: 183-187.
- **Boivin-Masson, C., Bontemps, C., Golfier, G., Gris-Liebe, C., et Talini, L.** (2006) Détection et typage du gène nodC à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. Actes du BRG., 6: 97-110.
- **Boivin, C., et Giraud, E.** (1999) Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Toward a polyphasic approach using nod factors and nod genes. In : Highlights of Nitrogen Fixation Research. (Martinez-Romero, E. et Hernandez, G. eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p: 295-299.

- **Bouhmouche, I., Brhada, F., Filali-Maltouf, A., et Aurag, J.** (2001) Selection of osmotolerant and effective strains of Rhizobiaceae for inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Moroccan saline soils. *Agronomie.*, 21: 591-599.
- **Boussaid, M., Ben Fadhel, N., et Ben M'hamed, M.** (1998) Structure of vegetation in Northern and Central Tunisia and protective Measures. *Cah. Opt. Mediter.*, 38: 295-302.
- **Bouzerzouret et al.** (2002)
(http://www.gredaal.com/biodiversite/fichiers_biodiv/Articles%20specifiques/grandes_cultures/vue_panoramique_grandes_cultures.htm)
- **Bodrossy, L., et Sessitsch, A.** (2004) Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7: 245-54.
- **Boncompagni, E., Dupont, L., Mignot, T., Østeras, M., Lambert, A., Poggi, M.-C., et Le Rudulier, D.** (2000) Characterization of a *Sinorhizobium meliloti* ATP-Binding cassette Histidine transporter also involved in betaine and proline uptake. *J. Bacteriol.*, 182: 3717-3725.
- **Boncompagni, E., Østeras, M., Poggi, M.-C., et Le Rudulier, D.** (1999) Occurrence of Choline and Glycine betaine uptake and metabolism in the family of *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (5): 2072-2077.
- **Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M.-C., et Le Rudulier, D.** (2002) BetS is a major Glycine Betaine/Proline Betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 184 (10): 2654-2663.
- **Bot, A., Nachtergaele, F., et Young, A.** (2000) Land resource potential and constraints at regional and country levels. *World Soil Resources Report N° 90*. Rome: FAO of UN.
- **Botsford, J. L., et Lewis, T. A.** (1990) Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 488-494.
- **Bowtell, D., et Sambrook, J.** (2003) DNA microarrays. A molecular cloning manual ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory. Press, 712p.
- **Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P. T. M., et Zehnder, J. B.** (1991) Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic beta-(1,2)-glucan excreted by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA-1. *Arch. Microbiol.*, 156: 501-506.
- **Brhada, F., Poggi, M.-C., et le Rudulier, D.** (1997) Choline and Glycine betaine uptake in various strains of rhizobia isolated from nodules of *Vicia faba* var. major and *Cicer arietinum* L.: Modulation by salt, choline, and glycine betaine. *Cur. Microbiol.* 34: 167-172.
- **Brhada, F., et le Rudulier, D.** (1994) Osmoregulation chez les bactéries et chez *Rhizobium* en particulier: rôle de la glycine bêtaïne dans l'osmoregulation chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. (Ed.) INRA, Paris (Les Colloques, n°77), p: 126-137.

- **Brigido, C., Alexandre, A., Laranjo, M., et Oliveira, S.** (2007) Moderately acidophilic mesorhizobia isolated from chickpea. *Letters Appl. Microbiol.*, 44: 168-174.
- **Brown, J-R., Douady, C. J., Italia, M. J., Marshall, W. E., et Stanhope, M. J.** (2001) Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nat. Genet.*, 28: 281-285.
- **Brunel, B., Rome, S., Ziani, R., et Cleyet-Marel, J. C.** (1996) Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual *Medicago* species. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 19: 71-82.
- **Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., A. Becker, A., Boutry, M., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Kahn, D., Kiss, E., Lelaure, V., Masuy, D., Pohl, T., Portetelle, D., Pühler, A., Purnelle, B., Ramsperger, U., Renard, C., Thebault, P., Vandenberg, M., Weidner, S., et Galibert, F.** (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 9877-82.
- **Casida, L. E. Jr.** (1982) *Ensifer adhaerens*, gen. nov., sp. nov. a bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32 (3): 339-345.
- **Chamard, P.** (1993) Environnement et développement. Références particulières aux états sahéliers membres du CILSS. *Sécheresse*, 3 : 172-3.
- **Charbonnier, Y., Gettler, B., François, P., Bento, M., Renzoni, A., Vaudaux, P., Schlegel, W., et Schrenzel, J.** (2005) A generic approach for the design of whole-genome oligoarrays, validated for genotyping, deletion mapping and gene expression analysis on *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics.*, 6: 95.
- **Chaudhri, I. I., Shah, B. H., Naqvi, N., et Mallick, I. A.** (1964) Investigations on the role of *Suaeda fruticosa* Forsk in the reclamation of saline and alkaline soils in West Pakistan. *Plant and soil*, 12: 1-7.
- **Chehema, A., Djebbar, M. R., Hadjaïji, F., et Rouabeh, L.** (2005) Etude floristique spatio-temporelle des parcours sahariens du Sud-Est algérien. *Science et changements planétaires. Sécheresse*, 16 (4) : 275-285.
- **Chehema, A.** (1987) Contribution à la connaissance du dromadaire dans quelques aires de distribution en Algérie. Mémoire d'ingénieur INA, El-Harrach.
- **Chemining'wa, G.N., et Vessey, J. K.** (2006) the abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil. Biol. Biochem.*, 38: 294-302.
- **Chellig, R.** (1969) La steppe, le pays du mouton. Rapport mara, production animale, 9p.
- **Chen, W.-M., James, E. K., Coenye, T., Chou, J.-H., Barrios, E., de Faria, S. M., Elliot, G. N., Sheu, S.-Y., Sprent, J. I., et Vandamme, P.** (2006) *Burkholderia*

mimosarum sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 1847-1851.

- **Chen, W. M., Levens, S., Lee, T.-M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., et Vandamme, P.** (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patients. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, 51: 1729-1735.
- **Chen, W. X., Tan, Z. Y., Gao, J. L. et Wang, E. T.** (1997) *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 870-873.
- **Chen, W. X., Wang, E. T., Wang, S. Y., Ly, Y. B., Chen, X. Q., et Li, Y.** (1995) Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xingjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45:153-159.
- **Chen, W. X., Ly, G. S., Qi, Y. L., Wang, E. T., Yuan, H. L., et Li, J. L.** (1991) *Rhizobium huakuui* sp. nov. Isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 275-280.
- **Chen, W. X., Yan, G. H., et Li, J. L.** (1988) Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38: 392-397.
- **Cheng, Y., Watkin, E. L. J., O'Hara, G. W., et Howieson, J. G.** (2002) *Medicago sativa* and *Medicago murex* differ in the nodulation response to soil acidity. *Plant and Soil*, 238: 31-39
- **Chevery, C., Robert, M.** (1993) Salure des sols maghrébiens. Influence sur les propriétés physicochimiques des sols. Répercussions des modifications de ces dernières sur la fertilité, notamment azotée des sols. Rennes. ENSA, 59p.
- **Cho, J. C., et Tiedje, J. M.** (2001) Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3677-3682.
- **Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J.** (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 147-167.
- **Cohan, F. M.** (2001) Bacterial species and speciation. *Syst. Biol.*, 50: 513-524.
- **Conseil National Economique** (1996) Résumé des considérations générales relatives à l'étude sur l'agriculture. Ss. Gr. 9 Agriculture. (CNES), Alger.
- **Coque,** (1962) La Tunisie présaharienne (étude géomorphologique). Thèse Doc. en Sciences. Facultés des lettres, Paris, 448p.

- **Cordovilla, M. P., Ligeró, F., et Lluch, C.** (1995) Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Phaseolus faba* L.) under salt stress. *Plant Soil*, 172: 289-297.
- **Csonka, L. N.** (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, 53: 121-147.
- **Davet, P.** (1996) Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris. 383p.
- **De Freitas, J. R., Gupta, V. V. S. R., et Germida, J. J.** (1993) Influence of *Pseudomonas syringae* R25 and *Pseudomonas putida* R105 on the growth and nitrogen fixation (acetylene reduction activity) of pea (*Pisum sativum* L.) and field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biol. Fertil. Soils*, 16 : 215-220.
- **De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Mohamed, S. H., Torck, U., Coopman, R., Filali-Matlouf, A., Kersters, K., Dreyfus, B., Lindström, K., et Gillis, K.** (1999). *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.*, 22: 119-132.
- **De Lajudie, P., Fulele-Laurent, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. D., Kersters, K., Dreyfus, B. L., et Gillis, M.** (1998a) Description of *Allorhizobium undicola* gen. nov. sp. nov. For nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 1277-1290.
- **De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M. T., Lindström, K., Dreyfus, B., et Gillis, M.** (1998b) Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 369-382.
- **De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K., et Gillis, M.** (1994) Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahari* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 (4): 715-733.
- **Dixon, R. O. D., et Wheeler, C. T.** (1986) Nitrogen fixation in plants. Blackie, Glasgow, United Kingdom.
- **Djili, K., Daoud, Y., Gaouar, A., et Beldjoudi, Z.** (2003) La salinisation secondaire des sols au Sahara ; Conséquences sur la durabilité de l'agriculture dans les nouveaux périmètres de mise en valeur. *Science et changements planétaires/ Sécheresse*, 14 (4): 241-6.
- **Djimingué, N.** (1989) Liens entre la désertification et les changements climatiques. 12^{ème} Session de la Global Biodiversity Forum. 4-6 décembre 1998, Dakar, Sénégal.
- **Dobert, R. C., Breil, B. T., et Triplett, E. W.** (1994) DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationships to those of other nodulating bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5: 564-572.

- **Doignon-Boursier, Willems, A., Coopman, R., Laguerre, G., Gillis, M., et de Lajudie, P.** (2000) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified length polymorphism fingerprint analyses. *App. Environ. Microbiol.*, 66 : 3987-3997.
- **Dommergues, Y., et Mangenot, F.** (1970) *Ecologie microbienne du sol.* (Ed.) Masson et Cie, Paris, 796 p.
- **Demenach, A. M., et Wery, J.** (1989) Estimation de l'activité fixatrice d'azote : comparaison des méthodes. FAO, IV EXPE 4A, 1-4.
- **Drevon, J.-J.** (1989) Evaluation de l'activité nitrénase des nodosités de légumineuses par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène. FAO, p : 1-5.
- **Dreyfus, B., Garcia, J. L., et Gillis, M.** (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 89-98.
- **Drmanac, R., Drmanac, S., Chui, G., Diaz, R., Hou, A., Jin, H., Jin, P., Kwo, S., Lacy, S., Moeur, B., Shafto, J., Swanson, D., Ukrainezyk, T., Xu, C., et Little, D.** (2002) Sequencing by hybridization (SBH) : advantages, achievements, and opportunities. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 77 : 75-101.
- **Doyle, J.-J.** (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci.*, 3: 473- 478
- **Duhoux, E., et Nicole, M.** (2004) *Biologie végétale: Associations et interactions chez les plantes.* Atlas, Dunod, Paris, 166p.
- **Dupont, L., Garcia, I., Poggi, M.-C., Alloing, G., Mandon, K., et Le Rudulier, D.** (2004) The *Sinorhizobium meliloti* ABC transporter Cho is highly specific for Choline and expressed in bacteroids from *Medicago sativa* nodules. *J. Bacteriol.*, 186 (18): 5988-5996
- **Dupuy, A. R.** (1986) La conservation de la nature au Maroc. *Le Courrier de la Nature*, 104 : 19-21.
- **Dupuy, N., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Vandenbruaene, L., Maestrojuan, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, M. D., et Gillis, M.** (1994) Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 461-473.
- **Eardly, B. D., Nour, S. M., van Berkum, P., et Selander, R. K.** (2005) Rhizobial 16S rRNA and *dnaK* genes: mosaic and uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1328-1335.
- **El-Sheikh, E. A. E., et Wood, M.** (1995) Nodulation and N₂-fixation by Soy-bean inoculated with salt tolerant rhizobia or sensitive bradyrhizobia in salt soil. *Soil Biol. Biochem.*, 27:657-661.

- **Embalomatis, A., Ppacosta, D. K., et Katinakis, P.** (1994) Evaluation of *Rhizobium meliloti* strains isolated from indigenous populations Northern Greece. *J. Agri. Crop. Sci.*, 172 : 73-80.
- **Essendoussi, M., Brhada, F., Eljamali, J-E., Filali-Maltouf, A., Bonnassie, S., Georgeault, S., Blanco, C., et Jebbar, M.** (2007) Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south eastern Moroccan Sahara. *Environ. Microbiol.*, 9 (3): 603-611.
- **Euzéby, J. P.** (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the internet. *Inter. J. Sys. Bacteriol.*, 47 (2): 590-592.
- **Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yabuuchi, E.** (1989) Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 224-229.
- **Faggs, C. W., et Stewart, J. L.** (1994) The value of *Acacia* and *Prosopis* in arid and semi-arid environments. *J. Arid Environ.*, 27: 3-25.
- **Fahmy, S. S., Abdel Sabour, M. F., et Housseini, M.** (1997) Evaluation of some organic fertilizers in respect to their maturity and suitability as soil amendment, p: 64-77. In Proceeding of the 9th Microbiology Conference.
- **Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G., et Bult, C.** (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10 : 315-319.
- **FAO** (2005) Utilisation des engrais par culture en Algérie. FAO, Rome, Italy.
- **FAO** (2002) Le sel de la terre, un danger pour la production vivrière. FAO, Rome, Italy.
- **FAO** (1996) The state of world of plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, Italy.
- **Ferreira, E. M., et Castro, I. V.** (1995) Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. *Soil. Biol. Biochem.*, 27: 1177-1183.
- **Forum des Nations Unies sur les forêts** (2005) Rapport National. Cinquième session.
- **FOSA** (2000) L'étude prospective du secteur forestier en Afrique (FOSA) Algérie.
- **Foster, A. C., McInnes, J. L., Skingle, D. C., et Symon, R. H.** (1985) Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent. *Photobiotin. Nucleic Acids Res.*, 13: 745-761.
- **Founoune, H., Duponnois, R., Meyer, J. M., Thioulouse, J., Masse, D., Chotte, J. L., et Neyra, M.** (2002) Interactions between ectomycorrhizal symbiosis and fluorescent

pseudomonads on *Acacia holosericea*: isolation of mycorrhiza helper bacteria (MHB) from a Soudano-Sahelian soil. FEMS Microbiol. Ecol., 41 (1): 37-46.

- **Foury, A.** (1954) Les légumineuses fourragères au Maroc. Seconde partie. Les cahiers de la recherche agronomique. Rabat, 5 : 289-656.
- **Franco, A. A., et de Faria, S. M.** (1997) The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. Soil Biol. Biochem., 29 (5/6): 897-903.
- **Frank, B.** (1889) Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Deut. Bot. Ges., 7: 332-346.
- **Furhman, J., Davey, C. B., et Wollum, A. G.** (1986) Dessiccation tolerance in clover rhizobia in sterile soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 50: 639-644.
- **Galibert, F., Barloy-Hubler, F., Capela, D., et Gouzy, J.** (2000) Sequencing the *Sinorhizobium meliloti* genome. DNA sequence, 11 (3-4): 207-210.
- **Galinski, E., et Truper, H. G.** (1982) Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. FEMS Microbiol. Lett., 13: 357-360.
- **Gao, J.-L., Turner, S. L., Kan, F. L., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Qiu, Y. H., Gul, J., Terefework, Z., Young, J. P. W., Lindström, K., et Chen, W. X.** (2004) *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54 (6): 2003-2012.
- **García-Fraile, P., Rivas, R., Willems, A., Peix, A., Martens, M., Martínez-Molina, E., Mateos, P. F., et Velázquez, E.** (2007) *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 844-848.
- **Garcia Latorre, J., Sanchez Picon, A., et Gaecia Latorre, J.** (2001) The man-made desert: effect of economic and demographic growth on the ecosystems of arid southeastern Spain. Environ. Histor., 6: 75-94.
- **Garçon, J.** (2006) L'Algérie débordée par le désert. Journal quotidien Libération.
- **Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., et Young, J. P.** (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 2037-48.
- **Ghazi, A.** (2004) la désertification en Algérie : Aspects environnementaux et sécuritaires dans le cadre de la globalisation. 5^{ème} conférence Pan-Européenne et 3^{ème} conférence de AFES-PRESS GMOSS sur la reconceptualisation de la sécurité dans le cadre de la mondialisation. La Haye, 9-11 septembre 2004.

- **Ghosh, W., et Roy, P.** (2006) *Mesorhizobium thiogangeticum* sp.; nov., a novel sulphur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56(1): 91-97.
- **Gibson, A. H.** (1980) Methods for legumes in glasshouse and controlled environment cabinets. In: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation* (Bergersen, F. J., ed). Wiley, Chichester and N. Y., 139-184.
- **Gillis, M., Vandamme, P., De Vos, P., Swings, J., et Kersters, K.** (2005) Polyphasic taxonomy. In Brenner, D. J., Krieg, R. K., Staley, J. T., Garrity, G. M., editors, Part A, *Introductory essays, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2: 43-48. Springer, New York, 2nd edition.
- **Giridhar, I. K.** (1987) Effect of root-zone salinity on the performance of dhaincha. *Indian J. Agric. Sci.*, 57: 723-725.
- **Glasser, P.** (2005) Les puces à ADN vont-elles révolutionner l'identification des bactéries ? *Médecine/Sciences*, 21: 539-544.
- **Gonzalez, V., Santamaria, R. I., Bustos, P., Hernandez-Gonzalez, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S. C., Ramirez, M. A., Jimenez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., et Davila, G.** (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103 (10): 3834-9.
- **Gonçalves, E. R., et Rosato, Y. B.** (2002) Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 355-361.
- **Graham, P. H.** (1998) Biological dinitrogen fixation : symbiotic. In: Sylvia, D. M. (Ed.), *Principles and application of soil microbiology*. Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, NJ: 322-345.
- **Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnet, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., Deley, D. J., Roslychy, E. B., Strijdom, B. W., et Young, J. P. W.** (1991) Proposed minimal standars for the description of new genera and species of root and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 582-587.
- **Grimont, P. A. D.** (1998) La taxonomie bactérienne à la fin du XX ème siècle. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 13: 3-5.
- **Gupta, R. K., et Abrol, I. P.** (1990) Salt-affected soils: Their reclamation and managment for crop production. In *advances in Soil Science*, 273-287.
- **Gürtler, V., et Stanisich, V. A.** (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3-36.
- **Hadjiat, K.** (1997) Etat de dégradation des sols en Algérie. Rapport d'expert PNAE, Banque Mondiale, 45p.

- **Halitim A.** (1988) Sols des régions arides d'Algérie. Alger, OPU.
- **Hamadache, A.** (2001) Les alternatives possibles à la jachère en relation avec le milieu physique et socioéconomique. Sémin. Nation. sur la problématique de l'agriculture des zones arides et de la reconversion. Sidi-Bel-Abbes janv. 2001., 315-325.
- **Hamid, M. E., Roth, A., Landt, O., Kroppenstedt, R. M., Goodfellow, M., et Mauch, H.** (2002) Differentiation between *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense* strains based on 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 707-711.
- **Han, S. Z., Wang, E. T., Chen, W. Z., et Han, S. Z.** (2005) Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campilotropis* and *Cassia* grown in China. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28(3): 265-276.
- **Hancock, T. L. C., Costello, A. M., Lindstrom, M. E., Oremland, R. S.** (1998) Strain IMB-1, a novel bacterium for the removal of methyl bromide in fumigated agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2899-2905.
- **Hashimoto, J. G., Stevenson, B. S., et Schmidt, T. M.** (2003) Rates and consequences of recombination between rRNA operons. *J. Bacteriol.*, 185: 966-972.
- **Haukka, K., Lindström, K. et Young, J. P.** (1998) Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 419-26.
- **Haukka, K., Lindström, K., et Young, P. W.** (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.
- **Heinrich, K., Ryder, M. H., et Murphy, P. J.** (2001) Early production of rhizopine in nodules induced by *Sinorhizobium meliloti* strain L5-30. *Can. J. Microbiol.*, 47: 165-171.
- **Helemish, F. A., Abdel-Wahab, S. M., El-Mokadem, M. T., et Abou-El-Nour, M. M.** (1991) Effect of Sodium chloride salinity on the growth, survival and tolerance response of some rhizobial strains. *Ain Shams Sci. Bull.*, 28B: 423-440.
- **Hernandez-Lucas, I., Rogel-Hernandez, M. A., Segovia, L., Rojas-Jiménez, K., Martínez-Romero, E.** (2004) Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 703-706.
- **Hernandez-Luca, L., Segovia, L., Martínez-Romero, E., et Pueppke, S. G.** (1995) Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2775-2779.
- **Hillel, D., et Rosenzweig, C.** (2002) Desertification in relation to climate variability and change. *Advanced Agro.*, 77: 1-38.

