

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

Université A.MIRA-BEJAIA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département des Sciences Biologiques de l'Environnement

Mémoire de Magister

Filière: Science de la Nature

Option : Ecologie de l'Environnement

Thème

Caractérisation phénotypique des endosymbiontes de *Cytisus* sp.

Présenté par : AHNIA Hadjira

Soutenue le : / / 2015

Devant le jury composé de :

M ^{me} ZEBBOUDJ Aicha	Professeur	UAM Béjaïa	Présidente
M ^{me} BEDJOU Fatiha	Professeur	UAM Béjaïa	Examinatrice
M ^f TOUATI Abdelaziz	Professeur	UAM Béjaïa	Examinateur
M ^{me} BOULILA Farida	MCA	UAM Béjaïa	Promotrice

Année : 2014/2015



Remerciements

Au terme de cette étude, je tiens à adresser mes vifs remerciements aux membres du jury :

Madame Pr. ZEBBOUDJ Aicha qui nous a fait l'honneur de présider ce jury et d'évaluer ce document .

Madame Pr. BEDJOU Fatiha et **M**onsieur Pr. TOUATI Abdelaziz pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Mes remerciements et ma reconnaissance s'adressent à ma promotrice Madame BOULILA Farida, de m'avoir dirigée, orientée et encouragée tout le long de ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur BOULILA Abdelghani pour son aide et ses nombreux conseils judicieux et avisés.

Je remercie le Pr. Tomás Ruiz-Argüeso et toute son équipe (Luis Rey, David Durán, Juan Imperial) du centre de Biotechnologie et Génomique des Plantes de l'Université Polytechnique de Madrid, Espagne pour leur précieuse aide.

Je remercie également tous les membres de l'équipe du Laboratoire d'Ecologie Microbienne « Interaction Plantes-Microorganismes » particulièrement : M^{elle} BOUREBABA Yasmina, M^r BELHADI Djellali, M^r REMDANI Nacer, M^r HAMLAT Mourad pour leur soutien.

Enfin, Dans le souci de n'oublier personne notamment M^{me} AHNIA Fatma du Laboratoire de Génie des Procédés , que ceux qui m'ont soutenue, encouragée de près ou de loin trouvent dans ces lignes ma reconnaissance et gratitude.

Sommaire

Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des photos

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Fixation biologique de l'azote	3
I.1. Microorganismes fixateurs d'azote.....	3
I.1.1. Micro organismes fixateurs libres.....	4
I.1.2. Micro organismes fixateurs symbiotiques	4
II. Légumineuses.....	4
II.1. Taxonomie des légumineuses	5
II.2. La tribu des <i>Genistées</i>	6
II.3. Intérêt des légumineuses.....	7
II.3.1. Intérêt écologique	7
II.3.2. Intérêt économique	7
II.3.3. Intérêt médical	8
III. Rhizobia.....	8
III.1. Description des rhizobia.....	8
III.2. Taxonomie des rhizobia	9
III.3. Taxonomie des rhizobia isolées du genre <i>Cytisus</i>	15
III.4. Différentes approches taxonomiques.....	18
III.4.1. Caractérisation phénotypique	18

III.4.2. Caractérisation génotypique	18
III.4.3. Caractérisation polyphasique.....	20
III.5. Evolution et diversité des rhizobia	22
IV. Symbiose rhizobia-légumineuses	22
IV.1. Processus de nodulation	24
IV.1.1. Les étapes de la nodulation.....	24
IV.1.2. Régulation du nombre de nodules	25
IV.2. Spécificité symbiotique	26
IV. 3. Promiscuité	27
V. Facteurs limitant la symbiose rhizobia-légumineuses.....	27
V.1. Stress thermique	28
V.2. Stress salin.....	28
V.3. Stress hydrique	29
V.4. Acidité et alcalinité du sol	29

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique	31
II. Méthodes	32
II.1. Caractérisation phénotypique des souches isolées de <i>Cytisus villosus</i>	32
II.1.1. Description morphologique	32
II.1.1.1. Caractérisation morphologique des colonies	32
II.1.1.2. Caractérisation cellulaire des isolats.....	32
II.1.1.3. Temps de génération et taux de croissance.....	32
II.1.2. Caractérisation physiologique.....	33
II.1.2.1. Effet de la température sur la croissance	33

II.1.2.2. Effet du pH sur la croissance	33
II.1.2.3. Effet du NaCl sur la croissance	33
II.1.3. Caractérisation nutritionnelle.....	34
II.1.3.1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone.....	34
II.1.3.2. Assimilation des acides aminés comme seule source d'azote.....	34
II.1.4. Caractérisation biochimique	34
II.1.4.1. Type respiratoire.....	34
II.1.4.2. Test de la catalase	35
II.1.4.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)	35
II.1.4.4. Recherche de l'acétoïne : Réaction de Voges-Proskauer (VP)	35
II.1.4.5. Production d'acide: Réaction au rouge de méthyle	36
II.1.4.6. Fermentation du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H ₂ S	36
II.1.4.7. Recherche de la β-galactosidase et β-galactopérase	36
II.1.4.8. Production d'indole	37
II.1.4.9. Test acide-indole-pyruvique	37
II.1.4.10. Utilisation du citrate	37
II.1.4.11. Hydrolyse de l'urée.....	37
II.1.4.12. Réduction des nitrates.....	38
II.1.5. Sensibilité et résistance aux antibiotiques	38
II.1.6. Sensibilité et résistance aux métaux lourds	39
II.2. Test de nodulation simple et croisé (Test cross)	39
III. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique	41

Chapitre III : Résultats et discussions

I. Caractérisation phénotypique des souches isolées de <i>Cytisus villosus</i>	42
---	-----------

I.1. Description morphologique.....	42
I.1.1. Caractérisation morphologique des colonies	42
I.1.2. Caractérisation cellulaire des isolats	42
I.1.3. Temps de génération et taux de croissance	42
I.2. Caractérisation physiologique	43
I.2.1. Effet de la température sur la croissance	43
I.2.2. Effet du pH sur la croissance	44
I.2.3. Effet du NaCl sur la croissance.....	45
I.3. Caractérisation nutritionnelle	47
I.3.1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone	47
I.3.2. Assimilation des acides aminés comme seule source d'azote	48
I.4. Caractérisation biochimique.....	49
I.5. Sensibilité et résistance aux antibiotiques	50
I.6. Sensibilité et résistance aux métaux lourds	51
II. Test de nodulation simple et croisé (Test cross)	54
III. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique	57
Conclusion et perspective.....	60
Références bibliographiques.....	62

Annexes

Liste des figures

- Figure 1** : Arbre phylogénétique NJ basé sur l’alignement de 1400 pb de séquences nucléotidiques du gène de l’ARNr *16S*. Les valeurs de bootstrap aux points de branchement sont $\geq 65\%$. Les isolats de *Cytisus* sont indiqués en gras..... 16
- Figure 2** : Arbre phylogénétique NJ basé sur l’alignement de 1300 pb de séquences nucléotidiques des gènes *glnII*, *recA* and *atpD*. Les valeurs de bootstrap aux points de branchement sont $\geq 65\%$. Les isolats de *Cytisus* sont indiqués en gras 17
- Figure 3** : Pouvoir discriminatifs des différentes techniques de la taxo (Vandamme et al.,1996) 21
- Figure 4** : Echange de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobia / legumineuse (d’après Lindstrom et al., 2010)..... 23
- Figure 5** : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004)..... 25
- Figure 6** : Effet de la température sur la croissance des souches testées 44
- Figure 7** : Effet du pH sur la croissance des souches testées 45
- Figure 8** : Effet du NaCl sur la croissance des souches testée 46
- Figure 9** : Dendrogramme de la CAH de 6 souches de rhizobia isolées de *Cytisus villosus* de la région cotiere Ouest de Bejaia, et de 4 souches de référence, *B. cytisi* CTAW11, *B. rifense* CTAW71 *B. japonicum* USDA6, *B. canariense* BTA-1..... 59

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des rhizobia d'après Weir (2013)	10
Tableau II : Souches utilisées pour cette étude et souches de référence	31
Tableau III : Différents antibiotiques testés	38
Tableau IV: Résultat du taux de croissance et du temps de génération.....	43
Tableau V: Assimilation des sucres comme seule source de carbone	47
Tableau VI : Assimilation des acides aminés comme seule source d'azote.....	48
Tableau VII : Phénotype de résistance des souches testées.....	50
Tableau VIII : Résultat des tests des métaux lourds sur la croissance des rhizobia	53
Tableau IX : Coefficient de similitudes inter-souches de rhizobia.....	58

Liste des photos

Photo 1 : Plante de <i>C. villosus</i>	7
Photo 2 : Graines de <i>C. villosus</i>	40
Photo 3 : Graines de <i>C. villosus</i> mises à germer	40
Photo 4 : Graines de <i>C. villosus</i> germées	40
Photo 5 : Plantules de <i>C. villosus</i> dans les jars leonard.....	40
Photo 6 : Aspect de colonies sur YMB.....	42
Photo 7 : Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique X40.....	42
Photo 8 : Test de nodulation avec la plante hôte <i>C. villosus</i>	54
Photo 9 : Les plantes de <i>C.villosus</i> après le test de nodulation en présence d'un témoin négative à gauche	54
Photo 10 : Nodules apparus sur la plante hote <i>C.villosus</i>	54
Photo 11 : Forme multilobées des nodules de <i>C. villosus</i>	54
Photo 12 : Test de nodulation croisé avec les plantes de la tribu des <i>Genisteeae</i>	56
Photo 13 : Test de nodulation croisé	56

Les bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses, communément nommées rhizobia, forment un grand groupe fonctionnel hétérogène, polyphylétique. Ces rhizobia appartiennent au Domaine *Bacteria*, au Phylum *Proteobacteria*. Ils se répartissent en 13 genres comportant 98 espèces, phylogénétiquement intercalés parmi de nombreux autres genres et espèces bactériennes à l'intérieur des α - et des β -Protéobactéries (Weir, 2013).

Leur taxonomie, à l'issue du transfert latéral de gènes symbiotiques, est sans cesse changeante et de nouvelles espèces sont découvertes. La taxonomie polyphasique, introduite en 1970 par Colwell tient compte d'un maximum de données : caractères génotypiques, caractères phénotypiques, caractères phylogénétiques, données écologiques.

Il a été rapporté que plusieurs espèces de plantes du genre *Cytisus* (*C.scoparius*, *C. balansae*, *C. multixorus* et *C. striatus*) sont nodulées par *Bradyrhizobium canariense* et d'autres par *Bradyrhizobium* sp. (Quatrini et al. 2002; Rodriguez-Echeverría et al. 2003; Lafay et Burdon 2006). Dans ce cadre d'investigations nous avons isolé et purifié des bactéroïdes à partir des nodules prélevés de *Cytisus villosus* poussant dans la région côtière de Bejaia. Le présent travail a pour but de les décrire et de statuer sur leur appellation en tant que nouvelles espèces

Ces souches ont subi l'analyse phylogénique PCR-RAPD et le séquençage de l'ADNr16S. Les résultats ont révélé leur appartenance au genre *Bradyrhizobium*. Alors que, le séquençage du gène symbiotique nodC montre qu'elles représentent le *biovar genistearum*, celui des gènes de ménage précise qu'elles forment trois différents groupes autour de *B.canariens*, *B.japonicum*, et un troisième non identifié jusqu'à présent (Ahnia et al., 2014).

En complément de l'approche phylogénétique nous avons procédé à la caractérisation phénotypique des souches qui prend en compte les caractères morphologiques, biochimiques, nutritionnels, physiologiques et structuraux (Sneath et Sokal, 1973). Cette étude est présentée en trois chapitres. Le premier chapitre aborde une synthèse bibliographique ayant pour but de replacer notre démarche par rapport aux connaissances actuelles concernant les deux partenaires de la symbiose (légumineuse/rhizobia). Le second correspond à la méthodologie de travail adoptée et enfin, le dernier rassemble les résultats de l'expérimentation que nous avons entreprise.

Par ailleurs, cette étude s'intègre, en partie, dans le projet de recherche algéro-espagnol AECID/PCI développé sur les Légumineuses spontanées par le laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université de Bejaia et le Centre de Biotechnologie et Génomique des Plantes de l'Université Polytechnique de Madrid.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Fixation biologique de l'azote

Le cycle de l'azote joue un rôle primordial dans les écosystèmes et dans l'agriculture. L'azote est un facteur limitant majeur de la production agricole, alors que l'atmosphère est la principale réserve naturelle d'azote. Malheureusement cet azote moléculaire, en abondance considérable n'est pas accessible à la plus part des êtres vivants. L'azote combiné est la seule forme biologiquement assimilable par les plantes et les animaux. La fixation symbiotique joue un rôle important dans le cycle de l'azote et dans l'écosystème tout entier puisqu'elle constitue la plus grande source d'azote combiné produit dans la nature (Dreyfus, 1982).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique constitue 60% de la fixation globale de l'azote. Le reste provient des oxydes d'azote de l'air (10%) et de la fixation industrielle (30%) (Hopkins, 2003).

Le processus de fixation biologique permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux. C'est une réduction enzymatique de N₂ (azote moléculaire) en azote ammoniacal (NH₃) par des bactéries diazotrophes (Gaudry, 1997) suivant la réaction globale :



Cette réduction est catalysée par la nitrogénase, enzyme que possèdent les organismes diazotrophes (Blondeau, 1980). Les rhizobia sont des bactéries du sol capables d'induire sur les racines des légumineuses la formation d'organes particuliers, les nodosités au sein desquels ils réduisent l'azote de l'air. Dans cette association à bénéfice mutuel, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, en échange, synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte (Dénarié, 2009).

I.1. Microorganismes fixateurs d'azote

Les bactéries fixatrices d'azote, sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que les tubes digestifs de divers animaux. On distingue deux types de fixateurs : les microorganismes libres et les microorganismes symbiotiques.

I.1.1. Micro organismes fixateurs libres

Diverses bactéries, à l'état libre dans le sol ou dans l'eau, sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Les plus répandues sont des hétérotrophes. On les rencontre en condition anaérobie comme *Clostridium*, *Bacillus*, mais aussi en condition aérobie comme *Azotobacter*. Beaucoup vivent et se multiplient en s'adjoignant aux surfaces des racines comme *Bacillus* sp.

I.1.2. Micro organismes fixateurs symbiotiques

Les systèmes fixateurs les plus efficaces sont des symbioses qui permettent un couplage entre la fixation d'azote qui demande beaucoup d'énergie et la photosynthèse. Cette fixation s'effectue au niveau des racines dans les nodosités qui contiennent des microorganismes en très grand nombre. Le rôle de ces bactéries dans la formation des nodules fut rapidement établi en leur absence.

Dans le sol, les deux types de symbioses les plus répandues sont d'une part, les associations entre légumineuses et bactéries à Gram négatif appelée communément rhizobia, et celles des plantes souvent ligneuses à Gram positif du genre *Frankia*.

II. Légumineuses

La famille des légumineuses ou *Fabaceae* est l'un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondant et les plus diversifiées. Elle est subdivisée en trois sous-familles : *Mimosoideae*, *Cesalpinoideae* et *Papilionoideae*. Elle comporterait plus de 19000 espèces réunis en 580 genres et dont seulement 10% ont été examinés pour la nodulation racinaire ou caulinaire. Celle-ci a été observée dans plus de 90% des cas chez les Mimosacées et les Papilionacées (Guerrouj et *al.*, 2009). En revanche on trouve peu d'espèces nodulées chez les Cesalpinacees (Sprent et *al.*, 1987). Cette famille contient aussi bien des plantes herbacée annuelles que des plantes ligneuses ; elle colonise les régions tropicales, les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre. Les légumineuses, grande famille végétale, sont caractérisée par la fructification en gousses ou légumes, les fleurs généralement hermaphrodites (rarement dioïques ou polygames) régulières ou irrégulières (Quezel et Santa, 1962).

L'ensemble du pourtour méditerranéen comprend une flore très riche en légumineuses adaptées aux diverses conditions pédoclimatiques de ces régions. Certaines ont développé des

mécanismes d'adaptation particuliers, avec des systèmes racinaires puissants ou des cycles végétatifs incluant une période de dormance estivale. Système autonome où la bactérie fournit les composés azotés à la plante en échange des substrats carbonés, les associations symbiotiques fixatrices d'azote « rhizobium légumineuse » sont parfaitement adaptées à la revégétalisation de sites dégradés soumis à de fortes contraintes hydriques ou pauvres en azote. Celles-ci constituent une première séquence de végétation contribuant à faire entrer l'azote atmosphérique dans l'écosystème sol-plante et à activer la formation d'un sol, véritable support d'une végétation pérenne et d'une réhabilitation durable (Domergue, 2006).

II.1. Taxonomie des légumineuses

Selon Quezel et Santa, (1962), la famille des légumineuses est classée comme suit :

Règne :	Eucaryote
Phylum :	<i>Planta</i>
Sous règne :	Végétaux (phanérogame)
Embranchement :	Spermaphytes (plantes a graines)
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous classe :	<i>Rosidae</i>
Ordre :	Fabales
Famille :	<i>Leguminosae</i>

La famille des légumineuses comporte trois sous-familles : *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae*, *Papilionoideae*.

a. Caesalpinoideae

Ce sont des arbres, arbustes, et des herbacées rependues dans les régions tropicales et subtropicales à climat chaud. Cette sous famille compte environ 200 genres et 2800 espèces (Gaussen et *al.*, 1982). Les fleurs de *Cesalpinoideae* sont irrégulières (zygomorphes) avec cinq pétales qui ne sont pas différenciés en standard. Les étamines sont visibles de l'extérieur.

b. Mimosoideae

Les plantes de *Mimosoideae* sont caractérisées par leurs petites fleurs régulières (actinomorphe) entassées, généralement en épis ou de têtes qui ressemblent à une pom-pom

(White, 2010). Principalement arbres ou arbustes, rarement des herbes, certaines possèdent de la résine. On les retrouve dans les régions tropicales, subtropicales à climat chaud. Avec environ 60 genres et 3200 espèces certaines sont cultivées pour la production de tannins (extrait de l'écorce) utilisés pour le traitement des cuirs.

c. Papilionoideae

Cette appellation est due à la forme de la corole qui se présente sous forme de papillon (Guinard et Dupont, 2005). C'est un groupe de légumineuses très diversifié à grande représentation principalement herbacée mais comprend aussi des arbres et arbustes. C'est une sous famille très importante dans la région méditerranéenne. Elle compte environ 440 genres, regroupés en 31 tribus (Labat et *al.*, 1996) et 11300 espèces. Dans cette sous famille 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995).

Les *Papilionoideae* sont utilisées pour la production des graines alimentaires (haricot, vigne, pois, fève...) pour l'alimentation humaine et celle du bétail sous forme de fourrage (lupins, trèfle, ...). Parmi cette sous-famille on compte la tribu des *Genistées* qui a fait l'objet de notre travail

II.2. La tribu des *Genistées*

Les *Genistées* (Adans) Benth se rencontrent fondamentalement au pourtour méditerranéen. Différent processus paleoclimatique et géologiques ont eu un impacte sur l'évolution des communautés des plantes méditerranéennes. Cette tribu représente une grande signification écologiques dans les pays méditerranéens car elles colonisent les forêts dégradées et caractérisent les paysages des régions en déforestation (Lograda et *al.*, 2009). Il existe plusieurs genres appartenant à cette tribu : genre *Retama*, genre *Genista*, genre *Lupinus*, genre *Spartium*, genre *Cytisus*.

- **Genre *Cytisus***

Ce sont des Arbustes ou arbrisseaux à feuilles, en général trifoliolées. Les Stipules sont réduites ou nulles et les fleurs sont de couleur jaunes. On reconnaît à ce genre six espèces : *C. purgans*, *C. linifolius*, *C. Fontanesii*, *C. villosus*, *C. monspessulanus*, *C. arboreus* (Quezel et Santa, 1962). Dans ce qui suit nous décrivons notre plante model qui est concernée par notre expérimentation.

- *Cytisus villosus*

Arbrisseau de 1 à 1,5 m dressé, robuste, à rameaux allongés. Les jeunes rameaux sont couverts de poils ; feuilles pétiolées, à folioles obovales, couvertes sur les deux faces de poils appliqués, ne noircissant pas par la dessiccation ; fleurs latérales, en grappes feuillées sur les rameaux anciens ; pédicelles égalant à peu près le calice ; calice à poils étalés-dressé, allongé, tubuleux, à lèvres divariquées, la supérieure à dents obtuses, peu courbées en dehors ; gousse de 25-30 mm ; sur 5-6, à valves convexes, noire, très velue-soyeuse (Quezel et Santa, 1962).



Photo 1 : Plante de *C.villosus*

II.3. Intérêt des légumineuses

II.3.1. Intérêt écologique

De nombreux travaux ont démontré le pouvoir des légumineuses dans la restauration, la revégétalisation des milieux dégradés et la fertilisation des sols pauvres (Lograda et *al.*, 2009). Ce pouvoir est rendu possible grâce à l'association symbiotique entre les rhizobia et les légumineuses (Zahran, 2009). Elles constituent d'excellentes lignes de brise-vent et ralentissent voir arrêtent la progression des dunes de sable (Ferry et *al.*, 1990).

Les légumineuses contribuent à la réduction de l'émission de gaz à effet de serre à travers la diminution de l'utilisation des engrais azotés, qui contribuent à la fois aux émissions de CO₂ et le N₂O (Rispaill et *al.*, 2010).

II.3.2. Intérêt économique

En termes d'importance économique, les légumineuses sont au deuxième rang après les graminées (céréales) dans la fourniture des cultures vivrières destinées à l'agriculture

mondiale. Elles sont une source majeure de protéines et de lipides pour la consommation Humaine et animale (Masson et *al.*, 2000).

Les légumineuses sont utilisées pour une variété d'autres fins telles que la production du bois, de résines précieuses, substances dans les vernis, les peintures et laques, par exemple *Copaifera*. D'autres sont la source de colorants, exemple *Indigofera* qui est cultivé pour un colorant bleu. L'importance économique des légumineuses est susceptible d'augmenter à mesure que la pression humaine rencontre d'avantage de demande de terres marginales (White, 2010).

II.3.3. Intérêt médical

La famille des légumineuses fournit de très grand nombres de drogues, recherchées pour divers principes. Ces drogues existent surtout dans des espèces appartenant à la flore des zones arides ou semi-arides (Chopra et *al.*, 1960). Selon une récente enquête ethnobotanique dans la région Nord-Est de la Libye, *Retama* est prescrite pour le traitement de l'hypertension (Ishurda et *al.*, 2004) et des troubles gastro-intestinaux. Elle était couramment utilisée pour le traitement traditionnel de certaines maladies rénales et comme plantes guérisseuses pour le contrôle du diabète et de la phytothérapie (Maghrani et *al.*, 2005).

III. Rhizobia

III.1. Description des rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatif, non sporulantes. On distingue deux formes :

a. Forme végétative

les rhizobia sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 μm de largeur sur 1,2 à 3 μm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobia à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les rhizobia à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire.

b. Forme bactéroïdes

A l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobia se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry et *al.*, 2004). Il existe des

bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

- **Caractères cultureux**

On distingue trois groupes de rhizobia : le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 h. Le deuxième est le groupe de rhizobia à croissance moyenne les *Mesorhizobium* qui produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-4 jours et ont une vitesse de dédoublement de 4-5h, le troisième est le groupe de rhizobia à croissance lente, les *Bradyrhizobium* qui produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 4-5 jours et ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le Yeast Mannitol Agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture des rhizobia (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides ou brillantes. Les colonies jaunes pâles sont rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994). Il est admis que seules les bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson et al., 2006).

III.2. Taxonomie des rhizobia

Rhizobiums est le nom communément attribué aux bactéries fixatrices d'azote associées aux légumineuses, alors que “ *Rhizobium* ” est un genre bactérien. L'histoire des rhizobia commence au XIX^{ème} siècle, quand Beijerinck (1888) et Frank (1889) regroupent toutes les bactéries isolées de nodosités de racines de légumineuses dans le genre *Rhizobium*.

Caractérisées ensuite par leur vitesse de croissance, des souches à croissance rapide du genre *Rhizobium* sont différenciées de souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium*. Plus tard, le genre *Rhizobium* sera subdivisé en 3 genres : *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium*.

L'introduction de la taxonomie numérique et de techniques moléculaires, a permis de décrire de nouveaux genres et de nouvelles espèces de bactéries capables de noduler les légumineuses (Zakhia et de Lajudie, 2001). Les rhizobia appartiennent au Domaine *Bacteria*,

au Phylum *Proteobacteria*. Ils se répartissent en 13 genres comportant 98 espèces, phylogénétiquement intercalés parmi de nombreux autres genres et espèces bactériennes à l'intérieur des α - et des β -Protéobactéries (Weir, 2013).

Les rhizobia de la classe α -Protéobactéries appartiennent à l'ordre des Rhizobiales, alors que les rhizobia de la class β -Protéobactéries appartiennent à l'ordre des *Burkholderiales*. Cette classification est loin d'être définitive, car on estime que seulement près d'un tiers des légumineuses a été étudié pour leur aptitude à noduler (Weir, 2013).

Tableau I: Classification des rhizobia d'après Weir (2013).

