

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologie

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Présenté par :

LAOUADI Anfel

BECHNEB Sara

Thème

Revue bibliographie des méthodes moléculaires actuelles utilisées pour l'étude des souches de BNL associées aux différents genres de la famille des Fabaceae

Soutenu publiquement

Le : 19/06/2022.

Devant le jury :

Président	ABBAS A.	M.C.A	UKM Ouargla
Examineur	BELDI N.	M.C.A	UKM Ouargla
Promoteur	CHAICH K.	M.C.A	UKM Ouargla

Année universitaire : 2021/2022



Remerciements

*On remercie Dieu Le Tout Puissant de nous
avoir donné la santé et la volonté d'entamer et
de terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait
pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr
K.CHAICH, on le remercie vivement pour la qualité de son
encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et
sa disponibilité permanente durant la préparation de ce
mémoire.*

*Nos vifs remerciements vont, également, à Mme A.ABBAS et
Mme N.BELDI pour avoir accepté de juger ce modeste travail.*

Qu'ils trouvent ici l'expression de notre parfaite gratitude.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents ; Khemissi & Rachida, qui n'ont pas cessé de m'encourager et m'ont fourni tous les moyens nécessaires pour réaliser ce travail. Vous êtes la source de ma réussite, d'inspiration, une source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Vos prières et Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, et d'encouragement.

Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts.

Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé, bonheur, et longue vie.

A mon mari Abderrezak

Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu me voulais toujours le meilleur. Ton amour ne m'a procuré que confiance et stabilité. Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés, Je te remercie de ne m'avoir jamais déçu. Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon amour et mon respect.

A mes adorables fils, la joie de ma vie, mes porte-bonheur, Anes et Asser mes accompagnons dans ce long chemin. Merci pour tous vos sacrifices.

A ma sœur Hiba et son mari Benaceur et leur fils Kinan

Tu as été à mes côtés ma sœur pendant toutes les étapes de ce travail, je t'en suis très reconnaissante. Aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments fraternels et d'amour, d'attachement que j'éprouve à ton égard.

A ma petite sœur Kaouther, une sœur comme on ne peut trouver nul part ailleurs.

A mes très chers frères Hakim et Ayoub.

A mes chères cousines Romeissa et Meriem pour leurs encouragements permanents, leur aide, et leur soutien moral.

A ma tante Hassina, et son mari Cherif et leurs enfants.

A une famille au sein de laquelle je me suis toujours sentie chez moi et qui m'a toujours considérée comme une des leurs.

A ma tante Hadda et son mari Abdelatif.

A mon oncle Nacer eddine wahbi.

Mes très chères amies Amina et Lynda.

A mes grandes familles : LAOUADI & TRAIIDI

A ma deuxième famille ZERARI.

A ma chère collègue Sara avec laquelle j'ai réalisé ce modeste travail.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Une pensée vive à la mémoire de ma chère tante Nacira qui nous a quittés, qu'Allah, le Tout Puissant, l'accueille dans ses vastes paradis.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents, en témoignage de l'amour, de l'affection et le soutien que vous m'avez offert depuis ma naissance. Pour toutes les peines et tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, vous m'avez appris à me battre jusqu'au bout pour réussir, je n'ai été guidée jusqu'à présent que par le désir de vous honorer.

A mes frères Yacine, Ismaïl et à ma sœur Amel

A la plus grande chance de ma vie, mon mari Houari DJEBBOUR à celui qui est toujours présent et continue de l'être pour faire mon bonheur, qui ma tenu la main depuis les premiers moments de ce travail et qui n'a jamais hésité une seule seconde à m'aider et à me soutenir. Merci pour ta patience et tes encouragements, tu as toujours su trouver les mots qui conviennent pour me remonter le morale dans les moments pénibles, grâce à toi j'ai pu surmonter toutes les difficultés, que tu trouves ici mon grand respect et amour.

A toute ma famille BECHENEB

A ma deuxième famille "DJEBBOUR".

A ma chère collègue Anfel avec laquelle j'ai réalisé ce modeste travail.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table Des Matières

Remerciements.....	
Dédicaces.....	
Dédicaces.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. La classification des êtres vivants, l'évolution et la diversité microbiennes	
1. Rappels utiles.....	3
2. La systématique.....	4
2.1. La classification.....	4
2.2. La nomenclature.....	4
2.3. L'identification.....	4
3. La notion d'espèce.....	5
4. La classification de Bergey.....	6
5. Les grands groupes de bactéries.....	8
6. La phylogénie.....	9
CHAPITRE II. La diversité des associations symbiotiques BNL -Légumineuse	
1. La fixation biologique de l'azote.....	10
2. Diversité des micro-organismes fixateurs d'azote.....	12
2.1. Les fixateurs libres.....	13
2.2. Les fixateurs symbiotiques.....	14
3. L'association Rhizobium Légumineuse.....	14
3.1. Diversité de la famille des fabacées (partenaire végétal).....	14
3.2. Diversité des "Rhizobia" (partenaire microbien).....	17
3.3. Particularités du génome des rhizobia.....	20
4. Etablissement de l'association symbiotique Rhizobum-Légumineuse.....	21
5. Dialogue moléculaire entre les partenaires de la symbiose.....	21
6. Les flavonoïdes :.....	22