- **Hungria, M., Franco, A. A., et Sprent, J. I.** (1993) New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 149: 103-109.
- **Huguet, T., Duc, G., Sagan, M., Olivieri, L., et Prospero, J. M.** (1994) *Medicago truncatula*: une légumineuse plante-modèle, pp. 223-228, in J. J. Drevon, ed., Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le Bassin méditerranéen, Les Colloques, n° 77, INRA Editions, Paris, France.
- **Imhoff, J. F.** (1986) Osmoregulation and compatible solutes in Eubacteria. *FEMS Microbiol. Let.*, 39 (1-2): 57-66.
- **Issolah, R., et Abdelguerfi, A.** (1995) Etude comparative des graines, gousses et infructescences de populations de différentes espèces de trèfles spontanés en Algérie. *Cahiers Options méditerranéennes*. ISSN : 1022-1379, 12 : 13-16.
- **Jarvis, B. D. W., van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Mareil, J.-C., et Gillis, M.** (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium Huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 895-898.
- **Jarvis, B. D. W., Downer, H. L., et Young, J. P. W.** (1992) Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 93-96.
- **Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E., et Patel, J. J.** (1982) *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 378-380.
- **Jebara, M., Mhamdi, R., Aouani, M. E., Ghrir, R. et Mars, M.** (2001) Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. *Can. J. Microbiol.*, 47 (2): 139-147.
- **Jenkins, M. B., Virginia, R. A., Jarrel, W. M.** (1989) Ecology of fast growing and slow growing mesquite nodulating rhizobia in Chihuahua and Sonoran desert ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53: 543-549.
- **Jha, P. K., Nair, S., Gopinathan, M. C., et Babu, C. R.** (1995) Suitability of rhizobia inoculated wild legumes *Argyrolobium flaccidum*, *Astragalus graveolens*, *Indigofera gangetica* and *Lespedeza stenocarpa* in providing a vegetational cover in and unreclaimed limestone quarry. *Plant Soil*, 177: 139-149.
- **Jian, W., Susheng, Y., et Jilun, L.** (1993) Studies on the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Acta. Microbiol. Sin.*, 33: 260-267.
- **Jones, D., et Krieg, N. R.** (1984) Serology and Chemotaxonomy. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 1. Sous la direction de: Krieg, N. R., et Holt, J. G. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland, pp. 15-18.

- **Jordan, D. C.** (1984). Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL, p. 234-256. In Krieg, N. R., Holt J. G. (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- **Jordan, D. C.** (1982) Transfert of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing root-nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 32: 136-139.
- **Jourand, P., Giraud, E., Béna, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., et de Lajudie, P.** (2004) *Methyllobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 2269-2273.
- **Kaci, Y., Heyraud, A., Barakat, M., et Heulin, T.** (2005) Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterisation of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Res. Microbiol.*, 156 (4): 522-31.
- **Kallioniemi, A., et al.** (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Sciences*, 258: 818-821.
- **Kaneko, T., Nakamura, Y. Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., et Tabata, S.** (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.*, 9 (6):189-197.
- **Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., et Tabata, S.** (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.*, 7 (6): 331-8.
- **Keating, B. A., Strickland, R. W., et Fisher, M. J.** (1986) Salt tolerance of some tropical pasture legumes with potential adaptation to cracking clay soils. *Aust. Agri. Res.*, 26: 181-186.
- **Khbaya, B., Neyra, M., Normand, P., Zerhari, K., et Filali-Maltouf, A.** (1998) Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (12): 4912-4917.
- **Kirchner, O.** (1896) Die Wurzelknollchen der Sojabohne. *Beutr. Biol. Pflanz.*, 7: 213-224.
- **Koide, T., Zaini, P. A., Moreira, L. M., Vencio, R. Z., Matsukuma, A. Y., Durham, A. M., Teixeira, D. C., El-Dorry, H., Monteiro, P. B., da Silva, A. C., Verjovski-Almeida, S., da Silva, A. M., et Gomes, S. L.** (2004) DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a non pathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J. Bacteriol.*, 186: 5442-9.

- **Kosanke, J. W., Robert, M., Osburn, R., et Smith, S.** (1997) Process for preparation of bacterial agricultural products. United States Patent, 5: 695-541.
- **Kovda, V. A.** (1983) Loss of productive land due to salinization. *Ambio*, 12: 91-93.
- **Krasova-Wade, T., Ndoye, I., Braconnier, S., Sarr, B., de Lajudie, P. et Neyra, M.** (2003) Diversity of indigeneous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favourable water conditions in Senegal (West Africa). *Afric. J. Biotech.*, 2 (1): 13-22.
- **Kumar, H., Arora, N. K., Kumar, V., et Maheshwari, D. K.** (1999) Isolation, characterization and selection of salt tolerant rhizobia nodulating *Acacia catechu* and *Acacia nilotica*. *Symbiosis*, 26: 279-288.
- **Kumar Parida Asish et Bandhu Das Anath.** (2005) Salt tolerance and salinity effects on plant: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324-349.
- **Kuykendall, L. M., Saxena, B., Devine, T. E., et Udell, S. E.** (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 38: 501-503.
- **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- **Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., et Amarger, N.** (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol. U.K.*, 147: 981-993.
- **Lal, B., et Khanna, S.** (1995) Selection of salt tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 637-639.
- **Lapage, S. P., Sneath, P. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R., et Clark, W. A.**, (1990) International code of nomenclature of bacteria. American Society of Microbiology, Washington.
- **Larguet A.** (1998) Effet osmoprotecteur d'extrait d'halophytes sur *Rhizobium meliloti*. Thèse de Magister. Université de Sétif, 177p.
- **Le Floch, E., Grossmann, A.** (1998) Les légumineuses spontanées de la flore tunisienne répartition, intérêts et rôle. *Revue de l'INAT. Actes du 1er séminaire international sur les ressources naturelles de la rive sud de la Méditerranée*, 359-385.
- **Le Houérou, H. N.** (1989) Classification écoclimatique des zones arides (s. l.) de l'Afrique du Nord. *Ecolo. Medite.*XV : 3/4.

- **Le Houérou, H. N.** (1980) Les fourrages ligneux en Afrique du Nord. Colloques « Les fourrages ligneux en Afrique » (Le houérou ed.) CIPEA, Addis Abeba, p : 57-67.
- **Le Monde** (2006) Environnement : des déserts menacés et menaçants. Journal le Monde l'Alsace. France.
- **Le Rudulier, D.** (2005) Osmoregulation in rhizobia : the key role of compatible solutes. *Graine Legumes*, 42: 18-19.
- **Le Rudulier, D., et Bernard, T.** (1986) Salt tolerance in *Rhizobium* : a possible role for betaines : *FEMS Microbiol. Rev.*, 39: 67-72.
- **Le Rudulier, D., Ström, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T., et Valentine, R. C.** (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science*, 224: 1064-1068.
- **Le Tacon, F., Obaton, M.,** (1984) Faune et flore du sol : les organismes symbiotiques. *Faune et flore auxiliaires en agriculture. ACTA.*, Paris. 119-133.
- **Lewis, G.P., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., Lock, J. M.** (2003) Legumes of the world Royal botanic gardens, Kew, U. K.
- **Lindström, K.** (1989) *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 365-367.
- **Lioret, J., Balanos, L., et Lucus, M. M.** (1995) Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain. *App. Environ. Microbiol.*, 61: 3701-3074.
- **Liu, J., Wang, E. T., et Chen, W. X.** (2005) Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis recemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28 (5): 465-477.
- **Lloret, L., Ormeno-Orrillo, E., Rincon, R., Martinez-Romero, J., Rogel-Hernandez, M., Antonio et Martinez-Romero, E.** (2007) *Ensifer mexicanum* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico instead of *Sinorhizobium mexicanum* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.*, 30 (4): 280-90.
- **Lloret, J., Wulff, B. B. H., Rubio, J. M., Downie, J. A., Bonilla, I., et Rivilla, R.** (1998) Exopolysaccharides II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1024-1028.
- **Lockhart, D. J., et Winzeler, E. A.** (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405: 827-836.
- **Lortet, G., Mear, N., Lorquin, J., Dreyfus, B., de Lajudie, P., Rosenberg, C., et Boivin, C.** (1996) Nod factor thin-layer chromatography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga*

and *Rhizobium* sp. strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Mol. Plant-Microb Interact.*, 9: 736-747.

- **Lucchini, S., Thompson, A., et Hinton, J. C. D.** (2001) Micro-arrays for microbiologists. *Microbiology.*, 147: 1403-1414.
- **Lucht, J. M., et Bremer, E.** (1994) Adaptation of *Escherichia coli* to high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol. Rev.*, 14 : 3-20.
- **Maâtallah, J., Berraho, E. B., Munoz, S., Sanjuan, J., Lluch, C.** (2002) Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 531-540.
- **Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Qing, Z., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G.** (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 3140-3145.
- **Mandon, K., Ósteras, M., Boncompagni, E., Trinchant, J. C., Spennato, G., Pggi, M. C., et Le Rudulier, D.** (2003) The *Sinorhizobium meliloti* Glycine Betaine biosynthetic genes (betICBA) are induced by choline and highly Expressed in bacteroids. *Mol. Plant Micro. Intera.*, 26 (8): 709-719
- **Mantelin, S., Fischer-Le Saux, M., Zakhia, F., Béna, G., Jeder, H., de Lajudie, P., Cleyet-Marel J. C.** (2006) Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated to plant roots *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov. *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov. *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 827-839.
- **Marmur, J.** (1961) A procedure for the isolation of Deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3: 208-218.
- **Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., et Willems, A.** (2007) Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 489-503.
- **Martinez-Romero, E., Segovia, L., Martins, F., Franco, A. A., Graham, P. H., et Pardo, M. A.** (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 417-426.
- **Mashady, A. S., Salem, S. H., Barakah, F. N., et Heggo, A. M.** (1998) Effect of salinity on survival and symbiotic performance between *Rhizobium meliloti* and *Medicago sativa* L. in Saudi Arabian soils. *Arid Soil. Research and Rehabilitation*, 12 : 3-14.
- **McKey, D.** (1994) Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In: Sprent, D., McKey, eds, advances in legume systematics, Part 5: The nitrogen factor. Royal Botanic Gardens, kew, UK, 211-228.

- **McQuilken, M. P., Halmer, P., et Rhodes, D. J.** (1998) Application of micro organisms to seeds. In: Burges, H.D. (ed.) *Formulation of Microbial Biopesticides*. Kluwer, Dordrecht.
- **Mezni, M. Y., et Sifi, B.** (1996) Réponse des *Medicago* annuelles à deux souches de *R. meliloti* dans le semi-aride Tunisien. *CIHEAM*, 113-117.
- **Mhamdi, R., Mrabet, M., Laguerre, G., Tiwari, R., et Aouani, M. E.** (2005) Colonisation of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Can. J. Microbiol.*, 51: 105-111.
- **Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M., Amarger, N.** (2002) Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS, Microbiol. Ecol.*, 41: 77-84.
- **M'hirit, O., et Maghnoij, M.** (1997) Stratégie de conservation des ressources génétiques forestières au Maroc. In: *Ressources phylogénétiques et développement durable* (eds. Birouk, A., et Rejdali, M.). Actes Editions, Rabat, Maroc, 123-138.
- **Michiels, J., Verreth, C., et Vanderleyden, J.** (1994) Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1206-1212.
- **Minchin, F. R., Witty, J. F., Sheehy, J. E., et Muller, M.** (1983) A major error in the acetylene reduction assay. *J. Exp. Bot.*, 34: 641-649.
- **Miller, K. J., et Wood, J.-M.** (1996) Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50: 101-136;
- **Mohammad, R. M., Akhvan-Kharazian, M., Campbell, W. F., et Rumbaugh, M. D.** (1991) Identification of salt- and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant Soil*, 134: 271-276.
- **Mohammad, R. M., et Campbell, W. F.** (1985) The search for salt tolerant alfalfa/*Rhizobium* Utah. *Science*, 46: 36-37.
- **Moreira, M. S., Cruz, L., Miana de Faria, S., Marsh, T., Martinez-Romero, E., de Oliveira Pedrosa, F., Maria Pitard, R., et Young, P. W.** (2006) *Azorhizobium doebereineræ* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29(3): 197-206.
- **Morot-Gaudry, J-F.** (1997) Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. (Ed.) INRA. Paris, 178p.
- **Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C., et Stepkowski, T.** (2004) Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phyl. Evol.*, 30: 720-732.
- **Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., et Boivin-Masson, C.** (2001) Nodulation of legumes by members of the β subclass of Proteobacteria. *Nat.*, 411: 948-950.

- **Mpeperekwi, S., Makonese, F., et Wollum, A. G.** (1997) Physiological characterisation of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*, 22 : 275-292.
- **Mrabet, M., Mnasri, B., Ben Romdhane, S., Laguerre, G., Elarbi Aouani, M., et Mhamdi, R.** (2006) *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 56(2): 304-309.
- **Mullis, K. B., et Faloona, F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in-Vitro* via, a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
- **Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J.** (2005) Application of Multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiol.*, 151: 2141-2150.
- **Nedjraoui, D.** (1999) Notes de réflexions sur la politique de lutte contre la désertification en Algérie. Rapport, OSS, 34p.
- **Nei, M.** (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- **Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi, S., et Abe, M.** (2004) A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrom* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50 (1): 17-27.
- **Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M., et Lindström, K.** (1999) *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1359-1368.
- **Norman, H. C., Ewing, M. A., Loi, A., Nutt, B. J., Sandral, G. A.** (2002) The pasture and forage industry in the mediterranean bioclimates of Australia. *Cahiers Options méditerranéennes*, 45: 453-476.
- **Normand, P., Cournoyer, B., Simonet, P., et Nazaret, S.** (1992) Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene*, 111: 119-124.
- **Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., Evtushendro, L. et Misra, A. K.** (1996) Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the Family Frankiaceae. *Int. J. Syst. Bact.*, 46: 1-9.
- **Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P., et Fernandez, J.-C.** (1995) Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 640-648.

- **Nour, S., Fernandez, M. P., Normand, P., et Cleyet-Marel, J. C.** (1994) *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L). Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 511-522.
- **Nuti, M. P., et Casella, S.** (1989) Advances in the utilization of rhizobia in arid environments. Arid Soil Research and Rehabilitation, 3: 243-258.
- **N'zoué, A., Domergue, O., Moulin, L., Avarre, J.-C., et de Lajudie, P.** (2007) Tropical legume nodulating bacteria. Mol. Biolog. Tropic. Plants. Sous presse
- **Obaton, et Blachère.** (1965) In: Boullard, B. (1990) Guerre et paix dans le règne végétal. Ed ellipses, France, 336p.
- **Ochman, H., Lawrence, J. G., et Groisman, E. A.** (2000) Lateral transfer and the nature of bacterial innovation. Nature, 405: 299-304.
- **Ogasawa, M., Suzuki, T., Mutoh, I., Annapurna, K., Arora, N. K., Nishimura, Y., et Maheshwari, D. K.** (2003) *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. isolated from tropical legumes, *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. Symbiosis, 34 (1) : 53-68.
- **Ohwada, T., Sasaki, Y., Koike, H., Igawa, K., et Sato, T.** (1998) Correlation between NaCl sensitivity of *Rhizobium* bacteria and ineffective nodulation of leguminous plants. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 62: 2086-2090.
- **Olsen, P. E., Rice, W. A., et Collins, M. M.** (1995) Biological contaminants in North American legume inoculants. Soil Biol. Biochem., 27: 699-701.
- **Ozenda, P.** (1977) Flore du Sahara. 2^e édition, complétée. Paris : Centre national de la recherche scientifique (CNRS).
- **Papastylianou, I.** (1990) The role of legumes in the farming systems of Cyprus. In A. E. Osman, M. H., Ibrahim and Jones, M. A. (eds). The role of legumes in the farming systems of the Mediterranean areas. Kluwers Academic Publishers. Dordrecht/ Boston/ London, 39-9.
- **Parniske, M., Downie, J. A.** (2003) Plant biology: locks, keys and symbioses. Nature, 425: 569-70.
- **Perret, X., Staehelin, C., et Broughton, W. J.** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64: 180-201.
- **Perroux, B., et Le Rudulier, D.** (1985) Glycine betaine transport in *Escherichia coli* : Osmotic modulation. J. Bacteriol., 161: 393-401.
- **Pocard, J.-A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M. C., et Le Rudulier, D.** (1997) Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. Microbiology, 143: 1369-1379.

- **Poljacoff-Mayer, A. D., Symon, E., Jones, G. P., Naidu, B. P., et Paleg, L. G. (1987)** Nitrogenous compatible solutes in native south australian plants. *Aust. J. Plant physiol.*, 14: 341-350.
- **Ponsonnet, C., et Nesme, X. (1994)** Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTI and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.*, 161(4):300-309..
- **Pouget, M. (1971)** Etude géopédologique du bassin du Zahrez Rharbi (feuille du rocher du sel), Alger, 158p.
- **Priefer, U. B., Aurag, J., Boesten, B., Bouhmouch, I., Defez, R., Filali-Maltouf, A., Miklis, M., Moawad, H. et al. (2001)** Characterisation of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J. Biotech.*, 91: 223-236.
- **Provorov, N. A. (1994)** The interdependence between taxonomy of legumes and specificity of their interaction with rhizobia in relation to evolution of the symbiosis. *Symbiosis*, 24: 183-200.
- **Prosperi, J.-M., Jenczewski, E., Angevain, M., Ronfort, J. (2006)** Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. *Gen. Res. Crop Evol.*, 53: 843-856.
- **Prosperi, J. M., Guy, P., Genier, G., et Angevain, M. (1995)** Les luzernes ou le genre *Medicago*. In *Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon*. (Ed.) INRA, France, 131-140.
- **Qadir, M., Ghafoor, A., et Murtaza, G. (2000)** Amelioration strategies for saline soils : a review. *Land Degrad. Develop.*, 11: 501-521.
- **Qadir, M., Qureshi, R. H., et Ahmed, N. (1996)** Reclamation of saline-sodic soil by gypsum and *Leptochloa fusca*. *Geoderma*, 74: 207-217.
- **Quan, Z.-X., Bac, H.-S., Back, J.-H., Chen, W.-F., Im, W.-T., et Lee, S.-T. (2005)** *Rhizobium daejeonense* sp. nov., isolated from a cyanide treatment bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 2543-2549.
- **Quézel, P. (1978)** Analysis of the flora of the mediterranean and saharan Africa. *Ann. Missouri Botan. Gard*, 65: 475-534
- **Quézel, P., et Santa, S. (1962)** Nouvelle flore de l'Algérie. *TI. ED. CNRS, Paris VII.*
- **Quézel, P., et Simonneau, P. (1960)** Quelques aspects de la végétation des terrains salés des plaines sublittorales de l'Oranie orientale. *DSER Végétation*, 12 : 1-27.
- **Radeva, G., Jurgens, G., Niemi, M., Nick, G., Suominen, L., et Lindström, K (2001)** Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species: biovar *orientalis* and biovar *officinalis*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 24: 192-205.

- **Ramsar** (1971) Convention sur les zones humides des régions arides. Iran.
- **Räsänen, L. A., Elväng, A. M., Jansson, J., et Lindström, K.** (2001) Effect of heat stress on cell activity and cell morphology of the tropical rhizobium, *Sinorhizobium arboris*. FEMS Microbiol. Ecol., 34: 267-278.
- **Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., et Vivekanandan, M.** (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J. Plan. Physiol., 161: 1189-1202.
- **Requena, N., Perz-Solis, E., Azcon-Aguilar, C., Jeffries, P., et Barea, J-M.** (2001) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. Appl. Environ. Microbiol., 67 (2): 495-498.
- **Revellin, C., Meunier, G., Giraud, J. J., Sommer, G., Wadoux, P. et Catroux, G.** (2000) Changes in the physiological and agricultural characteristics of peat-based *Bradyrhizobium japonicum* after long-term storage. Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 206-211.
- **Rhodes, D., et Nadolska-Orczyk, A.** (2001) Plant stress physiology. Encyclopedia of life Sciences, 1-7.
- **Rinaudo, G., Orenza, S., Fernandez, M., Meugnier, H., et Bardin, R.** (1991) DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem and root nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 114-120.
- **Rivas, R., Willems, A., Palomo, J. L., Garcia-Benavides, P., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Gillis, M., et Velázquez, E.** (2004) *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. Int. J. syst. Evol. Microbiol., 54 (4): 1271-1275.
- **Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N., Mateos, P. F., Dazzo, F. B., Martinez-Molina, E., Gillis, M., et Velázquez, E.** (2003) Description of *Devosia neptunia* sp. nov., that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. Syst. Appl. Microbiol., 26: 47-53.
- **Roberts, G. P., Leps, W. T., Silver, L. E., et Brill, W. J.** (1980) Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol., 39: 414-422.
- **Robinson, S. P., et Jones, G. P.** (1986) Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. Aust. J. Plant physiol., 13: 659-668.
- **Robson, A. D., et Bottomley, P. J.** (1991) Limitations in the use of legumes in agriculture and forestry, p. 320-349. In M. J. Dilworth and A. R. Glenn (ed.), Biology and Biochemistry of nitrogen fixation. Elsevier Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

- **Rogel, M. A., Hernandez-Lucas, I., Kuykendall, L. D., Balkwill, D. L., et Martinez-Romero, E.** (2001) Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harbouring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(7): 3264-3268.
- **Rognon, P.** (1996) Sécheresse et aridité : leur impact sur la désertification au Maghreb. *Science et changements planétaires/ Sécheresse*, 7 (4) : 287-297.
- **Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., et Cleyet-Marel, J-C.** (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 972-980.
- **Saitou, N., Nei, M.** (1987). The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4), 406-425.
- **Sanginga, N., Wirkom, L. E., Okogun, A., Akobundu, I. O., Carsky, R. J., et Tian, G.** (1996) Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and legumes in Guinea savanna in Nigeria. *Biol. Fertil. Soils*, 23 : 441-448.
- **Sarr, A., Dioup, B., Peltier, R., Neyra, M., Lesueur, D.** (2005) Effect of rhizobial inoculation methods and host plant provenances on nodulation and growth of *A. senegal* and *A. nilotica*. *News Forests*, 29 (1): 75-87.
- **Schleifer, K. H., et Ludwig, W.** (1989) Phylogenetic relationships of bacteria. The hierarchy of life. Sous la direction de: Fernholm, B., Bremer, K., Jörnvall, H. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 103-117.
- **Scholla, M. H., et Elkan, G. H.** (1984) *Rhizobium fridii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 484-486.
- **Schouls, L. M., Schot, C. S., Jacobs, J. A.** (2003) Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *J. Bacteriol.*, 185: 7241-7246.
- **Sebbane, N., Sahnoune, M., Zakhia, F., Willems, A., Benallaoua, S., et de Lajudie, P.** (2006) Phenotypical and genotypical characteristics of root nodulating bacteria isolated from annual *Medicago* spp. in Soummam Valley (Algeria). *Let. Appl. Microbiol.*, 42: 235-241.
- **Segovia, L., Young, J. P. W., et Martinez-Romero, E.** (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 374-377.
- **Seklani, H., Zoghlami, A., Mezni, M., Hassen, H.** (1996) Synthèse des travaux de recherche réalisés sur les *Medicago* à l'institut nationale de la recherche agronomique de Tunisie. *CEHEAM*. 31-37.
- **Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., et Whittam, T. M.** (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 873-884.