Rhizobium	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i>	Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i>
<i>Rhizobium alamii</i>	Berge et al. (2009)
<i>Rhizobium alkalisoli</i>	Lu et al. (2009b)
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	García-Fraile et al. (2007)
<i>Rhizobium daejeonense</i>	
<i>Rhizobium endophyticum</i>	López-López et al. (2011)
<i>Rhizobium etli</i>	
<i>Rhizobium galegae</i>	
<i>Rhizobium gallicum</i>	
<i>Rhizobium giardinii</i>	
<i>Rhizobium hainanense</i>	
<i>Rhizobium herbae</i>	Ren et al. (2011b)
<i>Rhizobium huautlense</i>	
<i>Rhizobium indigoferae</i>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Espèce type
<i>Rhizobium loessense</i>	Autrefois <i>Rhizobium huanglingense</i>
<i>Rhizobium lusitanum</i>	

<i>Rhizobium mesosinicum</i>	Lin et al. (2009)
<i>Rhizobium miluonense</i>	
<i>Rhizobium mongolense</i>	
<i>Rhizobium multihospitium</i>	Han et al. (2008)
<i>Rhizobium oryzae</i>	Peng et al. (2008)
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium pisi</i>	Ramirez-Bahena et al. (2008)
<i>Rhizobium tibeticum</i>	Hou et al. (2009)
<i>Rhizobium sullae</i>	Autrefois <i>Rhizobium hedysari</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	
<i>Rhizobium tubonense</i>	Zhang et al. (2011)
<i>Rhizobium undicola</i>	Autrefois <i>Allorhizobium undicola</i>
<i>Rhizobium vignae</i>	Ren et al. (2011)
<i>Rhizobium yanglingense</i>	
Mesorhizobium	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Phyllobacteriaceae</i>	
<i>Mesorhizobium albiziae</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium alhagi</i>	Chen et al. (2010)
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	
<i>Mesorhizobium australicum</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium camelthorni</i>	Chen et al. (2011)
<i>Mesorhizobium caraganae</i>	Wang et al. (2007)
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Autrefois <i>Rhizobium ciceri</i>

<i>Mesorhizobium gobiense</i>	
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Autrefois <i>Rhizobium huakuii</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	Autrefois <i>Rhizobium loti</i> , espèce type
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	Autrefois <i>Rhizobium mediterraneum</i>
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	Vidal et al. (2009)
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	
<i>Mesorhizobium robiniae</i>	Zhou et al. (2010)
<i>Mesorhizobium shangrilense</i>	Lu et al. (2009)
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	
<i>Mesorhizobium tarimense</i>	
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Autrefois <i>Rhizobium tianshanense</i>
<i>Ensifer</i> (autrefois <i>Sinorhizobium</i>)	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i>	Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Rhizobiaceae</i>
<i>Ensifer abri</i>	
<i>Sinorhizobium americanum</i>	
<i>Ensifer arboris</i>	
<i>Ensifer fredii</i>	Autrefois <i>Rhizobium fredii</i> , forme type pour <i>Sinorhizobium</i>
<i>Ensifer garamanticus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer indiaense</i>	
<i>Ensifer kostiensis</i>	
<i>Ensifer kummerowiae</i>	

<i>Ensifer medicae</i>	
<i>Ensifer meliloti</i>	Autrefois <i>Rhizobium meliloti</i>
<i>Ensifer mexicanus</i>	
' <i>Sinorhizobium morelense</i> '	
<i>Ensifer adhaerens</i>	
<i>Ensifer numidicus</i>	Merabet et al. (2010)
<i>Ensifer saheli</i>	
<i>Ensifer sojae</i>	Li et al. (2010)
<i>Ensifer terangae</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Bradyrhizobiaceae</i>	
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	
<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>	Autrefois <i>Blastobacter denitrificans</i> ;
<i>Bradyrhizobium elkani</i>	
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	Islam et al. (2008)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Autrefois <i>Rhizobium japonicum</i> , espèce type
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	Ramírez-Bahena et al. (2009)
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	Ramírez-Bahena et al. (2009)
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	
<i>Burkholderia</i>	
Classe: <i>Betaproteobacteria</i> Ordre: <i>Burkholderiales</i> Famille: <i>Burkholderiaceae</i>	
<i>Burkholderia caribensis</i>	
<i>Burkholderia cepacia</i>	

<i>Burkholderia mimosarum</i>	
<i>Burkholderia nodosa</i>	
<i>Burkholderia phymatum</i>	
<i>Burkholderia sabiae</i>	Chen et al. (2008)
<i>Burkholderia tuberum</i>	
Phyllobacterium	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Phyllobacteriaceae</i>	
<i>Phyllobacterium trifolii</i>	
<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>	
<i>Phyllobacterium leguminum</i>	
Microvirga	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Methylobacteriaceae</i>	
<i>Microvirga lupini</i>	
<i>Microvirga lotononidis</i>	
<i>Microvirga zambiensis</i>	
Azorhizobium	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i>	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Espèce type
<i>Azorhizobium doebereinae</i>	Autrefois <i>Azorhizobium johannae</i>
Ochrobactrum	
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i> Ordre: <i>Rhizobiales</i> Famille: <i>Brucellaceae</i>	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	Zurdo-Piñeiro et al. 2007
<i>Ochrobactrum lupini</i>	
Methylobacterium	

Classe: <i>Alphaproteobacteria</i>	Ordre: <i>Rhizobiales</i>	Famille: <i>Methylobacteriaceae</i>
<i>Methylobacterium nodulans</i>		
<i>Cupriavidus</i>		
Classe: <i>Betaproteobacteria</i>	Ordre: <i>Burkholderiales</i>	Famille: <i>Burkholderiaceae</i>
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>		
<i>Devosia</i>		
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i>	Ordre: <i>Rhizobiales</i>	Famille: <i>Hyphomicrobiaceae</i>
<i>Devosia neptuniae</i>		
<i>Shinella</i>		
Classe: <i>Alphaproteobacteria</i>	Ordre: <i>Rhizobiales</i>	Famille: <i>Rhizobiaceae</i>
<i>Shinella kummerowiae</i>	Lin et al. (2008)	

III.3. Taxonomie des rhizobia isolées du genre *Cytisus*

Des travaux réalisés par Rodriguez - Echevarría et *al.* (2003) sur l'analyse de séquences partielles de l'ADNr *16S* des isolats du genre *Cytisus* ont montré leur appartenance au genre *Bradyrhizobium*. Actuellement 9 espèces de *Bradyrhizobium* ont été décrites (Tableau I).

Selon Chahboune et *al.* (2011a, 2011b, 2012) une étude similaire réalisée sur les isolats de la plante *Cytisus villosus* du Maroc, révèle une apparition de deux nouvelles espèces *B. cytisi* CTAW11 et *B. rifense* CTAW71, un groupe appartient au *B. japonicum* et un autre groupe *B. canariense*.

Concernant les rhizobia de *Cytisus* d'Algérie, l'analyse phylogénétique basée sur les séquences nucléotidiques de l'ADNr *16S* de 51 isolats de *C. villosus* ont montré leur appartenance au genre *Bradyrhizobium* (Fig. 1).

En outre l'arbre phylogénétique basé sur les gènes de ménages de ces souches ont déterminés trois groupes un groupe appartient au *B. japonicum*, un autre se regroupe avec *B. canariense* et le troisième groupe peut faire l'objet d'un nouveau groupe (Fig. 2) (Ahnia et *al.*, 20014).

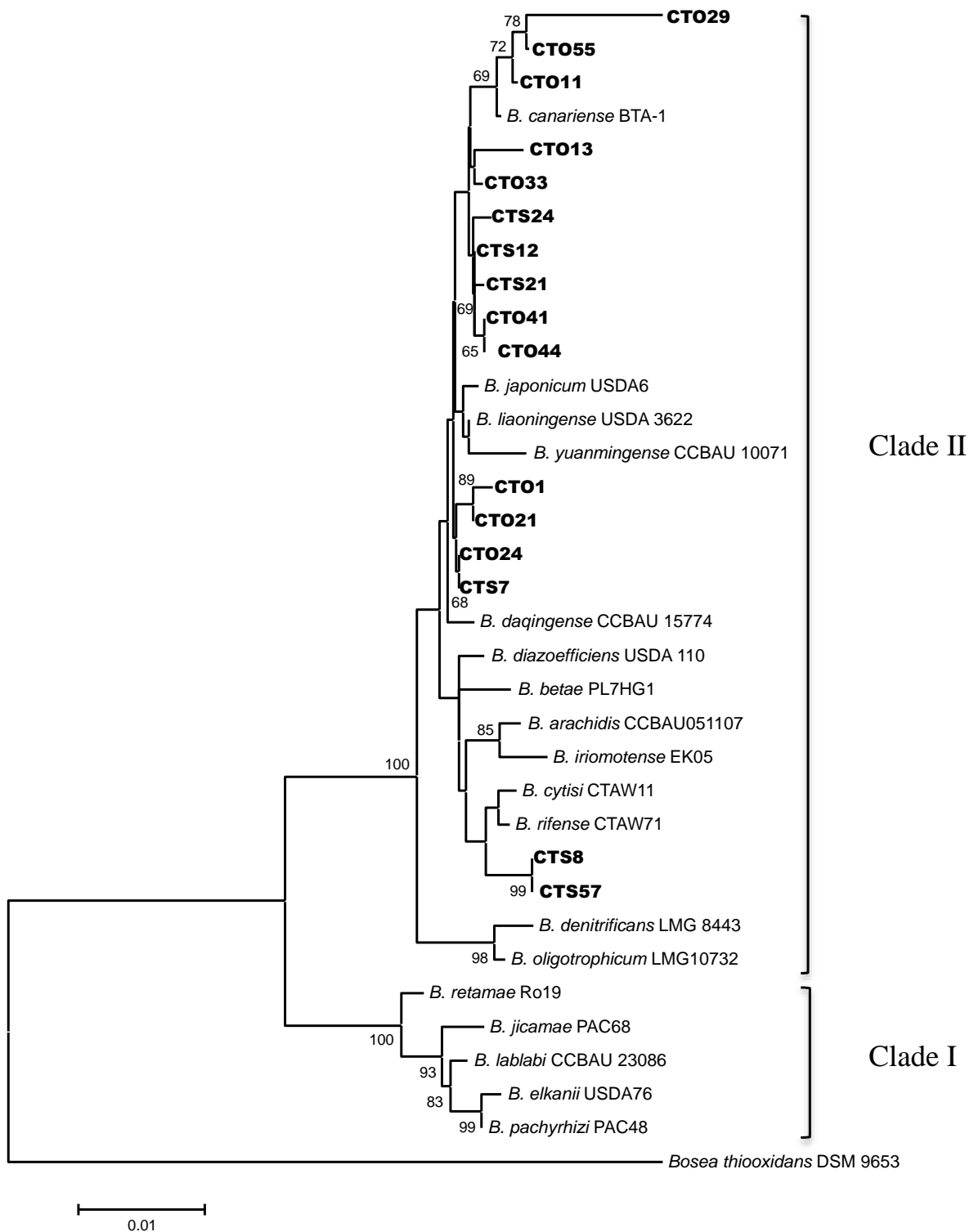


Figure 1 : Arbre phylogénétique NJ basé sur l’alignement de 1400 pb de séquences nucléotidiques du gène de l’ARNr *16S*. Les valeurs de bootstrap aux points de branchement sont $\geq 65\%$. Les isolats de *Cytisus* sont indiqués en gras.

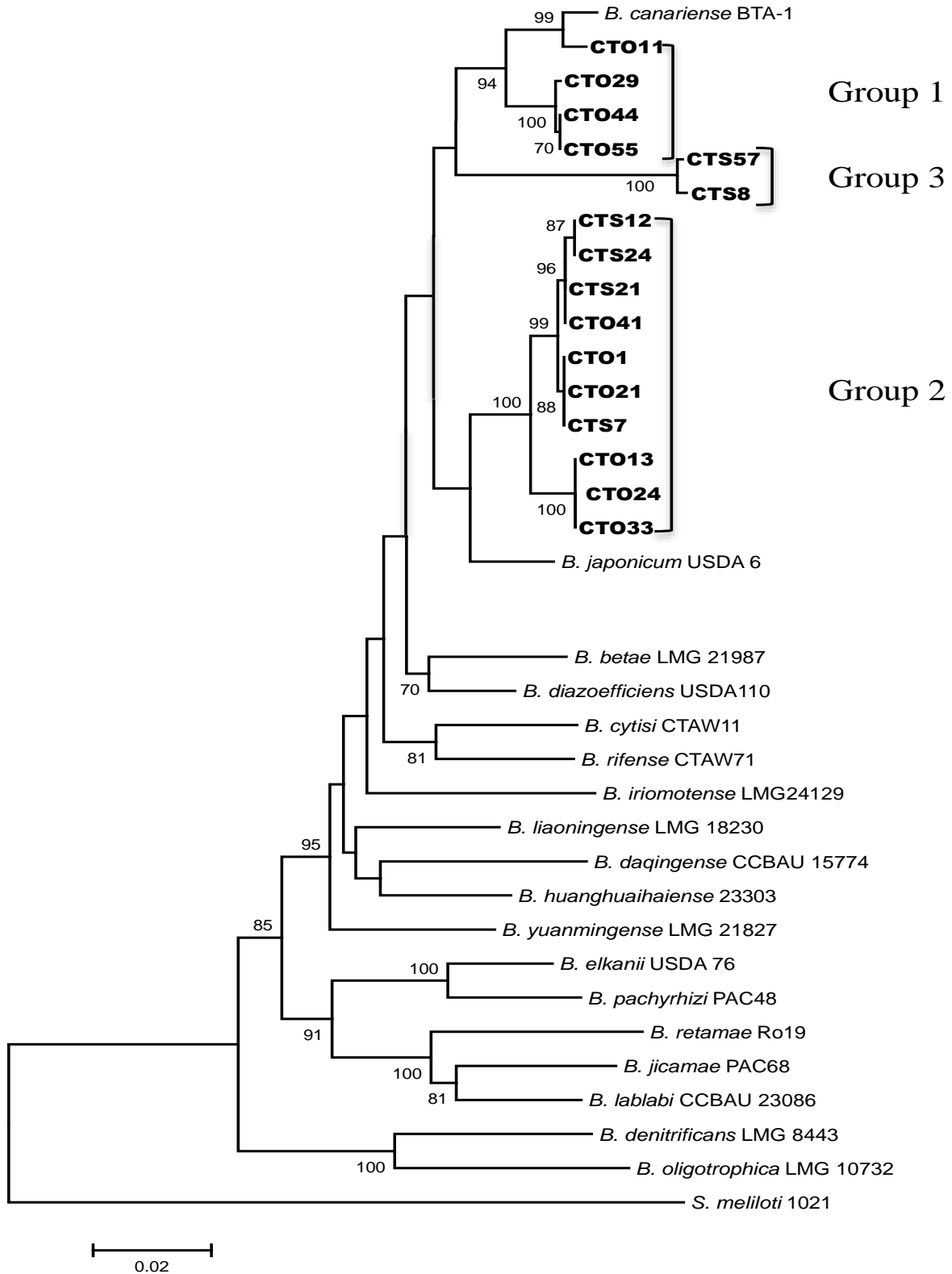


Figure 2 : Arbre phylogénétique NJ basé sur l’alignement de 1300 pb de séquences nucléotidiques des gènes *glnII*, *recA* and *atpD*. Les valeurs de bootstrap aux points de branchement sont $\geq 65\%$. Les isolats de *Cytisus* sont indiqués en gras.

III.4. Différentes approches taxonomiques

La taxinomie ou taxonomie est la science qui a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de pouvoir les identifier puis les nommer, et enfin les classer. Les critères de la classification ont varié dans le temps et il est possible de distinguer quatre grandes périodes au cours desquelles ont été utilisées une taxonomie phénétique, une taxonomie phylogénétique et une taxonomie polyphasique.

III.4. 1. Taxonomie phénotypique

La caractérisation phénotypique classique des rhizobiums se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques (Graham et *al.*, 1991). Les critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, nombre et type de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores) et les caractéristiques de la colonie (couleur, dimension, forme).

Les critères symbiotiques indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée. Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différentes enzymes telles que glutamate déshydrogénase, glucose 6-phosphate déshydrogénase, indole-phénol oxydase, nitrate réductase, uréase, adénylate kinase ainsi que d'autres enzymes impliqués dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés.

Les critères physiologiques regroupent le taux de croissance de la bactérie sur le milieu YEM (*Yeast Extract Mannitol*) (Vincent, 1970), la capacité d'utiliser différents carbohydrates et différentes sources d'acides aminés, la tolérance à différentes concentrations en sels et aux variations du pH, la croissance à différentes températures, la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, etc...

Il est important de noter que les taxonomistes bactériens prescrivent que ces critères phénotypiques soient pris en compte lorsqu'un auteur veut donner un nom à une nouvelle espèce.

III.4.2. Taxonomie génotypique

Le génome des bactéries est constitué en plus de l'ADN chromosomique, d'ADN plasmidique qui peut constituer jusqu'à 50 % du génome entier. Les méthodes d'analyse

impliquent par conséquent des gènes d'origine chromosomique et d'autres d'origine plasmidique comme les gènes symbiotiques dans le cas des rhizobiums.

Parmi les techniques de classification des bactéries qui visent l'ADN chromosomique, se trouvent le séquençage total du génome et la détermination du pourcentage d'homologie ADN/ADN.

La détermination du pourcentage d'homologie ADN/ADN par hybridation de l'ADN de souches à identifier avec l'ADN de souches de référence est reconnue comme la méthode standard pour identifier les espèces (Wayne *et al.*, 1987). Sur la base de ce type d'analyse, le genre *Mesorhizobium* a été créé. Certaines espèces initialement classées dans le genre *Rhizobium* ont été renommées (et de nouvelles espèces ont été décrites dans le genre *Rhizobium* comme c'est le cas pour *R. sulae* (Squartini *et al.*, 2002).

Le développement des techniques moléculaires a permis à travers les méthodes basées sur la *Polymérase Chain Reaction* (PCR) de caractériser des populations naturelles de rhizobiums et d'examiner les relations phylogénétiques entre les différents isolats.

Parmi ces méthodes, on cite, la RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (Laguerre *et al.*, 1996) ou encore l'utilisation d'amorces dérivées de séquences palindromiques réputées très conservées chez les bactéries: séquences REP (*repetitive extragenic palindromic*) (De Bruijn, 1992).

La séquence la plus largement utilisée chez les rhizobiums est celle de l'ADNr 16S (Weisburg *et al.*, 1991). L'utilisation de la variation de la séquence de l'ADNr 16S pour un but taxonomique suppose que l'évolution du génome progresse à un taux constant et que les gènes soient hérités de manière stricte d'une génération à une autre sans aucun transfert latéral.

L'étude des gènes codant pour l'ADN ribosomique 16S a démontré la proximité phylogénétique entre les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* d'une part, et entre *Bradyrhizobium*, *Rhodospseudomonas* et *Nitrobacter* d'autre part (De Lajudie *et al.*, 1994; Van Berkum *et al.*, 1996).

La caractérisation des rhizobiums en se basant sur les critères génotypiques est maintenant couramment réalisable dans plusieurs laboratoires. Le choix des techniques

dépend du nombre et du type de souches à étudier et du niveau de résolution désiré car chaque méthode a un pouvoir de résolution propre.

III.4.3. Taxonomie polyphasique

Les termes de "polyphasic taxonomy" ou taxonomie polyphasique ont été introduits en 1970 par Colwell pour faire référence à une classification qui tient compte d'un maximum de données : caractères génotypiques, caractères phénotypiques, caractères phylogénétiques, données écologiques...

L'expression "polyphasic taxonomy" sous-entend également que cette classification est susceptible d'avoir l'agrément d'un maximum de bactériologistes. C'est pourquoi elle est appelée par certains "taxonomie mixte et consensuelle".

Vandamme et *al.*, (1996) ont présenté les différentes techniques utilisées dans la taxonomie bactérienne moderne (fig.2). Elles ont des niveaux d'expression et un pouvoir discriminant variable et la combinaison de plusieurs techniques permet de révéler à la fois des diversités génétiques au sein de groupes bactériens et des relations taxonomiques entre des groupes très éloignés.

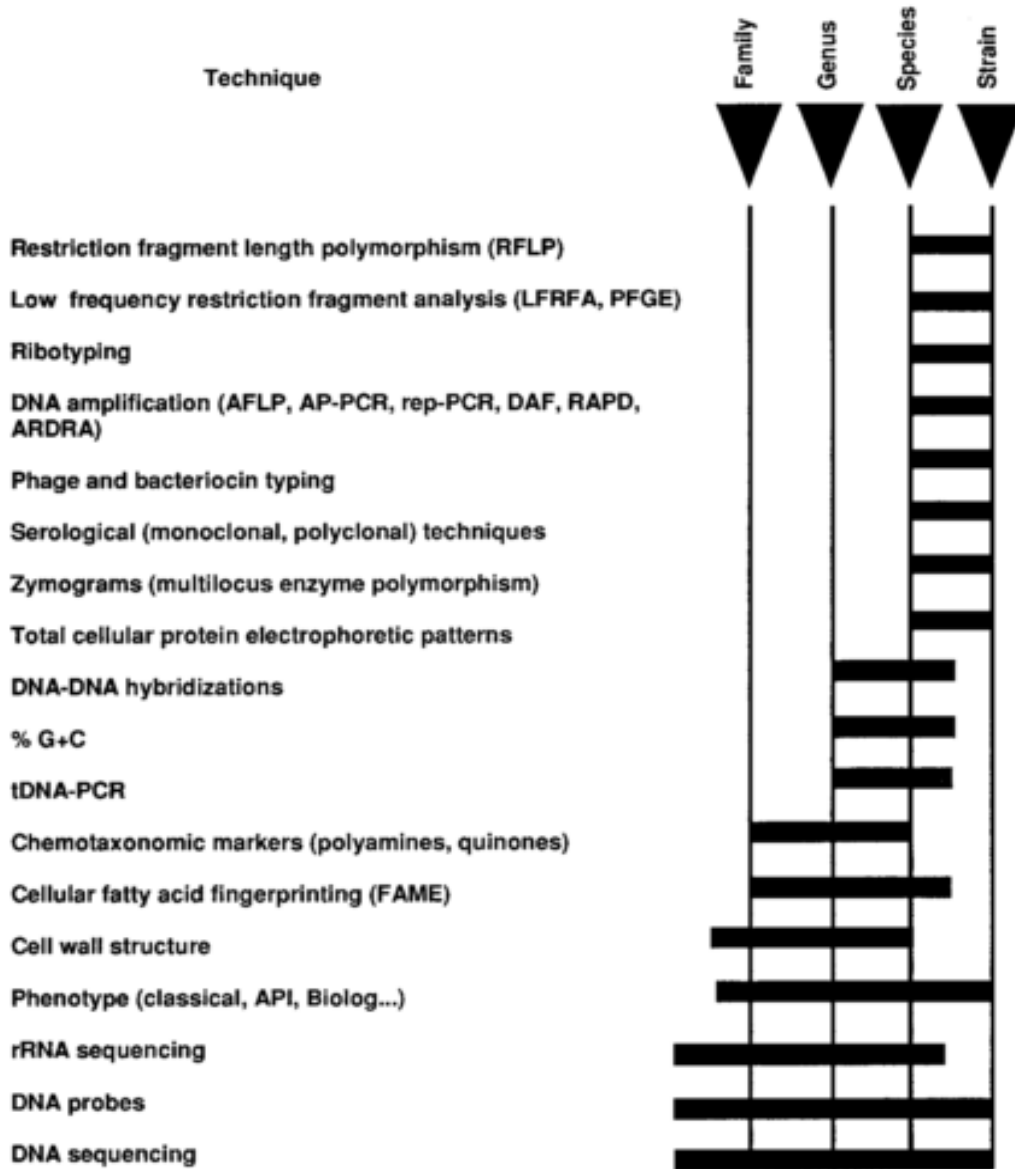


Figure 3 : Pouvoir discriminatifs des différentes techniques de la taxonomie (Vandamme et *al.*,1996).

Les abréviations : LFRFA (low Frequency Restriction Fragment Analysis); PEGE (pulsed Field Gel Electrophoresis) ; AFLP (amplified Fragment Length Polymorphism); AP-PCR (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain- Reaction); REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR); ERICPCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus); DAF (DNA amplification Fingerprinting); RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA); ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis); FAME(FattyAcidMethylEster).

III.5. Evolution et diversité des rhizobia

Plusieurs études montrent que la taxonomie des rhizobia ne reflète pas les propriétés symbiotiques. Ces études s'appuient sur la comparaison des phylogénies des gènes *nod* avec des phylogénies de marqueurs taxonomiques comme l'*ADNr16S* qui montre une incongruité nette entre ces deux types de marqueurs. Les auteurs en question ont comparé les phylogénies des protéines *nodD* et *ADNr16S* (Young et Johnston, 1989), les phylogénies des gènes *nodA*, *nodC* et *ADNr16S* (Ueda et al., 1995), ou *nodA*, *nodB*, *nifH* et *ADNr16S* (Dobert et al., 1994), ou *nodC*, *nifH* et *ADNr16S* (Laguerre et al., 2001), ou encore les phylogénies des gènes *nodABCIJ* et *ADNr16S* (Suominen et al., 2001).

La comparaison entre la phylogénie de l'*ADNr16S* des rhizobia et la phylogénie de leurs légumineuses hôtes permet également de conclure que la taxonomie des rhizobia n'est pas adaptée à l'étude de leurs propriétés symbiotiques. Ils concluent tous à l'implication de transferts latéraux des gènes *nod* parmi la diversité taxonomique des rhizobia, au niveau intra- et intergénique.