7. Les facteurs Nods.....	23
8. Formation du nodule fixateur d'azote	26
9. Organogenèse du nodule	26

CHAPITRE III. Méthodes et techniques appliquées à l'étude de la diversité des BNL.

1. Méthodes phénotypiques.....	29
2. Méthodes génotypiques.....	29
2.1. Séquençage de l'ADNr16S.....	30
2.2. PCR-RFLP du gène de l'ARNS.....	31
2.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	32
2.4. RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ou AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR).....	32
2.5. REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) ou (Repetitive Element PCR).....	32
2.6 L'analyse de séquence multi locus ou MLSA.....	33
3. Les outils de la taxonomie polyphasique bactérienne	35
4. Les gènes de ménage	35
5. Phylogénie et construction d'arbres.....	36
5.1 Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques.....	36
5.1.1 Méthodes de distance	36
5.1.2. Méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood-ML)	36
5.1.3 Méthodes de maximum de parcimonie	37
5.2. Fiabilité de l'arbre phylogénétique.....	37
5.2.1 Evaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques.....	37
5.2.2 Enracinement de l'arbre.....	37

CHAPITRE IV. Techniques et méthodes récemment réalisées pour l'étude de la diversité moléculaire des BNL.

1. Etude de la diversité moléculaire des souches de BNL associées au genre <i>Retama</i> tribu des Genistae en Algérie (Boulila et al, 2009).....	38
1.1. Méthodologie adoptée	38
1.2. Résultats obtenus.....	38
1.3. Conclusion.....	39

2. Analyse de séquences multilocus de BNL isolées des nodosites des racines de différents genres de <i>fabaceae</i> (<i>Lotus</i> , <i>Argyrolobium</i> et <i>Medicago</i> au senegal et en tunisie).....	39
2.1. Méthodologie adoptée	39
2.2. Résultats obtenus.....	39
2.3. Conclusion.....	41
3. Etude de la diversité moléculaire des souches de BNL associées à la légumineuse spontanée <i>R.raetam</i> du Sahara septentrional est Algerien (Chaich, 2018)	41
3.1. Méthodologie adoptée	41
3.2. Résultats obtenus.....	42
3.3. Conclusion.....	45
4. Etude de la diversité moléculaire des souches BNL associés à <i>Vicia sativa</i> dans la province du Shanxi au nord de la Chine (2021).....	45
4.1 Méthodologie adoptée	45
4.2 Résultats obtenus.....	46
4.3 Conclusion.....	48
CONCLUSION GENERALE	49
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50

Liste des figures

Figure 1. L'arbre phylogénique universel du vivant.	4
Figure 2. Les principaux groupes de procaryotes et leurs apparentements.....	7
Figure 3. Structure hiérarchique en taxinomie.	9
Figure 4. Structure de la nitrogénase et organisation des gènes impliqués dans sa biosynthèse...11	
Figure 5. Arbre des grands groupes phylogénétiques des eubactéries basé sur les séquences d'ADNr 16S	13
Figure 6. Phylogénie des Leguminosae d'après l'analyse des séquences du gène chloroplastique <i>rbcl</i>	16
Figure 7. Représentation schématique des fonctions des flavonoïdes biologiquement actifs médiant diverses communications biologiques dans la rhizosphère.....	22
Figure 8. Structure du facteur Nod majoritaire de <i>S. meliloti</i> et enzymes nécessaires à sa synthèse.....	24
Figure 9. Schéma montrant la diversité des facteurs Nods (FNs).	24
Figure 10. Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/légumineuse	25
Figure 11. Signalétique des facteurs Nod et a structure des facteurs Nod de <i>Sinorhizobium meliloti</i> , symbionte de <i>Medicago truncatula</i> ,(haut), est comparée à la structure des facteurs Myc, lipochitooligosaccharide non-sulphaté, produite par un champignon arbusculaire <i>Glomus intraradices</i> (bas).	26
Figure 12. Schéma global du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule fonctionnel Chez <i>Medicago</i>	28
Figure 13. Niveau de résolution taxonomique des différentes techniques.	34
Figure 14. Reconstruction phylogénétique basée sur l'analyse individuelle du gène de l'ARNr 16S..	40
Figure 15. Arbre phylogénétique Neighbour-joining phylogenetic basé sur les gènes ARNr 16S.....	43
Figure 16. Arbre phylogenetique Maximum-likelihood basé sur les séquences partielles des gènes de ménage <i>atpD</i> et <i>recA</i> concaténés... ..	44
Figure 17. Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale des séquences du gène de l'ARNr 16S montrant les relations des rhizobiums isolés de <i>Vicia sativa</i> dans le nord de la Chine.....	47
Figure 18. Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale basé sur des séquences de gènes <i>atpD-recA</i> concaténées montrant les relations entre les rhizobiums isolés de <i>Vicia sativa</i> dans le nord de la Chine.	48

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des genres et des espèces de rhizobia actuellement connues.....	18
--	----

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique.