- **Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L.-E., Martinez-Romero, E., et Souza, V. (2003)** *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 884-893.
- **Simonneau, P. (1952)** La végétation halophile de la plaine de Perregaux; Alger: Direction des services de la colonisation et de l'hydraulique, 279p.
- **Söller, R., Hirsch, P., Blohm, D., et Labrenz, M. (2000)** Differentiation of newly described Antarctic bacterial isolates related to *Roseobacter* species based on 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 909-915.
- **Soltner, D. (2005)** Les bases de la production végétale. Tome I (le sol et son amélioration). Collection sciences et techniques agricoles. 24^{ème} ed., 472 p.
- **Somasegaran, P., et Hoben, H. J. (1994)** Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. ISBN 0387-94134-7, Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- **Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T., et Le Rudulier, D. (1988)** Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 170: 3142-3149.
- **Soussi, M., Santamaria, M., Ocana, A., et Liuch, C. (2001)** Effects of salinity on protein and Lipopolysaccharide pattern in α salt tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. *J. Appl. Microbiol.*, 90: 476-481.
- **Sprent, J. I. (1995)** Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil. Biol. Biochem.*, 27: 401-407.
- **Sprent, J. L., et Sprent, P. (1990)** Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- **Squartini, A., Struffi, P., Doring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velazquez, E., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Dazzo, F. B., Casella, S., et Nuti, M. P. (2002)** *Rhizobium sullae* sp. nov. (Formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52 (PT 4): 1267-1276
- **Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. Kampfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trupper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., et Whitman, W. B. (2002)** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1043-1047.
- **Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994)** Taxonomic note: a place of DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence Analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 846-849.

- **Stepkowski, T., Czaplinska, M., Miedzinska, K., et Moulin, L.** (2003) The variable part of the dnaK gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 26: 483-494.
- **Styrvold, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M. W., Borjensen, T., et Ström, A. R.** (1986) Selection, mapping and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J. Bacteriol.*, 165: 856-863.
- **Subba-Rao, N. S., Lakshmi-Kumari, M., et Magu, S. P.** (1972) Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Indian. J. Agric. Sci.*, 42: 384-386.
- **Susheng, Y., Jing, Z., et Jilun, L.** (1993) The osmoregulation of *Sinorhizobium fredii*. *Acta. Microbiol. Sin.*, 33: 86-91.
- **Suzuki, K., Goodfellow, M., et O'Donnell, A. G.** (1993) Cell envelopes and classification. *Handbook of new bacterial systematics*. Sous la direction de: Goodfellow, M., et O'Donnell, A. G. Academic Press, Ltd., London, P: 195-250.
- **Swofford, D. L.** (2002). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- **Sy, A.** (2001) Caractérisation de *Methylobacterium nodulans* : une nouvelle espèce bactérienne nodulant les crotalaires. Université Claude Bernard - Lyon I. 193 p.
- **Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., et Dreyfus, B.** (2001). Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.*, 183: 214 -220.
- **Szabolcs, I.** (1994) Soils and salinisation. In: M. Passarak eds, *Plant and crop stress*. New York-Basel-Hong Kong, 3-13.
- **Talamucci, P., et Chaulet, C.** (1989) Contraintes et evolution des ressources fourrageres dans le Bassin Méditerranéen. In Proc. Of 17th Intern. Rang. Congr., Nice, France, 1: 1731-1740.
- **Tan, Z. Y., Kan, F. L., Peng, G. X., Wang, E. T., Reinholdt-Hurek, B., et Chen, W. X.** (2001) *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 909-914.
- **Tanji, K. K.** (1990) Nature and extent of agricultural salinity. In: *Agricultural Salinity Assesment and Management*, Tanji, K. K. (ed.). *Manuals and Reports on Engineering Practices No. 71*. American Society of Civil Engineers: New York; 1-17.
- **Tao, H., Brewin, N. J., et Noel, K. D.** (1992) *Rhizobium Leguminosarum* CFNH2. Lipopolysaccharide antigenic changes induced by enviromental conditions. *Bacteriol.*, 174: 2222-2229.

- **Tate, R. L.** (1995) Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation), p: 307-333. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- **Tazi, M.** (1999) Forage and pasture seed production and supply in the near east and north Africa. Workshop on sees policy and programs in the N. A. Cyprus, 27/6-2/7.
- **Toledo, I., Lloret, L., Martinez-Romero, E.** (2003) *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. Syst. Appl. Microbiol. 26, 54-64.
- **Tremblin, G.** (2000) Comportement auto-écologique de *Halopeplis amplexicaulis* : plante pionnière des sebkhas de l'Ouest algérien. Sciences et changements planétaires. Sécheresse, 11(2): 109-16.
- **Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.-M., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., et Velázquez, E.** (2005) Nodulation of *Lupinus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol., 71: 1318-1327.
- **Trüper, H. G., et de Clari, L.** (1997) Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) in "apposition". Int. J. Syst. Bacteriol., 47: 908-909.
- **Turner, S. L., Zhang, X., Li, F., et Young, J. P. W.** (2002) What does bacterial genome sequence represent? Misassignment of MAFF 303099 to the genospecies *Mesorhizobium loti*. Microbiology, 148: 3330-3331.
- **Turner, S. L., et Young, J. P. W.** (2000) The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. Mol. Biol. Evol., 17: 309-319.
- **Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T., et Kataoka, M.** (1999) Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. J. Bacteriol., 181: 78-82.
- **UNCCD** (1995) Down to Earth: A simplified guide to Covention to Combat Desertification, why it is necessary and what is important and different about it. Bonn, Germany, Secretariat for the United Nations Convention to Combat Desertification.
- **Upchurch, R. G., et Elkan, G. H.** (1977) Comparison of colony morphology, salt tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum*. Can. J. Microbiol., 23: 1118-1122.
- **Ursing, J. B., Rossellomora, R. A., Garciavaldes, E. et Lalucat, J.** (1995) Taxonomic note- a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. Int. J. Syst. Bacteriol., 45: 604.
- **USDA en ligne.** The United States Department of Agriculture website provides suitable global information about agricultural issues. Available en ligne at: <http://www.usad.gov>
- **Ussery, D. W.** (2004) Genome Update : 161 prokaryotic genomes sequenced, and counting. Microbiol., 150: 261-263.

- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., et Velázquez, E. (2006) *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. Int J Syst Evol Microbiol., 56 (2006): 2631-2637.
- Valverde, A., Velázquez, E., Fernandez-Santos, F., Vizeaino, N., Rivas, R., Gillis, M., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Igual, J. M., et Williams, A. (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. Nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 1985-1989.
- Valverde, A., Velázquez, E., Gutierrez, C., Cervantes, E., Ventoza, A., Igual, J. M. (2003) *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53 (6): 1979-83.
- van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S. Lindström, K., Eardly, B. D. (2003) Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. J. Bacteriol., 185: 2988-2998.
- van Berkum, P., et Eardly, B. D. (2002) The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. Appl. Environ. Microbiol., 68: 1132-1136.
- van Berkum, P., et Fuhrmann, J.-J. (2000) Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and Internal transcribed spacer region sequence divergence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50: 2165-2172.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.-M., De Vos, P., et Willems, A. (2003) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol., 25: 507-512.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., et Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev., 60: 407-438.
- Van der Heijden, M. G. A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T. R., Rutten, M., van Logtestijn, R., et Staehelin, C. (2006) Symbiotic bacteria as determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. FEMS Microbiol. Ecol., 56: 178-187.
- Vanechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E., et Verschraegen, G. (2004) *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *syzygii* (Roberts *et al.*, 1990) comb. nov. Int. J. System. Evol. Microbiol., 54: 317-327.
- van Veen, R. J. M., den Dulk-Ras, H., Bisseling, T., Schilperoort, R. A., et Hooykaas, P. J. J. (1988) Crown gall tumor and root nodule formation by the bacterium *Phyllobacterium myrsinocarum* after the introduction of an *Agrobacterium* Ti plasmid or a *Rhizobium* Sym plasmid. Mol. Plant-microbe. Interact, 1: 231-234.

- Velázquez, E., Igual, J. M., Willems, A., Fernández, M. P., Muñoz, E., Mateos, P. F., Abril, A., Toro, N., Normand, P., Cervantes, E., Gillis, M., et Martínez-Molina, E. (2001) Description of *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 1011-1021.
- Villegas, M. D. C., Rome, S., Maure, L. et al. (2006) Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. *laciniata*) of *S. meliloti*. *Syst. Appl. Microbiol.* In press.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria, pp. 73 – 97, in: International Biological Programme Handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford.
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., J. Bedmar, E., Martínez-Romero, E. (2005a) Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28: 702-716.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., et Martínez-Romero, E. (2005b) 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.
- Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., et Martínez-Romero, E. (2005c) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoideae*: *Genisteae*) growing in the canary Islands, along with *B. japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies α and *Bradyrhizobium* genospecies β . *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 569-575.
- Vitrey, V., Fettel, A., et Droughton, W. J. (2000) FROST-FRAME INVASION BY RHIZOBIA. *Subcellular Biochemistry*, volume 33: Bacteria invasion into Eukaryotic cells, Oelschaeger and Hacker (ed.). Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.
- Wadisirisuk, P., Danso, S. K. A., Hardarson, G., et Bowen, G. D. (1989) Influence of *Bradyrhizobium japonicum* location and movement on nodulation and nitrogen fixation in soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1711-1716.
- Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Reinhold-Hurek, B., et Martínez-Romero, E. (2002) *Sinorhizobium morelense* sp. nov., isolated from *Leucaena leucocephala* that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int. J. Syst. Microbiol.*, 52: 1687-1693.
- Wang, E. T., Rogel, M. A., Garcia-de los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M. A., et Martínez-Romero, E. (1999a) *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1479-1491.

- Wang, E.T., Van Berkum, P., Sui, X. H., Beyne, D., Chen, W. X., et Martinez-Romero, E. (1999b) Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from chine soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. Int. J.Syst. Bacteriol., 49: 51-65.
- Wang, E. T., Van Berkum, P., Beyne, D., Sui, X. H., Dorado, O., Chen, W. X. et Martinez-Romero, E. (1998) *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galega*. Int. J. Syst. Bacteriol., 48: 687-699.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., et Truper, H. G. (1987) Report of the Ad Hoc Committee on the Reconciliation Approaches to Bacterial Systematics. Int. J. Syst. Bacteriol., 463-464.
- Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Hans, S. Z., et Chen, W. X. (2003) Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 1575-1583.
- Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., et Chen, W. X. (2002) *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52: 2231-2239.
- Chen, W.-M., Euan, K., James, Coenye, T., Chou, J.-H., Barrios, E., de Faria, S., M., Geoffrey, N., Elliott, Sheu, S.-Y., Sprent, J. I., et Vandamme, P. (2006) *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56: 1847-1851.
- Wertz, J. E., Goldstone, C., Gordon, D. M., et Riley, M. A. (2003) A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. J. Evol. Biol., 16: 1236-1248.
- Willems, A. (2000) The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant and Soil, 227: 5-14.
- Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., et Gillis, M. (2001a) DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 1315-22.
- Willems, A., Coopman, R., et Gillis, M. (2001b) Comparison sequence analysis of 16S-23S spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. Int. J. Syst; Evol. Microbiol., 51: 623-632.
- Willems, A., Munive, A., de Lajudie, P., et Gillis, M. (2003) In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. System. Appl. Microbiol., 26: 203-210.
- Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Munoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martinez-Romero, E., Toro, N., et Gillis, M. (2003a) Description of new *Ensifer* strains

- from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 53: 1207-1217.
- **Woese, C. R.** (1991) Prokaryote systematics: the evolution of a science. The prokaryotes. Sous la direction de: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., et Schleifer, K. H. Vol 1. Springer, New York, p: 3-18.
 - **Woese, C. R.** (1987) Bacterial Evolution. *Rev. Microbiol.*, 51: 221-271.
 - **Woese, C. R., et Fox, G. E.** (1977) Phylogenetic structure of the procaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 5088-5090.
 - **World Ressources** (1987) World Ressources Institute and the International Institute for Environment and Development. Basic Books, New York.
 - **Wullstein, L. H.** (1989) Evaluation and significance of associative dinitrogen fixation for arid soil rehabilitation. *Arid Soil. Res. Rehabil.*, 3: 259-265.
 - **Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li., et Fan, H.** (1995) *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 706-711.
 - **Yahia, N., et Fyad-Lameche, F. Z.** (2003) Evaluation de la variabilité de jeunes plants de *Medicago* soumis à un régime de basse température. *Acta. Bot. Gallica.*, 150 (1): 3- 17.
 - **Yahiaoui, S., et Abdelguerfi, A.** (1995) Comportement et phénologie d'une espèce annuelle de luzerne : *Medicago orbicularis* (L.) Bart. Colloque sur les systèmes sylvopastoraux. Dans Cahier Options Méditerranéennes, 12: 25-28.
 - **Yao, Z. Y., Kan, F. L., Wang, E. T., Wei, G. H., et Chen, W. X.** (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 52: 2219-2230.
 - **Yap, S. F., et Lim, S. T.** (1983) Rspnse of *Rhizobium* sp. UMKL 20 to sodium chloride stress. *Arch. Microbiol.*, 135: 224-228.
 - **Yassoglou, N. J.** (2000) History of desertification in the European Mediterranean. Pp. 9-15 in Enne, G., D'Angelo, M. and Zanolla, C. (eds) Indicators for Assessing Desertification in the Mediterranean. Proceedings of the International Seminar held in Porto Torres, Italy, 18-20 september, 1998. Sassari Italy: University of Sassari Nucleo Ricerca Desertificazione.
 - **Yeo, A. R., Lee, K. S., Izard, P., Boursier, P. J., et Flowers, T. J.** (1991) Short and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.*, 42: 881-9.

- **Young, J. P. W., Crossman, L. C., Johnston, A. W. B., Thomson, N. R., Ghazoui, Z. F. et al.** (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology*, 7 (4): R34.
- **Young, J. M., Park, D-C., et Weir, B. S.** (2004) Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determinations. *FEMS Microbiol. Let.*, 238 (1): 125-131.
- **Young, J. M.** (2003) The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982. Is the combination *Sinorhizobium adhaerens* (Casida 1982) Willems et al., 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 2107-2110.
- **Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A et Sawada, H.** (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and there inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium undicola* and *Rhizobium vitis*. *Int. J. Syst. Evolutionary Microbiol.*, 51 : 89-103.
- **Young, J. P. W., Downer, H. L., et Eardly, B. D.** (1991) Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* BTAIL by polymerase chain reaction based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.*, 173: 2271-2277.
- **Young, J. P., et Johnston, A. W. B.** (1989) The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Trends Evol.*, 4: 341-348.
- **Zahran, H. H.** (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an Arid climate. *Microbiol. Molec. Biolog. Rev.*, 63 (4): 968-989.
- **Zahran, H. H.** (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol. Fertil. Soils*, 25: 211-223.
- **Zahran, H. H., Ahmed, M. S., et Afkar, E. A.** (1995) Isolation and characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic bacteria from saline soils of Egypt. *J. Basic Microbiol.*, 35: 269-275.
- **Zahran, H. H., Karsitol, A. M., et Lindström, K.** (1994) Alternation of lipopolysaccharides and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *Word J. Microbiol. Biotech.*, 10: 100-105.
- **Zahran, H. H.** (1991a) Variation in growth of three Egyptian strains of *Rhizobium leguminosarum* grown under sodium chloride and ammonium nitrate treatments. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ.*, 20: 161- 169.
- **Zahran, H. H.** (1991b) Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil. Soils*, 12: 73-80.

- **Zakhia, F., et de Lajudie, P.** (2006a) La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol.*, 52: 169-181.
- **Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Dreyfus, B., et de Lajudie, P.** (2006b) Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microb. Ecol.*, 51: 375-393.
- **Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.-C. , Gillis, M., Dreyfus, B., et de Lajudie, P.** (2004) Characterisation of Legume-Nodulating Bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. *Syst. and Appl. Microbiol.*, 27: 380-395.
- **Zakhia, F.** (2004) Diversité des bactéries hôtes de légumineuses méditerranéennes en Tunisie et au Liban. PHD thesis. Université de MontpellierII, 200p.
- **Zeigler, D. R.** (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J., Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1893-1900.
- **Zerhari, K., Aurag, J., Khbaya, B., Kharchaf, D., Filali-Maltouf, A.** (2000) Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the Arid and Saharan regions of Morocco. *Letters Appl. Microbiol.*, 30 (5): 351-357.
- **Zhao, Z., Williams, S. E., et Schuman, G. E.** (1997) Renodulation and characterization of *Rhizobium* isolates from cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). *Biol. Fertil. Soils*, 25: 169-174.
- **Zhang, K., Harper, R., Karsisto, M., et Lindström, K.** (1991) Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 104-113.
- **Zhou, J.** (2003) Microarrays for bacterial detection and microbial. Community analysis. *Corr. Opin. Microbiol.*, 6: 288-94.
- **Zribi, K., Mhamdi, R., Huguet, I., Aouani, M. E.** (2005) Diversity of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* nodulating *Medicago truncatula* according to the host and soil origins. *World. J. Microbiol. Biotech.*, 20 (6-7): 1009-1015.
- **Zwick, M. E., Mcfee, F., Cutler, D. J., Read, T. D., Ravel, J., Bowman, G. R., Galloway, D. R., et Mateczun, A.** (2005) Microarray-based sequencing of multiple *Bacillus anthracis* isolates. *Genome Biol.*, 6: R 10.



Annexes

Annexe 1 (Chapitre II)

Protocole de purification du fragment amplifié, sur colonne avec le kit « QIAquick Gel Extraction Kit » (Quiagen)

- Peser les fragments de gel d'agarose (dans les tubes).
- Ajouter 3 volume de tampon QG (μl) pour volume de gel (mg).
- Incuber a 50°C pendant 10 minutes en agitant vigoureusement toutes les 2 minutes.

Ce tampon permet la solubilisation de l'agarose et augmente l'affinité de l'ADN pour la membrane de la colonne QIAquick spin.

Lorsque le gel est complètement dissous, vérifier que la couleur du mélange est jaune. Si la couleur est orange ou violet, ajouter $10 \mu\text{l}$ de la solution d'acétate de sodium 3 M PH 5 et mélanger. L'adsorption de l'ADN à la membrane QIAquick n'est efficace qu'à un $\text{pH} < 7,5$. Le tampon QG contient un indicateur de pH qui vire au jaune pour des $\text{pH} < 7,5$ et devient orange ou violet pour des pH plus basiques.

- Ajouter 1 volume d'isopropanol correspondant au volume du gel de départ et mélanger. Ce produit fait précipiter l'ADN. ne pas centrifuger a cette étape.
- Placer une colonne QIAquick sur un tube collecteur de 2ml.
- Transférer a l'aide d'une pipette a mixture sur la colonne (volume maximum de colonne 800 μl ; au delà, répéter l'étape suivant le nombre de fois suffisant).
- Centrifuger pendant 1 mn à 14000 tours par minute, puis vider le tube collecteur.
- Remettre la colonne sur le même tube, puis ajouter 0,5 ml de tampon QG. Ceci a pour but d'éliminer les éventuels reste d'agarose.
- Centrifuger pendant 1 mn à 14000 tours par minute. Le filtrat est jeté.
- Ajouter 0,75 ml de tampon PE pour laver la colonne et laisser reposer 2 à 5 minutes.
- Centrifuger pendant 1 mn à 14000 tours par minute, puis vider le tube collecteur.
- Centrifuger a nouveau pendant 1 mn à 14000 tours par minute, puis placer la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Pour éluer l'ADN, ajouter 50 μl de tampon EB (10mM tris-Cl pH 8,5 au centre de la membrane QIAquick, attendre 1 mn et centrifuger pendant 1 mn à 14000 tours par minute.
- Jeter la colonne.
- L'ADN est conservé à -20°C .