Cependant, deux études phylogénétiques, l'une portant sur les gènes *nodA*, *nifH* et *ADNr16S* (Haukka et al., 1998), l'autre sur les gènes *nodBC* et divers marqueurs chromosomiques, concluent à une certaine convergence des phylogénies des *loci nod* et des *loci* chromosomiques au niveau intergénique. Leurs résultats suggèrent l'existence de transferts horizontaux de *loci nod* entre des rhizobia proches taxonomiquement (intra- et interspécifiques) mais pas entre des rhizobia appartenant à des lignées taxonomiques différentes (Wernegreen et Riley, 1999). Ces résultats soulignent également l'importance du contexte génétique d'une souche donnée pour intégrer de l'ADN étranger.

Alors que la phylogénie du gène *nifH* avait été en partie corrélée avec la phylogénie 16S des rhizobia (Dobert et al., 1994), des études récentes sur une diversité élevée de rhizobia montrent de nombreuses incongruités entre les phylogénies de ces deux marqueurs. La phylogénie *nifH* serait plutôt corrélée à celle des gènes *nodA* (Haukka et al., 1998) et *nodC* (Laguerre et al., 2001), bien que de nombreuses incohérences existent.

IV. Symbiose rhizobia-légumineuses

La symbiose rhizobia-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. A la suite de mécanismes complexes de

reconnaissance entre les deux organismes, via un dialogue moléculaire notamment, la bactérie induit chez la légumineuse la formation sur les racines d'un organe spécialisé, le nodule, à l'intérieur duquel la bactérie, intracellulaire, se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant, via le complexe nitrogénase, en ammonium (Perret et *al.*, 2000). Certaines légumineuses sont également capables de former des nodules sur les tiges, appelés nodules caulinaires (Dreyfus et Dommergues, 1981). L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires.

Les légumineuses permettent ainsi une réduction de l'utilisation des engrais chimiques azotés soit en utilisation directe (légumineuses alimentaires par exemple), soit lorsqu'elles sont utilisées en rotation de culture en tant qu'engrais verts. Les légumineuses jouent donc un rôle essentiel dans les écosystèmes naturels, en agriculture et en agroforesterie, en colonisant des espaces pauvres en azote et en constituant une source majeure de fertilisants naturels et économiques pour les cultures.

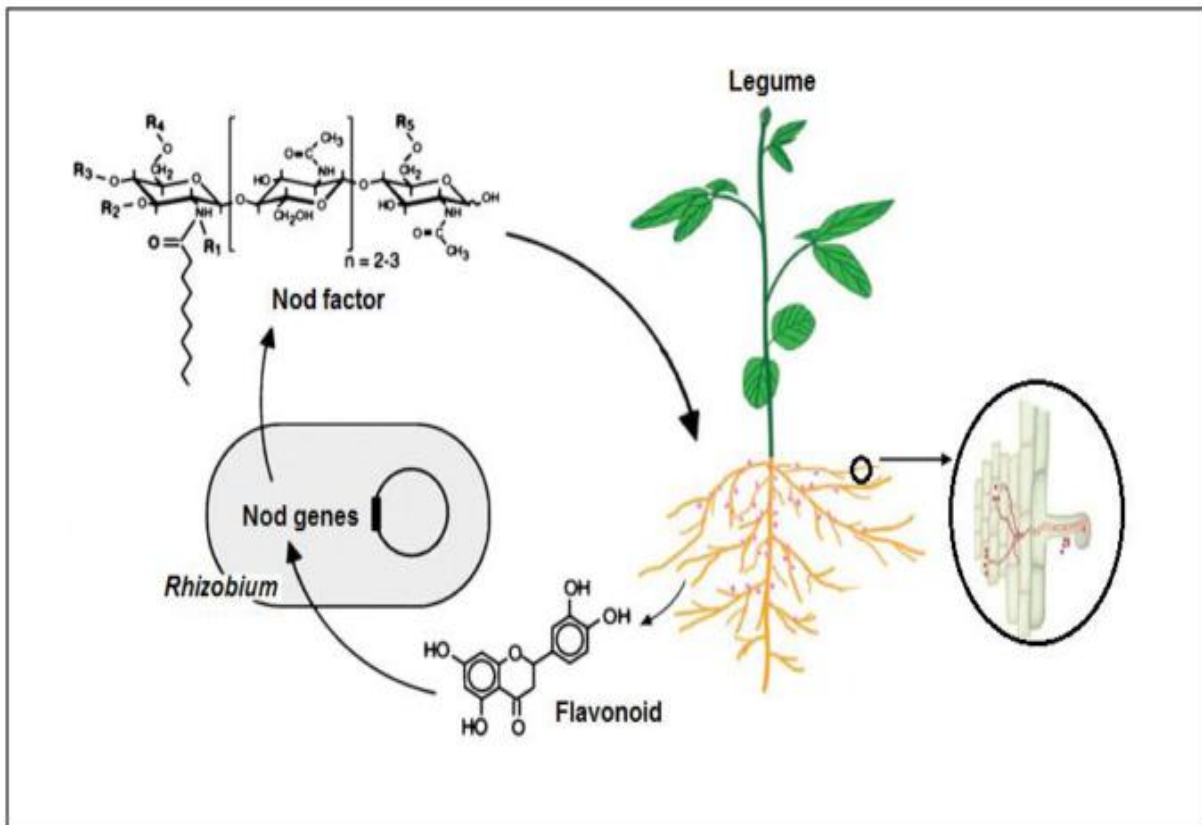


Figure 4 : Echange de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobia / légumineuse (d'après Lindstrom et *al.*, 2010).

Cependant, beaucoup de légumineuses sont sensibles à la sécheresse et à l'acidité des sols, ce qui gêne l'expansion de ces cultures dans les régions à faible pluviométrie. Ainsi, l'identification d'espèces hôtes et rhizobiennes tolérantes au sel et/ou à l'acidité des sols sont une priorité dans le domaine de la recherche agricole (Graham et Vance, 2003). L'association symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses est très diverse et implique de nombreuses espèces chez les deux partenaires, végétal et bactérien.

IV.1. Processus de nodulation

L'interaction entre les plantes légumineuses et les rhizobia nécessite la formation d'un nouvel organe, le nodule ; avec cette structure les bactéries se différencient en bactéroïdes qui fixent l'azote moléculaire pour le bénéfice de la plante (Xi et *al.*, 2000).

IV.1.1. Les étapes de nodulation

L'interaction commence avec la colonisation de jeunes poils absorbants par les rhizobia et un échange de molécules-sigales s'établit. Les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par une large gamme de substances (Kape et *al.*, 1991; Waligora et *al.*, 2008).

Dès la reconnaissance du rhizobium spécifique par la plante, des modifications structurales apparaissent dans les premières heures de l'infection. Il s'agit de plusieurs paramètres cytophysiologiques du poil absorbant : dépolarisations de la membrane plasmique, modification des concentrations du Ca^{2+} intracellulaire, augmentation du pH et fragmentation de l'actine (Duhoux et Nicole, 2004). Une induction de l'expression de gènes spécifiques et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite cross de berger à l'intérieur de laquelle les bactéries se multiplient (Esseling et *al.*, 2003). C'est également à cet endroit que la paroi du poil absorbant est lysée puis s'invagine pour former un cordon d'infection (Duhoux et Nicole, 2004). Le cordon d'infection poursuit sa progression en se ramifiant et déverse par endocytose les rhizobiums dans les cellules du méristème.

Le stade final du processus infectieux est atteint lorsque les bactéries sont déversées dans la cellule hôte (Hopkins et *al.*, 2003). Les rhizobiums se libèrent du filament d'infection et pénètrent dans des enveloppes dérivées de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ils se développent en cellules spécialisées dans la fixation d'azote, nommées bactéroïdes (Raven et *al.*, 2007).

Les bactéroïdes restent entourés d'une membrane nommée pér bactéroidienne. La différenciation en bactéroïdes est marquée par nombreuses modification métaboliques comprenant la synthèse d'enzymes et d'autres facteurs dont l'organisme a besoin pour accomplir sa tâche principale: la fixation d'azote (Hopkins et *al.*, 2003) (Fig. 4).

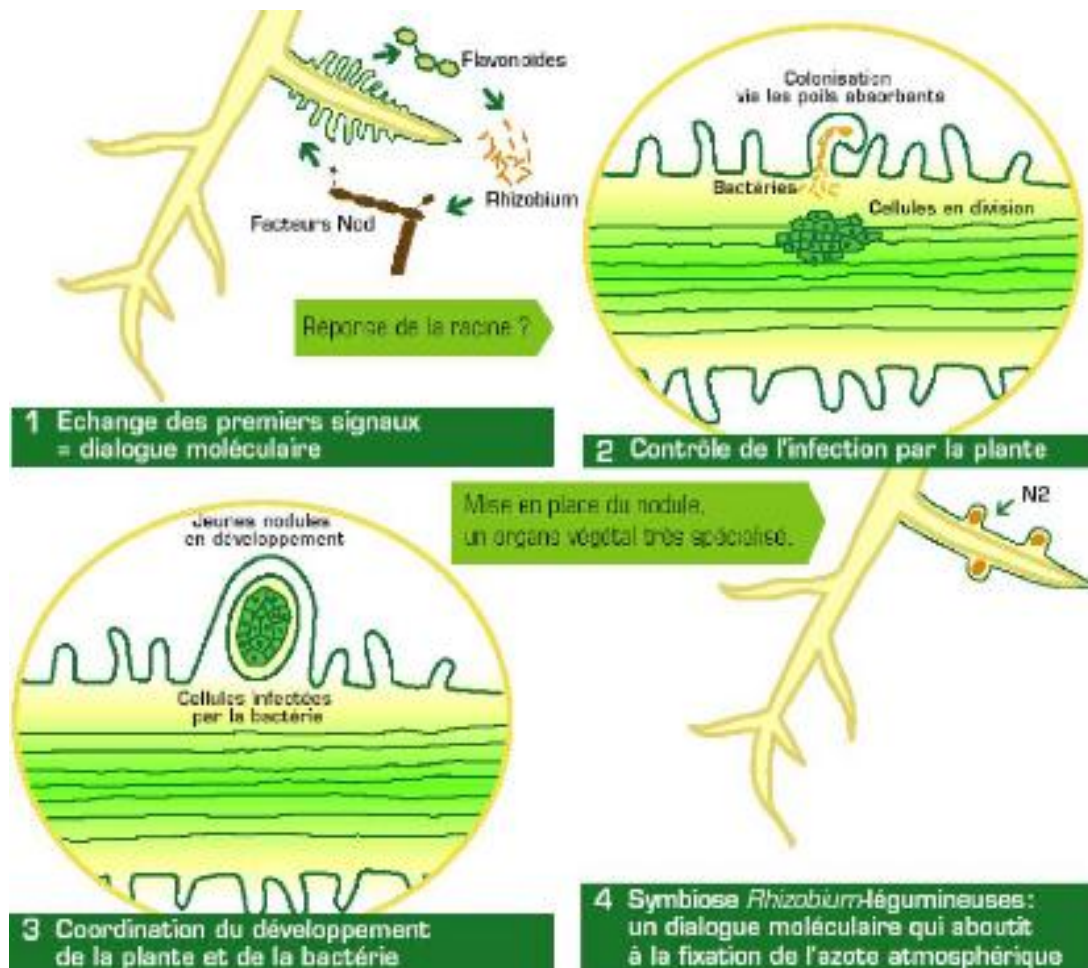


Figure 5: Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (Journet, 2004).

IV.1.2. Régulation du nombre de nodules

La symbiose est contrôlée par un processus d'autorégulation qui commande le nombre de nodules et la fixation de l'azote par une signalisation à distance (Caetano-Anolles et *al.*, 1991).

Après inoculation, les nodules sont formés dans les régions spécifiques de la racine. Quand le système racinaire se développe, d'autres régions pouvant être infectées se forment continuellement. Mais une fois que les nodules sont fonctionnels, la nodulation est inhibée dans les autres jeunes parties. Dans ce cas, les plantes contrôlent le nombre de nodules en maintenant un certain équilibre bénéfique fixation d'azote / coût (ressources de carbone) (Stacey et al., 2006).

Cette autorégulation est réalisée par des signaux moléculaires émis par la partie racinaire ainsi que par des phytohormones produits au niveau des tiges (Oka-Kira et Kawaguchi, 2006).

IV.2. Spécificité symbiotique

L'une des caractéristiques majeures des symbioses rhizobia- légumineuses est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de rhizobia n'est capable, en générale, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même, une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces bactériennes (Tilak et al., 2005).

Certaines souches bactériennes ont un spectre très large, comme la souche de *Sinorhizobium* sp. NGR 234 qui peut noduler expérimentalement près de 120 genres de légumineuses (Peupke, et Broughton, 1999). Inversement, le spectre d'hôte est étroit chez *Sinorhizobium meliloti* qui ne s'associe qu'aux espèces végétales des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* ainsi que chez *Mesorhizobium huakuii* (Chen et al., 1991).

La spécificité est très forte pour le partenaire bactérien *Azorhizobium cauldans* qui s'associe à *Sesbania rostrata* et à d'autre *Sesbania* sp., alors que cette légumineuse possède d'autres partenaires tels que *Sinorhizobium saheli* et *Sinorhizobium teranga* (Bovin et al., 1997). Certaines légumineuses dites à large spectre d'hôte acceptent plusieurs espèces de rhizobia à l'exemple de *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine*, *Macroptilium atropurpureum* (Siratro), *Acacia* et *Sesbania* (de Lajudie et al., 1998). D'autres, comme *Galega*, ne forment des nodules qu'avec l'espèce *Rhizobium galegae* (Lindstrom et al., 1989).

IV.3. Promiscuité

Des études menées sur une espèce de légumineuse boisée tropicale (Vinuesa et *al.*, 1998), ou tempérée (Lafay et Burdon, 2001) ou dans un environnement semi-aride (Marsudi et *al.*, 1999), prouvent que cette espèce boisée peut être nodulée par des bactéries des genres *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium*.

Par ailleurs six souches de rhizobia ont été isolées de nodules obtenus à partir de six légumineuses originaires de la Péninsule ibérique (*Cytisus balansae*, *C. multiflorus*, *C. scoparius*, *C. striatus*, *Genista hystrix* and *Retama sphaerocarpa*). Leur croissance lente et l'analyse phylogénétique a permis de les classer dans le genre *Bradyrhizobium* (Rodriguez-Echeverria et *al.*, 2003). Il semble que ce genre prédomine parmi les populations rhizobiales en Espagne centre-occidentale où les sols sont acides ou proche du pH-neutre. Ces travaux ont montré que *Cytisus scoparius* était l'espèce végétale qui présentait une très forte promiscuité car elle s'associe avec toutes les souches de rhizobia qui ont été testées.

La distribution géographique de *Bradyrhizobium* est liée à celle des légumineuses à partir desquelles il a été isolé (Lafay et Burdon, 1998). Une homologie génétique élevée de l'ADNr 16S a été trouvée parmi ces isolats. L'analyse de l'ADNr 16S est un outil puissant et fiable pour la phylogénétique mais échoue pour distinguer étroitement les différentes souches. Même des espèces bactériennes différentes peuvent avoir un ADNr 16S similaire jusqu'à la hauteur de 99% (Fox et *al.*, 1992). Les profils partiels de l'ADNr 16S suggère que les nouveaux isolats peuvent appartenir à trois espèces différentes.

Contrairement aux données précédentes des rhizobia associés avec les légumineuses arbustives (Valladares et *al.*, 2002), les souches de *Bradyrhizobium* ont montré de hautes infection et efficacité. Un certain degré de promiscuité pour les espèces croissant ensemble peut être prévu en raison du transfert horizontal des gènes entre les bactéries dans le sol. La plupart des gènes responsables de la nodulation et de la fixation d'azote sont localisés sur des plasmides. De ce fait, le transfert de ces éléments entre les bactéries du sol est très commun (Schofield et *al.*, 1987).

V. Facteurs limitant la symbiose rhizobia-légumineuses

Plusieurs conditions de l'environnement sont considérées comme étant des facteurs limitant la croissance et l'activité des plantes fixatrices d'azote dans la symbiose rhizobia

légumineuses. Le processus de la fixation de N₂ est fortement lié à l'état physiologique de la plante hôte.

Par conséquent, on ne s'attend pas à ce qu'une souche rhizobienne concurrente et persistante exprime sa pleine capacité pour la fixation de l'azote si les facteurs limitant (salinité, pH défavorable du sol, insuffisance nutritive, toxicité minérale, températures extrêmes, humidité insuffisante ou excessive du sol, photosynthèse non satisfaisante, maladies de la plante et pâturage) imposent des limitations à la vigueur de la légumineuse hôte (Zahran, 1999).

V.1. Stress thermique

Le stress thermique (non extrême) induit généralement l'expression de protéines de stress thermique HcP (Heat shock proteins), qui assurent la protection des enzymes clés de la physiologie microbienne (Cloutier et *al.*, 1992). L'effet des basses températures sur les rhizobiums est moins rapporté par rapport aux températures élevées (Prévost et *al.*, 1987). Il a été rapporté que les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes *nod* et donc l'infection et la nodulation (Zhang et *al.*, 1996).

A l'opposé, la température élevée affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (Zahran, 1999). La température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce. Il a été ainsi rapporté que les températures critiques de la fixation d'azote sont de 30°C pour la trèfle et le pois (Michiels et *al.*, 1994), de 30°C à 33°C pour le Haricot (Piha et Munns, 1987) et varient entre 35°C et 40°C pour les graines de cacahuètes et de soja (Michiels et *al.*, 1994).

V.2. Stress salin

Parmi les facteurs environnementaux, la salinité constitue la contrainte majeure limitant le développement et la productivité des plantes cultivées. Environ 40% de la surface terrestre présente des problèmes potentiels de salinité (Cordovilla et *al.*, 1994). Les zones à problèmes se localisent essentiellement dans les régions tropicales et méditerranéennes (FAO, 1988).

Le facteur causal de la salinisation des sols est principalement l'irrigation (Szabolcs, 1986). L'augmentation de la teneur en sel est également liée au lessivage des cations, à

l'évapotranspiration, aux conditions climatiques et à la nature du sol. Le stress salin affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol.

Les cellules de rhizobia exposées aux concentrations élevées de sel accumulent souvent des osmolytes organiques protecteurs tels que des acides aminés comme la proline, la bétaine (et dérivés), l'ectoïne et le glutamate ou des carbohydrates comme le tréhalose, le saccharose et autres afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (Gouffi et *al.*, 1999).

V.3. Stress hydrique

La sécheresse ou la déshydratation est un facteur abiotique majeur qui conduit à la réduction de la production agricole, due au déficit de l'eau. Les réponses des plantes à cet effet seront par des changements cellulaires, métaboliques et moléculaires pour l'adaptation à ce stress (Sazzad, 2007). Elle exerce un effet très marqué sur la quantité de l'azote fixée car le fonctionnement des nodules est plus sensible à cette contrainte que celui du métabolisme général de la racine et de la tige (Ganry et Dommergues, 1995).

Le principale résultat de la sécheresse est le déséquilibre métabolique et osmotique de la plante suivit de l'expression de la croissance cellulaire et d'une photosynthèse inadéquate à cause de dioxyde du carbone limité rapidement grâce à la fermeture du stroma.

V.4. Acidité et alcalinité du sol

L'acidité est un facteur chimique qui a un impact direct sur la croissance et la persistance d'initiation des nodules et l'effectivité de la fixation d'azote (Kellman, 2008). La croissance des rhizobia et de la plante hôte est limitée sur les pH extrêmes. La majorité des légumineuses requièrent un pH du sol neutre ou légèrement acide pour leur croissance spécifique lorsqu'elle dépend de la fixation symbiotique d'azote (Zahran, 1999).

Les mécanismes d'adaptation physiologiques et biochimiques des rhizobiums sous les conditions acides sont nombreux, ces mécanismes incluent entre autres l'exclusion et l'expulsion des protons H^+ , la forte teneur en potassium et en glutamate du cytoplasme des cellules stressées, le changement de la composition du LPS et l'accumulation de polyamines.

L'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums, la majorité des souches peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9. Cependant, l'effet négatif que présente le pH alcalin

du sol est l'indisponibilité des minéraux tels que, le fer et le manganèse, indispensables autant pour les rhizobia que pour la plante hôte (El-Hilali, 2006).

I. Matériel biologique

L'étude concerne 6 souches des 51 isolats de la région côtière de Bejaia. Ces souches représentent de trois différents groupes du genre *Bradyrhizobium* caractérisés génotypiquement et phylogénétiquement par Ahnia *et al.* (2014).

Les souches choisies pour cette étude sont consignées dans le tableau II qui comporte également des souches références.

Tableau II : Souches utilisées pour cette étude et souches de référence

Souches	Plante hôte	Origine	Source
CT8	<i>Cytisus villosus</i>	Algérie	Ahnia <i>et al.</i> , 2014
CTS57			
CTO1			
CTO33			
CTO11			
CTO55			
RST 89	<i>Retama spherocarpa</i>		Boulila <i>et al.</i> , 2009
S1	<i>Lupinus hirsutus</i>		Collection du laboratoire d'Ecologie Microbienne
S2	<i>Calicotom spinosa</i>		
S3	<i>Genista numidica</i>		
<i>B. cytisi</i> CTAW11	<i>Cytisus villosus</i>	Maroc	Chahboune <i>et al.</i> , 2011
<i>B. rifense</i> CTW71			Chahboune <i>et al.</i> , 2012
<i>B. japonicum</i> USDA6	<i>Glycine max</i>	Japon	Jordan, 1982
<i>B. elkanii</i> USDA76			Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
<i>B. japonicum</i> BGA	<i>Chamaecytisus proliferus</i>	Iles Canaries	Vinuesa <i>et al.</i> , 2005
<i>B. canariense</i> BTA-1			
<i>B. valantinum</i> LM3	<i>L. mariae josephi</i>	Espagne	Duran <i>et al.</i> , 2014
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48			Ramirez <i>et al.</i> , 2009

En ce qui concerne le matériel végétal nous avons collecté des graines à partir des plantes de : *Cytisus villosus*, *Cytisus liniifolius*, *Lupinus hirsutus*, *Genista numidica*, *Spartium jencium*, *calicotom spinosa*, *Retama sphaerocarpa*, *Retama reatam*. Quant aux graines de *Lupinus mariae josephi*, *Vigna unguiculata*, *Ornithopus compressus* et *Glycine max*, elles nous ont été gracieusement offertes par le centre de Biotechnologie et Génomique de Plantes (CBGP) de Madrid.

II. Méthodes

II.1. Caractérisation phénotypique des souches isolées de *Cytisus villosus*

Les souches concernées par ces tests sont les CTS8, CTS57, CTO1, CTO33, CTO11, CTO55, ainsi que les souches de références suivantes : *B. cytisis* CTAW11, *B. rifense* CTAW71, *B. japonicum* USDA6, *B. canariense* BTA-1. Cette étude a englobé la description morphologique, caractérisation physiologique, nutritionnelle, biochimique, la résistance et sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourds,

II.1.1. Description morphologique

II.1.1.1. Caractérisation morphologique des colonies

Les caractéristiques morphologiques des colonies sont étudiées à travers la forme la taille, la couleur, l'opacité, l'élévation et la production des exopolysaccharides. Cette description se fait sur des colonies obtenues sur milieu YMA après incubation à 28°C (Vincent 1970, Jordan 1982).

II.1.1.2. Caractérisation cellulaire des isolats

La forme, la mobilité et la présence des poly β -hydroxybutyrates (PHB) ont été déterminées par observation au microscope photonique (grossissement 100) à l'état frais d'un frottis bactérien issu d'une colonie âgée de 6 à 10 jours. Le test Gram est pratiqué selon la méthode classique de microbiologie qui consiste à réaliser une coloration spéciale d'un frottis bactérien.

II.1.1.3. Temps de génération et taux de croissance

La détermination du temps de génération et du taux de croissance a été réalisée sur milieu YMB. Les tubes ont étéensemencés par quelques colonies prélevées d'une culture sur

milieu YMA. Une absorbance a été mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 630\text{nm}$ dès l'inoculation des tubes et a été considérée comme étant la D.O à $t = 0$. L'incubation a été réalisée à 28°C et la cinétique de croissance est suivit par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 630\text{nm}$ avec un intervalle de 24 h pendant 12 jours.

Le temps de génération et le taux de croissance sont déterminés par l'équation suivante:

$$G = \frac{t \log 2}{\log X - \log X_0}$$

D'où : $T = 1/G$

X: nombre de division,

G : temps de génération,

T: taux de génération

II.1.2. Caractérisation physiologique

A ce niveau sont étudiés les effets de facteurs tels que la température, le pH et a l'NaCl sur la croissance des isolats de *Cytisus villosus*. Pour chaque expérience, un volume de culture cellulaire contenant environ 10^7 cellules/ml, dénombrées avec la cellule de Malassez a été utilisé. Après incubation, la croissance des souches est estimée par l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 630\text{nm}$. Trois exemplaires ont été pris en considération pour chaque test.

II.1.2.1. Effet de la température sur la croissance

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu YMB liquide et incubées à différentes températures : 26°C , 28°C , 30°C , 32°C , 37°C .

II.1.2.2. Effet du pH sur la croissance

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB liquide à différents pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9, et 10. La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 630 nm.

II.1.2.3. Effet du NaCl sur la croissance

L'étude de la croissance des souches à l'NaCl a été effectuée sur milieu YMB à différentes concentration: 0Mm, 100Mm, 200Mm, 300Mm et 400Mm. La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 630 nm.