ADNr: acide désoxyribonucléique ribosomique.

ADNr 16S: Acide Désoxyribo-Nucléique Ribosomal 16S.

ARN : Acide Ribo-Nucléique.

ARN 16S : Acide Ribo-Nucléique Ribosomal 16S.

AtpD : ATP synthase.

BNL : Bactéries nodulant les légumineuses.

GC : guanine, cytosine

EPS : ExoPolySaccharide.

FNs: Facteurs Nod.

GlnII: glutamine synthétase.

GlcNAC : N-acetylglucosamine.

MLSA: multilocus sequence analysis.

N: azote.

N₂ : diazote atmosphérique.

NH₃: ammoniacque.

NodC : N-acétylglucosaminyltransférase.

PCR : Polymérase Chain réaction.

RecA: recombinaise.

INTRODUCTION

Introduction

Les légumineuses sont très importantes, à la fois sur le plan écologique agronomique, et par conséquent, économique (balances alimentaires de nombreuses populations humaines). Elles sont responsables d'une partie substantielle de l'écoulement de l'azote atmosphérique (N_2) vers des formes telles que l'ammoniac, le nitrate et l'azote organique. (Sobti, Djaghoubi et Belhadj 2015). (<http://www.ildis.org/Leguminosae/>)

Chez les végétaux supérieurs, l'acquisition des minéraux à partir du sol est d'une importance majeure et la carence en ces éléments constitue un grand facteur limitant.

Indéniablement, l'azote est un élément primordial dans la composition des glucides, protéines lipides. En effet, c'est l'élément chimique fondamental pour toute forme de vie. On le retrouve dans de nombreuses biomolécules ; telles que : les acides aminés, les acides nucléiques, et dans de nombreux autres composés organiques indispensables à la vie, ce qui implique son intervention dans la structure et le métabolisme cellulaire (Peret, 2007). Cet élément est l'un des plus abondants sur terre, il constitue près de 78% de l'atmosphère (Richlefs et Miller, 2005), il est présent sous forme de diazote gazeux (N_2), une forme chimiquement inerte stable et inutilisable par la majorité des organismes vivants. (Hopkins, 2003; Perry et *al.*, 2004).

L'utilisation de la symbiose rhizobienne à des fins agronomiques et écologiques semble une opportunité prometteuse (Graham et Vance, 2003 ; Peoples et *al.*, 2009). Un des enjeux scientifiques, à court terme, consiste à identifier des couples symbiotiques efficaces, adaptés à des conditions agronomiques ou écologiques précises. (Bonaldi, 2010).

Eu égard à cette importance sur tout plan, l'étude approfondie des principaux partenaires de la symbiose (bactérie, végétal et environnement) a connu un grand essor ces dernières décennies. De très nombreuses études ont été consacrées aux bactéries nodulant les légumineuses (BNL) associées à divers genres et espèces de Fabacées tant spontanées que cultivées.

L'étude de la biodiversité des BNL implique des techniques permettant de déterminer les caractéristiques à la fois génotypiques et phénotypiques en vue de sélectionner les souches les plus performantes pour des applications adéquates. Certaines études, menées dans le Sahara septentrional-est d'Algérie, ont permis

d'identifier la diversité des souches de BNL associés aux légumineuses spontanées telles que *Genista saharae* (Chaich et al, 2016) (Chaich 2018).

Sur le plan génétique, le développement de la taxonomie polyphasique (phénotypique, génotypique et phylogénétique) et l'utilisation de l'ARN 16S (hautement conservé) comme marqueur taxonomique ont conduit à de nombreux changements dans la taxonomie des rhizobiums (Vandamme et al.,1996; Zakhia et de Lajudie, 2006), (de Lajudie et al., 2019).

Au niveau interspécifique, le gène ARN 16S ne suffit pas à la discrimination d'espèces. La technique dite MLSA (Multi Locus Sequence Analysis), utilisent plusieurs gènes de ménage telles (atpD, recA, glnII etc...). A cet effet, le passage en revue des techniques les plus performantes et déterminantes, utilisées à travers le monde actuellement, parait d'une importance capitale pour cerner le domaine.