Annexe 2 (Chapitre II)

Alignements des séquences de l'ADNr16S de 12 espèces de référence d'*Ensifer* avec indication en couleur de la zone du gène utilisé en séquençage partiel (position 440- 1031pb) et qui représente la région la plus variable entre les *Ensifer* spp. (*Sinorhizobium* spp.).

Name: fredii	Len: 1491	Check: 4122	Weight: 1.00
Name: medicae	Len: 1491	Check: 2280	Weight: 1.00
Name: meliloti	Len: 1491	Check: 4035	Weight: 1.00
Name: saheli	Len: 1491	Check: 5545	Weight: 1.00
Name: terangae	Len: 1491	Check: 7062	Weight: 1.00
Name: arboris	Len: 1491	Check: 4364	Weight: 1.00
Name: kostiense	Len: 1491	Check: 4070	Weight: 1.00
Name: kummerowiae	Len: 1491	Check: 4166	Weight: 1.00
Name: morelense	Len: 1491	Check: 7023	Weight: 1.00
Name: xinjiangense	Len: 1491	Check: 2356	Weight: 1.00
Name: sino_ensifer	Len: 1491	Check: 7882	Weight: 1.00
Name: SMC	Len: 1491	Check: 4111	Weight: 1.00

	1	50
E. frediiAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA	
E. medicaeAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA	
E. melilotiAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA	
E. saheliAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA	
E. terangaeAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA	
E. arborisaac gaacgctggc ggcaggctta	
E. kostienseaac gaacgctggc ggcaggctta	
E. kummerowiaeaac gaacgctggc ggcaggctta	
E. morelenseaac gaacgctggc ggcaggctta	
E. xinjiangenseta	
E. sino_ensifergc ggcaggctta	
SMC	CAACTTGAGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA	

	51	100
fredii	ACACATGCAA GTCGAGCGCC CCGCAAGGGG AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA	
medicae	ACACATGCAA GTCGAGCGCC CCGCAAGGGG AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA	
meliloti	ACACATGCAA GTCGAGCGCC CCGCAAGGGG AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA	
saheli	ACACATGCAA GTCGAGCGCG TGGCAATACG AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA	
terangae	ACACATGCAA GTCGAGCGCG TAGCAATACG AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA	
arboris	acacatgcaa gtcgagcgcc ccgcaagggg agcggcagac gggtgagtaa	
kostiense	acacatgcaa gtcgagcgcc ccgcaagggg agcggcagac gggtgagtaa	
kummerowiae	acacatgcaa gtcgaacgcc cggcaagggg agcggcagac gggtgagtaa	
morelense	acacatgcaa gtcgagcgcc c.gcaagggg agcggcagac gggtgagtaa	
xinjiangense	acacatgcaa gtcgagcgcc ccgcaagggg agcggcagac gggtgagtaa	
sino_ensifer	acacatgcaa gtcgagcgcc ccgcaagggg agcggcagac gggtgagtaa	
SMC	ACACATGCAA GTCGAGCGCC CCGCAAGGGG AGCGGCAGAC GGGTGAGTAA	

	101		150
fredii	CGCGTGGGAA	TCTACCCTTT	TCTACGGAAT AACGCAGGGA AACTTGTGCT
medicae	CGCGTGGGAA	TCTACCCTTT	TCTACGGAAT AACGCAGGGA AACTTGTGCT
meliloti	CGCGTGGGAA	TCTACCCTTT	TCTACGGAAT AACGCAGGGA AACTTGTGCT
saheli	CGCGTGGGAA	TCTACCCTTT	TCTACGGAAT AACGCAGGGA AACTTGTGCT
terangae	CGCGTGGGAA	TCTACCCTTT	TCTACGGAAT AACGCAGGGA AACTTGTGCT
arboris	cgcggtggaa	tctacccttt	tctacggaat aacgcaggga aacttgtgct
kostiense	cgcggtggaa	tctacccttt	tctacggaat aacgcaggga aacttgtgct
kummerowiae	cgcggtggaa	cgtacccttt	actacggaat aacgcaggga aacttgagct
morelense	cgcggtggaa	tctacccttt	tctacggaat aacgcaggga aacttgtgct
xinjiangense	cgcggtggaa	tctacccttt	tctacggaat aacgcaggga aacttgtgct
sino_ensifer	cgcggtggaa	tctacccttt	tctacggaat aacgcaggga aacttgtgct
SMC	CGCGTGGGAA	TCTACCCTTT	TCTACGGAAT AACGCAGGGA AACTTGTGCT

	151		200
fredii	AATACCGTAT	GAGCCCTTCG	GGGAAAGAT TTATCGGGAA AGGATGAGCC
medicae	AATACCGTAT	AAGCCCTTCG	GGGAAAGAT TTATCGGGAA AGGATGAGCC
meliloti	AATACCGTAT	GAGCCCTTCG	GGGAAAGAT TTATCGGGAA AGGATGAGCC
saheli	AATACCGTAT	GAGCCCTTCG	GGGAAAGAT TTATCGGGAA AGGATGAGCC
terangae	AATACCGTAT	ACGCCCTTTT	GGGAAAGAT TTATCGGAGA AGGATGAGCC
arboris	aataccgtat	aagcccttcg	gggaaagat ttatcgggaa aggatgagcc
kostiense	aataccgtat	acccccttcg	gggaaagat ttatcggaga aggatgagcc
kummerowiae	aataccgtat	gtgcccttcg	gggaaagat ttatcggtaa aggatcagcc
morelense	aataccgtat	gagcccttcg	gggaaagat ttatcgggaa aggatgagcc
xinjiangense	aataccgtat	gaacccttcg	gggaaagat ttatcgggaa aggatgagcc
sino_ensifer	aataccgtat	acgcccttcg	gggaaagat ttatcgggaa aggatgagcc
SMC	AATACCGTAT	GAGCCCTTCG	GGGAAAGAT TTATCGGGAA AGGATGAGCC

	201		250
fredii	CGCGTTGGAT	TAGCTAGTTG	GTGGGGTAAA GGCCTACCAA GGCGACGATC
medicae	CGCGTTGGAT	TAGCTAGTTG	GTGGGGTAAA GGCCTACCAA GGCGACGATC
meliloti	CGCGTTGGAT	TAGCTAGTTG	GTGGGGTAAA GGCCTACCAA GGCGACGATC
saheli	CGCGTTGGAT	TAGCTAGTTG	GTGGGGTAAA GGCCTACCAA GGCGACGATC
terangae	CGCGTTGGAT	TAGCTAGTTG	GTGGGGTAAA GGCCTACCAA GGCGACGATC
arboris	cgcgttggat	tagctagttg	gtggggtaaa ggcctaccaa ggcgacgac
kostiense	cgcgttggat	tagctagttg	gtggggtaaa ggcctaccaa ggcgacgac
kummerowiae	cgcgttggat	tagctagttg	gtggggtaaa ggcctaccaa ggcgacgac
morelense	cgcgttggat	tagctagttg	gtggggtaaa ggcctaccaa ggcgacgac
xinjiangense	cgcgttggat	tagctagttg	gtggggtaaa ggcctaccaa ggcgacgac
sino_ensifer	cgcgttggat	tagctagttg	gtggggtaaa ggcctaccaa ggcgacgac
SMC	CGCGTTGGAT	TAGCTAGTTG	GTGGGGTAAA GGCCTACCAA GGCGACGATC

	251		300
fredii	CATAGCTGGT	CTGAGAGGAT	GATCAGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC
medicae	CATAGCTGGT	CTGAGAGGAT	GATCAGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC
meliloti	CATAGCTGGT	CTGAGAGGAT	GATCAGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC
saheli	CATAGCTGGT	CTGAGAGGAT	GATCAGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC
terangae	CATAGCTGGT	CTGAGAGGAT	GATCAGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC

arboris catagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg agacacggcc
kostiense catagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg agacacggcc
kummerowiae catagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg agacacggcc
morelense catagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg agacacggcc
xinjiangense catagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg agacacggcc
sino_ensifer catagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg agacacggcc
SMc CATAGCTGGT CTGAGAGGAT GATCAGCCAC ATTGGGACTG AGACACGGCC

301

351

fredii CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAA
medicae CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAA
meliloti CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAA
saheli CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAA
terangae CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAA
arboris caaactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaa
kostiense caaactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaa
kummerowiae caaactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaa
morelense caaactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaa
xinjiangense caaactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaa
sino_ensifer caaactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaa
SMc CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGGACAA TGGGCGCAA

351

401

fredii CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGAGTGATGA AGGCCCTAGG GTTGTAAGC
medicae CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGAGTGATGA AGGCCCTAGG GTTGTAAGC
meliloti CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGAGTGATGA AGGCCCTAGG GTTGTAAGC
saheli CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGAGTGATGA AGGCCCTAGG GTTGTAAGC
terangae CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGAGTGATGA AGGCCCTAGG GTTGTAAGC
arboris cctgatccag ccatgccgcg tgagtgatga aggccctagg gttgtaaagc
kostiense cctgatccag ccatgccgcg tgagtgatga aggccctagg gttgtaaagc
kummerowiae cctgatccag ccatgccgcg tgagtgatga aggccctagg gttgtaaagc
morelense cctgatccag ccatgccgcg tgagtgatga aggccctagg gttgtaaagc
xinjiangense cctgatccag ccatgccgcg tgagtgatga aggccctagg gttgtaaagc
sino_ensifer cctgatccag ccatgccgcg tgagtgatga aggccctagg gttgtaaagc
SMc CCTGATCCAG CCATGCCGCG TGAGTGATGA AGGCCCTAGG GTTGTAAGC

401

451

fredii TCTTTCACCG GTGAAGATAA TGACGGTAAC CGGAGAAGAA GCCCCGGCTA
medicae TCTTTCACCG GTGAAGATAA TGACGGTAAC CGGAGAAGAA GCCCCGGCTA
meliloti TCTTTCACCG GTGAAGATAA TGACGGTAAC CGGAGAAGAA GCCCCGGCTA
saheli TCTTTCACCG GTGAAGATAA TGACGGTAAC CGGAGAAGAA GCCCCGGCTA
terangae TCTTTCACCG GTGAAGATAA TGACGGTAAC CGGAGAAGAA GCCCCGGCTA
arboris tctttcaccg gtgaagataa tgacggtaac cggagaagaa gccccggcta
kostiense tctttcaccg gtgaagataa tgacggtaac cggagaagaa gccccggcta
kummerowiae tctttcaccg gtgaagataa tgacggtaac cggagaagaa gccccggcta
morelense tctttcaccg gtgaagataa tgacggtaac cggagaagaa gccccggcta
xinjiangense tctttcaccg gtgaagataa tgacggtaac cggagaagaa gccccggcta
sino_ensifer tctttcaccg gtgaagataa tgacggtaac cggagaagaa gccccggcta

SMc TCTTTCACCG GTGAAGATAA TGACGGTAAC CGGAGAAGAA GCCCCGGCTA

451

500

fredii ACTTCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGAA GGGGGCTAGC GTTGTTCGGA
medicae ACTTCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGAA GGGGGCTAGC GTTGTTCGGA
meliloti ACTTCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGAA GGGGGCTAGC GTTGTTCGGA
saheli ACTTCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGAA GGGGGCTAGC GTTGTTCGGA
terangae ACTTCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGAA GGGGGCTAGC GTTGTTCGGA
arboris acttcgtgcc agcagccgcg gtaatacgaa gggggctagc gttgttcgga
kostiense acttcgtgcc agcagccgcg gtaatacgaa gggggctagc gttgttcgga
kummerowiae acttcgtgcc agcagccgcg gtaatacgaa gggggctagc gttgttcgga
morelense acttcgtgcc agcagccgcg gtaatacgaa gggggctagc gttgttcgga
xinjiangense acttcgtgcc agcagccgcg gtaatacgaa gggggctagc gttgttcgga
sino_ensifer acttcgtgcc agcagccgcg gtaatacgaa gggggctagc gttgttcgga
SMc ACTTCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGAA GGGGGCTAGC GTTGTTCGGA

501

550

fredii ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGTAGCGGA CATTAACTC AGGGGTGAAA
medicae ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGTAGCGGA TTGTTAAGTG AGGGGTGAAA
meliloti ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGTAGCGGA TTGTTAAGTG AGGGGTGAAA
saheli ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGTAGCGGA CATTAACTC AGGGGTGAAA
terangae ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGTAGCGGA CATTAACTC AGGGGTGAAA
arboris attactgggc gtaaagcgca cgtagcgga cattaactc aggggtgaaa
kostiense attactgggc gtaaagcgca cgtagcgga cattaactc aggggtgaaa
kummerowiae attactgggc gtaaagcgca cgtagcgga cattaactc aggggtgaaa
morelense attactgggc gtaaagcgca cgtagcgga cattaactc aggggtgaaa
xinjiangense attactgggc gtaaagcgca cgtagcgga cattaactc aggggtgaaa
sino_ensifer attactgggc gtaaagcgca cgtagcgga cattaactc aggggtgaaa
SMc ATTACTGGGC GTAAAGCGCA CGTAGCGGA TTGTTAAGTG AGGGGTGAAA

551

600

fredii TCCCAGGGCT CAACCCCGGA ACTGCCTTTG ATACTGGG.T GTCTAGAGTC
medicae TCCCAGGGCT CAACCCCGGA ACTGCCTTTC ATACTGGC.A ATCTAGAGTC
meliloti TCCCAGGGCT CAACCCCGGA ACTGCCTTTG ATACTGGC.A ATCTAGAGTC
saheli TCCCAGGGCT CAACCCCGGA ACTGCCTTTG ATACTGGG.T GTCTAGAGTC
terangae TCCCAGGGCT CAACCCCGGA ACTGCCTTTG ATACTGGG.T GTCTAGAGTC
arboris tcccagggct caaccctgga actgcctttg atactggc.a atctagagtc
kostiense tcccagggct caaccctgga actgcctttg atactggg.t gtctagagtc
kummerowiae tcccagggct caactccgga actgcctttg atactggg.t gtctagagtc
morelense tcccagagct caactctgga actgcctttg atactggggt gtctagagta
xinjiangense tcccagggct caaccctgga actgcctttg atactggg.t gtctagagtc
sino_ensifer tcccagggct caaccctgga actgcctttg atactggg.t gtctagagta
SMc TCCCAGGGCT CAACCCCGGA ACTGCCTTTC ATACTGGC.A ATCTAGAGTC

601

650

fredii CGGAAGAGGT GAGTGGAAAT CCGAGTGTAG AGGTGAAATT CGTAGATATT
medicae CAGAAGAGGT GAGTGGAAAT CCGAGTGTAG AGGTGAAATT CGTAGATATT
meliloti CAGAAGAGGT GAGTGGAAAT CCGAGTGTAG AGGTGAAATT CGTAGATATT

sahelii CGGAAGAGGT GAGTGGAAATT CCGAGTGTAG AGGTGAAATT CGTAGATATT
 terangae CGGAAGAGGT GAGTGGAAATT CCGAGTGTAG AGGTGAAATT CGTAGATATT
 arboris cagaagaggt gagtggaaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt
 kostiense cgaagaggt gagtggaaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt
 kummerowiae tgaagaggt gagtggaaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt
 morelense tgaagaggt gagtggaaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt
 xinjiangense cgaagaggt gagtggaaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt
 sino_ensifer tgaagaggt gagtggaaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt
 SMc CAGAAGAGGT GAGTGGAAATT CCGAGTGTAG AGGTGAAATT CGTAGATATT

651 700

fredii CGGAGGAACA CCAAGTGGCGA AGGCGGCTCA CTGCTCCGGT ACTGACGCTG
 medicae CGGAGGAACA CCAAGTGGCGA AGGCGGCTCA CTGCTCCGGT ACTGACGCTG
 meliloti CGGAGGAACA CCAAGTGGCGA AGGCGGCTCA CTGCTCCGGT ACTGACGCTG
 sahelii CGGAGGAACA CCAAGTGGCGA AGGCGGCTCA CTGCTCCGGT ACTGACGCTG
 terangae CGGAGGAACA CCAAGTGGCGA AGGCGGCTCA CTGCTCCGGT ACTGACGCTG
 arboris cggaggaaca ccagtggcga aggcggctca ctggtccatt actgacgctg
 kostiense cggaggaaca ccagtggcga aggcggctca ctggtccatt actgacgctg
 kummerowiae cggaggaaca ccagtggcga aggcggctca ctggtccatt actgacgctg
 morelense cggaggaaca ccagtggcga aggcggctca ctggtccatt actgacgctg
 xinjiangense cggaggaaca ccagtggcga aggcggctca ctggtccatt actgacgctg
 sino_ensifer cggaggaaca ccagtggcga aggcggctca ctggtccatt actgacgctg
 SMc CGGAGGAACA CCAAGTGGCGA AGGCGGCTCA CTGCTCCGGT ACTGACGCTG

701 750

fredii AGGTGCGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC
 medicae AGGTGCGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC
 meliloti AGGTGCGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC
 sahelii AGGTGCGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC
 terangae AGGTGCGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC
 arboris aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac
 kostiense aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac
 kummerowiae aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac
 morelense aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac
 xinjiangense aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac
 sino_ensifer aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac
 SMc AGGTGCGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC

751 800

fredii GCCGTAAACG ATGAATGTTA GCCGTGGGC AGTTTACTGT TCGGTGGCGC
 medicae GCCGTAAACG ATGAATGTTA GCCGTGGGC AGTTTACTGT TCGGTGGCGC
 meliloti GCCGTAAACG ATGAATGTTA GCCGTGGGC AGTTTACTGT TCGGTGGCGC
 sahelii GCCGTAAACG ATGAATGTTA GCCGTGGGC AGTTTACTGT TCGGTGGCGC
 terangae GCCGTAAACG ATGAATGTTA GCCGTGGGC AGTTTACTGT TCGGTGGCGC
 arboris gccgtaaacg atgaatgtta gccgtgggc agtttactgt tcggtggcgc
 kostiense gccgtaaacg atgaatgtta gccgtgggc agtttactgt tcggtggcgc
 kummerowiae gccgtaaacg atgaatgtta gccgtgggc agtttactgt tcggtggcgc
 morelense gccgtaaacg atgaatgtta gccgtgggc agtttactgt tcggtggcgc

xinjiangense gcogtaaacy atgaatgtta gcogtcgggc agtttactgt tcggtggggc
sino_ensifer gcogtaaacy atgaatgtta gcogtcgggc agtttactgt tcggtggggc
SMc GCGTAAACG ATGAATGTTA GCGTCGGGC AGTTTACTGT TCGGTGGGC

801 850

fredii AGCTAACGCA TTAACATTC CGCCTGGGA GTACGGTGC AAGATTAAAA
medicae AGCTAACGCA TTAACATTC CGCCTGGGA GTACGGTGC AAGATTAAAA
meliloti AGCTAACGCA TTAACATTC CGCCTGGGA GTACGGTGC AAGATTAAAA
saheli AGCTAACGCA TTAACATTC CGCCTGGGA GTACGGTGC AAGATTAAAA
terangae AGCTAACGCA TTAACATTC CGCCTGGGA GTACGGTGC AAGATTAAAA
arboris agctaacgca ttaaacattc cgcttgggga gtacggtcgc aagattaaaa
kostiense agctaacgca ttaaacattc cgcttgggga gtacggtcgc aagattaaaa
kummerowiae agctaacgca ttaaacattc cgcttgggga gtacggtcgc aagattaaaa
morelense agctaacgca ttaaacattc cgcttgggga gtacggtcgc aagattaaaa
xinjiangense agctaacgca ttaaacattc cgcttgggga gtacggtcgc aagattaaaa
sino_ensifer agctaacgca ttaaacattc cgcttgggga gtacggtcgc aagattaaaa
SMc AGCTAACGCA TTAACATTC CGCCTGGGA GTACGGTGC AAGATTAAAA

851 900

fredii CTCAAAGGAA TTGACGGGG CCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA
medicae CTCAAAGGAA TTGACGGGG CCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA
meliloti CTCAAAGGAA TTGACGGGG CC.GCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA
saheli CTCAAAGGAA TTGACGGGG CCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA
terangae CTCAAAGGAA TTGACGGGG CC.GCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA
arboris ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaag cggtgagca tgtggttaa
kostiense ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaag cggtgagca tgtggttaa
kummerowiae ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaag cggtgagca tgtggttaa
morelense ctcaaaggaa ttgacggggg cc.gcacaag cggtgagca tgtggttaa
xinjiangense ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaag cggtgagca tgtggttaa
sino_ensifer ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaag cggtgagca tgtggttaa
SMc CTCAAAGGAA TTGACGGGG CCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA

901 950

fredii TTGGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAGCC CTTGACAT.C CCGA.TGCGG
medicae TTGGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAGCC CTTGACAT.C CCGA.TGCGG
meliloti TTGGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAGCC CTTGACAT.C CCGA.TGCGG
saheli TTGGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAGCC CTTGACAT.C CCGG.TGCGG
terangae TTGGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAGCC CTTGACAT.C CCGG.TGCGG
arboris ttogaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacat.c cggg.tcgcg
kostiense ttogaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacat.c cggg.tcgcg
kummerowiae ttogaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacat.c cggg.tcgcg
morelense ttogaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacat.c cggg.tcgcg
xinjiangense ttogaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacat.c cggg.tcgcg
sino_ensifer ttogaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacat.c cggg.tcgcg
SMc TTGGAAGCAA CGCGCAGAAC CTTACCAGCC CTTGACAT.C CCGA.TGCGG

951 1000

fredii GATACGAGAG ATCGTATCCT TCAGTTCGGC TGGATCGGAG .ACAGGTGCT

medicae	GATAGGAGAG	ATCGTATCCT	TCAGTTGGGC	TGGATCGGAG	.ACAGGTGCT
meliloti	GATACGAGAG	ATCGTATCCT	TCAGTTGGGC	TGGATCGGAG	.ACAGGTGCT
saheli	GATACGAGAG	ATCGTATCCT	TCAGTTGGGC	TGGATCGGAG	.ACAGGTGCT
terangae	GATTACAGAG	ATGTTTTTCT	TCAGTTGGGC	TGGATCGGAG	.ACAGGTGCT
arboris	gatacgagag	atcgatatcct	tcagttgggc	tggacgggag	.acaggtgct
kostiense	gaaacgagag	atcgtttctt	tcagttgggc	tggacgggag	.acaggtgct
kummerowiae	.ttgcagag	at.gcaaggt	tcctctggg.	.ggacgggga	cacaggtgct
morelense	gattacagag	atgatatcct	tcagttgggc	tggatcggag	.acaggtgct
xinjiangense	gatacgagag	atcgatatcct	tcagttgggc	tggatcggag	.acaggtgct
sino_ensifer	gattacggag	acgttttctt	tcagttgggc	tggatcggag	.acaggtgct
SMc	GATACGAGAG	ATCGTATCCT	TCAGTTGGGC	TGGATCGGAG	.ACAGGTGCT

1001

1050

fredii	GCATGGCTGT	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCACAA
medicae	GCATGGCTGT	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCACAA
meliloti	GCATGGCTGT	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCACAA
saheli	GCATGGCTGT	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCACAA
terangae	GCATGGCTGT	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCACAA
arboris	gcatggctgt	cgtcagctcg	tgtcgtgaga	tgttgggta	agtcccaca
kostiense	gcatggctgt	cgtcagctcg	tgtcgtgaga	tgttgggta	agtcccaca
kummerowiae	gcatggctgt	cgtcagctcg	tgtcgtgaga	tgttgggta	agtcccaca
morelense	gcatggctgt	cgtcagctcg	tgtcgtgaga	tgttgggta	agtcccaca
xinjiangense	gcatggctgt	cgtcagctcg	tgtcgtgaga	tgttgggta	agtcccaca
sino_ensifer	gcatggctgt	cgtcagctcg	tgtcgtgaga	tgttgggta	agtcccaca
SMc	GCATGGCTGT	CGTCAGCTCG	TGTCGTGAGA	TGTTGGGTTA	AGTCCCACAA

1051

1100

fredii	CGAGCGCAAC	CCTCGCCCTT	AGTTGCCAGC	ATTTAGTTGG	GCACTCTAAG
medicae	CGAGCGCAAC	CCTCGCCCTT	AGTTGCCAGC	ATTCAGTTGG	GCACTCTAAG
meliloti	CGAGCGCAAC	CCTCGCCCTT	AGTTGCCAGC	ATTCAGTTGG	GCACTCTAAG
saheli	CGAGCGCAAC	CCTCGCCCTT	AGTTGCCAGC	ATTTGGTTGG	GCACTCTAAG
terangae	CGAGCGCAAC	CCTCGCCCTT	AGTTGCCAGC	ATTTGGTTGG	GCACTCTAAG
arboris	cgagcgcaac	cctcgccctt	agttgccagc	atttagttgg	gcactctaag
kostiense	cgagcgcaac	cctcgccctt	agttgccagc	attcagttgg	gcactctaag
kummerowiae	cgagcgcaac	c.ctcgccctt	agttgccagc	attcagttgg	gcactctaag
morelense	cgagcgcaac	cctcgccctt	agttgccagc	attaagttgg	gcactctaag
xinjiangense	cgagcgcaac	cctcgccctt	agttgccagc	atttagttgg	gcactctaag
sino_ensifer	cgagcgcaac	cctcgccctt	agttgccagc	atttagttgg	gcactctaag
SMc	CGAGCGCAAC	CCTCGCCCTT	AGTTGCCAGC	ATTCAGTTGG	GCACTCTAAG

1101

1150

fredii	GGGACTGCCG	GTGATAAGCC	GAGAGGAAGG	TGGGGATGAC	GTCAAGTCCT
medicae	GGGACTGCCG	GTGATAAGCC	GAGAGGAAGG	TGGGGATGAC	GTCAAGTCCT
meliloti	GGGACTGCCG	GTGATAAGCC	GAGAGGAAGG	TGGGGATGAC	GTCAAGTCCT
saheli	GGGACTGCCG	GTGATAAGCC	GAGAGGAAGG	TGGGGATGAC	GTCAAGTCCT
terangae	GGGACTGCCG	GTGATAAGCC	GAGAGGAAGG	TGGGGATGAC	GTCAAGTCCT
arboris	gggactgccg	gtgataagcc	gagaggaagg	tggggatgac	gtcaagtctt
kostiense	gggactgccg	gtgataagcc	gagaggaagg	tggggatgac	gtcaagtctt

kummerowiae gggactgccg gtgataagcc gagaggaagg tggggatgac gtcaagtcct
morelense gggactgccg gtgataagcc gagaggaagg tggggatgac gtcaagtcct
xinjiangense gggactgccg gtgataagcc gagaggaagg tggggatgac gtcaagtcct
sino_ensifer gggactgccg gtgataagcc gagaggaagg tggggatgac gtcaagtcct
SMc GGGACTGCCG GTGATAAGCC GAGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCCT

1151

1200

fredii CATGGCCCTT ACGGGCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG TGGTGACAGT
medicae CATGGCCCTT ACGGGCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG TGGTGACAGT
meliloti CATGGCCCTT ACGGGCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG TGGTGACAGT
saheli CATGGCCCTT ACGGGCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG TGGTGACAGT
terangae CATGGCCCTT ACGGGCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG TGGTGACAGT
arboris cattgccctt acgggctggg ctacacacgt gctacaatgg tggtgacagt
kostiense cattgccctt acgggctggg ctacacacgt gctacaatgg tggtgacagt
kummerowiae catggccctt acgggctggg ctacacacgt gctacaatgg tggtgacagt
morelense catggccctt acgggctggg ctacacacgt gctacaatgg tggtgacagt
xinjiangense catggccctt acgggctggg ctacacacgt gctacaatgg tggtgacagt
sino_ensifer catggccctt acgggctggg ctacacacgt gctacaatgg tggtgacagt
SMc CATGGCCCTT ACGGGCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG TGGTGACAGT

1201

1250

fredii GGGCAGCGAG ACCGCGAGGT CGAGCTAATC TCCAAAAGCC ATCTCAGTTC
medicae GGGCAGCGAG ACCGCGAGGT CGAGCTAATC TCCAAAAGCC ATCTCAGTTC
meliloti GGGCAGCGAG ACCGCGAGGT CGAGCTAATC TCCAAAAGCC ATCTCAGTTC
saheli GGGCAGCGAG ACCGCGAGGT CGAGCTAATC TCCAAAAGCC ATCTCAGTTC
terangae GGGCAGCGAG ACCGCGAGGT CGAGCTAATC TCCAAAAGCC ATCTCAGTTC
arboris gggcagcgag accgcgaggt cgagctaate tccaaaagcc atctcagttc
kostiense gggcagcgag accgcgaggt cgagctaate tccaaaagcc atctcagttc
kummerowiae gggcagcgag accgcgaggt cgagctaate tccaaaagcc atctcagttc
morelense gggcagcgag accgcgaggt cgagctaate tccaaaagcc atctcagttc
xinjiangense gggcagcgag accgcgaggt cgagctaate tccaaaagcc atctcagttc
sino_ensifer gggcagcgag accgcgaggt cgagctaate tccaaaagcc atctcagttc
SMc GGGCAGCGAG ACCGCGAGGT CGAGCTAATC TCCAAAAGCC ATCTCAGTTC

1251

1300

fredii GGATTGCACT CTGCAACTCG AGTGCATGAA GTTGGAAATCG CTAGTAATCG
medicae GGATTGCACT CTGCAACTCG AGTGCATGAA GTTGGAAATCG CTAGTAATCG
meliloti GGATTGCACT CTGCAACTCG AGTGCATGAA GTTGGAAATCG CTAGTAATCG
saheli GGATTGCACT CTGCAACTCG AGTGCATGAA GTTGGAAATCG CTAGTAATCG
terangae GGATTGCACT CTGCAACTCG AGTGCATGAA GTTGGAAATCG CTAGTAATCG
arboris ggattgcact ctgcaactcg agtgcataaa gttggaatcg ctagtaatcg
kostiense ggattgcact ctgcaactcg ggtgcatgaa gttggaatcg ctagtaatcg
kummerowiae ggattgcact ctgcaactcg agtgcataaa gttggaatcg ctagtaatcg
morelense ggattgcact ctgcaactcg agtgcataaa gttggaatcg ctagtaatcg
xinjiangense ggattgcact ctgcaactcg agtgcataaa gttggaatcg ctagtaatcg
sino_ensifer ggattgcact ctgcaactcg agtgcataaa gttggaatcg ctagtaatcg
SMc GGATTGCACT CTGCAACTCG AGTGCATGAA GTTGGAAATCG CTAGTAATCG

1301

1350

fredii CAGATCAGCA TGCTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC
 medicae CAGATCAGCA TGCTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC
 meliloti CAGATCAGCA TGCTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC
 saheli CAGATCAGCA TGCTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC
 terangae CAGATCAGCA TGCTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC
 arboris cagatcagca tgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
 kostiense cagatcagca tgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
 kummerowiae cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
 morelense cagatcagca tgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
 xinjiangense cagatcagca tgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
 sino_ensifer cagatcagca tgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
 SMC CAGATCAGCA TGCTGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC

1351

1400

fredii CGTCACACCA TGGGAGTTGG TTCTACCCGA AGGTAGTGCG CTAACCGCAA
 medicae CGTCACACCA TGGGAGTTGG TTCTACCCGA AGGTAGTGCG CTAACCGCAA
 meliloti CGTCACACCA TGGGAGTTGG TTCTACCCGA AGGTAGTGCG CTAACCGCAA
 saheli CGTCACACCA TGGGAGTTGG TTCTACCCGA AGGTAGTGCG CTAACCGCAA
 terangae CGTCACACCA TGGGAGTTGG TTCTACCCGA AGGTAGTGCG CTAACCGCAA
 arboris cgtcacacca tgggagttgg ttctaccga aggtagtgcg ctaaccgcaa
 kostiense cgtcacacca tgggagttgg ttctaccga aggtagtgcg ctaaccgcaa
 kummerowiae cgtcacacca tgggagttgg ttttaccga aggtagtgcg ctaaccgcaa
 morelense cgtcacacca tgggagttgg ttctaccga aggtagtgcg ctaaccgcaa
 xinjiangense cgtcacacca tgggagttgg ttctaccga aggtagtgcg ctaaccgcaa
 sino_ensifer cgtcacacca tgggagttgg ttctaccga aggtagtgcg ctaaccgcaa
 SMC CGTCACACCA TGGGAGTTGG TTCTACCCGA AGGTAGTGCG CTAACCGCAA

1401

1450

fredii GGAGGCAGCT AACCACGGTA GGGTCAGCGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA
 medicae GGAGGCAGCT AACCACGGTA GGGTCAGCGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA
 meliloti GGAGGCAGCT AACCACGGTA GGGTCAGCGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA
 saheli GGAGGCAGCT AACCACGGTA GGGTCAGCGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA
 terangae GGAGGCAGCT AACCACGGTA GGGTCAGCGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA
 arboris ggaggcagct aaccacgta gggtcagcga ctggggtgaa gtcgtaacaa
 kostiense ggaggcagct aaccacgta gggtcagcga ctggggtgaa gtcgtaacaa
 kummerowiae ggaggcagct aaccacgta gggtcagcga ctggggtgaa gtcgtaac..
 morelense ggaggcagct aaccacgta gggtcagcga ctggggtgaa gtcgtaacaa
 xinjiangense ggaggcagct aaccacgta gggtcagcga ctggggtgaa gtcgtaacaa
 sino_ensifer ggaggcagct aaccacgta gggtcagcga ctggggtgaa gtcgtaacaa
 SMC GGAGGCAGCT AACCACGGTA GGGTCAGCGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA

1451

1491

fredii GGTAGCCGTA GGGGAACC..
 medicae GGTA.....
 meliloti GGTAGCCGTA GGGGAACC..
 saheli GGTAGCCGTA GGGGAACC..
 terangae GGTAGCCGTA GGGGAACC..

arboris ggtagccgta gggaacc..
kostiense ggtagccgta gggaacc..
kummerowiae
morelense ggtagccgta gggaacc..
xinjiangense ggta.....
sino_ensifer ggtagccgta gggaacc..
SMc GGTAGCCGTA GGGGAACTG CGGCTGGATC ACCTCCTTC T

Annexe 3 (Chapitre III. 3)
Analyse Statistique des essais en serre

Medicago ciliaris

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	7	52942,312	7563,187	3,333	,0050
Residual	55	124801,339	2269,115		

Dependent: Hauteur (mm)

Means Table

Effect: Souche

Dependent: Hauteur (mm)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
ORS 634	8	315,000	60,886	21,527
STM 1003	8	281,250	48,237	17,054
STM 1062	8	341,875	48,251	17,059
STM 2348	8	338,750	52,491	18,559
STM1064	8	272,500	47,359	16,744
STM990	8	318,125	23,443	8,288
STM994	8	338,125	37,219	13,159
Témoïn	7	266,429	54,369	20,549

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: Hauteur (mm)

Significance level: ,05

	Count	Mean	
Témoïn	7	266,429	a
STM1064	8	272,500	a b
STM 1003	8	281,250	a b
ORS 634	8	315,000	a b
STM990	8	318,125	a b
STM994	8	338,125	b
STM 2348	8	338,750	b
STM 1062	8	341,875	b

Medicago ciliaris

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	7	4,991	,713	30,602	,0001
Residual	55	1,282	,023		

Dependent: Poids sec parties aériennes (g)

Means Table

Effect: Souche

Dependent: Poids sec parties aériennes (g)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
ORS 634	8	,599	,060	,021
STM 1003	8	,450	,095	,034
STM 1062	8	,460	,114	,040
STM 2348	8	,551	,068	,024
STM1064	8	,566	,087	,031
STM990	8	1,101	,245	,087
STM994	8	1,190	,271	,096
Témoin	7	,443	,117	,044

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: Poids sec parties aériennes (g)

Significance level: ,05

	Count	Mean	
Témoin	7	,443	a
STM 1003	8	,450	a
STM 1062	8	,460	a
STM 2348	8	,551	a
STM1064	8	,566	a
ORS 634	8	,599	a
STM990	8	1,101	b
STM994	8	1,190	b

Medicago ciliaris

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	7	,112	,016	4,525	,0005
Residual	55	,194	,004		

Dependent: Poids sec parties racinaires + nodules (g)

Means Table

Effect: Souche

Dependent: Poids sec parties racinaires + nodules (g)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
ORS 634	8	,243	,030	,011
STM 1003	8	,199	,045	,016
STM 1062	8	,226	,057	,020
STM 2348	8	,186	,051	,018
STM1064	8	,188	,045	,016
STM990	8	,287	,079	,028
STM994	8	,303	,096	,034
Témoin	7	,203	,043	,016

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: Poids sec parties racinaires + nodules (g)

Significance level: ,05

	Count	Mean	
STM 2348	8	,186	a
STM1064	8	,188	a
STM 1003	8	,199	a
Témoin	7	,203	a
STM 1062	8	,226	a b
ORS 634	8	,243	a b
STM990	8	,287	b
STM994	8	,303	b

Medicago ciliaris

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	5	77918573,333	15583714,667	33,445	,0001
Residual	12	5591414,667	465951,222		

Dependent: ARA (nMol/h/plant)

Means Table

Effect: Souche

Dependent: ARA (nMol/h/plant)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
ORS 634	3	119,000	133,270	76,944
STM 1003	3	325,333	297,014	171,481
STM 1062	3	31,333	54,271	31,333
STM 1064	3	584,667	592,098	341,848
STM990	3	4046,000	695,030	401,276
STM994	3	5171,667	1361,300	785,947

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: ARA (nMol/h/plant)

Significance level: ,05

	Count	Mean	
STM 1062	3	31,333	a
ORS 634	3	119,000	a
STM 1003	3	325,333	a
STM 1064	3	584,667	a
STM990	3	4046,000	b
STM994	3	5171,667	b

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.01	0.005	0.00	0.997
Error	2	0.00	0.000		
Total	4	0.01			

Dependent Variables: Y1, Y2, Y3

Means Table

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0.01	2	0.005	0.00	0.997
Error	0.00	2	0.000		
Total	0.01	4			

Dependent: Y1, Y2, Y3

Student-Newman-Keuls
 Effect: Source
 Dependent: Y1, Y2, Y3
 Significant level: .05

Count

Source	Y1	Y2	Y3
Model	0.00	0.00	0.00
Error	0.00	0.00	0.00

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.01	0.005	0.00	0.997
Error	2	0.00	0.000		
Total	4	0.01			

Dependent Variables: Y1, Y2, Y3

Means Table

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0.01	2	0.005	0.00	0.997
Error	0.00	2	0.000		
Total	0.01	4			

Dependent: Y1, Y2, Y3

Student-Newman-Keuls
 Effect: Source
 Dependent: Y1, Y2, Y3
 Significant level: .05

Count

Source	Y1	Y2	Y3
Model	0.00	0.00	0.00
Error	0.00	0.00	0.00

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.01	0.005	0.00	0.997
Error	2	0.00	0.000		
Total	4	0.01			

Dependent Variables: Y1, Y2, Y3

Means Table

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0.01	2	0.005	0.00	0.997
Error	0.00	2	0.000		
Total	0.01	4			

Dependent: Y1, Y2, Y3

Student-Newman-Keuls
 Effect: Source
 Dependent: Y1, Y2, Y3
 Significant level: .05

Count

Source	Y1	Y2	Y3
Model	0.00	0.00	0.00
Error	0.00	0.00	0.00

Medicago ciliaris

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	3	1825.119	608.373	1.862	.2143
Residual	8	2613.197	326.650		

Dependent: Aire C2H4

Means Table

Effect: Souche

Dependent: Aire C2H4

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
STM2347	3	7.553	13.083	7.553
STM2349	3	29.847	15.152	8.748
STM2350	3	25.467	30.097	17.377
STM2354	3	0.000	0.000	0.000

Medicago polymorpha

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	7	129227,187	18461,027	18,144	,0001
Residual	72	73257,500	1017,465		

Dependent: Hauteur (mm)

Means Table

Effect: Souche

Dependent: Hauteur (mm)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
ORS 634	10	312,000	24,404	7,717
STM 1062	10	309,500	31,131	9,845
STM 994	10	403,000	17,029	5,385
STM1003	10	318,500	20,823	6,585
STM1064	10	335,000	25,386	8,028
STM2348	10	351,000	26,750	8,459
STM990	10	372,000	24,404	7,717
Témoin	10	262,500	62,417	19,738

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: Hauteur (mm)

Significance level: ,05

	Count	Mean	
Témoin	10	262,500	a
STM 1062	10	309,500	b
ORS 634	10	312,000	b
STM1003	10	318,500	b c
STM1064	10	335,000	b c
STM2348	10	351,000	c d
STM990	10	372,000	d
STM 994	10	403,000	e

Medicago polymorpha

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	7	9,940	1,420	64,333	,0001
Residual	72	1,589	,022		

Dependent: Poids sec parties aériennes (g)

Means Table

Effect: Souche

Dependent: Poids sec parties aériennes (g)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
ORS 634	10	,360	,167	,053
STM 1062	10	,289	,088	,028
STM 994	10	1,256	,310	,098
STM1003	10	,318	,046	,014
STM1064	10	,289	,035	,011
STM2348	10	,343	,039	,012
STM990	10	,954	,196	,062
Témoin	10	,275	,038	,012

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: Poids sec parties aériennes (g)

Significance level: ,05

	Count	Mean	
Témoin	10	,275	a
STM1064	10	,289	a
STM 1062	10	,289	a
STM1003	10	,318	a
STM2348	10	,343	a
ORS 634	10	,360	a
STM990	10	,954	b
STM 994	10	1,256	c

Medicago polymorpha

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	7	,254	,036	15,530	,0001
Residual	72	,168	,002		

Dependent: Poids sec parties racinaires + nodules (g)

Means Table

Effect: Souche

Dependent: Poids sec parties racinaires + nodules (g)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
ORS 634	10	,207	,018	,006
STM 1062	10	,215	,039	,012
STM 994	10	,349	,092	,029
STM1003	10	,219	,024	,008
STM1064	10	,158	,029	,009
STM2348	10	,232	,031	,010
STM990	10	,308	,071	,023
Témoin	10	,235	,030	,009

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: Poids sec parties racinaires + nodules (g)

Significance level: ,05

	Count	Mean	
STM1064	10	,158	a
ORS 634	10	,207	b
STM 1062	10	,215	b
STM1003	10	,219	b
STM2348	10	,232	b
Témoin	10	,235	b
STM990	10	,308	c
STM 994	10	,349	c

Medicago polymorpha

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	6	72,272	12,045	25,727	,0001
Residual	14	6,555	,468		

Dependent: ARA

Means Table

Effect: Souche

Dependent: ARA

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
ORS 634	3	,084	,146	,084
STM 1003	3	1,126	1,001	,578
STM 1062	3	,638	1,009	,582
STM 1064	3	0,000	0,000	0,000
STM 2348	3	0,000	0,000	0,000
STM990	3	3,686	,960	,554
STM994	3	4,953	,562	,324

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: ARA

Significance level: ,05

	Count	Mean	
STM 2348	3	0,000	a
STM 1064	3	0,000	a
ORS 634	3	,084	a
STM 1062	3	,638	a
STM 1003	3	1,126	a
STM990	3	3,686	b
STM994	3	4,953	c

000000	0.
000000	5
000000	5
000000	0.