II.1.3. Caractérisation nutritionnelle

Les types nutritionnels sont des caractères très importants pour la classification de ces micro-organismes. Pour ce faire, des volumes contenant environ 10^7 cellules/ml, dénombrées avec la cellule de Malassez, ont été utilisés comme inoculum standard. Après incubation à 28°C, la croissance de ces souches est estimée par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 630\text{nm}$. Chaque test est réalisé en trois exemplaires.

II.1.3.1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone

L'assimilation des différents sucres comme unique source de carbone a été testée en utilisant le milieu YMB dépourvu de mannitol et de toute autre source de carbone. En effet l'extrait de levure a été remplacé par 0,1% de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) comme source d'azote. 16 sucres ont été testés à raison de 1% : D-glucose, D-galactose, L-fructose, L-arabinose, D-mannose, D-ribose, L-rhamnose, D-xylose, Dextrine, L-sorbose, Sucrose, D-cellobiose, Lactose, D-raffinose, D-trehalose, D-maltose (Boulila, 2009).

II.1.3.2. Assimilation des acides aminés comme seule source d'azote

L'utilisation des acides aminés par les souches comme source d'azote est recherchée dans des tubes à essai contenant 5 ml de milieu composé de mannitol, de sels minéraux (NaCl , KH_2PO_4 , MgSO_4) et un acide aminé comme source d'azote. 9 acides aminés à raison de 0,1% dans le milieu ont été testés : Bétaine, L-proline, Acide glutamique, L-serine, Lysine, Glycine, Leucine, Cystéine, L-tryptophane (Boulila, 2009).

II.1.4. Caractérisation biochimique

Plusieurs tests biochimiques ont été effectués pour les souches selon les techniques décrites par Marchal et *al.* (1982).

II.1.4.1. Type respiratoire

Cette étude est menée sur le milieu gélose viande foie (VF). Des tubes très fins (9X18mm) contenant du VF ont étéensemencés à l'aide d'une pipette Pasteur scellée et chargée. La pipette est introduite au fond du tube et on remonte en spirale. Après incubation à 28°C, le type respiratoire des souches est déterminé par la position de la zone de croissance.

- **Type aérobie strict** : culture seulement en présence de di-oxygène donc croissance uniquement en surface;
- **Type aéro-anaérobie** : culture en présence et en absence de di-oxygène donc croissance sur la longueur du tube;
- **Type anaérobie strict** : culture uniquement en l'absence de di-oxygène (croissance au fond du tube) ;
- **Type micro-aérophile** : culture seulement dans une zone de pression faible en di-oxygène.

II.1.4.2. Test de la catalase

Il consiste à déposer au centre de la lame quelques colonies prélevées à partir d'une culture pure et à ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10% . Une souche catalase positive se manifeste par une effervescence selon la réaction suivante:



II.1.4.3. Test du bleu de bromothymol (BTB)

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YEM a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré bromophénol bleu à une concentration de 0,0025% (w/v). Les boites inoculées ont été mises en incubation à 28°C. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration du milieu. Une coloration jaune indique une réaction acide et une coloration bleu foncé indique une réaction basique.

II.1.4.4. Recherche de l'acétoïne : Réaction de Voges-Proskauer (VP)

L'acétoïne est recherchée sur milieu Clark et Lubs (CL),ensemencé avec une culture bactérienne prélevée sur milieu YMB et incubé à 28°C pendant 6 jours, après incubation 03 gouttes du réactif VP1 et VP2 sont rajoutés, après 10 minutes on note le résultat

- VP⁺ : coloration rouge cerise.
- VP⁻ : coloration jaune citrin ou rose pale.

II.1.4.5. Production d'acide: Réaction au rouge de méthyle

La production d'acide est mise en évidence sur milieu Clark et Lubs, ensemencé avec une culture bactérienne prélevée sur milieu YMB, incubé à 28°C, puis quelques gouttes de la solution de rouge de méthyle sont rajoutées.

- RM⁺ : Teinte rouge.
- RM⁻ : Teinte jaune.

II.1.4.6. Fermentation du saccharose et du glucose, production de gaz et d'H₂S

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron) nous renseigne sur la dégradation des sucres qui est accompagnée d'une production d'acide. Celle-ci est détectée par l'indicateur de pH, le rouge de phénol, qui en milieu basique devient rouge et en milieu acide devient jaune. Le thiosulfate est réduit en sulfures d'hydrogènes (H₂S) par certaines bactéries. Ce dernier réagit avec un sel de Fer pour donner un précipité noir. La pente de la gélose est ensemencée par stries serrées, puis le culot par piqûre profonde et centrale. L'incubation se fait à 28°C. La lecture se fait comme suit :

- Fermentation du lactose et / ou du saccharose : virage au jaune de la pente.
- Fermentation du glucose : virage du culot au jaune.
- Production de gaz: apparition de bulles de gaz.
- Production d'H₂S: noircissement du milieu.

II.1.4.7. Recherche de la β-galactosidase

Le test d'ONPG permet de rechercher directement la présence d'une β-galactosidase qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose, en fournissant à la bactérie son substrat qui est l'orthonirophényl β-D galactopyranoside. A partir d'une colonie isolée de chaque souche à tester, une suspension dense a été réalisée dans l'eau distillée stérile en tube à hémolyse, après homogénéisation de la suspension un disque d'ONPG (9mm, 1.2mg/disque) a été placé au fond du tube contenant la suspension. La lecture a été faite après 15min, 30min, 1h et 24 heures si nécessaire. Le virage du milieu au jaune révèle un résultat positif.

II.1.4.8. Production d'indole

Le milieu utilisé pour ce test est l'eau péptonée exempte d'indole. Celui-ci riche en tryptophane permet de détecter la présence de la tryptophane-désaminase qui dégrade le tryptophane en indole. Les tubes sontensemencés avec 100 µl d'une suspension bactérienne obtenue sur milieu YMB. Après incubation à 28°C, quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées. La réaction est immédiate par l'apparition d'un anneau rouge en surface.

II.1.4.9. Test acide-indole-pyruvique

Les souches testées sont mises en culture dans des tubes à essai contenant 5ml de milieu eau péptonée exempte d'indole. Après incubation à 28°C, de petite quantité de ces suspensions bactériennes sont transvasées dans des tubes à hémolyse. La lecture est effectuée après avoir ajouté deux gouttes de réactif TDA avec agitation.

- La coloration brun rouge avec présence fréquente d'un précipité indique un résultat TDA⁺
- La coloration jaune orangé indique que la souche est TDA⁻.

II.1.4.10. Utilisation du citrate

La mise en évidence de l'utilisation du citrate et de la présence d'une citrate perméase et hydrolase a été menée sur milieu citrate Simmons incliné. La pente du milieu a étéensemencée par stries longitudinales à partir d'une culture prélevée sur milieu YMB. Après incubation à 28°C, l'utilisation du citrate se manifeste par l'alcalinisation du milieu et l'apparition d'une couleur bleu du milieu.

II.1.4.11. Hydrolyse de l'urée

Pour chaque souche, 10 µl de la pré-culture fraîchement préparée dans le milieu YMA ont été utilisés pour ensemenecer des boites contenant le même milieu solide additionné de 2% d'urée et 0,012% de rouge de phénol (Jarvis et *al.*, 1977). Les solutions de ces deux produits ont été stérilisées par filtration. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Les boites ont été incubées à 28°C. Les résultats ont été évalués par le changement de la coloration du milieu. Une coloration rouge indigo indique l'hydrolyse de l'urée alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative.

II.1.4.12. Réduction des nitrates

L'étude de la réduction des nitrates est faite sur le bouillon nitraté. Après ensemencement et incubation à 28°C. On additionne le réactif de Griess NRI (acide sulfanilique) et NRII (α -naphtylamine).

- La coloration rouge cerise traduit la transformation des nitrates en nitrites par la nitrate réductase (NR⁺).

- L'absence de la coloration n'indique pas une réaction négative. On ajoute alors une pincée de poudre de zinc (réducteur de nitrates). Dans ce cas, si le milieu devient rouge les souches n'ont pas réduit les nitrates, par contre si le milieu demeure incolore, les bactéries ont dégradé les nitrates au-delà du stade nitrite (NR⁺⁺).

II.1.5. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

La résistance ou la sensibilité des souches aux antibiotiques est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur milieu YMA selon les recommandations du comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2014). Une suspension de 10⁸ bactéries a été ensemencé par écouvillonnage, ensuite les disques d'antibiotique de charge déterminé ont été déposés et Incuber à 28°C. Quatre agents antimicrobiens de différentes familles, sont utilisés : Gentamicine, Oxacilline, Érythromycine et Tétracycline (tableau III).

Tableau III : Différents antibiotiques testés.

Antibiotiques	Symboles	Charges	Diamètres critiques		Familles
			Sensible (S)	Résistant (R)	
Gentamicine	Gen	10 µg	≥18	<16	Aminosides
Oxacilline	Ox	5 µg	≥20	<18	Tétracyclines
Tétracycline	TE	30UI	≥19	<17	Tétracyclines
Erythromycine	E	15µg	≥22	<19	Macrolides

*Les antibiotiques testés proviennent de la marque HIMEDIA

II.1.6. Sensibilité et résistance aux métaux lourds

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister à quatre différents types de métaux lourds tous sous forme de chlorures. Les solutions de différents métaux ont été stérilisées par filtration (Millipore 0,22 µm, Sigma) puis additionnées au milieu YEM gélosé pour aboutir à des concentrations en µg/ml variant de 50 à 400 ZnCl₂, de 50 à 400 pour PbCl₂ et de 25 à 200 pour CdCl₂, 2H₂O et 12.5 à 100 CuCl₂. Trois répétitions ont été faite pour chaque souches (El Hilali, 2006).

II.2. Test de nodulation simple et croisé (Test cross)

Le test de nodulation simple permet de montrer la capacité des souches isolées de *Cytisus villosus* a noduler leur plante hôte (photos 5).

Concernant le test de nodulation croisé les isolats de *Cytisus villosus* ont été testés sur d'autres légumineuses. Nous avons choisis des plantes spontanées qui font parties de la tribu des *Genisteae* à savoir: *Cytisus liniifolius*, *Lupinus hirsutus*, *Genista numidica*, *Spartium jencium*, *Calycotome spinosa*, *Retama sphaerocarpa*, *Retama reatam*, *Lupinus mariae josephi*, et d'autres plantes légumineuses qui ne font pas partie de cette tribu comme : *Vigna unguiculata*, *Ornithopus compressus*, *Glycine max*.

D'autre part, pour tester la nodulation de la plante *Cytisus villosus* par d'autre *Bradyrhizobium*, nous avons choisis les souches suivantes : RST89, S1, S2, S3, CTAW11, CTAW71, USDA6, USDA76, BTA-1, BGA, PAC48, LM3 (voir tableau II).

- **Stérilisation des graines**

Les graines ainsi stérilisées sont disposées dans des boites de Pétri contenant du papier absorbant imbibés d'eau distillée stérile puis mises à l'obscurité à une température de 20°C. Les graines germées ont été transférées aseptiquement dans des pots de Leonard jars contenant de la vermiculite et du milieu Jensen stérile (photos 3, 4, 5).



Photo 2 : Graines de *C. villosus*



Photo 3 : Graines de *C. villosus* mises à germer



Photo 4 : Graines de *C. villosus* germées



Photo 5 : Plantules de *C. villosus* dans les jars leonard

- **Inoculation des plantules**

Les plantules sont inoculées avec 1 ml d'une suspension bactérienne contenant environ 10^9 bactéries. Pour chaque souche bactérienne, au minimum trois répétitions ont été prévues. Les cultures sont exposées aux conditions naturelles de lumière et de température.

IV. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique

L'analyse des caractères phénotypiques permet de calculer le coefficient de similitude des souches selon la formule de Sneath et Collins (1974):

$$Cs = (A+C) / (A+B+C) \times 100$$

Cs : coefficient de similitude entre deux souches.

A: nombre de tests positifs communs aux deux souches.

B : nombre de tests différents entre deux souches.

C: nombre de tests négatifs communs aux deux souches.

Le calcul permet de comparer les souches deux à deux. Les résultats de l'étude des caractères phénotypiques ont été convertis en une matrice pour un traitement numérique grâce au logiciel XL-STAT-Pro version 7.5.2.

Les variables qualitatives sont codées « 1 » pour positif ou présent et « 0 » pour négatif ou absent. La classification ascendante et hiérarchique (CAH) a permis de classer les souches par degré de ressemblance en allant des plus proches aux plus éloignées.

Le calcul des distances euclidiennes indique l'indice de ressemblance entre les souches. Parmi les différents types d'analyse numérique qui révèlent la structure taxonomique, la plus utilisée est l'analyse des clusters (groupe d'échantillons ou de souches), sous forme d'un diagramme ramifié similaire à un arbre ou dendrogramme où plus les branches sont proches, plus les groupes de souches sont similaires.

I. Caractérisation phénotypique des souches isolées de *Cytisus villosus*

Les résultats qui sont présentés dans ce chapitre concernent les 6 souches représentatives de 51 isolats de *Cytisus villosus*, cette caractérisation a été faite en présence de souches de références.

I.1. Description morphologique

Cette description concerne les caractères morphologiques des colonies ,les caractères cellulaires ainsi que le temps de génération et taux de croissance des 6 représentants.

I.1.1. Caractérisation morphologique des colonies

Les isolats cultivés sur YMA à 28°C forment des colonies au bout de 4 à 7 jours, certaines produisent des exopolysaccharides telles que CTO1, CTO33, CTO11, CTO55, les autres non. Le diamètre des colonies varie de 0.5 à 3mm, ces colonies sont opaques, circulaire, bombées, de couleur allant du beige au blanc (photo 6). Cette description concorde avec celle donnée par Jordan (1982,1984) sur le genre *Bradyrhizobium*.

I.1.2. Caractérisation cellulaire des isolats

L'observation microscopique d'une suspension bactérienne, montre des bâtonnets aux extrémités arrondies, mobiles (photo. 7). La coloration de Gram a confirmé leur appartenance aux bactéries Gram négatif. Ces résultats sont en accord avec la description donnée pour les *Bradyrhizobium* isolés par Vinuesa et al. (2005).

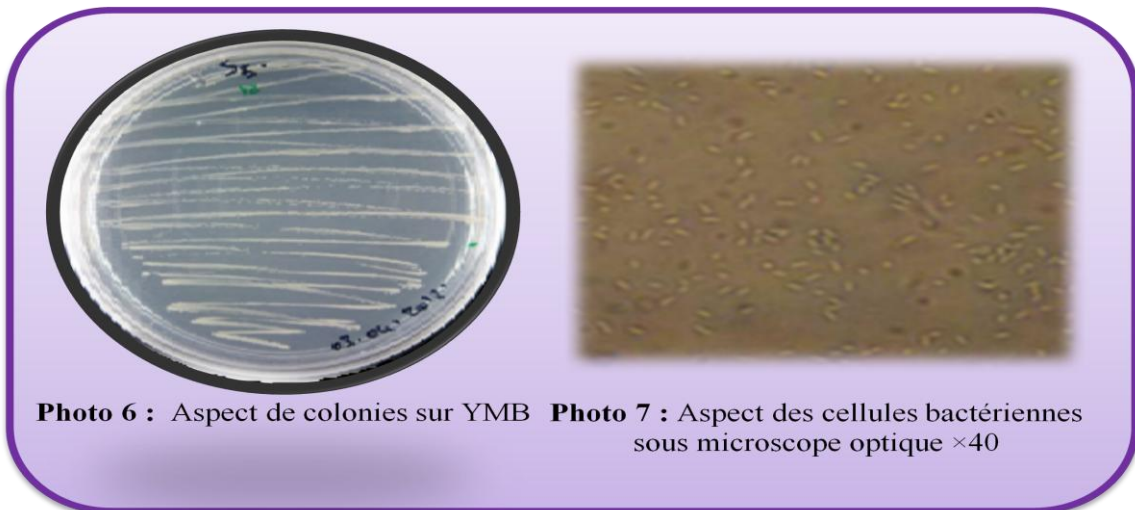


Photo 6 : Aspect de colonies sur YMB **Photo 7 :** Aspect des cellules bactériennes sous microscope optique $\times 40$

II.1.3. Temps de génération et taux de croissance

Le calcul du temps de génération confirme l'appartenance de ces souches représentatives de la collection des rhizobia isolées de *Cytisus villosus* étudiées au genre *Bradyrhizobium* (Jordan. 1982 et 1984). En effet ces souches ont une croissance lente avec un temps de génération \geq à 6h (Tableau IV).

Tableau IV: Résultat du taux de croissance et du temps de génération.

Souches	Taux de croissance (h ⁻¹)	Temps de génération (h)
CTS8	0,520	8
CTS57	0,550	8
CTO1	0,630	6
CTO33	0,680	6
CTO11	0,120	7
CTO55	0,160	7
<i>B.cytisi</i> CTAW11	0,090	8
<i>B.rifens</i> CTAW71	0,195	7
<i>B.japonicum</i> USDA6	0,605	6
<i>B.canariense</i> BTA-1	0,150	6

I.2. Caractérisation physiologique

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de la température, du pH et du NaCl sur la croissance des rhizobia isolées de nodules racinaire de *Cytisus villosus*. Les souches ont été incubées à 28°C sur milieu YMB.

I.2.1. Effet de la température sur la croissance

Toutes les souches y compris les souches de références montrent une croissance entre 26 à 30°C avec un optimum à 28°C pour la plupart des souches. Aucune croissance n'a été remarquée à partir de 32°C pour toutes les souches (fig6). Le caractère mésophile des rhizobia a été déjà signalé par Graham (1992) et Zahran (1999) indiquant que la gamme de température optimale pour la croissance des rhizobia se situe entre 28° à 31°C, et beaucoup ne peuvent pas se développer à 37°C.

Il a été rapporté que les températures critiques de la fixation d'azote sont de 30°C pour la trèfle et le pois (Michiels et *al.*, 1994), de 30°C à 33°C pour le Haricot (Piha et Munns, 1987) et varient entre 35°C et 40°C pour les graines de cacahuètes et de soja (Michiels et *al.*, 1994). Matallah et *al.* (2002) ont signalé que la tolérance des rhizobia à la température n'est pas corrélée avec la température du site de prélèvement. Cependant, la température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat de cette espèce (El Hilali, 2006).

Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes (Cloutier et *al.*, 1992). Les travaux de (Cloutier et *al.*, 1992) ont montré des capacités d'adaptation des rhizobia au choc thermique ce qui pourrait être expliqué par l'induction de l'expression des protéines de stress thermique HSP (Heat Shock Proteins).

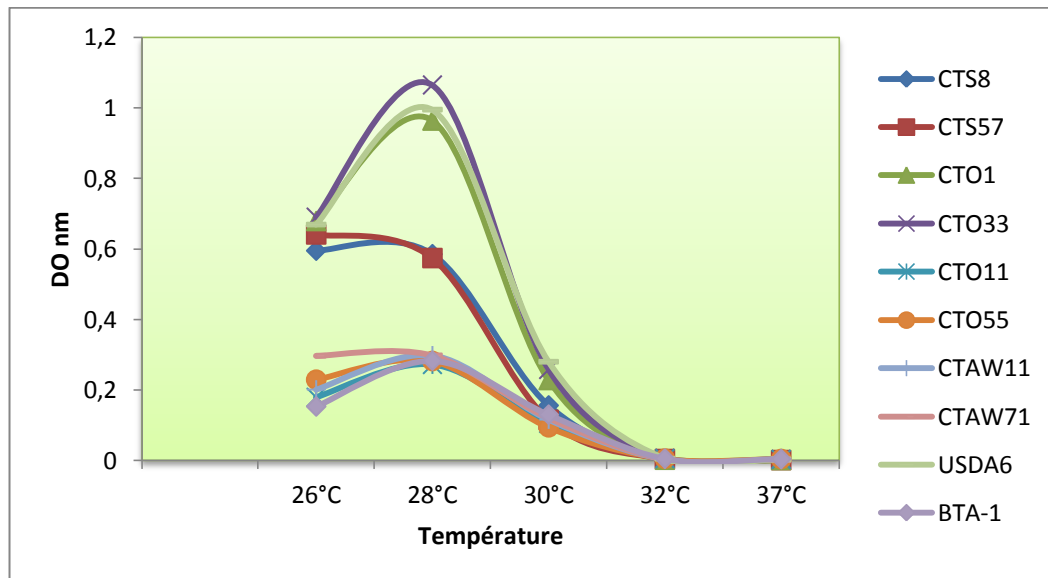


Figure 6 : Effet de la température sur la croissance des souches testées

I.2.2. Effet du pH sur la croissance

La plupart des souches étudiées présentent une croissance entre pH 4 et pH 8. Autrement les souches CTO1, CTO33 et USDA6 montrent une croissance à pH 9 (fig.7).

Il a été rapporté par Raza *et al.* (2001) que les souches de rhizobia isolées de deux espèces *Lupinus luteus* et *Lupinus angustifolius* ont une très bonne croissance dans une large gamme (pH 4 à pH10). D'autres travaux ont montré que l'acidité du sol bloque la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie du rhizobia et leur persistance dans les sols, ainsi que la réduction de la nodulation (Appunu et Dhar, 2006).

En outre, l'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums, la majorité des souches peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9. Cependant, l'effet négatif que présente le pH alcalin du sol est l'indisponibilité des minéraux tels que, le fer et le manganèse, indispensables autant pour les rhizobia que pour la plante hôte (El-Hilali, 2006).

Les mécanismes d'adaptation possibles comprennent la régulation du pH cytoplasmique: L'exclusion des protons, la production des exopolysaccharides et les changements d'hydrophobicité de la membrane plasmique. Ces mécanismes ont été décrits comme étant une réponse adaptative au pH du milieu chez des rhizobia (Correa et Barneix, 1997).

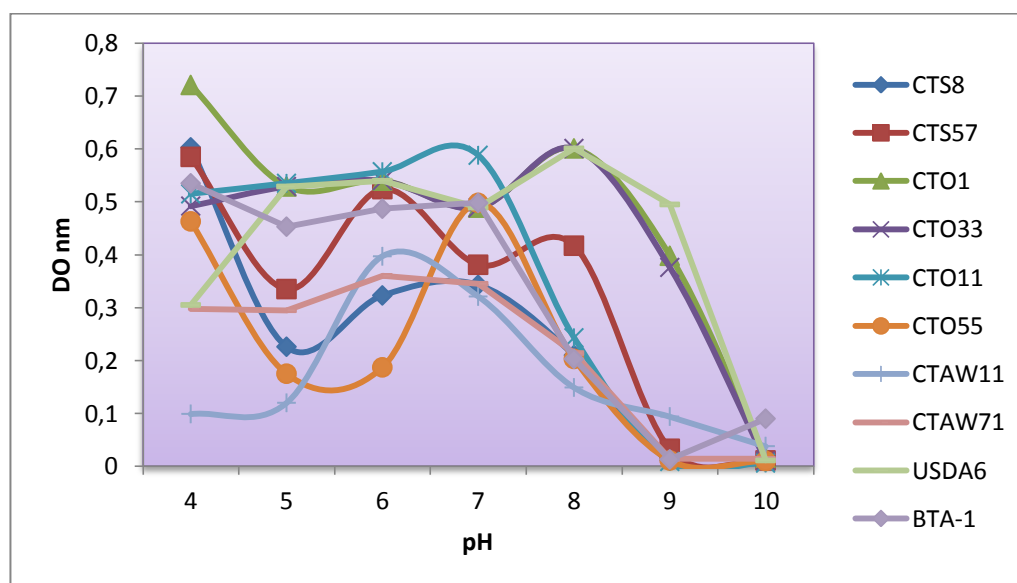


Figure 7 : Effet du pH sur la croissance des souches testées

I.2.3. Effet du NaCl sur la croissance

L'étude de l'effet du NaCl sur la croissance des souches montre qu'elles ne présente aucune croissance à 100mM, à l'exception de la souche CTS57 qui ne semble pas très affectée à cette concentration (fig.8). Ces résultats confirment ceux trouvés par Jordan,

1982, Vinuesa et al., 2005, Chang et al., 2011, Chahboune et al., 2011, 2012, Wang et al., 2012, Guerrouj et al., 2013. En effet, la croissance de la plupart des rhizobia particulièrement les *Bradyrhizobium* tel que *B. cytisi*, *B. rifense*, *B. japonicum*, *B. canariens*, *B. arachidis*, *B. lablabi*, *B. retamae*, est affectée dès que la molarité du milieu atteint 100mM de NaCl.

Cependant d'autres travaux indiquent que certaines espèces de *Bradyrhizobium* telles que *B. daqingense*, *B. betae*, *B. huanghuaihaiens*, présentent une bonne croissance à 1% de NaCl (Rivas et al., 2004, Zhang et al., 2011, Wang et al., 2012), tandis que certaines souches de *Sinorhizobium meliloti* peuvent proliférer entre 300 et 700mM voire à 800mM de NaCl.

Ce caractère halophile a été également signalé chez les isolats d'*Acacia*, de *Prosopis* et de *Leucaena* qui tolèrent une concentration de NaCl entre 500 et 850mM (Tilak et al., 2005). Il a été rapporté que chez les rhizobia le stress salin est une contrainte qui provoque la synthèse des exopolysaccharides, qui sont utiles pour l'adaptation (Hung et al., 2005). En outre, d'autres rhizobia s'adaptent aux stress salin par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faible poids moléculaire appelés les osmolytes ou osmoprotecteurs (Zahran, 1999).