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

000000	0.	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	0.	000000	000000

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

000000	0.	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	0.	000000	000000

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

000000	0.	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	0.	000000	000000

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

000000	0.	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	0.	000000	000000

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

000000	0.	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	0.	000000	000000

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

000000	0.	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	0.	000000	000000

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

000000	0.	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	0.	000000	000000

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

000000	0.	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	5	000000	000000
000000	0.	000000	000000

Count
 Mean
 Standard Deviation
 Dependent Variable (mm)
 Effect: Square

Medicago polymorpha

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Souche	3	2793.253	931.084	3.602	.0654
Residual	8	2068.213	258.527		

Dependent: Aire C2H4

Means Table

Effect: Souche

Dependent: Aire C2H4

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
STM2347	3	0.000	0.000	0.000
STM2349	3	12.867	13.170	7.604
STM2350	3	20.867	23.678	13.671
STM2354	3	42.000	17.321	10.000

Annexe 4 (Chapitre III. 3)
Analyse Statistique des essais au champ

Type III Sums of Squares

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value
Variété	1	10,354	10,354	8,642	,0044
Souche	3	13,607	4,536	3,786	,0140
Variété * Souche	3	,065	,022	,018	,9966
Residual	72	86,265	1,198		

Dependent: PS p.a. (g)

Means Table

Effect: Variété

Dependent: PS p.a. (g)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
M.sativa Algérie	40	1,319	,762	,120
M.sativa Tunis	40	2,039	1,408	,223

Means Table

Effect: Souche

Dependent: PS p.a. (g)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
Souche 1	20	2,100	1,034	,231
Souche 2	20	1,643	1,205	,269
Souche 3	20	1,949	1,343	,300
Témoin	20	1,024	,875	,196

Student-Newman-Keuls

Effect: Souche

Dependent: PS p.a. (g)

Significance level: ,05

	Count	Mean	
Témoin	20	1,024	a
Souche 2	20	1,643	a b
Souche 3	20	1,949	b
Souche 1	20	2,100	b

Means Table

Effect: Variété * Souche

Dependent: PS p.a. (g)

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Error
M.sativa Algérie, Souche 1	10	1,741	,698	,221
M.sativa Algérie, Souche 2	10	1,248	,897	,284
M.sativa Algérie, Souche 3	10	1,634	,581	,184
M.sativa Algérie, Témoin	10	,654	,283	,089
M.sativa Tunis, Souche 1	10	2,459	1,217	,385
M.sativa Tunis, Souche 2	10	2,037	1,383	,437
M.sativa Tunis, Souche 3	10	2,265	1,803	,570
M.sativa Tunis, Témoin	10	1,394	1,110	,351



Publications

Distribution of *Medicago* Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria

C. Merabet

Laboratoire de Rhizobiologie, Univ. Oran Es-Senia, Algérie and
Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM),
Campus International de Baillarguet, Montpellier, France

A. Bekki
N. Benrabah
M. Baba-Hamed Bey
L. Bouchentouf
H. Ameziane
M. A. Rezki

Laboratoire de Rhizobiologie, Univ. Oran Es-Senia, Algérie

O. Domergue
J.-C. Cleyet-Marel
J.-C. Avarre
G. Béna
X. Bailly
P. de Lajudie

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM),
Campus International de Baillarguet, Montpellier, France

We studied symbiosis of Medicago ciliaris and Medicago polymorpha, two legumes of forage and ecological importance in Algeria, especially in saline soil regions. We report the spatial distribution of the two species and their microsymbionts along salinity gradient transects in the Sebkhia of Misserghin (Algeria, North Africa). Seeds and root nodules were sampled from 10 sites. Twenty-seven rhizobial strains were

Received 30 August 2005; accepted 22 September 2005.

The authors are grateful to Amine Borsali, Faiza Boukhatem and Magali Roussel for technical assistance and to Bernard Dreyfus and Sophie Mantelin for helpful discussions. C. M. and A. B. are indebted to the *Département Soutien-Formation* (DSF) of the *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD), France for Ph.D. fellowship and ESCD grants, respectively. This work was supported by the Commission of the European Communities RT-program, contract BACDIVERS QLRT-2001-02097.

Address correspondence to P. de Lajudie, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR113, TA 10/J, Montpellier, Cedex 5, 34398, France. E-mail: P-De.Lajudie@mpl.ird.fr

isolated from root nodules and characterized as fast-growers and slime-producers on yeast mannitol agar. By partial sequencing of the gene coding for the 16S ribosomal RNA, they were found to be affiliated to *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, and *Agrobacterium* but several strains had sequences with separate positions. Interestingly one of these was further assigned to *Phyllobacterium*. Opposite to rhizobia, the distribution of the two *Medicago* species varied along the salinity gradient, *M. ciliaris* being dominant in the low NaCl concentration zones and *M. polymorpha* dominant in the most saline zones. Tolerance to salinity, of both bacterial and plant partners, was studied under laboratory conditions, showing that plants are susceptible to NaCl concentrations of 50 mM, 15-fold lower than that of their associated rhizobia (800 mM).

Keywords Algeria, *Medicago*, rhizobium, salinity

About 40% of the Earth's soil surface has potential salinity problems, and most of these areas are located in tropical and Mediterranean regions (Cordovilla et al., 1994). Soils affected by salinity (NaCl) represent about 24% of total arable soils in Algeria (Halitim, 1973). These saline depressions are named Sebkh (in the North) or Chott (in the South). As a result of the conjugated effects of both desertification and salinity, thousands of hectares are removed from agropastoral use every year. The global strategy to restore these salty and marginal soils generally includes the use of nitrogen (N)-fixing plant species, that are well adapted to drought and salinity constraints. In particular, legumes have been long recognized as good colonizers of poor soils, thanks to their N-fixing symbioses with soil bacteria collectively named "rhizobiums" or "Legume Nodulating Bacteria" (LNB) (Zakhia et al., 2004). These symbioses are responsible for half of the biologically-fixed N on earth. In addition to soil fertility maintenance, the legumes participate in the production of fodder, wood, and human food (pea, beans, lentil and peanuts).

Legumes of the genus *Medicago* are of special ecological and agropastoral importance in the Mediterranean regions. They include forage species expressing high levels of N-fixation and protein production per hectare (Huguet et al., 1994). In Algeria these species are naturally present in the arid and salty regions but their extension is limited by the increasing desertification and the salinity of soils.

During the 1980s, *Medicago* cultivars were selected in Australia and tested for introduction in Algeria. However, these introductions had major difficulties in adapting to local conditions. They exhibited low productivity, sensitivity to abiotic stress (drought and salinity) and a low degree of nodulation. This introduction strategy was altered allowing for the investigation of local cultivars, native rhizobia, and the selection of efficient rhizobium-*Medicago* symbiotic associations that were well adapted to the local stress conditions.

The Sebkh area of Misserghin (West Algeria) was chosen as a model study site because of its natural salinity gradient [as measured by electrical conductivity (EC)] from its borders toward its center. Plant species in the region were surveyed, quantifying their presence and their spatial distribution. This article focuses on ecological aspects of the two dominant *Medicago* species in this Sebkh, *M. ciliaris* and *M. polymorpha*, their distribution along the salinity gradient, their tolerance to NaCl, and the diversity of their associated microsymbionts. The diversity was evaluated by partial sequencing of the PCR-amplified DNA corresponding to the gene coding for the 16S ribosomal RNA, referred to as "16S rDNA" in the following,

an abbreviation widely used in literature (Quatrini et al., 2002; La Scola et al., 2002; Conrads et al., 2002; Montecchia et al., 2002; Stepkowski et al., 2003; Sawada et al., 2003; Zakhia et al., 2004; Coenye & Vandamme, 2004).

Materials and Methods

Field Survey

The salinity gradient in the Misserghin Sebkh, saline region of West Algeria was quantified by EC measurements along a transect from the center of the Sebkh region to its border. We first surveyed the plant species present in the entire region. *Medicago ciliaris* and *Medicago polymorpha* were determined to be the two most abundant plant species, and their presence was quantified by counting 1 m² areas in 10 sampling sites along a 300 m transect. From these sites, soil samples were taken for laboratory isolation of rhizobia. *Medicago* seeds were also collected.

Bacterial Isolation Procedure and Culture Media

Naturally occurring root nodules were obtained by in vitro trapping or collected *in natura* and were either directly used for bacterial isolation or stored dried in tubes containing CaCl₂ (Date, 1982). Upon isolation, the dried nodules were rehydrated in sterile water and surface sterilized by immersion in calcium hypochlorite (3%) for 5 min. The nodules were then aseptically rinsed eight times in sterile water, crushed in a drop of sterile water and the suspension streaked on YMA in Petri dishes. Colonies appeared after 2–6 day incubation at 28°C under aerobic conditions and were checked for purity by repeated streaking on YMA and by microscopic examination of living cells. Isolates were stored at –80°C in YM adjusted to 20% (v/v) glycerol. The investigated rhizobial strains and the host plants are listed in Table 1. All rhizobial strains were maintained on yeast mannitol agar (YMA) (Vincent, 1970) at 28°C, containing 10 g L⁻¹ of mannitol, 0.5 g L⁻¹ sodium glutamate, 0.5 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.05 g L⁻¹ NaCl, 0.04 g L⁻¹ CaCl₂, 0.004 g L⁻¹ FeCl₃, 1 g L⁻¹ yeast extract (Difco), pH 6.8 and 20 g L⁻¹ agar. All strains were stored at –80°C on the same medium plus 20% v/v glycerol. Bacterial cells were tested for NaCl tolerance on three replicates of plates of YEM agar supplemented with 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM, 900 mM and 1000 mM NaCl.

Plant Cultivation, Nodulation Tests and NaCl Tolerance Plant Tests

Seeds of *Medicago ciliaris* and *Medicago polymorpha* were harvested in the Sebkh. They were surface sterilized with 96% sulphuric acid, immersed in H₂SO₄ for 20 min and then washed 10 times in sterile water to remove all traces of acid. The seeds were then incubated in sterile Petri dishes containing 10% water agar for 24 h to 48 h in the dark to allow germination. Plants were then transferred to agar slant tubes (Bertrand, 1997) for root nodulation trials (five plants per strain). Plants were grown under continuous light (20 Wm⁻²) at 28°C and inoculated using 1 mL of a YEM bacterial suspension and grown to exponential growth phase. Roots were observed for nodule formation during the first 2 weeks after inoculation. For NaCl tolerance test plant germination with roots less than 2 cm long were transferred to tubes containing Bertrand culture medium that was adjusted to 25, 50, 100, or 150 mM NaCl, with

Table 1. Strains isolated from nodules in natura (*) or by trapping from soil samples (**) from different sites in the saline region of Misserghin

Distance from center of Sebkha (m)	Soil electrical conductivity mS/cm	Number of <i>Medicago ciliaris</i> and <i>Medicago polymorpha</i> plant/m ²	Strain	Partial 16rDNA sequence Blast results	Host plants	Growth	
						600 mM NaCl	800 mM NaCl
Center of the Sebkha	20	<i>Medicago ciliaris</i> 0 <i>Medicago polymorpha</i> 0	STM1815**	<i>Rhizobium indigoferae</i> (96%)	<i>M. polymorpha</i>	+/-	+/-
20 m	8,39	<i>Medicago ciliaris</i> 20 <i>Medicago polymorpha</i> 80	STM 2210*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (98%)	<i>M. ciliaris</i>	+	-
			STM 1067*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (97%)	<i>M. ciliaris</i>	+	-
			STM 990*	<i>Candidatus Rhizobium massiliae</i> (97%)	<i>M. ciliaris</i> <i>M. polymorpha</i>	++	+
22 m	8,30	<i>Medicago ciliaris</i> 50 <i>Medicago polymorpha</i> 100	STM1816**	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (99%)	<i>M. polymorpha</i>	+/-	-
			STM1817**	<i>Rhizobium tropici</i> (98%)	<i>M. ciliaris</i>	+/-	-
			STM 991*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (98%)	<i>M. polymorpha</i>	++	-
			STM 992*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (98%)	<i>M. ciliaris</i>	-	-
			STM 997*	<i>Agrobacterium rubi</i> (99%)	<i>M. ciliaris</i>	++	++

Table 1. Continued

Distance from center of Sebkha (m)	Soil electrical conductivity mS/cm	Number of <i>Medicago ciliaris</i> and <i>Medicago polymorpha</i> plant/m ²	Strain	Partial 16rDNA sequence Blast results	Host plants	Growth 600 mM NaCl	Growth 800 mM NaCl
222 m	3	<i>Medicago ciliaris</i> 160 <i>Medicago polymorpha</i> 30	STM1821**	<i>Candidatus Rhizobium massiliae</i> (99%)	<i>M. polymorpha</i> <i>M. ciliaris</i>	+	+/-
282 m	2,9	<i>Medicago ciliaris</i> 165 <i>Medicago polymorpha</i> 29	STM1823** STM1824**	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i> (97%) <i>Sinorhizobium meliloti</i> (99%)	<i>M. ciliaris</i> <i>M. polymorpha</i> <i>M. polymorpha</i>	+/-	+/-
302 m	2.50	<i>Medicago ciliaris</i> 180 <i>Medicago polymorpha</i> 15	STM1826**	<i>candidatus Rhizobium massiliae</i> (99%)	<i>M. polymorpha</i>	++	+/-
USA (Virginia) 1919	NT	NT	ORS 665, NZP 4027 LMG 6133 ^T	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>M. sativa</i>	-	-

+ Positive growth/High number of nodules.

+/- Low growth.

- No growth/No nodule.

NT: Not Tested.

M. *Medicago*.

M: Meter.

42 m	8,29	<i>Medicago ciliaris</i> 100	STM1818**	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i> (95%)	<i>M. polymorpha</i>	+	-
		<i>Medicago</i> <i>polymorpha</i> 70	STM1819**	<i>Rhizobium indigoferae</i> (97%)	<i>M. polymorpha</i> <i>M. ciliaris</i>	+	+
			STM 994'	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (97%)	<i>M. ciliaris</i>	+	
80 m	5,55	<i>Medicago ciliaris</i> 110	STM 2223*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (96%)	<i>M. ciliaris</i> <i>M. polymorpha</i>	+	+/-
		<i>Medicago</i> <i>polymorpha</i> 90	STM 996*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (97%)	<i>M. ciliaris</i>	++	+/-
			STM 998*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (97%)	<i>M. ciliaris</i>	+	-
			STM 999*	<i>Phyllobacterium</i> <i>rubiacearum</i> (98%)	<i>M. ciliaris</i>	++	+
			STM 1000*	<i>Agrobacterium rubi</i> (97%)	<i>M. ciliaris</i>	++	++
			STM 1001*	<i>Agrobacterium rubi</i> (97%)	<i>M. ciliaris</i>	++	++
			STM1081**	<i>candidatus Rhizobium</i> <i>massiliae</i> (98%)	<i>M. ciliaris</i>	+	-
	STM1082**	<i>candidatus Rhizobium</i> <i>massiliae</i> (98%)	<i>M. ciliaris</i>	++	++		
120 m	4,50	<i>Medicago ciliaris</i> 120	STM 2229*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (98%)	<i>M. ciliaris</i>	+	+
		<i>Medicago</i> <i>polymorpha</i> 60	STM 1003*	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (98%)	<i>M. polymorpha</i> <i>M. ciliaris</i>	++	++
182 m	3,75	<i>Medicago ciliaris</i> 130	STM1820**	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (96%)	<i>M. ciliaris</i>	+/-	-
		<i>Medicago</i> <i>polymorpha</i> 50					

(Continued)

five replications. Tubes were placed in a growth chamber (SANYO reference MLR-350), at 25°C, 16 hour-photoperiod and 2000 lux light intensity and plant growth measured daily.

Partial 16S rDNA Sequencing

Total DNA isolation was carried out as described by Zakhia et al. (2004). Cells from 2–3 day old YEM agar plate cultures were suspended in sterile water and washed twice. The quantity of cells corresponding to 200 µL suspension of O.D. (620 nm) = 1 was then harvested by centrifugation (12 000 rpm, 2 min). The pellet was suspended in 100 µL of sterile water followed by successive addition of 100 µL of Tris-HCl (10 mM, pH 8,3) and 20 µL of proteinase K (1 mg L⁻¹ solution) (Promega, Madison WI USA). After 2 h incubation at 55°C, proteinase K was denatured by incubation for 10 min in boiling water. The solution was then centrifuged at 14, 000 rpm for 10 min. The DNA containing supernatant was stored at –20°C until analyzed. Primers FGPS 6 and FGPS1509 (Normand et al., 1992) were used to amplify the 16S rDNA in a 50 µl reaction volume containing template DNA (2 µL), 5 µL of 10X reaction buffer (Invitrogen, USA), 1,5 µL of MgCl₂ 50 mM, 4 µL of dNTP 2.5 mM each (Sigma-ALDRICH, Germany), 2 µL of each primer (20 µM) (Biotech AG), 1 unit of Taq polymerase (Invitrogen, USA) and 33.2 µL of sterile Milli-Q water. A negative control without template was included in every PCR run. Amplification was performed in a Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/d IJssel, The Netherlands) using the following program: initial denaturation (5 min at 94°C), 35 cycles of denaturation (30 sec at 94°C), annealing (30 sec at 55°C) and extension (7 min at 72°C), and final extension (7 min at 72°C). The PCR products were checked by electrophoresis in 1% agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8,3) containing 2 drops of 0,5 mg/mL ethidium bromide.

The band corresponding to PCR product was excised and DNA purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Central part of 16S rDNA (591 bp) was sequenced by using the primers FGPS 485–292 (5' CAG-CAG-CCG-CGG-TAA 3') (Normand et al., 1996) and 1080r (5' GGG ACT TAA CCC AAC ATC T 3') (Sy et al., 2001). Sequence reactions were performed with the ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequence kit (Applied Biosystem, Foster City, Calif.) and analyzed on an Applied Biosystems model 310 DNA sequencer. Sequences were corrected using the Sequence Navigator 1.0 program (Applied Biosystem), assembled using the Autoassembler 2.1 program (Perkin Elmer) and aligned with Clustal X software. Sequences were identified by blast (Altschul et al., 1990). The aligned sequences were checked manually using Gendoc software, including reference sequences from GenBank. A Phylogenetic tree was constructed with the neighbor joining algorithm using PAUP4 software and the stability of the groupings was assessed by performing a bootstrap analysis (100 replications).

Results

Field Survey

Electrical conductivity was measured along a 300 m transect from the center to the border of the saline depression of the Sebkh of Misserghin (West Algeria) and evaluated according to the INRA Salinity Scale (ISS, <http://www.igcs-stb.org/pdf/>

dico_donesol2.pdf). Results are indicated in Table 1. Salinity exhibited an EC gradient from the border to the center (2.5 to 20 mS/cm), corresponding to levels 1 to 4 of the ISS. A majority of the sampling sites corresponded to level 2 (average salinity, 4–8 mS/cm) and 3 (saline, 8–16 mS/cm). No plant growth occurred in the very center of the Sebkha, which was invaded by salt crusts (20 mS/cm). Three different plant types could be identified in the Sebkha: halophytes, *Acacia* trees, and *Medicago* forage plants, with a spatial distribution along the salinity gradient. We further focused on *Medicago* to investigate efficient N-fixing symbiosis in this saline region, and to study the distribution of the two species *M. ciliaris* and *M. polymorpha* as a function of salt concentration. Both species were often associated with the halophyte *Arthrocnemum indicum*. Nodules and soil samples were collected at 10 sites along the transect.

Bacterial Strain Isolation

Twenty-seven isolates were obtained by direct isolation from nodules of the two species, *Medicago ciliaris* and *Medicago polymorpha*, either sampled *in natura* or obtained in the laboratory after trapping on plants inoculated with soil samples (Table 1). All isolates exhibited morphological characteristics of rhizobia (Dommergues & Mangenot, 1970). They formed white and creamy colonies on YEM agar with mucus production.