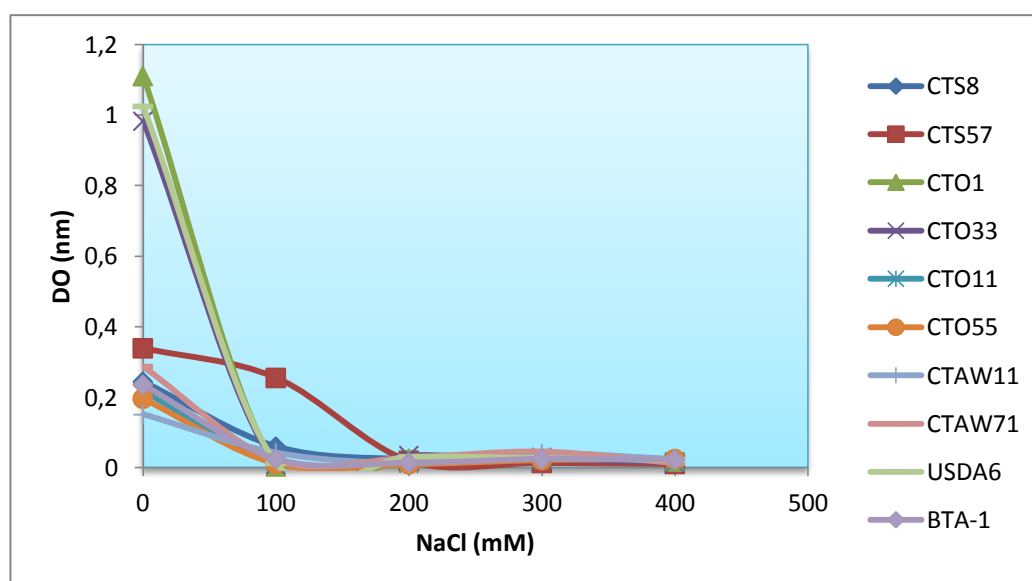


Figure 8 : Effet du NaCl sur la croissance des souches testées.

I.3. Caractérisation nutritionnelle

I.3.1. Assimilation des sucres comme seule source de carbone

Les résultats obtenus (tableau V) montrent qu'il existe des préférences pour l'assimilation de sucre comme source de carbone par les souches testées. En effet la plupart des souches présentent une croissance en présence de dextrine, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-ribose, D-xylose. Aucune croissance n'est observée pour les souches suivantes CTO11, CTO55, BTA-1 en présence du L-fructose .

Tableau V: Assimilation des sucres comme seule source de carbone

Sucres \ Souches	CTS8	CTS57	CTO1	CTO33	CTO11	CTO55	<i>B. cytisi</i> CTAW11	<i>B. rifense</i> CTAW71	<i>B. japonicum</i> USDA6	<i>B. canariense</i> BTA-1
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-fructose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-raffinose	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Lactose	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
D-cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : Assimilation

(-) : Absence de croissance

Absence de croissance pour toutes les souches en présence de L-rhamnose, D-trehalose, L-sorbose, Sucrose, D-cellobiose. Le D-raffinose et le lactose ne sont pas assimilés à l'exception des souches CTO1, CTO33.

L'étude de l'assimilation de divers sucres comme source de carbone par les différentes souches a indiqué que les bactéries du genre *Rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les monosaccharides et les disaccharides, et d'une manière restreinte les trisaccharides et les polyalcools. Cependant, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les trisaccharides (Stowers, 1985). L'utilisation des sucres peut fournir les caractères différentiels pour l'identification des espèces (Allen et Allen, 1950).

I.3.2. Assimilation des acides aminés comme seule source d'azote

Les résultats obtenus dans le (tableau VI) montrent que toutes les souches testées ont une bonne croissance en présence de l'histidine, Leucine, L-proline, Acide glutamique, L-serine, Lysine comme seule source d'azote.

En présence de L-Glycine, Cystéine, seules les souches CTO1, CTO33 présentent une croissance, encore une fois ces deux souches se comportent comme la USDA6 comme dans le cas des sucres. Seules les souches CTO11 et CTO55 et BTA-1 n'assimilent pas la betaine. Certains acides aminés peuvent être des inhibiteurs de croissance (Struffi et al., 1998)

Tableau VI : Assimilation des acides aminés comme seule source d'azote

Souches	CTS8	CTS57	CTO1	CTO33	CTO11	CTO55	CTAW11	CTAW71	USDA6	BTA-1
A. aminés										
Betaine	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
L-glycine	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
L-proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. glutamique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cystéine	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-

(+) : Assimilation (-) : Absence de croissance

I.4. Caractérisation biochimique

Des tests biochimiques ont été réalisés sur 6 souches du genre *Bradyrhizobium* isolées de *C. villosus* ainsi que 4 souches de références. La culture de toutes les souches sur milieu viande foie a montré une croissance à la surface et l'absence de la croissance tout au long de la pique centrale. Ce résultat montrent que toutes les souches sont aérobies.

Le test de BTB a montré que toutes les souches testées sont basiques. En effet, le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du bleu vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleue (El-Hilalil, 2006). Xu et al. (1995) ont rapporté que 80% des souches testées de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont pu donner des réactions positives avec le milieu YMA + BTB, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives.

Toutes les souches testées ne produisent pas d'acide (RM⁻) mais plutôt d'acétoïne (VP⁺), ce qui indique l'utilisation de la voie de fermentation butylène glycol engendrant la synthèse de différents métabolites et affirme que se sont des bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO₂ par la voie butanediolique.

Toutes ces souches ne fermentent pas le glucose, ni le sucrose /lactose, avec absence d'une production d'H₂S et du gaz. Le test d'ONPG négatif révèle l'absence d'une β-galactosidase.

Absence d'indole, indique que le tryptophane n'a pas été hydrolysé. En outre absence d'acide indole pyruvique, permet de suggérer que le tryptophane n'a pas été désaminé. En conclusion toutes les souches testées sont donc dites indole négatif, elles ne possèdent pas la tryptophane désaminase, elles sont dites TDA négatif.

La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis et al. (1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rouge foncé ou le rouge

indigo. Toutes les souches testées ont pu hydrolyser l'urée grâce à l'urease, à l'exception de la souche CTAW11 isolée par Chahboune et *al.* (2011).

Les souches CTO1, CTO33, USDA6 et CTAW11 ne présentent que l'activité nitrate réductase. Cependant, les souches CTS8, CTS57, CTO11, CTO55, BTA-1, CTAW71 possèdent en plus de l'activité nitrate réductase, une activité nitrite réductase.

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière. En fait, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des rhizobia sur la surface des racines (Sherwood et *al.*, 1984) ainsi que sur leur capacité infective et effective (Davidson et Robson, 1986 ; Arreseigor et *al.*, 1997).

I.5. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

La lecture des tests est faite selon les critères définis par le comité Français de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2014).

Tableau VII : Phénotype de résistance des souches testées.

Souches \ Antibiotique	CTS8	CTS57	CTO1	CTO33	CTO11	CTO55	CTAW11	CTAW71	USDA6	BTA-1
Gentamicine	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Oxacilline	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Tétracycline	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S
Erythromycine	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I

R : Résistant,

S : Sensible,

I : intermédiaire

Toutes les souches représentatives de la collection des rhizobia isolées de *Cytisus villosus* sont résistante a la Oxacilline et sensible à Erythromycine. Cependant la tetracycline a permet de distinguer entre des souches résistantes (CTS8, CTS57, CTO1, CTO33)et les souches sensibles (CTO11, CTO55).

La résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée dans les études rhizobiales en tant que moyen d'identification des souches et est considérée comme un bon trait pour comparer les différentes souches (Beck et *al.*, 1993).

La résistance intrinsèque aux antibiotiques a été étudiée aussi bien chez les souches de *Rhizobium* (Eaglesham, 1987 ; Zhang et *al.*, 1992) que celles de *Bradyrhizobium* (Kuykendall et *al.*, 1988).

Jordan (1984) avait déjà montré que les souches de rhizobia à croissance rapide sont plus sensibles à la tétracycline et à la streptomycine alors que les bradyrhizobia sont plus résistants aux antibiotiques.

Il a été rapporté également que le degré de la résistance peut varier d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce (Shishido et Pepper, 1990 ; Zhang et *al.*, 1991 ; Odee et *al.*, 1997). En effet, les résultats obtenus par Maatallah et *al.* (2002) montrent que les souches de rhizobia sont résistantes à la kanamycine et à l'érythromycine contrairement à Batzli et *al.* (1992) qui présentent des souches avec une grande tolérance aux tétracyclines et une faible tolérance à la kanamycine.

Graham et *al.* (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre. Le mode d'action de ces molécules varie en fonction du type d'antibiotique (Graham, 1963) ainsi qu'en fonction de la concentration testée (Lindström et Lehtomäki, 1988).

Le mécanisme de résistance aux antibiotiques le plus répandu chez les bactéries Gram négatif est l'inactivation extra ou intracellulaire de l'antibiotique, ce qui aboutit à la perte de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible.

I.6. Sensibilité et résistance aux métaux lourds

Les résultats obtenus montrent que les souches testées sur YMA contenant du Zn sont inhibées sauf pour les souches CTS8, CTS57 qui montrent une croissance allant jusqu'à 200µg/ml alors que pour la USDA6 jusqu'à 400µg/ml (tableau VIII). Des travaux ont montré qu'un excès de Zinc exerce un effet inhibiteur non seulement sur la croissance des

rhizobia mais aussi sur leur efficacité à travers la perte des plasmides symbiotiques (Giller et *al.*, 1998).

Concernant le cadmium aucune croissance n'a été constatée. Il a été rapporté que le Cadmium est néfaste aussi bien pour les micro-organismes symbiotiques que pour l'établissement de la symbiose (Gusmao-lima et *al.*, 2005). En effet, il n'a aucune fonction biologique et sa toxicité est 20 fois plus grande que celle des autres métaux lourds (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Le plomb a aussi permis de distinguer des souches résistantes comme CTS8, CTS57, CTO1 et USDA6 jusqu'à 200µg/ml, et le reste des souches est sensible à ce métal. Ces souches pourraient être intéressantes dans les projets de restauration des sols contaminés par le Plomb. Toutes les souches semblent résistantes aux différentes concentrations du Cu sauf pour les souches CTAW11 et CTAW71 qui montrent une sensibilité à ce métal à partir de la dose 25µg/ml.

L'effet des métaux lourds dépend de la durée de l'exposition, de la dose et du type de métal utilisé, (Giller et *al.*, 1998, Biro et *al.*, 2003) déterminent que la sensibilité aux métaux lourds a une importance primaire pour la sélection des isolats qui sont écologiquement divers,

Les souches de *Bradyrhizobium* comparées aux rhizobia sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'ils ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux moins disponibles dans leur environnement (Angel et *al.*, 1993). Cependant, une grande variabilité de résistance à différents métaux lourds a été observée entre les souches appartenant à la même espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Kinkle et *al.*, 1987).

Les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance qui immobilisent, mobilisent ou transforment les métaux lourds, et donc elles peuvent influencer la solubilité des métaux lourds par l'altération de leurs propriétés chimiques (Gremion, 2003). Ils consistent soit à la synthèse de protéines ou de polymères extracellulaires qui adhèrent au métal, soit par compartimentation à l'intérieur des cellules et soit par le moyen le plus commun, la diminution de l'assimilation et l'activation de l'exportation (Ross, 1993 ; Tomsett, 1993).

Tableau VIII : Résultat des tests des métaux lourds sur la croissance des rhizobia

métaux Concentration Souches	Zn				Cd				Pb				Cu			
	50	100	200	400	25	50	100	200	50	100	200	400	12.5	25	50	100
CTS8	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
CTS57	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
CTO1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
CTO33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CTO11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CTO55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CTAW11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CTAW71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
USDA6	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
BTA-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

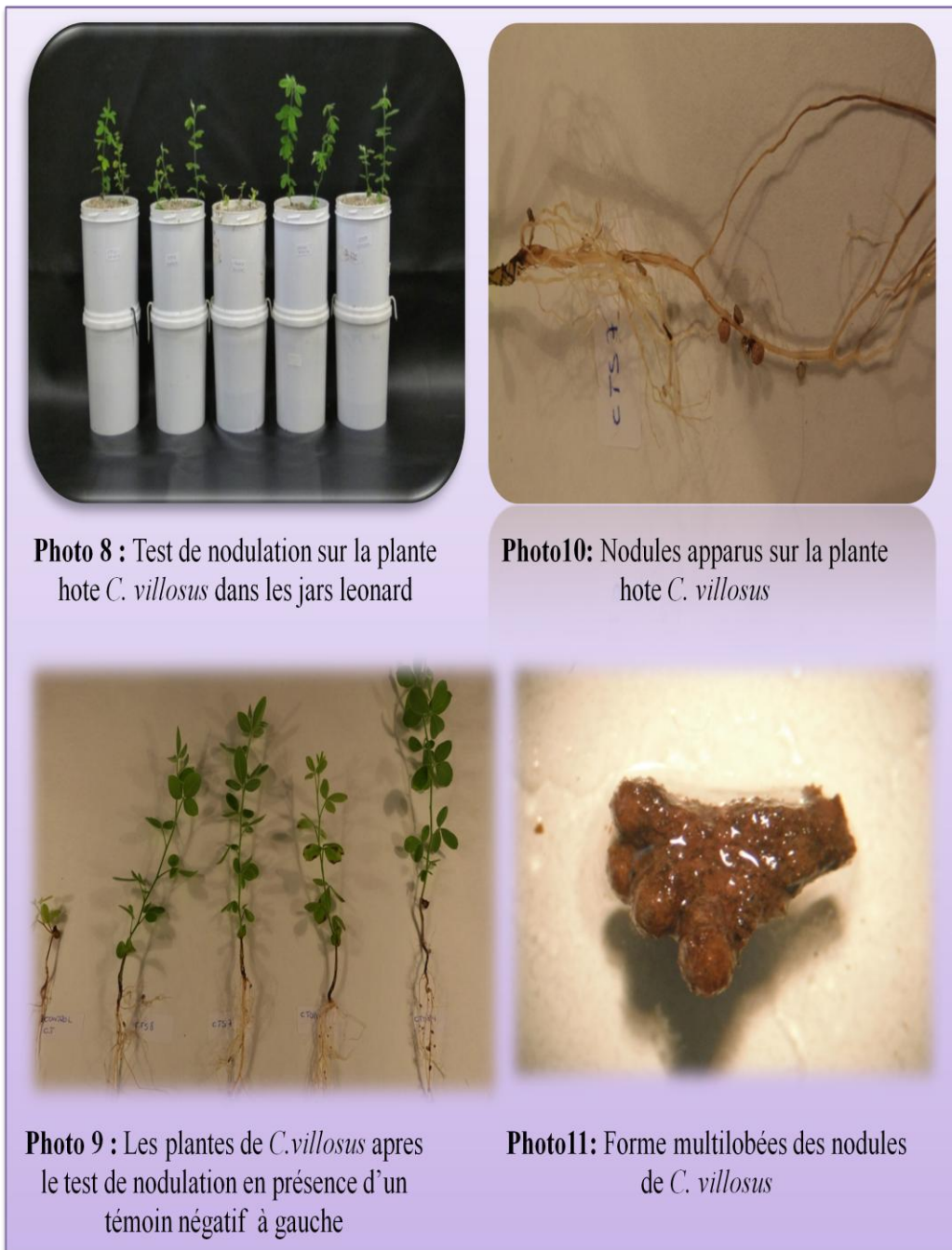
(+) : Résistant

(-) : Sensible

II. Test de nodulation simple et croisé

- Test de nodulation simple

La nodulation de *Cytisus villosus* (plante hôte) par les souches étudiées permet de confirmer leur appartenance aux rhizobia (photo.8, 9). Les nodules sont apparus au bout d'un mois d'inoculation. Leur nombre varie de 10 à 22 pour toutes les plantes. Leur taille est de 1 à 3mm. La couleur est brune, de forme allongée, multilobée (photo. 10, 11).



- **Test de nodulation croisé**

Les souches de *Bradyrhizobium* isolées de *Cytisus villosus* ont pu noduler différentes plantes de la tribu des *Genisteeae* à savoir : *Cytisus liniifolius*, *Retama reatam*, *Retama spherocarpa*, *Genista numidica*, *Lupinus hirsutus*, *Spartium jencium*, *Calicotome spinosa*, qui sont des légumineuses spontanées, sur les quelles nous avons observé l'apparition de nodules de couleur brune qui indiquant la fixation de l'azote, à l'exception de la plante *Lupinus mariae josephi* (photo.12).

Nous avons observé aussi l'apparition de nodules sur *Vigna unguiculata* dites à large spectre d'hôte (De Lajudie et *al.*, 1998), et des nodules blanc sur la plante *Ornithopus compressus*, mais aucune nodulation n'est observé avec la plante *Glycine max.* ce résultat est en concordance avec celui trouvé par Chahboune et *al.* en 2011a (photo.13).

D'autre part la plante *C. villosus* peut être infectée par la souche CTAW11, CTAW71 tout en formant des nodules bruns. Cependant les souches : USDA6, PAC48, USDA76 ne peuvent pas induire de nodulation avec la plante *Cytisus villosus* d'Algérie. Ces souches dites *Glycinearum* ne peuvent noduler que les *Glycine* et non pas les *Genistearum*.

L'une des caractéristiques majeures des associations rhizobia- légumineuses est leur spécificité d'hôte. En effet, une espèce de rhizobia n'est capable, en générale, d'établir une relation symbiotique efficace qu'avec un nombre limité de partenaires végétaux. De même, une espèce de légumineuse ne peut être nodulée que par un certain nombre d'espèces bactériennes (Tilak et *al.*, 2005).

Certaines souches bactériennes ont un spectre très large, comme la souche de *Sinorhizobium* sp. NGR 234 qui peut noduler expérimentalement près de 120 genres de légumineuses (Peuppke et Broughton, 1999). Inversement, le spectre d'hôte est étroit chez *Sinorhizobium meliloti* qui ne s'associe qu'aux espèces végétales des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (Krishman et Pueppke, 1991).

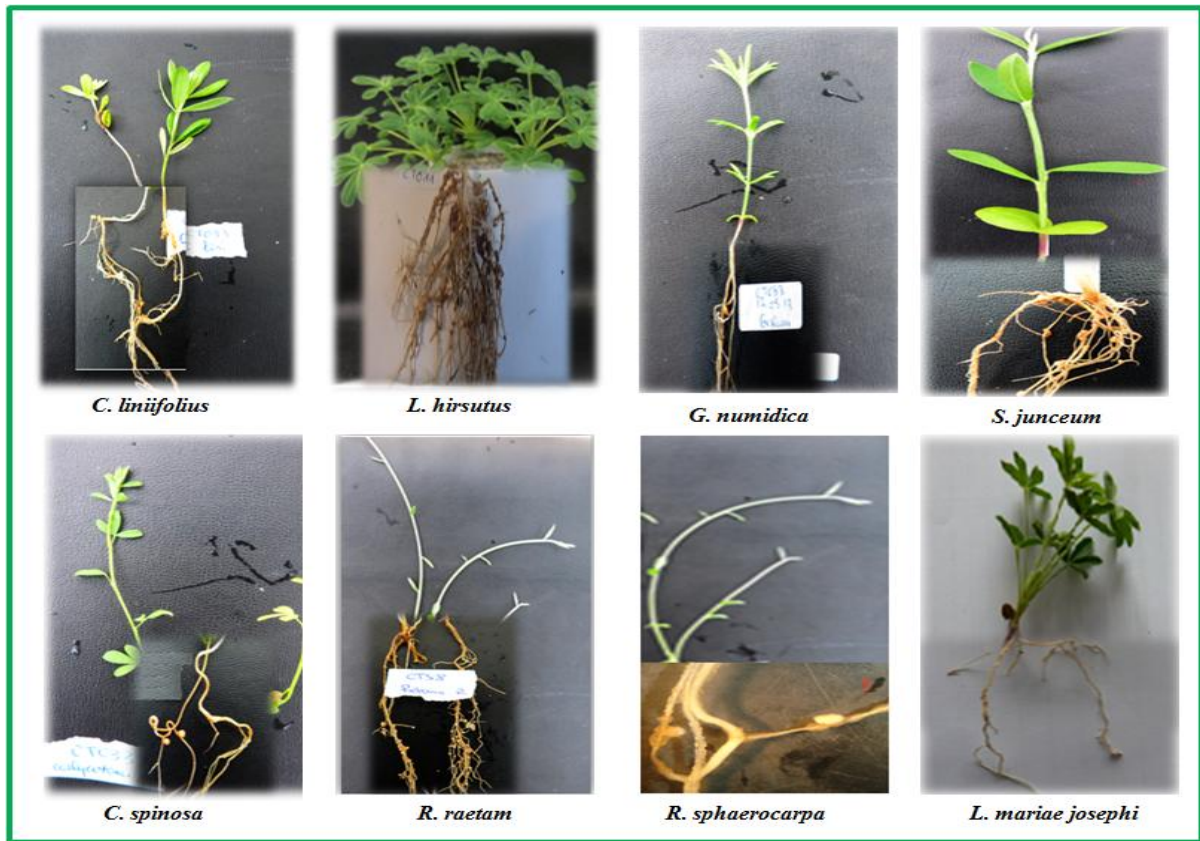


Photo 12: Test de nodulation croisé avec les plantes de la tribu des *Genisteae*

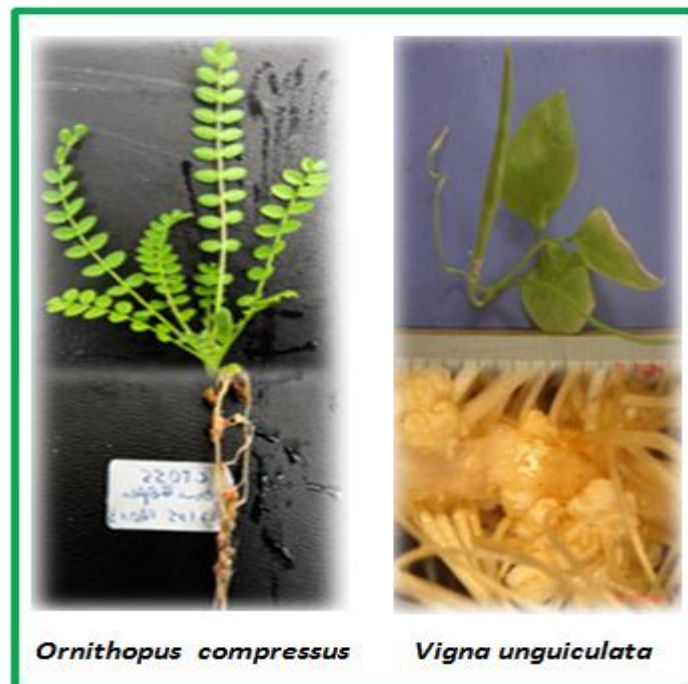


Photo 13 : Test de nodulation croisé

III. Analyse numérique des données de la caractérisation phénotypique

L'analyse numérique a été établie à partir de 75 caractères. Le calcul du coefficient de similitude a permis de classer les souches en fonction de leur ressemblance (tableau IX) . En effet, les 6 isolats de *Cytisus villosus* et les 4 souches de références partagent au moins 67% de ressemblance. Les souches CTS8, CTS57, CTO11, CTO55, *B. canariense* BTA-1 partagent plus de 90% de ressemblance. Les souches CTO1, CTO33, *B. cytisi* CTAW11, *B. japonicum* USDA6, CTS8 partagent plus de 80% de ressemblance.

Les tests phénotypiques sont convertis en une matrice (Annexe 3) qui a permis d'établir une classification ascendante hiérarchique CAH. Les résultats obtenus de cette analyse montre que les 10 souches testées sont groupées en deux branches. La branche **I** regroupe *B. japonicum* USDA6, CTO1 et la CTO33. La branche **II** elle-même se divise en deux clusters **A** et **B**. Le cluster **A** comprend *B. canariense* BTA-1, CTO11 et la CTO55. Le cluster **B** regroupe *B. cytisi* CTAW11, *B. rifense* CTAW71, CTS8 et la CTS57. Nous constatons que les souches CTS8, CTS57 forment un groupe différent de *Bradyrhizobium rifense* CTAW71 (fig.9).

Cette approche phénotypique vient de confirmer les résultats génotypique de l'analyse phylogénétique antérieure sur les mêmes souches (Ahnia et al., , 2014). En effet ces trois approches montrent clairement la présence de trois groupes parmi la collection de *Bradyrhizobium* isolés de *Cytisus* d'Algérie et surtout la présence d'un groupe qui pourrait être une nouvelle espèce.

Tableau IX : Coefficient de similitudes inter-souches de rhizobia

CTS8	100									
CTS57	96.10	100								
CTO1	81.81	81.81	100							
CTO33	67.53	84.41	97.40	100						
CTO11	90.90	90.90	84.41	74.02	100					
CTO55	89.61	92.20	84.41	84.41	97.40	100				
CTAW11	85.71	87.01	83.11	81.81	87.01	89.61	100			
CTAW71	94.80	96.10	85.71	85.71	93.50	93.50	88.31	100		
USDA6	83.11	79.22	94.80	92.20	81.81	81.81	80.51	81.81	100	
BTA-1	90.90	92.20	81.81	87.01	98.70	97.40	88.31	93.50	83.11	100
	CTS8	CTS57	CTO1	CTO33	CTO11	CTO55	CTAW11	CTAW71	USDA6	BTA-1

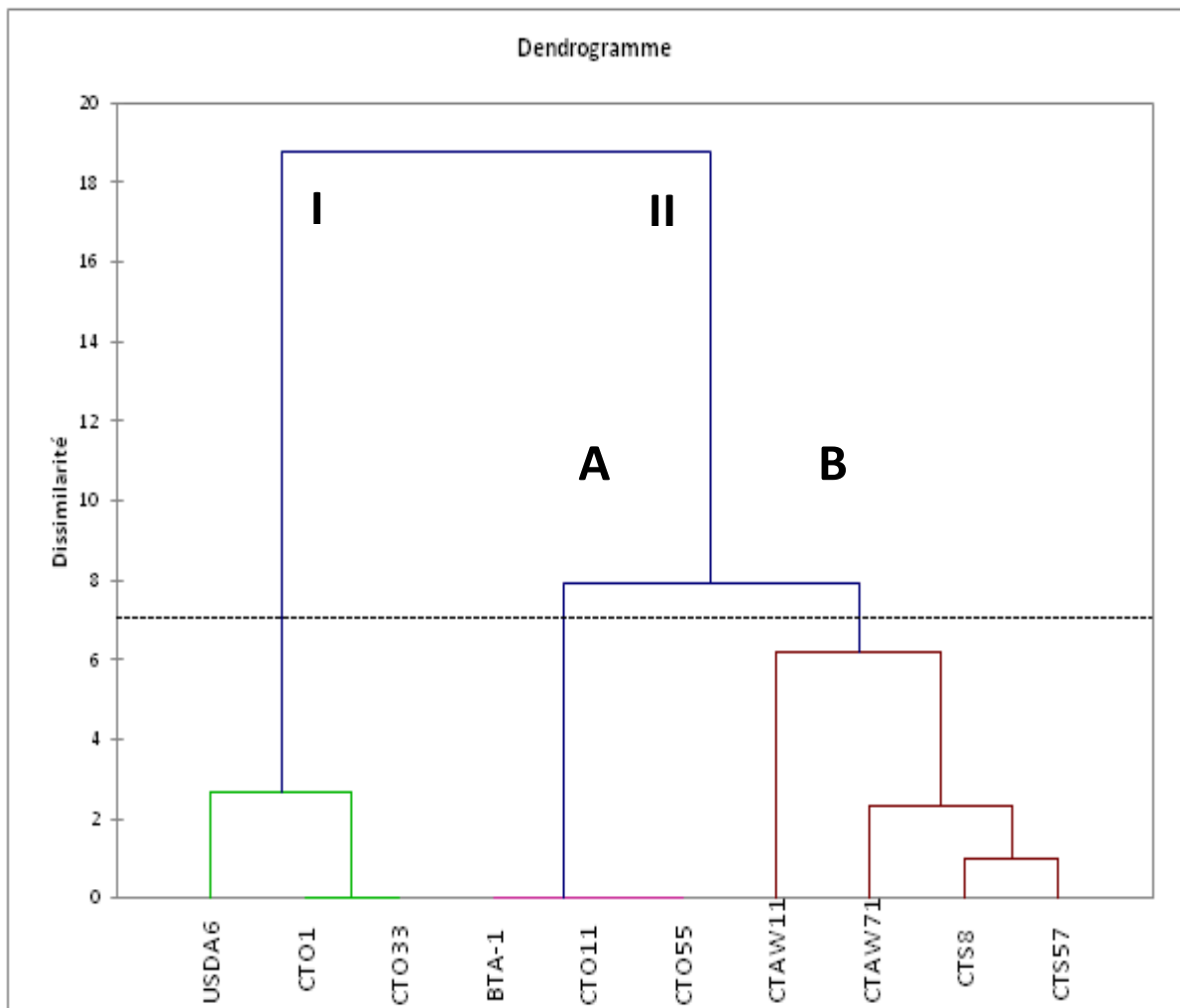


Figure 9: Dendrogramme de la CAH de 6 souches de rhizobia isolées de *Cytisus villosus* de la région cotière Ouest de Bejaia, et de 4 souches de référence, *B. cytisi* CTAW11, *B. rifense* CTAW71 *B. japonicum* USDA6, *B. canariense* BTA-1.

L'objectif de cette étude est la caractérisation de six représentants des 51 souches bactériennes isolées des nodules de la plante *Cytisus villosus* (*Genisteae*) de la région côtière Ouest de Bejaia. Une première approche avait montré que ces souches se divisaient en trois groupes déterminés par une analyse génotypique et phylogénétique. La deuxième approche que nous avons entreprise à travers l'étude des 75 caractères phénotypiques a montré également que les souches isolées partagent plus de 67% de similitude avec les souches de référence.

Les caractères physiologiques ont révélé une diversité de réponse vis-à-vis des facteurs testés à savoir la température, le pH et la salinité. La plupart des souches y compris les souches de référence présentent une bonne croissance entre 26°C et 30°C avec un optimum à 28°C. Ces souches présentent également une bonne croissance entre pH 4 et pH 8, et pour certaines allant jusqu'à pH 9. Aucune croissance n'a été observé à 100mM et plus de NaCl sauf pour la souche CTS57.

Les souches étudiées présentent une grande aptitude à assimiler les sucres comme source de carbone et les acides aminés comme source d'azote avec une variabilité d'assimilation plus ou moins importante. La réponse aux antibiotiques est différente d'une souche à une autre et ce caractère semble être discriminatif. Les souches testées et les souches de référence se sont montrées globalement sensibles aux métaux lourds à l'exception du Cuivre.

Le test de nodulation simple montre que les 6 isolats induisent une nodulation avec leur plante hôte *Cytisus villosus*. Le test cross, a permis de déterminer que ces isolats présentent une gamme large de plantes hôtes. En effet, ces souches sont capables de noduler 8 légumineuse appartenant à la tribu des *Genisteae*.

L'analyse numérique basée sur l'étude de 75 caractères phénotypiques a confirmé que ces isolats sont répartis en trois différents groupes similaires à ceux déterminés par l'étude phylogénétique. Le premier groupe comporte les souches qui se regroupent autour *B. japonicum* USDA6, le deuxième groupe comporte des souches proches de *B. canariense* BTA-1, et enfin un troisième groupe composé des souches CTS8 et CTS57 proche de *B. rifense* CTAW71 mais qui reste différent de cette espèce.

Pour nommer cette éventuelle nouvelle espèce , cette caractérisation polyphasique devra être soutenue par soit une hybridation ADN/ADN soit par le séquençage total du génome des isolats de *Cytisus villosus*.

Références Bibliographiques

Ahnia H., Boulila F., Boulila AG., Boucheffa K., Duran D., Bourebaba Y., Salmi A., Imperial J., Ruiz-Argueso T., Rey L. (2014). *Cytisus villosus* from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 105 : 1121-1129.

Allen E.K. & Allen O.N. (1950). Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. *Bacteriology Reviews*.14(4),273-330.

Appunu C. & Dhar B. (2006). Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. *African Journal of Biotechnology*.5(10),842-845.

Beijerinck MW. (1888). Die Bacterien der papilionaceenknöllchen. *Botanische Zeitung*, 46, 797-804.

Berge O., Lodhi A., Brandelet G., Santaella C., Roncato M.A., Christen R., Heulin T., Achouak W. (2009). *Rhizobium alamiisp. nov.*, an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 367-372.

Blondeau R. (1980). Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Librairie Vuibert. Paris. pp 5-6.

Boivin C., Ndoye I., Molouba F., de Lajudie P., Dupuy N., Dreyfus B. (1997). Stem nodulation in legumes : diversity, mechanisms, and unusual characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16, 1-30.

Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C. & L. Talini. (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. *Les Actes du BRG 6* : 97-110.

Boulila F. (2009). Caractérisation phénotypique et génotypique des rhizobia isolés de *Retama*. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane Mira. Bejaïa. 85p.

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

Caetano-Anolles G., et Gresshoff P. M. (1991). Plant genetic control of nodulation. *Annual Review Microbiology*.45, 345-382.

CA-SFM. (2014).Comité de l’antibiogramme de la société française de Microbiologie, recommandation 2014.

Chahboune R, Barrijal S, Moreno S, Bedmar EJ. (2012) *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. Isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Systematic and Applied Microbiology*. 35:302–305.

Chahboune R, Barrijal S, Moreno S, Bedmar EJ. (2011a) Characterization of *Bradyrhizobium* species isolated from root nodules of *Cytisus villosus* grown in Morocco. *Systematic and Applied Microbiology*. 34:440–445.

Chahboune R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velazquez E, Bedmar EJ. (2011b) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61:2922–2927.

Chang, Y.L., Wang, J.Y., Wang, E.T., Liu, H.C., Sui, X.H. & Chen, W.X. (2011). *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea* grown in Southern China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Epub ahead of print. doi: 10.1099/ijms.0.027110-0.

Chen W.M., de Faria S.M., Chou J.H., James E.K., Elliott G.N., Sprent J.I., Bontemps C., Young J.P., Vandamme P. (2008). *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58(9): 2174-9.

Chen W.X., Li G.S., Qi Y.L., Wang E.T., Yuan H.L., Li J.L. (1991). *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 275-280.

Chen, Wei-Min, Zhu, Wen-Fei, Bontemps, Cyril, Young, J. Peter W., Wei, Ge-Hong. (2011). *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61: 574-579.

Chen, Weimin, Zhu, Wenfei, Bontemps, C., Young, J. Peter W., Wei, Gehong. (2010). *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from root nodules of the wild legume *Alhagi sparsifolia* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60: 958-962.

Chopra C., Abrol B. K. & K. L. Handa. (1960). Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique. UNESCO, Paris. pp : 75.

Cloutier J., Prévost D., Nadeau P. & Antoun H. (1992). Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. Applied and Environmental Microbiology. 58(9), 2846-2853.

Colwell.R.R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* : numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. Journal of Bacteriology Bacteriol.104 : 410-433.

Cordovilla M.P., Ligerio F. & Lluch C. (1994). The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. The Journal of Experimental Botany. 45 (10), 1483-1488.

Correa O. S., et Barneix A. J. (1997). Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 13, 153-157.

Davidson, I. A., and M. J. Robson. (1986). Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N₂ fixation, nodulation and growth of white clover. Annal Botny. 57, 331-338.

De Bruijn F. J. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 58: 2180-2187.

De Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins MD, Kersters K, Dreyfus B, Gillis M. (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing

bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1277-1290.

De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MT, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M. (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov. *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 715-733.

Dénarié J. (2009). Les signaux des symbioses racinaires : de la biologie moléculaire à l'agronomie. Academie des Sciences. Institut de France. pp: 1.

Dobert RC, Breil BT, Triplett EW. (1994) DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 7, 564-572.

Domergue O. (2006). Diversité des rhizobia associés à ononis repens : Une légumineuse adaptée aux milieux Méditerranéens. MÉMOIRE pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études. 78p.

Dreyfus B.L. (1982). La symbiose entre *Rhizobium* et *Sesbania rostrata* : Légumineuse a nodules caulinaires. Thèse de Doctorat d'Etat Université de Paris VII, 119p.

Dreyfus, Y.R. Dommergues. Nodulation of *Acacia* species by fast-and slow-growing tropicals strains of *Rhizobium*. *Applied and Environmtal Microbiology* 41 (1981) 97-99.

Duhoux É. & Nicole M. (2004). Biologie Végétale : association et interaction chez les plantes, Edition : Dunod. Paris. 166p.

Duran D, Rey L, Sánchez-Cañizares C, Navarro A, Imperial J, Ruiz-Argüeso T. (2013). Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Systematic Applied Microbiology* 36:128–136.

El-Hilali I. (2006). La symbiose rhizobium-lupin: biodiversités des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V–Agdal. Faculté des sciences Maroc. 205p.

Esseling J.J., Lhuissier F.G.P & Emons A.M.C. (2003). Nod factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology*.132,1982-1988.

FAO. 1988. Programme de coopération technique. Programme de développement des productions fourragères et de l'élevage. Rapport de synthèse. 45p.

Ferry M. (1990). Concurrence et complémentarité des espèces végétales dans les oasis. CIHEAM - Options Méditerranéennes. Institut National de la Recherche Agronomique, France. 1,261-270.

Franck B. (1889). Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 7, 332-346.

Ganry F. & Dommergues Y. (1995). Arbres fixateurs d'azote, champ ouvert pour la recherche. *Agriculture et développement*. 7, 38-55.

Garcia-Fraile, Paula, Rivas, Raul, Willems, Anne, Peix, Alvaro, Martens, Miet, Martinez-Molina, Eustoquio, Mateos, Pedro F., Velazquez, Encarna. (2007). *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 844-848.

Gaudry M.J.F. (1997). Assimilation de l'azote chez les plantes, aspect physique, biochimique et moléculaire. *Institut Nationale Recherche*. pp : 139-140.

Gaussen H., Leroy . J-F. & P. Ozenda. (1982). Précis de botanique. Végétaux supérieures. Tome II. Ed 2. Masson. Paris. pp : 325-335.

Gouffi K., Pica N., Pichereau V. & Blanco C. (1999). Disaccharides as a new class of Nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*.65(4),1491-1500.

Graham P. H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. 38 (6), 475-484.

Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Kersters, Y. M. Barnett, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 41, 582-587.

Guerrouj K., Ruíz-Díez B., Chahboune R., Ramírez-Bahenad M.E., Abdelmoumen H., Quiñones M. A., Missbah El Idrissif M., Velázquez E., Fernández-Pascualb M., Bedmarh E.J., Peix A. (2013). Definition of a novel symbiovar (*sv. retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp.nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Systematic Applied and Microbiology*. In press.

Guerrouj K., H Benata., M Ourarhi., H Abdelmoumen., R Paul & M El Idrissi. (2009). Diversité des rhizobies qui nodulent quelques légumineuses de la région orientale du Maroc poster Symposium international Agriculture durable en région Méditerranéenne (AGDUMED), Rabat, Maroc.

Guignard J.L. & F. Dupont. (2005). Botanique. 13^{ème} Edition Masson.

Han, Tian Xu, Wang, En Tao, Wu, Li Juan, Chen, Wen Feng, Gu, Jin Gang, Gu, Chun Tao, Tian, Chang Fu, Chen, Wen Xin. (2008) *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1693-1699.

Haukka K, Lindström K, Young JPW. (1998). Tree phylogenetic groups of nodA and nifH in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 419-426.

Hopkins W.G. (2003). Physiologies végétale. Edition 2. Beock Université. Bruxel. pp : 470 499.

Hou, Bao Chao, Wang, En Tao, Li, Ying, Jr, Jia, Rui Zong, Chen, Wen Feng, Gao, Yu, Dong, Ren Jie, Chen, Wen Xin. (2009). *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Sirj.) Vassilez. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59: 3051-3057.

Hung M.H., Bhagwath A.A., Shen F.T., Devasya R.P. & Young C.C. (2005). Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. Pedobiologia. 49(6), 577-584.

Ishurda O., Kermagi A., Zgheel F., Flefla M., Elmabruk M., Yalin W., Kennedy J.F. & P. Yuanjiang. (2004). Structural aspects of water-soluble galactomannans isolated from the seeds of *Retama raetam*. Carbohydrate Polymers. 58, 41–44.

Islam, M.S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., and Seki, T. (2008). *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan." Bioscience Biotechnology and Biochememestry. 72:1416-1429.

Jarvis, B. D. W., T. S. Mc lean, I. G. C. Robertson, and G. R. Fanning. (1977). Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. New Zealand Journal of Agricultural Research. 20,42-52.

Jordan D.C. (1984). Family III. *Rhizobiacea*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Krieg N.R. & Holt J.G. 8ème edition. The Williams & Wilkins, Baltimore. 1,235-242.

Jordan, D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.32, 136-139.

Journet E.P. (2004). Symbioses racinaires. Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais. www .crdp-toulouse.fr.

Kellman A. W. (2008). *Rhizobium* inoculation, cultivar and management effects on the growth, development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Thèse de doctorat. Université New Zealand. 278p.

KuyKendall, Saxena L. D., B., Devine T. E. et Udell S. E. (1992). Genetic diversity in *bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology 38, 501-505.

Labat J.N. (1996). Biogéographie, endémisme et origine des légumineuses papilionacées de Madagascar. Biogéographie de Madagascar: 95-108.

Lafay. B, J. Burdon. (2006). Molecular diversity of rhizobia nodulating the invasive legume *Cytisus scoparius* in Australia, J. Appl. Microbiol. 100 1228–1238.

Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. (2001) Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts. Microbiology, 147, 981-993.

Laguerre, G., P. Mavingui, M. R. Allard, M. P. Charnay, P. Louvrier, S. I. Mazurier, L. Rigottier-Gois, and N. Amarger. (1996). Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. Appl. Environ. Microbiol. **62**, 2029-2036.

Li, Qin Qin, Wang, En Tao, Chang, Yue Li, Zhang, Yun Zeng, Zhang, Yan Ming, Sui, Xin Hua, Chen, Wen Feng, Chen, Wen Xin. (2010). *Ensifer (Sinorhizobium) sojae* sp. nov., isolated from root nodules of *Glycine max* grown in saline-alkaline soils in Hebei province of China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: ijs.0.025049-0.

Lin, Dong Xu, Wang, En Tao, Tang, Hui, Han, Tian Xu, He, Yu Rong, Guan, Su Hua, Chen, Wen Xin. (2008) *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 1409-1413.

Lindström K. (1989). *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology, 39, 365-367.

Lindström K., Terefework Z., Suominen L., Lortet G. (2010). Signalling and development of *Rhizobium*-legume symbiosis. biology and environment: Royal Irish Academy vol. 102B, NO. 1, 61–64.

Lograda T., Chaker A.N., Chalard P., Ramdani M., Chalchat J.C., Silini H. & G. Figueredo. (2009). Chemical composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Genista numidica* Spach. and *G. saharae* Coss et DUR. *Asian Journal of plant Sciences* 8 (7): 495-499, 2009.

Lopez-Lopez, Marco A. Rogel, Ernesto Ormeno-Orrillo, Julio Martinez-Romero, Esperanza Martinez-Romero. (2011). *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov., *Systematic and Applied Microbiology*, Volume 33, Issue 6, Pages 322-327.

Lu YL, Chen WF, Han LL, Wang ET, and Chen WX. (2009b). *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 3006-3011.

Lu, Yang Li, Chen, Wen Feng, Han, Li Li, Wang, En Tao, Zhang, Xiao Xia, Chen, Wen Xin, Han, Su Zhen. (2009). *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 3012-3018.

Maâtallah J., Berraho E. B., Munoz S., Sanjuan J., et Lluch C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. *Agronomie*. 22, 321-329.

Maghrani M., Zeggwagh N.A., Haloui M. & M. Eddouks. (2005). Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 99, 31-35.

Marchal N., Bourdon J.L. & Richard C.L. (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Edition : Doin Editeurs. Paris. 447p.

Masson P. & G. Gintzburger. (2000). Les légumineuses fourragères dans les systèmes de production méditerranéens: utilisations alternatives. CIHEAM-IAMZ. Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier. 483, 395-406.

Merabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., Domergue, O., Coopman, R., Bekki, A., Mars, M., Willems, A., de Lajudie, P. (2010). Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*,

Argyrolobium uniflorum and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 664-674.

Michiels J., Verreth C. & Vanderleyden J. (1994). Effects of temperature stress on bean nodulating Rhizobium strains. Applied and Environmental Microbiology. 60 (4), 1206-1212.

Nandasena, Kemanthi G., O'Hara, Graham W., Tiwari, Ravi P., Willems, Anne, Howieson, John G. (2009). *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2009 59: 2140-2147.

Oka-Kira E. & Kawaguchi M. (2006). Long-distance signaling to control root nodule number. Current Opinion in Plant Biology 9: 496-502.

Peng, Guixiang, Yuan, Qinghua, Li, Huaxing, Zhang, Wu, Tan, Zhiyuan. (2008) *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58 : 2158-2163.

Perret X., Staehelin C. & W.J. Broughton. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64, 180-201.

Perry J.J., staley J.T. & S. Lory. (2004). Microliologie. Edition Dunod, Paris.

Piha M.I. & Munnus D.N. (1987). Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to highsoil temperature. Plant Soil.98(2),183-194.

Presvost D., Antoun H. et Bordeleau L.M. (1987). Effects of low temperature on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia. FEMS Microbiology Ecology.45, (4), 205-210.

Pueppke SG, Broughton WJ. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Molecular Plant-Microbe Interaction, 12, 293-318.

Quezel P. & S. Santa. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris. pp : 15-475.

Quatrini P, Scaglione G, Cardinale M, Caradonna F, Puglia AM. (2002) Bradyrhizobium sp. Nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 92, 13-21

Ramirez-Bahena M.H., Peix A., Rivas R., Camacho M., Rodriguez-Navarro D.N., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Willems A., Veluzquez E. (2009). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1929–1934.

Ramirez-Bahena, Martha Helena, Garcia-Fraile, Paula, Peix, Alvaro, Valverde, Angel, Rivas, Raul, Igual, Jose M., Mateos, Pedro F., Martinez-Molina, Eustoquio, Velazquez, Encarna. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisisp.* nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2484-2490.

Ramirez-Bahena, Martha Helena, Peix, Alvaro, Rivas, Raul, Camacho, Maria, Rodriguez-Navarro, Dulce N., Mateos, Pedro F., Martinez-Molina, Eustoquio, Willems, Anne, Velazquez, Encarna. (2009). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1929-1934.

Raven P.H., Evert R.F. & Eichhorn S.E. (2007). *Biologie végétale*. Edition : de boeck université. 2eme édition. Paris-France. 653-660.

Raza S., Jornsgard B., Abou-Taleb H., & Christiansen J. L. (2001). Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Letters in applied microbiology*. 32 (6), 379-383.

Ren, Da Wei, Chen, Wen Feng, Sui, Xin Hua, Wang, En Tao, Chen, Wen Xin. (2011). *Rhizobium herbae* sp. nov. and *Rhizobium giardinii*-related bacteria, minor

microsymbionts of various wild legumes in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61:1912-1920.

Rispail N., Kalo P., Kiss G.B., Noel Ellis T.H., Gallardo K., Thompson R.D., Prats E., Larrainzar E., Ladrera R., Gonzalez E.M., Arrese-Igor C., Ferguson B.J., Gresshoff P.M. & D. Rubiales. (2010). Model legumes contribute to faba bean breeding. *Field Crops Research*. 115, 253-269.

Rivas.P, A. Willems, J.L. Palomo, P. Garcia- Benavides, P.F. Mateos, Martinez-Molina E., Gillis M., Velazquez E. (2004). *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54 : 1271-1275

Rodriguez-Echeverria S. & M. A. Pérez-Fernandez. (2003). Soil fertility and herb facilitation. Mediated by *Retama sphaerocarpa* *Journal of Vegetation Science*. 14 807-814.

Sazzad K. (2007). Exploring plant tolerance to biotic and abiotic stress. Thèse de Doctorat. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 66p.

Schofield, P. R., A. H. Gibson, W. F. Dudman, and J. M. Watson.(1987). Evidence for the genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Applied Environmental and Microbiology*. **53**, 2942-2947.

Sneath P.H.A. et Sokal R.R. (1973). Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Co San Francisco. soils. *Agronomie*. 22, 321-329.

Somasegaran P. et Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc p.450.

Sprent J.I.. (1995). Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry* 27(4/5): 401-407.

Sprent R., Sutherland J.M. & S.M. de Faria. (1987). Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 317, 1111-1129. *Systematic Applied Microbiology* 36:218–223.

Squartini A, Struffi P, Doring H, Selenska-Pobel S, Tola E, Giacomini A, Vendramin E, Velazquez E, Mateos PF, Martinez-Molina E, Dazzo FB, Casella S, Nuti MP. (2002) *Rhizobium sullae* sp nov (Formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1267-1276.

Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J. et May G.D. (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. Current Opinion in Plant Biology. 9:110-121.

Stowers M. D. (1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Annual Review Microbiology. 39, 89-108.

Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S. & Nuti M.P. (1998). Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. Journal of Applied Microbiology. 84 (1), 81-89.

Suominen L, Roos C, Lortet G, Paulin L, Lindstrom K. (2001) Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes : Evidence for horizontal gene transfer. Molecular Biology and Evolution, 18, 907-916.

Szabolcs I. 1986. Agronomical and ecological impact of irrigation on soil and water salinity. Adv. Soil Science 4, 189-218.

Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., De R., Saxena A.K., Shekhar Nautiyal C., Mittal S., Tripathi A.K. & B.N. Johri. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Current Science 89: 136-150.

Tortora G.j., Funk B.R. & Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Montréal. 968p.

Ueda T, Suga Y, Yahiro N, Matsuguchi T. (1995). Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC fragment Journal of Bacteriology, 177, 468-472.

Valladares, P. Villar-Salvador, S. Dominguez, M. Fernandez-Pascual, J.L. Penuelas, F. I. Pugnaire. (2002). Enhancing the early performance of the leguminous shrub *Retama*

sphaerocarpa (L.) Boiss. : fertilization versus Rhizobium inoculation. Plant and Soil. 240 253-262.

Van Berkum P., Beyene D. and B. D. Eardly. 1996. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean *Phaseolus vulgaris* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 46: 240-244.

Vandamme. P, B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kesters, J. Swings. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol.Rev.60 407-438.

Vidal, Celine, Chantreuil, Clemence, Berge, Odile, Maure, Lucette, Escarre, Jose, Bena, Gilles, Brunel, Brigitte, Cleyet-Marel, Jean-Claude. (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalcolours soil in Languedoc, France. Int J Syst Evol Microbiol 2009 59: 850-855.

Vincent J. M. (1970). A Manual for the practical study of the root nodule bacteria . IBP hand book n° 15. Oxford: Blackwell. pp: 164.