Partial 16S rDNA Sequencing

The 27 rhizobial isolates were characterized by sequencing of a 16S rDNA 591 bp region (positions 440 to 1031), enabling good discrimination between *Sinorhizobium* species. The results of the analysis are shown in Table 1 (Blast results) and in Figure 1 as a phylogenetic tree, including reference strains of known LNB. This allowed the affiliation of new isolates to five different genera. The first group (13 isolates) clustered with *Sinorhizobium meliloti*-*Sinorhizobium medicae*. The second group (four strains) was related to *Rhizobium sulae*. Strain STM 1817 was related outside the *Rhizobium* branch. The third group (three isolates) was close to *Agrobacterium rubi* (syn. *Rhizobium rubi*; Young et al., 2001). The fourth group (five isolates) is located on the *Agrobacterium* branch, but separate from the known species, and by blast was 97–99% similar to *Candidatus "Rhizobium massiliae."* Interestingly strain STM 999 grouped with *Phyllobacterium myrsinacearum*.

Symbiotic Effectiveness

A majority of the strains effectively nodulated their host plant of isolation, *M. ciliaris* or *M. polymorpha*. However some strains, like STM 990, nodulated both species (Table 1). Kinetics of nodule formation depended on the strains. For example nodules induced by STM 990 appeared 5 d after inoculation. Strain STM 1001, close to *Agrobacterium rubi*, induced pseudonodules on *M. ciliaris*, its host plant of isolation. Other *Agrobacterium*-like strains did not induce nodules on their host plant under laboratory conditions. Although *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of several legumes have been reported by several authors (de Lajudie et al., 1999) their role in nodulation remains unclear.

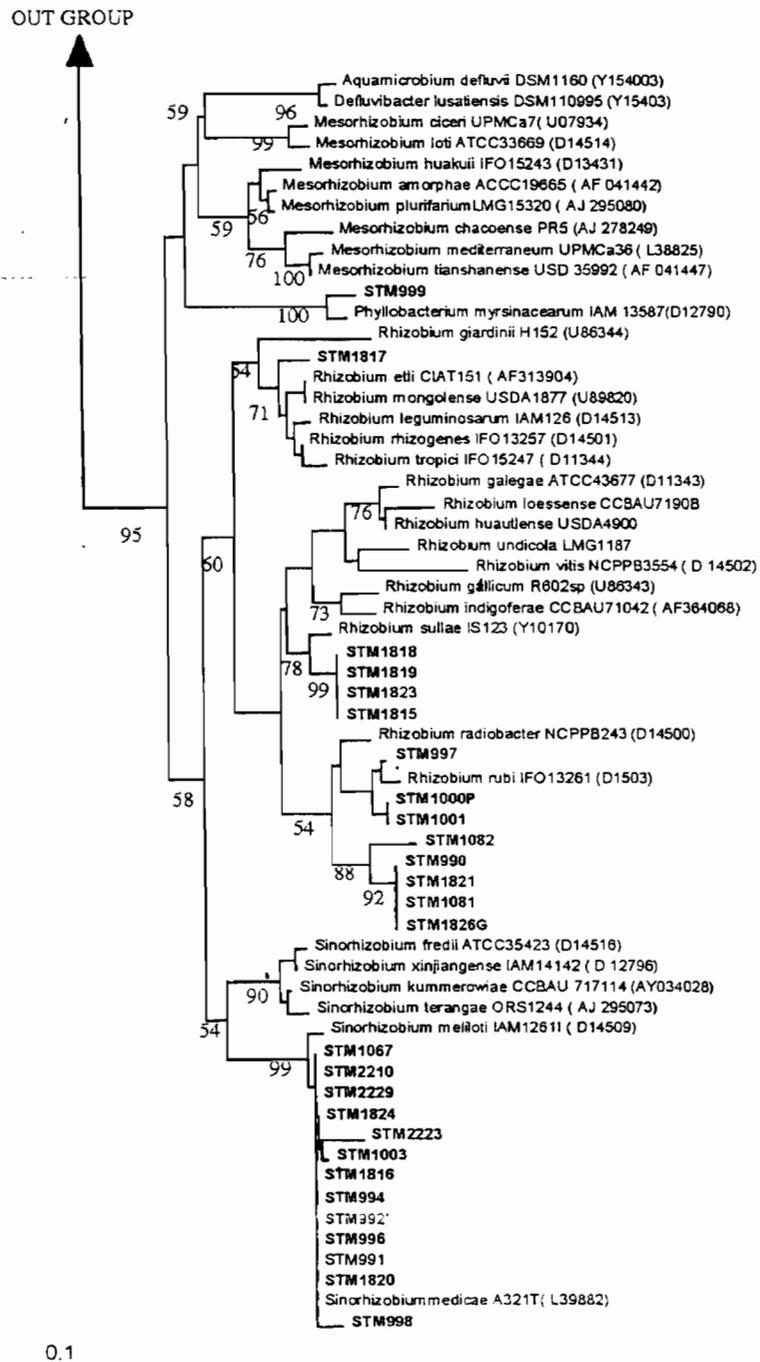


Figure 1. Phylogenetic relationships of Algerian strains based on partial 16S rDNA sequence analysis (positions 440–1031) using neighbor-joining method. Bootstrap values are indicated at the branching points when significant. Outgroup strains consisted of *Asticcacaulis*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Afipia*, *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Azorhizobium*, *Xanthobacter*, *Bosea*, and *Beijerinckia* species. Scale bar: number of mutations per nucleotide.

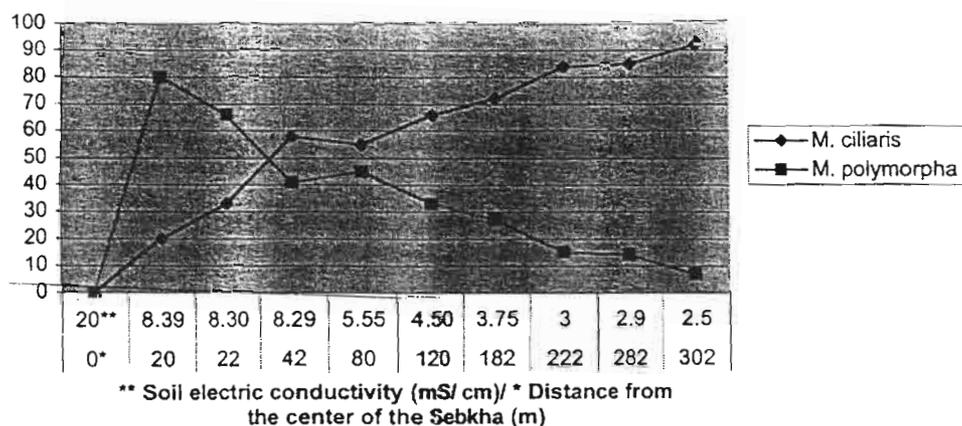


Figure 2. Distribution of *M. ciliaris* and *M. polymorpha* along the saline gradient (Sebkha of Misserghin).

Impact of NaCl on *Medicago* Growth and Spatial Distribution

The salinity gradient was accompanied by the differential distribution of the two species *Medicago ciliaris* and *M. polymorpha* (Table 1). *M. ciliaris* was predominant in the less saline areas (180 plants/m² at 302 m from the center of the Sebkha); *M. polymorpha* was predominant in the higher saline areas (100 plants/m² at 22 m from the center of the Sebkha) with an intermediate zone where the two species occurred in different relative proportions (Table 1, Figure 2). Root system development of *Medicago* plants was affected by increasing salinity.

We studied in vitro growth of the two *Medicago* species on a nutritive medium supplemented with various NaCl concentrations. Results show that plant growth is completely inhibited at ≥ 50 mM NaCl 5 days following their transfer to seedling agar slants containing that level of salinity. However optimum growth was observed at a concentration of 25 mM NaCl.

Bacterial Tolerance to NaCl

All bacterial isolates had normal growth in the presence of 200 or 400 mM NaCl. Twenty-six isolates tolerated 600 mM NaCl, 12 of which were *S. meliloti*. Fifteen strains grew on concentrations up to 800 mM NaCl, and the majority of these isolates were related to *Agrobacterium* (Table 1). Several authors already reported salinity tolerance of *Sinorhizobium* to NaCl, but not greater than 500 mM NaCl. (Mohammed & Campbell, 1985; Rome et al., 1996).

Discussion

Our field observations suggest that the species *Medicago polymorpha* was more tolerant to NaCl than *Medicago ciliaris*, since it was dominant in most of the saline areas of the Sebkha. However, in vitro tests showed their equivalence to *M. ciliaris* in their susceptibility to saline conditions where these plants died one week after their transfer to seedling agar slant supplemented with 50 mM NaCl. This raises the question how, in nature, these plants tolerate high NaCl concentrations, enter a symbiosis with rhizobia, and grow successfully. One explanation is that they occupy

unique microniches. As already mentioned, *Medicago* plants are frequently associated with the halophilic species *Arthrocnemum indicum*. Isolated plants are generally found on the banks of small brooks, where the salinity is locally low. Their size is however much smaller than *Medicago* plants surrounded by *Arthrocnemum*. Halophytes most probably play an important role in this ecosystem. They may alternatively have a role of local soil desalinization or excretion of substances promoting the growth of *Medicago* and enabling nodulation.

To determine whether salinity has an impact on growth and distribution of *Medicago* microsymbiont, we isolated and identified 27 isolates from nodules of *Medicago ciliaris* and *Medicago polymorpha*. Partial 16S rDNA sequencing showed great diversity of rhizobia associated with the two studied *Medicago* species. *Medicago ciliaris* and *Medicago polymorpha* were found associated with three main genera: *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, and *Agrobacterium*. In addition one strain, STM999 isolated from *Medicago ciliaris*, was found to belong to *Phyllobacterium*. Recently, Valverde et al. (2004) reported LNB strains isolated from *Trifolium pratense* root nodules in Spain as *Phyllobacterium*. *Medicago* spp. have long been considered to be very specifically nodulated by a narrow range of bacteria. Our results confirm and extend the findings of several reports demonstrating a bacterial diversity associated with these plant hosts, i.e., *Sinorhizobium* spp. strains (Rome et al., 1996), *Rhizobium mongolense* (Van Berkum et al., 1998), and *Bradyrhizobium yuanmingense* (Yao et al., 2002). However, as expected, a majority of our isolates belonged to *Sinorhizobium*, and close to *S. meliloti* and *S. medicae*. The latter two species are very close (Rome et al., 1996), and the complete 16S rDNA sequencing of these isolates is required for their precise species affiliation. Several strains, related to *Agrobacterium*, formed nodules on their host plants. Although *Agrobacterium* strains have been isolated from nodules on several legumes, their role in nodulation remains to be clarified (de Lajudie et al., 1999).

As a contrast to the *Medicago* plant species, the salinity gradient along the Sebkh do not appear to be correlated with a selection of the native rhizobia since *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, and *Agrobacterium* spp. strains were found to be present at the sampling sites along the salinity gradient (Table 1). This is confirmed by in vitro NaCl tolerance tests showing that rhizobia are tolerant to high NaCl concentrations and 15 isolates grew in the presence of 800 mM NaCl, a concentration 15-fold higher than that plants can tolerate.

Interestingly *Rhizobium* sp. strain STM1815 originated from the center of the Sebkh where salinity was very high (20 mS/cm) and where no plants were present. As already reported by several authors, the host plant is the limiting factor for symbiotic associations in these salinity affected regions. We observed that the strains producing the greatest amount of slime show the greatest tolerance to salinity. This is in agreement with Upchurch and Elkan (1977), Bekki (1986), Tao et al. (1992) and Zahran et al. (1994) who observed a correlation between exopolysaccharide production and tolerance to salinity. This work continues for the selection of host plants and rhizobia for optimization of nodulation and N-fixation under saline conditions.

References

- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers, and D. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410.
- Bekki, A. 1986. Fixation d'azote en condition de stress salin chez *Medicago*: Sensibilité respective des partenaires symbiotiques. Thèse de doctorat. Université des sciences et techniques de Nice. France.

- Bertrand, H. 1997. *Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du Colza inoculé avec des bactéries isolées de son rhizoplan*. Université Claude Bernard Lyon, Lyon I, 99.
- Coenye, T. and P. Vandamme. 2004. Use of the genomic signature in bacterial classification and identification. *Systematic and Applied Microbiology* 27:175–185.
- Conrads, G., M. C. Claros, D. M. Citron, K. L. Tyrrell, V. Merriam, and E. J. C. Goldstein. 2002. 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:493–499.
- Cordovilla, M. P., F. Ligeró, and C. Lluch. 1994. The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany* 45:1483–1488.
- Date, R. A. 1982. Collection, isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*, pp. 95–109, in J. M. Vincent, ed., *Nitrogen fixation in legumes*. Academic Press Publishers, Sydney, Australia.
- de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, S. H. Mohamed, U. Torck, R. Coopman, A. Filali-Matlouf, K. Kersters, B. Dreyfus, K. Lindström, and K. Gillis. 1999. *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology* 22:119–132.
- Dommergues, Y. and F. Mangenot. 1970. *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cie, Paris, France.
- Halitim, A. 1973. Etude expérimentale de sols sodiques d'Algérie en vue de leur mise en culture. Thèse de 3ème cycle. Université de Rennes, France, 176.
- Huguet, T., G. Duc, M. Sagan, I. Olivieri, and J. M. Prosperi. 1994. *Medicago truncatula*: Une légumineuse plante-modèle, pp. 223–228, in J. J. Drevon, ed., *Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le Bassin méditerranéen*, Les Colloques, n° 77. INRA Editions, Paris, France.
- La Scola, M., N. Mallet, P. A. D. Grimont, and D. Raoult. 2002. Description of *Afipia birgiae* sp. nov. and *Afipia massiliensis* sp. nov. and recognition of *Afipia felis* genospecies A. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1773–1782.
- Mohammed, R. M. and W. F. Campbell. 1985. The search for salt tolerant alfalfa/*Rhizobium*. *Utah Science* 46:36–37.
- Montecchia, M. S., N. L. Kerber, N. L. Pucheu, A. Peticari, and A. F. Garcia. 2002. Analysis of genomic diversity among photosynthetic stem-nodulating rhizobial strains from north-east Argentina. *Systematic and Applied Microbiology* 25:423–433.
- Normand, P., B. Cournoyer, P. Simonet, and S. Nazaret. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* 111:119–124.
- Normand, P., S. Orso, B. Cournoyer, P. Jeannin, C. Chapelon, J. Dawson, L. Evtushendro, and A. K. Misra. 1996. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the Family Frankiaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:1–9.
- Quatrini, P., G. Scaglione, M. Cardinale, F. Caradonna, and A. M. Puglia. 2002. *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology* 92:13–21.
- Rome, S., M. P. Fernandez, B. Brunel, P. Normand, and J.-C. Cleyet-Marel. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:972–980.
- Sawada, H., L. D. Kuykendall, and J. M. Young. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General Microbiology* 49:155–179.
- Stepkowski, T., M. Czaplinska, K. Miedzinska, and L. Moulin. 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology Journal of Bacteriology* 26:483–494.
- Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson, and B. Dreyfus. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology* 183:214–220.
- Tao, H., N. J. Brewin, and K. D. Noel. 1992. *Rhizobium leguminosarum* CFNH2. Lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. *Journal of Bacteriology* 174:2222–2229.

Biotechnologies végétales

Revue semestrielle internationale

ISSN - 1 112 - 67



Biotechnologies végétales

Comité Scientifique International

- Pr. AID F. USTHB – Alger – Algérie
Pr. BAUDOIN Ph. FSA – Gembloux – Belgique
Pr. BEKKI A. USTO – Oran – Algérie
Pr. BOUGUEDOURA N. USTHB – Alger – Algérie
Pr. BOUTEKRABT A. USD – Blida – Algérie
Pr. BOUZNAD Z. INA – Alger – Algérie
Pr. DRIRA N. U- S'fax – Tunisie
Pr. FRUTOS R. CIRAD – Montpellier – France
Pr. HADRAMI I. UCA – Marrakech – Maroc
Pr. HAMON S. IRD – Montpellier – France
Pr. JAOUA S. CBS – S'fax – Tunisie
Pr. KAID-HARCH M. USTO – Oran – Algérie
Pr. KAMELI A. ENS – Alger – Algérie
Pr. KHELPELLAH N. UMC – Constantine – Algérie
Pr. KHELIFI D. UMC – Constantine – Algérie
Pr. SPENCER M. FAO/AIEA – Vienne – Autriche
Pr. ZAID A. GDPN/PNUD – Emirates Arabes Unies
Dr. BENAMAR S. ENS – Fès – Maroc
Dr. BENCHABANE M. USD – Blida – Algérie
Dr. BENNACEUR M. Essania – Oran – Algérie
Dr. BORGEL A. IRD – Montpellier – France
Dr. BOUDJNIBA M. ENS – Alger – Algérie
Dr. KHELIFI L. INA – Alger – Algérie
Dr. KRIMI Z. USD – Blida – Algérie
Dr. LOUANCHI M. INA – Alger – Algérie
Dr. MEKLICHE L. INA – Alger – Algérie
Dr. OUNANE SM. INA – Alger – Algérie
Dr. SAADI A. U-Chlef – Algérie
Dr. SLAOUI M. INA – Alger – Algérie
Dr. SY MAME O. UCAD – Dakar – Sénégal
Dr. YAKOUB S. UMMT – Algérie

Directeur de la Revue
Dr. KHELIFI Lakhdar
Maître de conférences

N° 00 Financé par
ATST - KCR - TELT

Soumission des articles

Les manuscrits (l'original + support informatique) rédigés selon les recommandations aux auteurs doivent être soumis à l'adresse suivante :

KHELIFI Lakhdar
Institut National Agronomique
Rue Hassane Badi - 16200 - El Harrach, Alger - Algérie
e-mail : rab@ina.dz

Responsabilité

Les opinions exprimées dans cette revue sont celles des auteurs.
Elles n'engagent en rien les responsables de la revue.

Abonnement

Algérie : 800 DA le numéro
Pays du Maghreb : 15 € le numéro
Étranger : 20 € le numéro
Frais de port inclus

Impression : les éditions EKO-PLUS, Alger , Tel. 071 27 2 727 - 021 66 22 33

Photographie de la couverture

Embryons somatiques de pois (*Pisum sativum* L.)

Bekki A^{1,2}, Merabet C^{1,2}, Ameziane H¹, Rezki MA, Baba Hamed MB¹, de Lajudie P², Ounane SM³ et Dreyfus B²
1-Laboratoire de Rhizobiologie. Département de Biotechnologie. Faculté des Sciences. Université d'Oran Es-Senia. BP 18,
Oran. Algérie. 2-Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113 INRA/AGRO-M/CIRAD/IRD, TA
0 / J, Campus International de Baillarguet, 34398 MONTPELLIER Cedex 5, France. 3-Département de phytotechnie Institut
National Agronomique El Harrach 16200 Alger.
E-mail : abck31@hotmail.com

Mots clés

Salinité, Protéobactérie, Séquençage, Hybridation ADN/ADN,

Résumé

Au cours des vingt dernières années, l'application des principes de la taxonomie polyphasique aux microsymbiotes des légumineuses a permis la description de nombreuses nouvelles espèces parmi les α Protéobactéries. Plus récemment il a été découvert que certaines légumineuses développaient des symbioses avec d'autres groupes bactériens et de genres, jusque-là plutôt connus, comme pathogènes végétaux tel que les β protéobactéries et les γ protéobactéries.

En préalable à l'identification de couples symbiotiques plante/ bactérie performants et à haut potentiel fixateur sous stress abiotique (salinité sécheresse), nous avons étudié la diversité de différentes bactéries nodulant certaines légumineuses endémiques des régions salées et aride d'Algérie sur lesquelles peu de travaux ont été réalisés jusqu'à présent. La caractérisation phénotypique classique complétée par des techniques moléculaires récentes (PCR-RFLP, Séquençage de l'ADNr 16, l'hybridation ADN/ADN) a révélé l'existence d'une grande diversité au sein des bactéries associées à ces légumineuses. En effet les résultats obtenus montrent que ces bactéries appartiennent à divers genres tel que *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium*.

INTRODUCTION

Ces dernières années, on a assisté à la multiplication des études sur les rhizobias de plusieurs régions du monde peu inventoriées jusqu'à présent, qui ont révélé leur grande diversité et plusieurs nouvelles espèces ont été décrites (Young *et al.*, 1996 ; Jarvis *et al.*, 1997 ; Ben *et al.*, 1997 ; Moreira *et al.*, 1998 ; de Lajudie *et al.*, 1998a ; de Lajudie *et al.*, 1998b ; Wang *et al.*, 1999 ; Woese, 1987). Les rhizobiums capables d'induire des nodules fixateurs d'azote chez les légumineuses sont actuellement subdivisés en sept genres et une centaine d'espèces dans la sous-classe des alpha-Protéobactéries (tableau 1). Cependant, jusqu'à présent, seuls les rhizobiums isolés d'à peine 1% des 20.000 espèces de légumineuses connues ont été classés dans la taxonomie. Récemment des études ont montré que la capacité de fixation de l'azote en symbiose avec les légumineuses propre aux rhizobiums « classiques » était plus répandue chez les bactéries qu'on ne le supposait. Ainsi la caractérisation de certaines souches bactériennes isolées de nodules de légumineuses locales a révélé qu'elles appartiennent soit à *Burkholderia* soit à *Ralstonia*, deux genres qui font partie de la sous-classe des beta-Protéobactéries (Moulin *et al.* 2002 ; Chen *et al.*, 2001). Ces résultats ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan fondamental et appliqué.