Vinuesa P, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Werner D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. Applied and Environmental Microbiology, 64, 2096-2104.

Vinuesa P., Leon-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Perez- Galdona R., Werner D. et Martinez-Romero E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int J Syst Evol Microbiol 55:569–575.

Waligora C. & Tetu T. (2008). Légumineuses il est urgent de les réhabiliter. Edition : Techniques culturales simplifiées. 48p.

Wang J.Y., Zhang, Y. M., Wang, R., Liu, H. C., Wang, E. T., Sui, X. H. & Chen, W. X . (2012) *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:616–624.

Wang, Feng Qin, Wang, En Tao, Liu, Jie, Chen, Qiang, Sui, Xin Hua, Chen, Wen Feng, Chen, Wen Xin. (2007) *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1192-1199.

Wang, Feng Qin, WChen, Wen-Ming, de Faria, Sergio M., James, Euan K., Elliott, Geoffrey N., Lin, Kuan-Yin, Chou, Jui-Hsing, Sheu, Shih-Yi, Cnockaert, M., Sprent, Janet I., Vandamme, Peter. (2007) *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella* *Int J International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, May 2007; 57: 1055 - 1059.

Wayne, D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr, H.G.Trüper. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 34 : 463-464

Weirs B.S. (2013). The current taxonomy of rhizobia .International NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated.

Weisburg W. G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Jornal of Bacteriology* 173: 697-703.

Wernegreen JJ., Riley MA. (1999). Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci : A case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 98-113.

White R. (2010). International Legume Database & Information Service. (<http://www.ildis.org/>).

Xi C., Schoeters E., Vanderleyden J. & Michiels J. (2000). Symbiosis-specific expression of *Rhizobium etli* *casA* encoding a secreted calmodulin-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (20), 11114-11119.

Xu L. M., Ge C., Cui Z., Li J. et Fan H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 45,706-711.

Young JPW, Johnston AWB. (1989). The evolution of specificity in the legume *Rhizobium* symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 341-349.

Zahran H.H. (1999). *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(4), 968-989.

Zahran M.A. & A.J. Willis. (2009). *The Vegetation of Egypt*. Springer Science + Business Media .Edition 2 .pp:3-221.

Zakhia F. & P. de Lajudie. (2001). Taxonomy of Rhizobia. *Mini-review Agronomie*. 21, 596-576.

Zhang, F., T. C. Charles, B. Pan, and D. L. Smith. (1996). Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum nod* genes at low temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*. 28, 1579- 1583.

Zhang, Rong Juan, Hou, Bao Chao, Wang, En Tao, Li, Ying, Jr, Zhang, Xiao Xia, Chen, Wen Xin. (2011). *Rhizobium tubonense* sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 512-517.

Zhou, Ping Fa, Chen, Wei Min, Wei, Ge Hong. (2010) *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010 60: 2552-2556.

Zurdo-Pineiro, Jose Luis, Rivas, Raul, Trujillo, Martha E., Vizcaino, Nieves, Carrasco, Jose Antonio, Chamber, Manuel, Palomares, Antonio, Mateos, Pedro F., Martinez-Molina, Eustoquio, Velazquez, Encarna. (2007) *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated

from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 784-788.

Annexe 1

I- Milieux de culture utilisés pour la culture des rhizobiums**1- Composition du milieu YMA (Vincent, 1970)**

Mannitol	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Na Cl	0.1g
Agar	15g
Eau distillée qsp.....	1000 ml

PH Ajusté à 6.8

2- Composition du milieu YMB (Vincent, 1970)

Mannitol	10g
Extrait de levure.....	0.4g
K ₂ HPO ₄	0.5g
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Na Cl	0.1g
Eau distillée qsp.....	1000 ml

PH Ajusté à 6.8

II- Milieu de culture des légumineuses**1- Composition du milieu de Jensen (Somasegaran et Hoben, 1994)**

CaHPO ₄	1g
K ₂ HPO ₄	0.2g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.2g
FeCl ₃	0.1

Oligo éléments: 1ml (solution)

CuSO ₄ sulfate de cuivre.....	0.08g/l
ZnSO ₄ sulfate de zinc.....	0.2g/l
MnSO ₄ sulfate de manganèse.....	1.8g/l
(NH ₄) ₂ Mo ₇ H ₂ O heptamolybdate d'ammonium.....	0.25g/l
H ₃ BO ₃ acide borique.....	0.002g/l
H ₂ O (qsp).....	1000 ml

III- Composition des milieux utilisés pour la caractérisation biochimique**1. Milieu au citrate de Simmons**

Sulfate de magnésium.....	0.2g
Phosphate mono-ammonique.....	1g
Phosphate bipotassique.....	1g
Citrate de sodium.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Bleu de bromothymol.....	0.08g
Agar.....	15g

pH ajusté à 6.8

2. Bouillon nitraté

Macération.....	1000ml
Péptone tryptique.....	15g
NaCl ou KCl.....	5g
Ntrite de Sodium (NaNO ₂).....	1ml

pH ajusté à 7

3. Milieu Clark-Lubs

Peptone tryptique de viande.....	5g
Phosphate bipotassique.....	5g
Glucose.....	6g

pH ajusté à 7

4. Eau peptonée

Peptone tryptique.....	15g
NaCl.....	5g

pH ajusté à 7

5. Milieu de culture utilisé pour l'assimilation des sucres comme seule source de carbone

NH ₄ Cl	1g
Sucre.....	1g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
Eau distillée.....	1000ml

pH ajusté à 6.8

6. Milieu de culture utilisé pour l'assimilation des acides aminés comme seule source d'azote

Mannitol.....	10g
Acide aminé.....	1g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
Eau distillée.....	1000ml

pH ajusté à 6.8

Annexe 2

La moyenne des différents tests effectués

a-La moyenne des Do obtenue aux différentes températures

Température (°C)	26°C	28°C	30°C	32°C	37°C
CTS8	0,595	0,585	0,156	0,003	0,004
CTS57	0,641	0,574	0,115	0,004	0,001
CTO1	0,679	0,964	0,228	0,002	0,001
CTO33	0,69	1,065	0,258	0,006	0,003
CTO11	0,179	0,272	0,105	0,005	0,003
CTO55	0,229	0,282	0,094	0,005	0,004
CTAW11	0,201	0,298	0,116	0,003	0,002
CTAW71	0,297	0,298	0,12	0,003	0,001
USDA6	0,669	0,995	0,28	0,005	0,003
BTA-1	0,153	0,283	0,13	0,005	0,004

b-La moyenne des Do obtenue aux différents pH

pH	4	5	6	7	8	9
CTS8	0,603	0,226	0,323	0,343	0,21	0,011
CTS57	0,585	0,335	0,524	0,381	0,417	0,033
CTO1	0,721	0,529	0,54	0,489	0,601	0,398
CTO33	0,492	0,529	0,54	0,489	0,601	0,376
CTO11	0,515	0,535	0,557	0,588	0,243	0,009
CTO55	0,463	0,175	0,187	0,498	0,203	0,011
CTAW11	0,099	0,12	0,397	0,321	0,149	0,094
CTAW71	0,298	0,295	0,36	0,345	0,214	0,014
USDA6	0,305	0,529	0,54	0,489	0,601	0,495
BTA-1	0,535	0,453	0,487	0,498	0,203	0,013

c- La moyenne des Do obtenue aux différentes concentrations de NaCl

NaCl (mM)	0	100	200	300	400
CTS8	0,244	0,06	0,023	0,017	0,015
CTS57	0,339	0,255	0,02	0,014	0,011
CTO1	1,111	0,004	0,026	0,027	0,018
CTO33	0,983	0,009	0,035	0,023	0,015
CTO11	0,216	0,019	0,013	0,03	0,018
CTO55	0,196	0,012	0,01	0,022	0,025
CTAW11	0,151	0,043	0,015	0,041	0,025
CTAW71	0,287	0,021	0,029	0,046	0,013
USDA6	1,025	0,013	0,031	0,027	0,022
BTA-1	0,235	0,025	0,014	0,025	0,023

Annexe 5

Signification et valeurs des codes des caractères phénotypiques utilisés pour les analyses numériques (CAH).

Code	Code numérique
Forme	0 : autres formes 1 : arrondies
Mobilité	0 : non mobile 1 : mobile
Aspect	0 : rugueux 1 : lisse
Couleur	0 : non blanchâtre 1 : blanchâtre
EPS	0 : absence 1 : présence
Test Gram	0 : négatif 1 : positif
Contour	0 : non circulaire 1 : circulaire
Temps d'apparition des colonies	0 : ≤ 4 jours 1 : > 4 jours
Elévation des colonies	0 : plate 1 : bombée
Opacité des colonies	0 : opaque 1 : translucide
Type respiratoire	0 : anaérobie 1 : aérobie
ONPG hydrolase	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Citrate reductase	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Tryptophanase	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Production H ₂ S	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Production d'acides	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Production d'acétoïne	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Nitrate reductase	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Nitrite reductase	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Production de gaz	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Fermentation lactose	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Fermentation glucose	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Fermentation du sucrose	0 : absence de l'enzyme ou du produit 1 : présence
Test BTB	0 : acidité 1 : alcalinité
TDA	0 : TDA ⁻ 1 : TDA ⁺
L-fructose	0 : non assimilé 1 : assimilé
L-arabinose	0 : non assimilé 1 : assimilé
D-mannose	0 : non assimilé 1 : assimilé
D-ribose	0 : non assimilé 1 : assimilé
D-xylose	0 : non assimilé 1 : assimilé
Dextrine	0 : non assimilé 1 : assimilé
L-rhamnose	0 : non assimilé 1 : assimilé
D-trehalose	0 : non assimilé 1 : assimilé
L-sorbose	0 : non assimilé 1 : assimilé
Sucrose	0 : non assimilé 1 : assimilé
D-raffinose	0 : non assimilé 1 : assimilé
Lactose	0 : non assimilé 1 : assimilé
D- cellobiose	0 : non assimilé 1 : assimilé
D-glucose	0 : non assimilé 1 : assimilé

D-galactose	0 : non assimilé	1 : assimilé
Betaine	0 : non assimilé	1 : assimilé
L-Glycine	0 : non assimilé	1 : assimilé
L-proline	0 : non assimilé	1 : assimilé
Histidine	0 : non assimilé	1 : assimilé
Acide glutamique	0 : non assimilé	1 : assimilé
L-serine	0 : non assimilé	1 : assimilé
Lysine	0 : non assimilé	1 : assimilé
Leucine	0 : non assimilé	1 : assimilé
Cystéine	0 : non assimilé	1 : assimilé
Gentamycine	0 : sensible	1 : résistant
Erythromycine	0 : sensible	1 : résistant
Tétracycline	0 : sensible	1 : résistant
Oxacilline	0 : sensible	1 : résistant
Zinc	0 : sensible	1 : résistant
Cuivre	0 : sensible	1 : résistant
Plomb	0 : sensible	1 : résistant
Cadmium	0 : sensible	1 : résistant
T26	Croissance à 26°C	
T28	Croissance à 28°C	
T30	Croissance à 30°C	
T32	Croissance à 32°C	
T37	Croissance à 37°C	
PH4	Croissance à PH4	
PH5	Croissance à PH5	
PH6	Croissance à PH6	
PH7	Croissance à PH7	
PH8	Croissance à PH8	
PH9	Croissance à PH9	
PH10	Croissance à PH10	
0mM	Croissance à 0mM	
100mM	Croissance à 100mM	
200mM	Croissance à 200mM	
300mM	Croissance à 300mM	
400mM	Croissance à 400mM	

Annexes

BTB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-fructose	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
L-arabinose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-mannose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-ribose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-xylose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dextrine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-rhamnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-trehalose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-sorbose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sucrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-raffinose	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
Lactose	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
D- cellobiose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-glucose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D-galactose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Betaine	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
L-Glycine	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
L-proline	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Histidine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A glutamique	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L-serine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lysine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Leucine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cystéine	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
Gent	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Ery	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Tétra	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
Oxa	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Zn	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0

Cytisus villosus from Northeastern Algeria is nodulated by genetically diverse *Bradyrhizobium* strains

Hadjira Ahnia · Farida Boulila · Abdelghani Boulila · Karima Boucheffa · David Durán · Yasmina Bourebaba · Adouda Salmi · Juan Imperial · Tomás Ruiz-Argüeso · Luis Rey

Received: 13 February 2014 / Accepted: 8 April 2014
© Springer International Publishing Switzerland 2014

Abstract Fifty-one rhizobial strains isolated from root nodules of *Cytisus villosus* growing in Northeastern Algeria were characterized by genomic and phenotypic analyses. Isolates were grouped into sixteen different patterns by PCR-RAPD. The phylogenetic status of one representative isolate from each pattern was examined by multilocus sequence analyses of four housekeeping genes (16S rRNA, *glnII*, *recA*, and *atpD*) and one symbiotic gene (*nodC*). Analysis of 16S rRNA gene sequences showed that all the isolates belonged to the genus *Bradyrhizobium*. Phylogenetic analyses based on individual or concatenated genes *glnII*, *recA*, and *atpD* indicated that strains cluster in three distinct groups. Ten out of the sixteen strains grouped together with *Bradyrhizobium japonicum*, while a second

group of four clustered with *Bradyrhizobium canariense*. The third group, represented by isolates CTS8 and CTS57, differed significantly from all other bradyrhizobia known to nodulate members of the *Genisteeae* tribe. In contrast with core genes, sequences of the *nodC* symbiotic gene from all the examined strains form a homogeneous group within the genistearum symbiovar of *Bradyrhizobium*. All strains tested nodulated *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteus*, and *Spartium junceum* but not *Glycine max*. From these results, it is concluded that *C. villosus* CTS8 and CTS57 strains represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus.

Keywords PCR-RAPD · *Bradyrhizobium* · Phylogenetic analysis · *Cytisus villosus* · Legume symbiosis · *nodC*

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10482-014-0173-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. Ahnia · F. Boulila · A. Boulila · K. Boucheffa · Y. Bourebaba · A. Salmi
Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

D. Durán · J. Imperial · T. Ruiz-Argüeso · L. Rey (✉)
Departamento de Biotecnología (ETSI Agrónomos), Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Campus de Montegancedo, Universidad Politécnica de Madrid, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain
e-mail: luis.rey@upm.es

J. Imperial
CSIC, Madrid, Spain

Introduction

Two main characteristics make legume shrubs preferable over trees or herbaceous species for restoration of poor soils and revegetation of degraded areas in arid or semi-arid circum-Mediterranean regions. First, these shrubs are adapted to water stress through their extensive root systems, stomata closure, resilience to wildfires and sclerophyll leaves (Valladares et al. 2008; Moreira et al. 2011; Prieto et al. 2012). Second, legume shrubs, like most legumes, establish symbiosis with N₂-fixing bacteria known as rhizobia, thus providing a net input of nitrogen into the ecosystems.

This last trait enhances soil fertility, facilitates growth of other plant species and prevents erosion and desertification (Requena et al. 2001; Cardinale et al. 2010; Rodríguez-Echeverría and Pérez-Fernández; 2003; van der Heijden et al. 2006; Zakhia et al. 2004).

Representatives of the *Genisteeae* (Adans.) Benth tribe from the Fabaceae family occur mainly in the Mediterranean basin, with great diversity in the West (Morocco-Spain and surrounding countries) and in the East (Balkan region) (Cristofolini 1991), although they are also found in the Canary Islands, Northern Europe and the Americas (*Lupinus* spp.). This tribe includes several genera of shrubs, such as *Retama*, *Genista*, *Cytisus* and *Spartium*, with great ecological significance in Western Mediterranean countries, where they dominate many plant communities that characterize the landscape (López González 2001). The study of rhizobia nodulating these wild-grown legume shrubs is attracting great interest because of their high potential for environmental applications (Boulila et al. 2009; Cardinale et al. 2008; Kalita et al. 2006; Lafay and Burdon 2006; Mahdhi et al. 2008; Quatrini et al. 2002; Rodríguez-Echeverría et al. 2003; Rodríguez-Echeverría and Pérez-Fernández 2005; Ruiz-Díez et al. 2009).

The genus *Cytisus* is widespread in the Mediterranean Basin. It comprises ca. 60 species, eight of which grow in Northern Algeria. Broom, *Cytisus villosus* Pourr., syn. of *Cytisus triflorus* (L'Hérit), is disseminated in Northern Africa, appearing from the mountains of Central and Northern Morocco to the mountains of the Cape Bon in Tunisia (Quezel and Santa 1962). Recently, endosymbiotic bacteria from *C. villosus* growing in the Central-Western region of the Moroccan Rif have been described. These bacteria belong to different species of the genus *Bradyrhizobium*: *B. japonicum*, *B. canariense* and to the species *B. cytisi* and *B. rifense* recently described (Chahboune et al. 2011a, 2011b, 2012). However no data about bacteria able to nodulate *C. villosus* from Algeria or Tunisia are available. In this study, new strains have been isolated from nodules of *C. villosus* grown in Northeastern Algeria, and characterized by phylogenetic and phenotypic analyses.

Materials and methods

Nodule collection and bacterial isolation

Nodules (7–9/plant) were collected from roots of *C. villosus* growing at two different locations in

Northeastern Algeria, in the region of Bejaia, Oued Dass (36°51'N; 4°48'E) and Saket (36°49'N; 4°56'E). The region was 100 m above sea level and the soils were slightly acid (pH 6.2). The nodules were surface-disinfected for 20 s with 95 % ethanol and then transferred to 4 % NaClO (v/v) for 2–3 min. Nodules were then rinsed ten times with sterile distilled water, individually crushed on sterile plates and a loopful of nodule suspension streaked onto yeast extract-mannitol (YEM) agar Petri plates (Vincent 1970). Plates were incubated at 28 °C until colonies were visualized, usually after 4–7 days and then maintained at 4 °C. For long-term storage, isolates were kept in glycerol (20 % v/v) YME at –80 °C.

Genomic DNA isolation and PCR amplifications

Total DNA was recovered from a 1.5 mL YEM culture in exponential phase using DNeasy Blood & Tissue kit columns (Qiagen). PCR was carried out in a 25 µL solution containing DNA (1 µL, 5–10 ng), 2.5 µL of 10 × PCR buffer with magnesium chloride (Roche Applied Science), 10 mM of each dNTP, 10 µM of each primer, 1 µL DMSO and 1 U of Taq DNA polymerase (Roche Applied Science). M13 random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique (RAPD-PCR) was used to generate genomic fingerprints of the isolates investigated, employing M13 primer (5'-GAG-GGTGGCGGTTCT-3') and amplification conditions as described by Rivas et al. (2006). PCR amplifications of 16S rRNA, *recA*, *glnII*, *atpD* and *nodC* were carried out and sequenced following procedures already described elsewhere (Sánchez-Cañizares et al. 2013). Unincorporated primers and dNTPs were removed from PCR products with the NucleoSpin® Extract II (Macherey–Nagel) or, when needed, by gel electrophoresis followed by band purification with the same kit. Sequencing was performed externally at STAB Vida (Lisbon, Portugal).

Phylogenetic analysis

Sequences obtained from the PCR products were analysed and assembled with Sequencher (Gene Code Corporation, Ann Arbor, MI, USA) and then deposited in GenBank/EMBL database. Their accession numbers are listed in Table S1. Sequences of *recA*, *glnII* and *nodC* genes, including some from GenBank/

EMBL databases were aligned using ClustalW software from the EMBL server (<http://www.ebi.ac.uk/>) (Chenna et al. 2003). Sequences of 16S rRNA genes were aligned using the SINA alignment service from the SILVA database (<http://www.arb-silva.de/aligner>) (Pruesse et al. 2012). Phylogenetic trees were built using both the maximum likelihood and neighbour-joining (NJ) methods as implemented in the MEGA5 software package (Tamura et al. 2011). Bootstrap values in phylogenetic trees were obtained from 1,000 replicates. Consistent results were obtained by both sequence analysis methods, and only NJ trees are presented.

Plant nodulation tests

Nodulation ability of isolates was assessed as follows: *C. villosus* seeds were sterilized with 96 % sulphuric acid for 30 min, thoroughly rinsed several times with sterile distilled water, and placed in sterilized water overnight. They were then germinated on plates containing Jensen's solid medium (Somasegaran and Hoben 1994) at 28 °C in the dark for 3 days. Seedlings were planted in Leonard jars (2 seedlings/jar) containing sterile vermiculite and Jensen's solution and inoculated with 4 mL of rhizobial suspension (10^9 cells mL⁻¹) in triplicate. Three non-inoculated Leonard jars were included as control. In order to observe the presence of nodules, plants were maintained in a greenhouse for 8 weeks and watered with sterile Jensen's liquid medium once a week.

The same procedure was followed for inoculation of *Spartium junceum* seeds. However seeds of *Lupinus angustifolius*, *L. luteus*, and *Glycine max* were surface-sterilized in a different way. Seeds were maintained 1 min in 95 % ethanol, 3 min in 4 % NaClO (v/v), rinsed 10 times and kept in sterile water 1 h. Then seeds were germinated on agar plates at 28 °C for 3 days.

Results

Identification of symbiotically effective isolates from *C. villosus*

A total of 51 symbiotically effective isolates were obtained from nodules of *C. villosus* native plants

thriving in two locations of Northeastern Algeria, Oued Dass and Saket. Strains were named CT (from *C. triflorus*) followed by O or S according to the sites of origin. All isolates (37 CTO and 14 CTS) grew slowly on YME agar, producing non-mucoid colonies after 4 days of incubation, were able to grow at pH 4.4 in YME, in the presence of 1 % NaCl, and at 37 °C but they did not grow at pH 10.

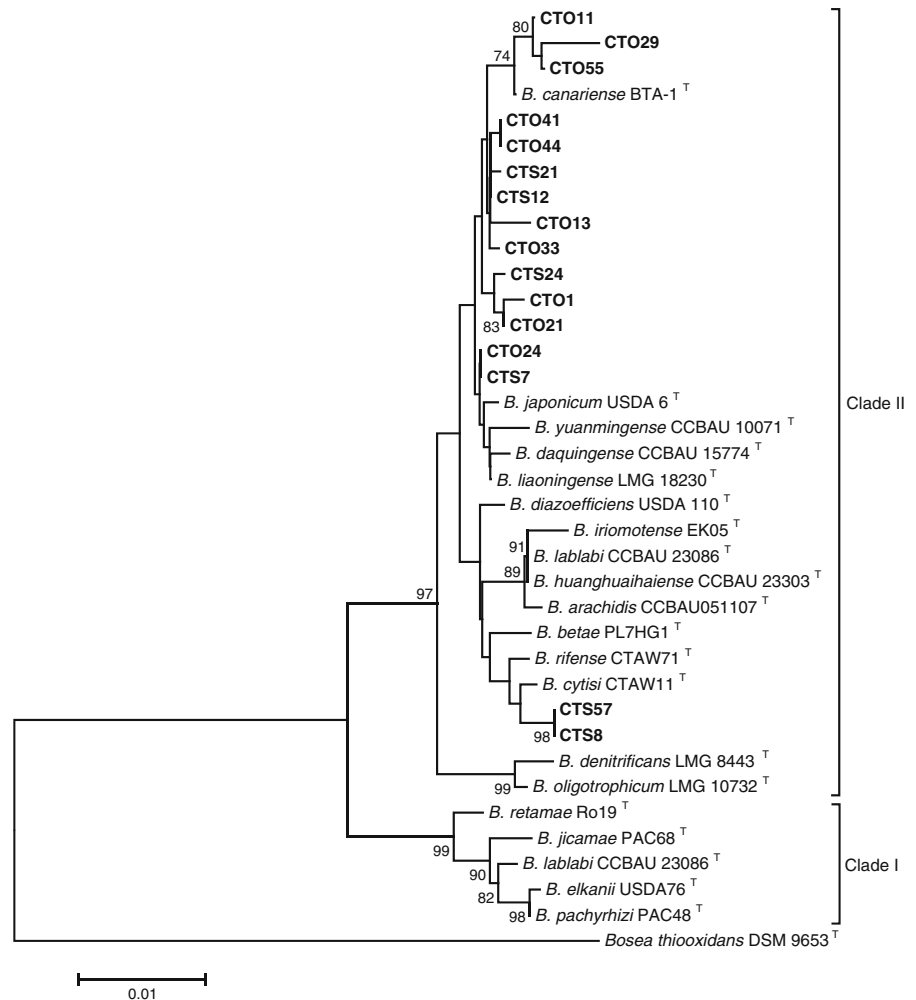
RAPD-PCR genomic analysis

M13 random amplified polymorphic DNA-PCR technique (RAPD-PCR) has been useful to analyse rhizobial diversity (Coutinho et al. 1999; Durán et al. 2013; McInnes et al. 2004; Rivas et al. 2006; Velázquez et al. 2010). Analysis of RAPD-PCR fingerprints of the 51 available isolates allowed the identification of 16 different patterns, shown in Fig. S1. Distribution of isolates among the different patterns is presented in Table S1. A randomly chosen representative of each pattern (strain) was selected for gene sequencing. To test pattern reliability, the *recA* sequences from isolates CTO1 and CTO56, belonging to the same pattern, were obtained and compared, and no variation was found among them (data not shown). However, the *recA* sequences from CTO1 and CTO11, two isolates belonging to distinct patterns, differed in 26 nucleotide positions out of 497.