En Algérie où 80% des terres cultivées sont situées sous des climats variant de semi-aride à aride, les problèmes de salinité et de sécheresse revêtent une importance capitale. En effet, sous l'effet conjugué de la désertification et de la salinité, chaque année des milliers d'hectares sont soustraits à l'utilisation agro-pastorale. Dans ces sols salés et marginaux, l'une des principales voies d'augmentation de la production agricole est l'amélioration de l'efficacité de la fixation biologique de l'azote par des associations symbiotiques adaptées à ces contraintes (Bekki *et al.*, 1987). L'utilisation de ces espèces végétales fixatrices d'azote, en particulier les légumineuses associées aux rhizobiums adaptés à ces contraintes, permet d'augmenter les productions agricoles et forestières et de lutter contre la dégradation de l'environnement en maintenant et régénérant la fertilité des sols. Ainsi un vaste programme d'introduction d'espèces de *Medicago* australiennes a été lancé dès les années 80 afin d'améliorer la production fourragère en Algérie. Néanmoins, les cultivars introduits rencontrent d'énormes difficultés d'adaptation. Outre leur faible productivité et leur sensibilité aux stress abiotiques (salinité et sécheresse), ces cultivars posent des problèmes de nodulation dans ces régions où ils sont largement dominés par les espèces locales. Il s'est donc avéré nécessaire de disposer de nouvelles connaissances concernant la distribution et l'aptitude à fixer

l'azote chez les populations naturelles de *Rhizobium* en Afrique du Nord sur lesquelles très peu d'informations sont disponibles (Mteron, 1991). Les résultats de nos recherches dans ce sens depuis plusieurs années ont montré que la tolérance à la salinité des rhizobias locales et leur association avec certaines espèces de *Medicago* constituent un potentiel très intéressant à exploiter pour améliorer la fixation biologique d'azote dans les régions salées (Bekki, 1986 ; Bekki *et al.* 1987 ; Bekki, 1995 ; Bekki *et al.*, 1999). L'identification de couples symbiotiques plante/ bactérie performants et à haut potentiel fixateur en conditions de stress abiotiques jouera un rôle primordial en zones salées et désertiques, à la fois économique (productions agricoles) et écologique (maintien et régénération de la fertilité des sols). En préalable, notre objectif est d'étudier la diversité des souches de *Rhizobium* en Algérie, et de constituer une collection de souches bien adaptées et représentatives des différentes conditions écologiques qui prévalent dans le pays.

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

Recherche et isolement des rhizobiums des sols salés et arides d'Algérie : L'isolement des souches de *Rhizobium* a été effectué selon la technique de de Lajudie *et al.*, (1994) à partir des nodosités de *Medicago* colonisant naturellement les bordures de la Sebkhah de Misserghine dans l'ouest algérien.

Caractérisation des isolats obtenus : Cette étude comporte les trois aspects fondamentaux suivants.

L'étude par PCR-RFLP de l'ADNr 16S-IGS : L'extraction de l'ADN a été effectuée selon la technique de Brenner *et al.*, (1982). Le principe de la méthode d'amplification des gènes ou PCR (Polymerase Chain Réaction) consiste à hybrider un ADN avec deux amorces oligonucléotidiques qui permettent la copie du brin d'ADN qu'ils encadrent en de nombreux exemplaires grâce à une ADN polymérase. Pour plus de discrimination entre les isolats testés, nous avons choisi d'amplifier le segment 16S-IGS de l'ADNr d'environ 2.8kb (figure 1). Les deux oligonucléotides utilisés comme primers sont ceux synthétisés et décrits par Ponsonnet et Nesme (1994). Il s'agit de FGPLS6 (5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TC-3' et FGPL 123' (5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3'). La réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur (IntegraBiosciences, Eaubonne, France). Les amplifiats obtenus ont été digérés pendant 1h par 10 U de trois endonucléases de restriction (MspI, HaeIII et CfoI) à 37°C.

Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell and Environment*, 22, 583-621.

Streeter JG, (1982) Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiol.*, 69: 1429-1434.

Streeter J (1988) Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Critical of reviews, Plant sciences*, 7, 1: 1-21.

Vessey JK, Waterer J (1992) In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol. Plant*, 84: 171-176.

Vincent JM, (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Sci. Publ., Oxford, UK.

Walsh KB, McCully ME, Canny MJ (1989) Vascular transport and soybean nodule function: Nodule xylem is a blind alley, not a through way. *Plant Cell. Environ.*, 12: 395-405.

Wasfi M, (1983) Analyse de l'inhibition de la fixation symbiotique des légumineuses lors d'un apport de nitrate. Thèse Doct. 3eme Cycle, Université Paris-Sud, Orsay.

Witty JF, Minchin FR, Skot L, Sheehy JE (1986) Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford Surveys Plant Molec Cell Biol.*, 3: 275-314.

Wong PF (1980) Nitrate and carbohydrates effects on nodulation and nitrogen fixation (acetylen reduction) activity of lentil (*Lense sculenta* Moench). *Plant Physiol.*, 65: 78-81.

Les fragments de restriction ont été ensuite séparés par électrophorèse horizontale sur gel Metaphor à 3% en tampon TBE contenant 1 µg/ml Bromure d'Ethium (BET). La migration est effectuée sous une tension de 100 Volt pendant 1h30 min. Les gels sont ensuite photographiés. L'analyse des profils de restriction des produits de l'amplification de l'ADNr par les trois enzymes permet de déterminer les relations génétiques des différents isolats (Ponsonnet et Nesme, 1994). Cette analyse a été faite à l'aide du logiciel Gel-Compar II version 2.0 (Applied Maths).

Performances symbiotiques avec les hôtes végétaux (inoculations croisées) : Le test d'inoculation est un critère important dans la caractérisation des *Rhizobium* (Graham *et al.*, 1991). Ce test nous renseigne également sur la performance symbiotique des isolats. En effet, grâce à la comparaison des poids secs des plantes inoculées et le témoin non inoculé nous pouvons confirmer l'efficacité des différents isolats étudiés. Ce test a été effectué selon la technique de Brokwell *et al.* (1983), en suivant les étapes suivantes :

Germination des graines

Pour ce test nous avons utilisé l'espèce *Medicago ciliaris*, espèce originaire des bordures des dépressions salées. La graine de *M. ciliaris* possède des téguments très coriaces qui constituent un obstacle à sa germination. Autrefois les graines de cette espèce étaient scarifiées manuellement (Brun, 1980), mais dans notre travail nous avons préféré suivre notre propre technique (Bekki, 1986) qui consiste à mettre les graines dans des tubes à hémolyse en plastique perforés à la base que l'on trempe dans l'acide sulfurique (H₂SO₄) à 90% pendant 40 min, ce qui assure également leur désinfection. Les graines sont ensuite rincées 15 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace d'acide. Les graines ainsi traitées sont mises à germer aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant 10 ml d'eau gélosée à 2%. Les boîtes sont ensuite mises à l'obscurité pendant 3 à 5 jours à une température de 25 C°.

Inoculation des plantes : Après germination l'ensemble des plantes dont la longueur de la radicule est de 2 cm sont transférées dans des tubes Gibson (Gibson, 1980) contenant un milieu nutritif pour les plantes dépourvues d'azote (Brunel *et al.*, 1980). Il est important d'ajuster le pH de la solution nutritive à 7. Les plantes sont inoculées avec 1ml de la suspension bactérienne de la souche à identifier et transférées dans une chambre de culture (température de 22 C°, humidité de 60% et photopériode de 14 h). Il est nécessaire d'introduire des témoins : Un contrôle négatif n'ayant pas reçu d'inoculum et un témoin pour lequel le milieu de culture contient de l'azote combiné.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

PCR-RFLP de l'ADNr 16S-IGS

Cette étude a porté sur une vingtaine d'isolats. Ils ont été choisis à cause de leur forte résistance à la salinité (Bekki *et al.*, 1987 ; Bekki, 1997).

La comparaison des tailles des bandes obtenues (figure 2) avec un marqueur de poids moléculaire (Smart ladder Eurogentec), montre que la majorité des isolats possèdent une seule bande similaire d'environ 2,7 kb. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Brunel *et al.*, (1996) chez différentes souches de *Sinorhizobium meliloti* isolées de diverses espèces de *Medicago* annuelles. Après digestion des ces amplifiats par trois endonucléases de restriction spécifique (HaeIII, MspI, CfoI) et grâce à la comparaison des tailles des différentes bandes obtenues (figure 3) chez les isolats étudiés à l'aide du logiciel GelCompar II version 2.0 (Applied Maths), nous avons obtenu les dendrogrammes de la figure 4. Les isolats étudiés peuvent être classés en trois groupes :

Groupe I, contenant les souches, 991, 997, 989, 990, 998 et 995.
Groupe II, renfermant les souches, 988, 996, 994, 1003, 1004, et 1006. La comparaison des profils RFLP de ces souches avec

ceux obtenus par Eardly *et al.*, (1990) ; Brunel *et al.*, (1996); Rome *et al.* (1996), Jebara *et al.*, (2001), montre que les souches du groupe I possèdent certaines caractéristiques des *Sinorhizobium medicae* alors que ceux appartenant au groupe II se rapprochent plutôt des *Sinorhizobium meliloti*.

Groupe III, formé des souches 1001 et 1002. L'inclusion dans l'analyse d'autres souches de référence permettrait peut-être de voir si elles appartiennent ou non à une espèce connue. Pour préciser le statut exact des trois groupes signalés précédemment, d'autres études sont nécessaires, dont le séquençage de l'ADNr 16S.

Performances symbiotiques avec les hôtes végétaux

Ne disposant pas du chromatographe en phase gazeuse, nécessaire à la mesure de l'activité nitrogénase, nous avons eu recours à la mesure de la masse de la matière sèche des plantes inoculées 30 jours après leur germination et 7 jours après leur inoculation avec des souches des deux groupes RFLP I (*S. medicae*-like) et II (*S. meliloti*-like). Cette technique est classiquement utilisée pour apprécier l'efficacité des souches de *Rhizobium* (Brunel *et al.*, 1996 ; Rome *et al.*, 1996 ; Jebara *et al.*, 2001).

Il ressort des résultats obtenus, que toutes les souches des groupes RFLP I (*S. medicae*-like) et II (*S. meliloti*-like) infectent *Medicago ciliaris* et forment, une semaine après l'inoculation des nodosités efficaces sur les racines de cette plante. Néanmoins, la performance symbiotique des souches (exprimée en matière sèche des parties aériennes) varie d'un groupe à un autre et même entre souches appartenant au même groupe (figure 5). Elle est plus importante chez les souches du groupe I. En effet avec 40,6 mg de matière sèche, la souche 998 peut être considérée comme la plus performante de ce groupe. Cette valeur est significativement supérieure à celle des plantes non inoculées (20 mg de matière sèche). Son utilisation comme inoculum dans nos conditions expérimentales a permis une amélioration du poids de la matière sèche d'environ 100%. La souche 999 (séparée en SDS-PAGE) permet une croissance similaire (38, 7 mg). L'inoculation avec les souches 990, 989 et 995 appartenant au même groupe I permet d'obtenir des poids secs de 36mg, 96mg, 32mg et 30 mg respectivement. Même si leurs performances symbiotiques sont inférieures, les souches 996, 994, 1006, appartenant au groupe II sont toutes infectives et efficaces sur *Medicago ciliaris* et forment des nodosités fixatrices. Avec des poids secs de plantes inoculées de l'ordre de 27, 8 mg, 27 mg et 26, 2 mg respectivement, ces souches ont un effet significatif sur la croissance.

Différents auteurs (Brunel *et al.*, 1996; Rome *et al.*, 1996; Jebara *et al.*, 2001) avaient montré des différences de spécificité d'hôtes entre les espèces *S. meliloti* et *S. medicae*. Ici nous montrons que les souches isolées des régions salées d'Algérie qui appartiennent à deux groupes distincts qu'on peut rapprocher de ces deux espèces, sont particulières et capables de noduler la même espèce de *Medicago*. La question est de savoir s'il s'agit de nouvelles espèces de *Sinorhizobium* spécifiques des sols salés. Ces résultats sont très encourageants et montrent que ces souches, très intéressantes, méritent d'être étudiées de façon plus approfondie.

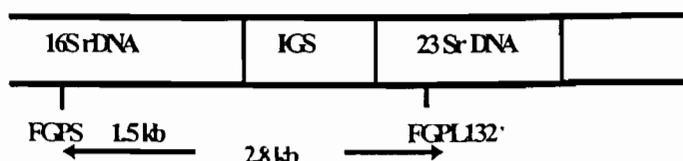


Figure 1 : Représentation schématique du segment d'ADN (16S-IGS) amplifié

Tableau 1. Classification des bactéries fixatrices d'azote symbiotique des légumineuses (Zakhia & de Lajudie 2001).

Espèces	Plantes hôtes	Références
Rhizobium		Frank, 1889
<i>R. leguminosarum</i>		Frank, 1889, Jordan, 1984
biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>	Frank, 1889, Jordan, 1984
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Frank, 1889, Jordan, 1984
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Frank, 1889, Jordan, 1984
<i>R. tropici</i>		
Type II A	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
Type II B	<i>P. vulgaris</i> L., <i>Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
<i>R. elti</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993 ; Hernandez-Lucas <i>et al.</i> , 1995
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> & autres plantes de régions arides	Chen <i>et al.</i> , 1997
<i>R. gallicum</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	Van Berkum <i>et al.</i> , 1998
<i>R. galegae</i>		Lindström, 1989
biovar <i>orientalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström, 1998
biovar <i>officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	Lindström, 1998
<i>R. giardinii</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
Mesorhizobium		
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Acacia</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> & autres plantes tropicales	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a
Sinorhizobium		Chen <i>et al.</i> , 1988 ; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>	Dangeard, 1926 ; Jordan, 1984 ; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. fredii</i>		Scholla et Elkan, 1984 ; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
chemovar <i>fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
chemovar <i>siensis</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp.	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia</i> spp.	Boivin et Giraud, 1999
biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania</i> spp.	Boivin et Giraud, 1999
<i>S. terangaie</i>		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 ; Trüper et de Clari, 1997
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia</i> spp.	Lortet <i>et al.</i> , 1996
biovar <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania</i> spp.	Lortet <i>et al.</i> , 1996
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i>	Rome <i>et al.</i> , 1996
<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
Azorhizobium		Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Azorhizobium</i> sp.	<i>Sesbania rostrata</i>	Rinaudo <i>et al.</i> , 1991

- Bekki A (1986) Fixation d'azote en condition de stress salin chez *Medicago* : sensibilité respective des partenaires symbiotiques. Thèse de doctorat. Université des sciences et techniques de Nice. France.
- Bekki A (1995) Effet de la salinité sur la fixation d'azote chez l'association *Rhizobium-Medicago* : sensibilité du partenaire bactérien à l'état libre et sous forme de microsymbiote et tentative d'essais aux champs, in : Drevon J.J, (Ed). Facteurs limitants de la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin Méditerranéen. Les colloques (77). INRA Paris.
- Bekki A (1997) Effect of salinity on the nitrogen fixation by the *Rhizobium meliloti* - *Medicago* association. 11^{ème} congrès international de fixation d'azote. Paris 20-25 juillet.
- Bekki A, Baba Ahmed H, Gaouar A (1999) Effect of soil salinity on survival and symbiotic performance between *Rhizobium meliloti* and *Medicago* in north west of Algeria. Accepté pour la publication in the third symposium on biological nitrogen fixation in mediterranean basin (FABAMED) : Toward biofertiliser application for an sustainable agriculture. El Arich (Egypte) 21-26 novembre 1999.
- Bekki A, Trinchant JC, Rigaud J (1987) Nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol. Plantarum*. 71: 61-67.
- Brenner DJ, McWhorther AC, Leete Knutson JK, Steigerwalt AG (1982) *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. *J. Clin. Microbiol.* 15 : 1133-1140.
- Brockwell J, (1983) Accuracy of plant-infection technique, for *Rhizobium trifolii*. *Appl. Microbiol.* 11 : 377-383.
- Brun A, (1980) Effets comparés de différentes concentrations de NaCl sur la germination, la croissance et la composition minérale de quelques populations de luzernes d'Algérie. Thèse de Spécialité. Université des Sciences et Techniques de Montpellier.
- Brunel B, Cleyet-Marel JC, Normand P, Bardin R. (1980) Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2636-2642.
- Brunel B, Rome S, Ziani R, Cleyet-Marel JC (1996) Comparaison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual *Medicago* species. *FEMS Microbiology Ecology*. 19: 71-82.
- Chen W X, Tan Z Y, Gao J L, Li Y, Wang E (1997) *Rhizobium hainanense* sp nov, isolated from tropical legumes *Int J Syst Bacteriol* 47: 870-873.
- Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp nov, isolated from root nodules of *Mimosa species* and sputum of *cystic fibrosis* patient. *Int J Syst. Evol. Microbiol.* 51:1729-1735.
- Eardly BD, Materon, LA, Smith, NH, Johnson DA, Rumbaugh MD, Selander RK (1990) Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti* *Appl Environ Microbiol.* 56: 87-194.
- Gibson AH (1980) Methods for legumes in glasshouse and controlled environment cabinets In: Bergersen FJ, (Ed), *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation* Chichester and NY. pp 139-184.
- Graham PH, Sadowsky MJ, Keyser HH (1991) Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 41: 582-567.
- Jackman PJH (1985) Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns In : Goodfellow M and Minnikin D, (Ed), *Chemical Methods in Bacterial Systematics* Academic Press. London, UK. pp 119-129.
- Jackman PJH (1987) Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns In: Colwell RR and Grigorova R, (Ed), *Methods in Microbiology (Current Methods for Classification and Identification of Microorganisms)* Academic Press, London, UK
- Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel J-C, Gillis M (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen nov, *Int J Syst Bacteriol.* 47: 895-898.
- Jebara M, Mhamdi R, Aouani ME, Ghrir R, Mars M (2001) Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisia soils *Can. J. Microbiol.* 47: 139-147.
- Kerstens K (1985) Numerical methods in the classification of bacteria by electrophoresis of their proteins Computer-assisted bacterial systematics London, Academic Press.
- Kiredjian M Holmes B Kersters K Guilvout De Ley J (1986) *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. *Int Syst Bacteriol* 36: 282-287.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature (London)* 227: 680-685.
- de Lajudie P, Willems A (1994) Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of genus *Sinorhizobium* and description of *Rhizobium meliloti* comb Nov, *Sinorhizobium saheli* sp nov, and *Sinorhizobium teranga* sp nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 : 715-733.
- de Lajudie P, Fulele-Laurent E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins M D, Kersters K, Dreyfus B, Gillis M (1998a) Description of *Allorhizobium undicola* gen nov sp nov for nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1277-1290.
- de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins M T, Lindström K, Dreyfus B, Gillis M (1998 b) Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp nov *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:369-382.
- Materon LA, (1991) Symbiotic characteristic of *Rhizobium meliloti* in west asian soils *Soil Biol. Biochem.* 23, 5 : 429-434.
- M, HAUKKA K, AND YOUNG J P W (1998) BIODIVERSITY OF RHIZOBIA ISOLATED FROM A WIDE OREIRA F M S RANGE OF FOREST LEGUMES IN BRAZIL *MOL ECOL* 7:889-895.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C (2002) Nodulation of legumes by members of b-subclass of *Proteobacteria* *Nature* 411: 948-950.
- Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 153: 335-350.
- Nick G, de Lajudie P, Eardly B D, Suomalainen S, Paulin L, Zhang X, Gillis M Lindström K (1999) *Sinorhizobium arboris* sp nov and *Sinorhizobium kostiense* sp nov, isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int J. Syst. Bacteriol.* 49: 1359-1368.

Ponsonnet C, Nesme X (1994) Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Arch. Microbiol. 161: 300-309.

Rome S, Fernandez MA, Brunel B, Normand P Cleyet-Marel JC (1996) *Sinorhizobium medicae* sp nov, Isolated from Annual *Medicago* spp Int.J. Syst. Bacteriol. 4: 972-980.

Stackebrandt E and Woese CR (1984) The phylogeny of the prokaryotes. Microbiol. Sci. 1: 117-122.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 2: 407-438.

Wang E T, Van Berkum P, Beyene D, Sui X H, Dorado O, Chen W X, Martinez-Romero E (1998) *Rhizobium huautlense* sp nov, a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. Int. J. Sys. Bacteriol. 48:687-699.

Wang E T, Van Berkum P, Sui X H, Beyene D, Chen W X, Martinez-Romero E (1999) Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:51-65.

Willems A F, Doignon-Bourcier J, Gori, R, Coopman P, de Lajudie , Gillis M (1987) DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.

Woese CR (1987) Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51 : 221-271.

Young J P W, Haukka K E (1996) Diversity and phylogeny of rhizobia New Phytol. 133:87-94.

Young JM (2001) Implication of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 945-953.