Phylogeny based on the 16S rRNA gene

Near full-length 16S rRNA gene of the 16 *C. villosus* strains was PCR amplified and sequenced. BLASTn search results showed that all sequences clustered with *Bradyrhizobium* species. A neighbor-joining phylogenetic tree was derived based on the 16S rRNA gene sequences of these strains and on the corresponding sequences from studied type strains of previously *Bradyrhizobium* delineated species. The tree indicated that all strains belong in Clade II (Fig. 1) that included most of the well-defined and named species of *Bradyrhizobium* (Sánchez-Cañizares et al. 2013). A total of 12 strains (CTO11, CTO29, CTO55, CTO41, CTO44, CTS21, CTS12, CTO13, CTO33, CTS24, CTO1 and CTO21), clustered with *B. canariense* BTA-1^T, 2 (CTO24, CTS7) grouped close to *B. japonicum* USDA 6^T and the remaining (CTS8, CTS57) grouped close to *B. cytisi* CTAW11^T (Fig. 1).

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences (1,274 bp). Sequences of strains isolated in this study from nodules of *C. villosus* are in **boldface**. Bootstrap values obtained after 1,000 replicates are indicated at the branching points as percentages, and values lower than 65 are not shown. *Scale bar* shows the number of substitutions per site. Clades I and II are as defined by Menna et al. (2006)



Phylogeny based on housekeeping genes *glnII*, *recA* and *atpD*

Taking into account that phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequence has insufficient resolution for *Bradyrhizobium* species (Rivas et al. 2009), a more robust phylogeny was performed using partial sequences of housekeeping genes *glnII*, *recA* and *atpD*, obtained after PCR amplifications. As expected, the lengths of fragments were ca. 890 bp for *glnII*, 600 bp for *recA* and 525 bp for *atpD*. Two phylogenetic trees were built with concatenated gene sequences, one performed with *recA* and *glnII* to include sequences belonging to *C. villosus* isolates from Morocco (Fig. 2a) and another, better resolved, with *glnII*, *recA* and *atpD* of strains whose three gene sequences were available (Fig. 2b). Both trees distributed the *C. villosus* strains

from Algeria in three groups (Fig. 2). Phylogenetic trees based on single gene sequences were consistent with these results (data not shown) but with lower bootstrap values. Most of the strains were grouped close to *B. japonicum* USDA6^T (CTS12, CTS24, CTS21, CTO41, CTO1, CTO21, CTS7, CTO13, CTO24 and CTO33) (Fig. 2, Group 2). Strains CTO11, CTO29, CTO44 and CTO55 were clustered with *B. canariense* BTA-1^T (Fig. 2, Group 1). Both groups contained *C. villosus* strains isolated from Morocco (Fig. 2a) although the isolates were clearly separated. The two remaining strains, CTS8 and CTS57, grouped separately from the described *Bradyrhizobium* type strains (Fig. 2, Group 3). In this analysis the closest species to Group 3 was *B. canariense*, rather than *B. cytisi*, as suggested by the 16S rRNA phylogenetic analysis (Fig. 1), though clearly in a distinct branch.

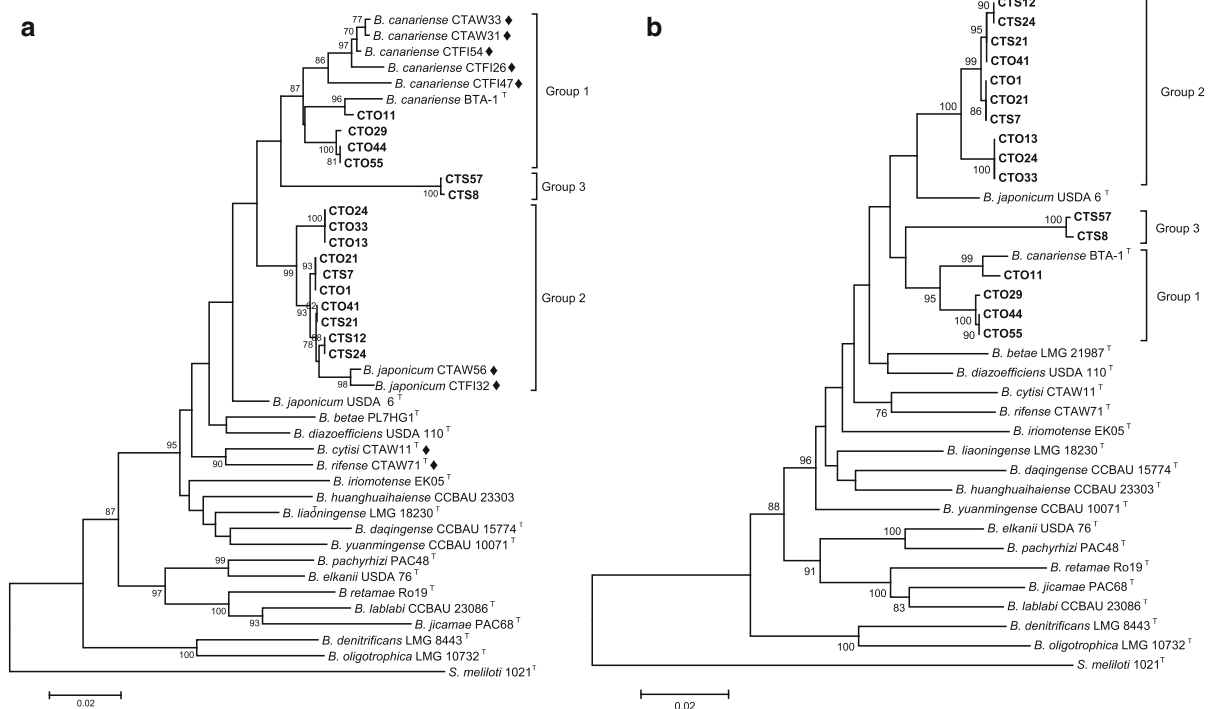


Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic trees based on concatenated partial sequences of different genes. Sequences of strains isolated in this study from nodules of *C. villosus* are in **boldface** and distributed in Groups 1–3. Bootstrap values obtained after 1,000 replicates are indicated at the branching points as

percentages, and values lower than 60 are not shown. *Scale bar* shows the number of substitutions per site. **a** Genes *glnII* (519 bp) and *recA* (458 bp). Moroccan strains isolated from nodules of *C. villosus* are marked with diamonds. **b** Genes *glnII* (478 bp), *recA* (376 bp) and *atpD* (403 bp)

Phylogeny based on symbiotic gene *nodC*

PCR amplification of *nodC* gene from all the 16 *C. villosus* strains, yielded a single band of approximately 0.6 kb which was sequenced. The corresponding neighbor-joining phylogenetic tree (Fig. 3) revealed that all the strains grouped with the symbiovar genistearum associated to *Bradyrhizobium* strains that nodulate genistoid legumes such as *Lupinus*, *Chamaecytisus*, *Retama*, *Teline* and *Cytisus* (Vinuesa et al. 2005; Sánchez-Cañizares et al. 2013; Guerrouj et al. 2013). Sequences of *nodC* gene from strains isolated from *C. villosus* in Morocco were intermingled with those isolated in Algeria (Fig. 3).

Cross inoculation tests

Host specificity of the *Bradyrhizobium* strains isolated from *C. villosus* in this work was studied through cross-inoculation experiments for three randomly selected strains, one from each group defined in

Fig. 2. The strains were CTO55 (representing *B. canariense* Group 1), CTO33 (representing *B. japonicum* Group 2), and CTS8 (representing the new Group 3). Besides *C. villosus*, all the tested strains nodulated *L. angustifolius*, *L. luteus*, and *S. junceum* (all from the tribe *Genisteeae*) but not *G. max* (tribe *Phaseoleae*).

Discussion

Rhizobia from nodules of native plants of *C. villosus* thriving in Algeria were isolated and characterized for the first time. Isolates (51) were grouped by RAPD-PCR technique in 16 unique patterns, and a randomly selected representative of each pattern was further characterized. Analysis based on 16S rRNA sequences showed that the 16 strains belong to the *Bradyrhizobium* genus, consistent with the fact that most nodule isolates from other *Cytisus* spp. (*C. balansae*, *C. multiflorus*, *C. scoparius*, *C. striatus*, *C. aeolicus*, *C. villosus*) have also been adscribed to the same genus

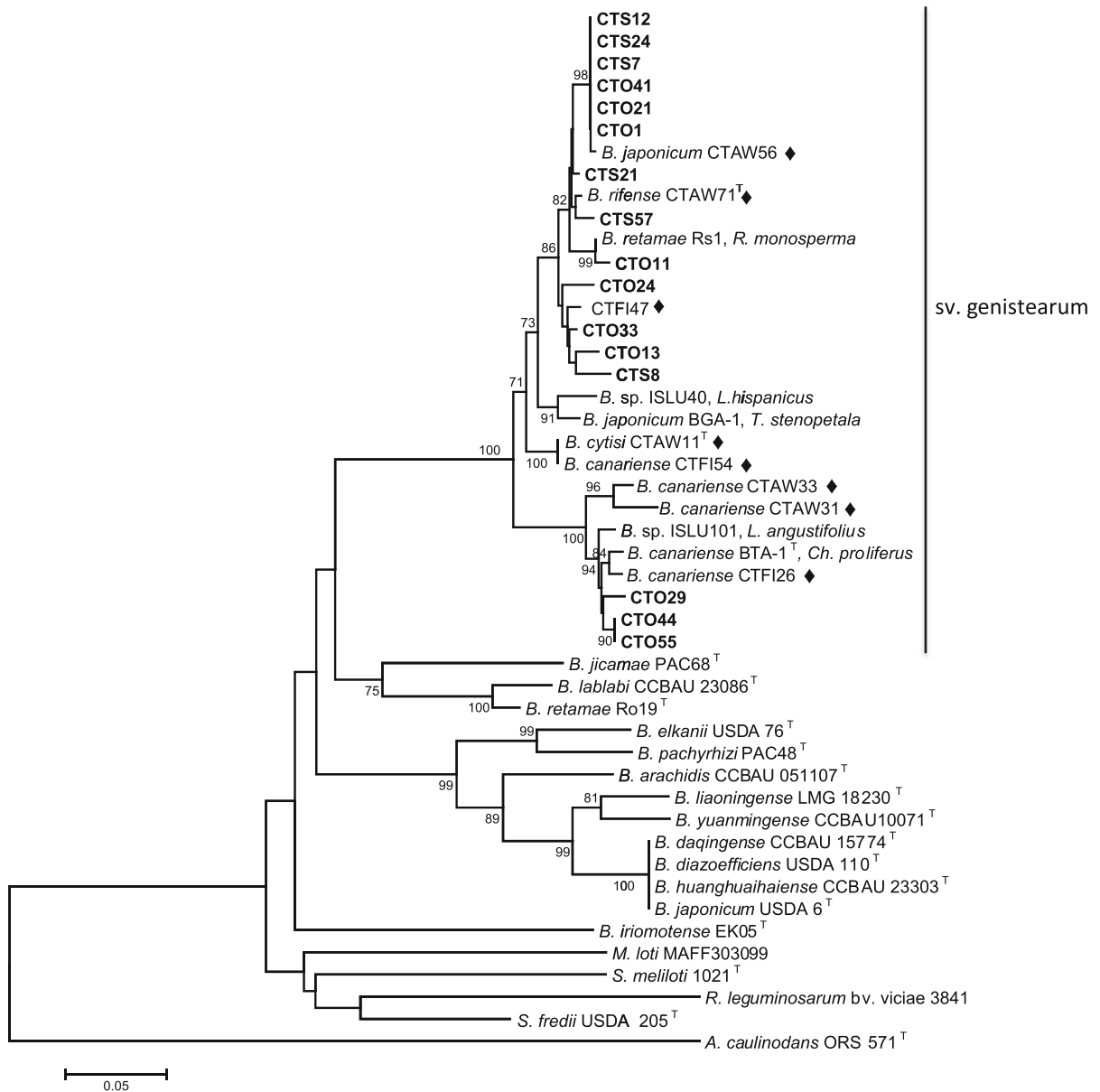


Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial *nodC* sequences (456 bp). Sequences of strains isolated in this study from nodules of *C. villosus* are in **boldface**. Other sequences of strains isolated from nodules of *C. villosus* are marked with *diamonds*. Genistoid legume hosts other than *C. villosus* follow strain names within the symbiovar genistearum.

Abbreviations: *Ch*: *Chamaecytisus*; *L*: *Lupinus*; *R*: *Retama*; *T*: *Teline*. Bootstrap values obtained after 1,000 replicates are indicated at the branching points as percentages, and values lower than 65 are not shown. *Scale bar* shows the number of substitutions per site

(Rodríguez-Echeverría et al. 2003; Kalita et al. 2004; Rodríguez-Echeverría and Pérez-Fernández, 2005; Cardinale et al. 2008; Ruiz-Díez et al. 2009; Chahboune et al. 2011a, Chahboune et al. 2011b, Chahboune et al. 2012). Some of these *Bradyrhizobium* strains fell

into the well-defined species *B. japonicum*, *B. canariense*, *B. cytisi*, and *B. rifense*. Other *Cytisus* sp. root nodule rhizobia are members of the genera *Rhizobium* and *Mesorhizobium* (Lafay and Burdon 2006; Ruiz-Díez et al. 2009).

Phylogenetic analyses based on sequences of the 16S rRNA gene and on concatenated *glnII*, *recA*, and *atpD* gene sequences showed that *Bradyrhizobium* strains isolated from Algerian *C. villosus* were split into different groups. The resolution of phylogenies based on 16S rRNA gene is low because of the high degree of sequence conservation (Willems et al. 2001). However, resolution of the phylogenies improved when sequences of concatenated genes *glnII*, *recA* and *atpD* were used. These genes are often employed to differentiate closely related *Bradyrhizobium* species (Vinuesa et al. 2005; Stepkowski et al. 2007; Appunu et al. 2008, Menna et al. 2009; Chang et al. 2011; Chahboune et al. 2012; Wang et al. 2012; Guerrouj et al. 2013). Two of the three *C. villosus* strain groups (Fig. 2) clustered with the well-defined species *B. japonicum* (Group 2, 10 strains) and *B. canariense* (Group 1, 4 strains). The third group probably represents a new genospecies within the genus *Bradyrhizobium*, with *B. canariense* as its closest species. Supporting this, Fig. 2a shows that the number of substitutions between *B. canariense* and *B. japonicum* type strains is lower (51) than number of substitutions of these two species regarding strains in group 3 as CTS8 (63 and 59, respectively). Similar differences can be inferred from Fig. 2b. Phylogenetic trees made with the individual genes supported these three groups (data not shown).

The sampling sites of bacteria nodulating *C. villosus* in the Central-Western region of Moroccan Rif (Chahboune et al. 2011a) are located ca. 1,000 km West of the sampling sites in Northeastern Algeria, and clear differences and similarities between both *C. villosus* symbiotic bacteria communities were observed. Moroccan and Algerian strains were distributed in three main groups (Fig. 2). Two groups of each country were considered part of *B. canariense* and of *B. japonicum* lineages. However the third remaining group of each sampling site is clearly different. The Moroccan group comprises strains that fall into two new close *Bradyrhizobium* species, *B. cytisi* (Chahboune et al. 2011b) and *B. rifense* (Chahboune et al. 2012) while the Algerian group, defined by strains CTS8 and CTS57, constitutes a new operational taxonomic unit not related to *B. cytisi* or *B. rifense* (Fig. 2).

Analysis of symbiotic gene *nodC* showed that all *C. villosus* isolates group with *B. japonicum*, *B. canariense*, *B. retamae* and *B. sp.* strains of symbiovar

genistearum isolated from nodules of genistoid legumes (Vinuesa et al. 2005; Sánchez-Cañizares et al. 2013; Guerrouj et al. 2013). A different grouping of *C. villosus* strains was found comparing phylogenetic trees based on *nodC* (Fig. 3) versus housekeeping genes (Figs. 1, 2). This result could be explained by events of lateral transfer of symbiotic genes with a common phylogenetic origin within several sympatric *Bradyrhizobium* species (Jarabo-Lorenzo et al. 2003, Moulin et al. 2004; Rogel et al. 2011). In line with this, the cross-inoculation tests performed with strains representing the three different groups of *Bradyrhizobium* strains nodulating *C. villosus* in Northern Algeria showed positive cross-nodulation with other species of the *Genisteeae* tribe, such as *Lupinus luteus*, *L. angustifolius* and *S. junceum*, but not with soybean (*Phaseoleae* tribe). These observations are in agreement with those previously reported by Vinuesa et al. (2005) that showed a lack of nodulation capacity of soybeans by bradyrhizobial strains belonging to biovar genistearum and an efficient nodulation of soybeans by strains belonging to biovar glycinearum, which present divergent *nodC* genes.

Further studies that include *C. villosus* isolates from diverse geographical and ecological origins will be required to define the complex diversity and taxonomic status of endosymbiotic bacteria nodulating this legume shrub not only in Northern Africa but in other regions of the Mediterranean Basin.

Acknowledgments H. Ahnia and Y. Bourebaba acknowledge AECID support for a fellowship at CBGP, Madrid. This work was supported by AECID (A1/038234/11 to TRA) and MICINN (CGL-26932 to JI). We thank A. Bautista for technical assistance.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Appunu C, N'Zoué A, Laguerre G (2008) Genetic diversity of native bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India. *Appl Environ Microbiol* 74:5991–5996
- Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benallaoua S, Laguerre G (2009) Retama species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst Appl Microbiol* 32:245–255

- Cardinale M, Lanza A, Bonni ML, Marsala S, Puglia AM, Quatrini P (2008) Diversity of rhizobia nodulating wild shrubs of Sicily and some neighbouring islands. *Arch Microbiol* 190:461–470
- Cardinale M et al (2010) Rehabilitation of mediterranean anthropogenic soils using symbiotic wild legume shrubs: plant establishment and impact on the soil bacterial community structure. *App Soil Ecol* 46:1–8
- Chahboune R, Barrijal S, Moreno S, Bedmar EJ (2011a) Characterization of *Bradyrhizobium* species isolated from root nodules of *Cytisus villosus* grown in Morocco. *Syst Appl Microbiol* 34:440–445
- Chahboune R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velázquez E, Bedmar EJ (2011b) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2922–2927
- Chahboune R et al (2012) *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst Appl Microbiol* 35:302–305
- Chang YL, Wang JY, Wang ET, Liu HC, Sui XH, Chen WX (2011) *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2496–2502
- Chenna R et al (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497–3500
- Coutinho HL, de Oliveira VM, Lobato A, Maia A (1999) Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Appl Soil Ecol* 13:159–167
- Cristofolini G (1991) The biodiversity of the Leguminosae-Genistae and its genesis. *Lagascalia* 19:121–128
- Durán D, Rey L, Sánchez-Cañizares C, Navarro A, Imperial J, Ruiz-Argüeso T (2013) Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Syst Appl Microbiol* 36:128–136
- Guerrouj K et al (2013) Definition of a novel symbiovar (sv. retamae) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst Appl Microbiol* 36:218–223
- Jarabo-Lorenzo A et al (2003) Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. *Syst Appl Microbiol* 26:611–623
- Kalita M, Malek W, Kaznowski A (2004) Analysis of genetic relationship of *Sarothamnus scoparius* microsymbionts and *Bradyrhizobium* sp. by hybridization in microdilution wells. *J Biosci Bioeng* 97:158–161
- Kalita M, Stepkowski T, Lotocka B, Malek W (2006) Phylogeny of nodulation genes and symbiotic properties of *Genista tinctoria* bradyrhizobia. *Arch Microbiol* 186:87–97
- Lafay B, Burdon JJ (2006) Molecular diversity of rhizobia nodulating the invasive legume *Cytisus scoparius* in Australia. *J Appl Microbiol* 100:1228–1238
- López González GA (2001) Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas. Mundi Prensa, Madrid
- Mahdhi M, Nzoué A, de Lajudie P, Mars M (2008) Characterization of root nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils. *Nat Sci* 18:43–49
- McInnes A, Thies JE, Abbott LK, Howieson JG (2004) The structure and diversity of rhizobial populations and communities: a review. *Soil Biol Biochem* 36:191–194
- Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN, Martinez-Romero E (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 29:315–332
- Menna P, Barcellos FG, Hungria M (2009) Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2934–2950
- Moreira F et al (2011) Landscape-wildfire interactions in Southern Europe: implications for landscape management. *J Environ Manag* 92:2389–2402
- Moulin L, Bena G, Boivin-Masson C, Stepkowski T (2004) Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol Phylogenet Evol* 30:720–732
- Prieto I, Armas C, Pugnaire FI (2012) Water release through plant roots: new insights into its consequences at the plant and ecosystem level. *New Phytol* 193:830–841
- Pruesse E, Peplies J, Glockner FO (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28:1823–1829
- Quatrini P, Scaglione G, Cardinale M, Caradonna F, Puglia AM (2002) *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *J Appl Microbiol* 92:13–21
- Quezel P, Santa S (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Paris
- Requena N, Pérez-Solis E, Azcón-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM (2001) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 67:495–498
- Rivas R, Peix A, Mateos PF, Trujillo ME, Martínez-Molina E, Velázquez E (2006) Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil* 287:23–33
- Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A (2009) Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 32:101–110
- Rodríguez-Echeverría S, Pérez-Fernández MA (2003) Soil fertility and herb facilitation mediated by *Retama sphaerocarpa*. *J Veg Sci* 14:807–814
- Rodríguez-Echeverría S, Pérez-Fernández MA (2005) Potential use of Iberian shrubby legumes and rhizobia inoculation in revegetation projects under acidic soil conditions. *App Soil Ecol* 29:203–208
- Rodríguez-Echeverría S, Pérez-Fernández MA, Vlaar S, Finan TM (2003) Analysis of the legume-rhizobia symbiosis in shrubs from central western Spain. *J Appl Microbiol* 95:1367–1374
- Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez Romero E (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol* 34:96–104
- Ruiz-Díez B, Fajardo S, Puertas-Mejía MA, de Felipe MR, Fernández-Pascual M (2009) Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch Microbiol* 191:35–46

- Sánchez-Cañizares C et al (2013) Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst Appl Microbiol* 34:207–215
- Somasegaran P, Hoben HJ (1994) Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. Springer, New York
- Stepkowski T et al (2007) Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl Environ Microbiol* 73:3254–3264
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Valladares F et al (2008) Is shade beneficial for mediterranean shrubs experiencing periods of extreme drought and late-winter frosts? *Ann Bot* 102:923–933
- van der Heijden MG et al (2006) Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiol Ecol* 56:178–187
- Velázquez E et al (2010) Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97:363–376
- Vincent JM (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Vinuesa P et al (2005) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:569–575
- Wang JY et al (2012) *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:616–624
- Willems A, Coopman R, Gillis M (2001) Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:111–117
- Zakhia F et al (2004) Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* 27:380–395

Résumé

Six isolats des nodules de *Cytisus villosus* de la région côtière de Bejaia appartenant au genre *Bradyrhizobium* ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique à savoir : les caractères culturels, cellulaires, nutritionnels, physiologiques, biochimiques. résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds ainsi que l'étude de la spécificité de la nodulation. Les souches testées présentent une bonne croissance entre 26 et 30°C, elles montrent une bonne croissance pH 4 et pH 7, elles ne supportent pas la salinité. Ces souches ont quelques préférences pour certains sucres et acides aminés comme seule source de carbone et d'azote. Elles sont sensibles aux antibiotiques et aux métaux lourds testés. Le test croisé montre l'aptitude de ces souches à noduler plusieurs plantes légumineuses de la tribu des *Genisteeae*. Ces souches peuvent faire l'objet de nouvelles espèces. Une classification ascendante hiérarchique des 75 caractères étudiés a permis de regrouper les souches testées en deux clusters.

Mots clés : *Cytisus villosus*, *Bradyrhizobium*, caractérisation phénotypique, *Genisteeae*.

Abstract

Six isolates nodules *Cytisus villosus* North East of Algeria in the genus *Bradyrhizobium* were the subject of a phenotypic characterization ie, cultural characters, cellular, nutritional, physiological, biochemical. resistance to antibiotics and heavy metals, as well as the study of specificity of nodulation. Strains tested show a good growth between 26 and 30 ° C again pH 4 and pH 8, they can not tolerate salinity. These strains have some preference to some sugar and amino acid as the one carbon and nitrogen source. they are sensitive to antibiotics and heavy metals tested. The cross test shows the ability of these strains nodulated several leguminous plants *Genisteeae* tribe. These strains may be of a new species. A hierarchical clustering of 75 characters studied was used to group the strains tested in two clusters.

Keywords: *Cytisus villosus*, *Bradyrhizobium*, phenotypic characterization, *Genisteeae*.

ملخص

ستة العزلات العقيدات للزنان *villosus* شمال شرق الجزائر في جنس كانت المجتذرة موضوع التوصيف المظهري الخلوية والتغذوية والفسولوجية والبيوكيميائية. المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة، فضلا عن دراسة دليل خصوصية. تظهر سلالات اختبار نمو جيد بين درجة الحموضة 4 و 8 درجة الحموضة، فإنها تظهر نموا جيدا في الفترة بين 26 و 30 درجة مئوية، وأنهم لا يستطيعون تحمل الملوحة. هذه السلالات تفضل كمصدر وحيد للكربون والحامض الاميني كمصدر النيتروجين الوحيد. فهي حساسة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة واختبارها. ويظهر الاختبار عبر قدرة هذه السلالات nodulated عدة النباتات البقولية القبيلة *Genisteeae*. قد تكون هذه السلالات من نوع جديد. تم استخدام المجموعات الهرمية من 75 حرفا درس لمجموعة سلالات اختبارها في مجموعتين.

كلمات البحث : اللزنان *villosus*، المجتذرة، وتوصيف المظهري، *Genisteeae*.