Le présent mémoire s'articule autour de 4 chapitres qui se résument en :

Chapitre 1, consacré à la classification des êtres vivants, notamment, l'évolution et la diversité microbienne ;

Chapitre 2 : Aperçu sur la diversité des associations symbiotiques BNL-Légumineuses ;

Chapitre 3, il résume, quant à lui, la taxonomie bactérienne en donnant un accent particulier aux méthodes et techniques utilisées pour l'identification des BNL dites 'Rhizobias' ;

Le 4^{ème} chapitre présente la méthode d'approche et différentes techniques utilisées, actuellement, pour l'étude et l'identification des BNL associés aux légumineuses.

CHAPITRE I
LA CLASSIFICATION DES ETRES VIVANTS,
L'EVOLUTION ET LA DIVERSITE
MICROBIENNES

CHAPITRE I. La classification des êtres vivants, l'évolution et la diversité microbiennes

1. Rappels utiles

Une fois que les microbes sont devenus visibles pour les humains à l'aide de microscopes, les scientifiques ont commencé à réaliser leur énorme diversité. Les micro-organismes varient de toutes sortes de façons, y compris leur taille, leur apparence et leur taux de reproduction. Pour étudier ce nouvel éventail incroyablement diversifié d'organismes, les chercheurs avaient besoin d'un moyen de les organiser systématiquement.

- En 1735 ; Carolus Linnaeus ; le premier taxonomiste, botaniste, zoologiste et médecin suédois a développé un système taxonomique pour classer les organismes en groupes apparentés.
- Un arbre phylogénétique est un moyen de montrer comment différents organismes sont supposés être liés les uns aux autres d'un point de vue évolutif. Le premier arbre phylogénétique contenait des règnes pour les plantes et les animaux.
- En 1866; Ernst Haeckel ; un biologiste, philosophe et médecin allemand, a proposé d'ajouter un royaume pour les protistes.
- En 1969 ; L'arbre de l'écologiste américain Robert Whittaker contenait cinq royaumes : Animalia, Plantae, Protista, Fungi et Monera.
- Dans les années 1970 ; le microbiologiste américain Carl Woese a utilisé une petite sous-unité d'ARN ribosomal pour créer un arbre phylogénétique qui regroupe les organismes en trois domaines en fonction de leur similitude génétique.
- On peut diviser les organismes vivants en trois domaines: les Eucarya, les Bacteria et les Archea (figure 1). La cellule eucaryote pourrait avoir dérivé de cellules procaryotes suite à des événements endosymbiotiques.

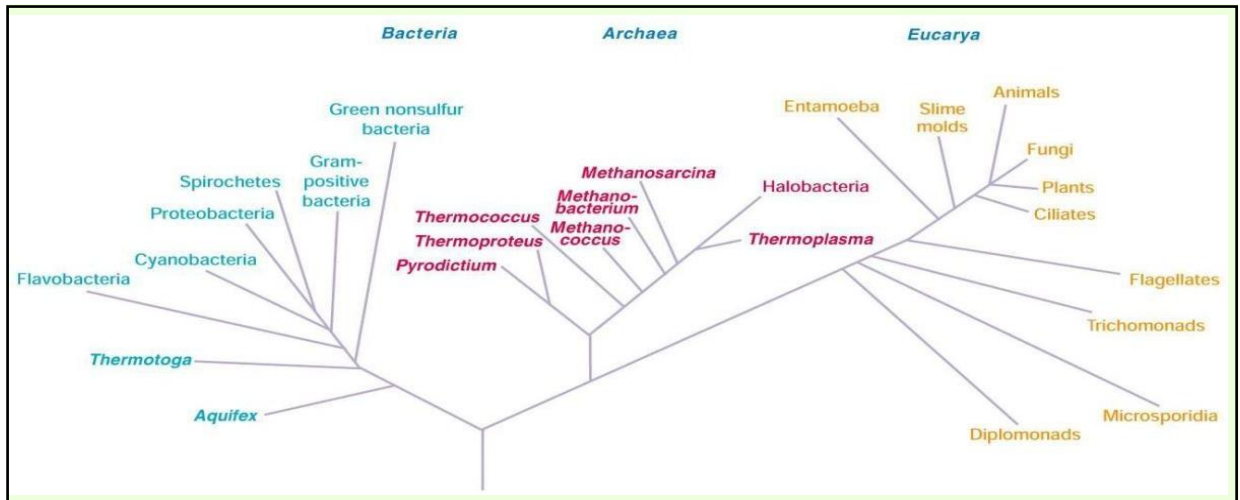


Figure 1. L'arbre phylogénique universel du vivant. (Jean-Claude CALLEN, Biologie Cellulaire, Dunod, 1999).

Cette représentation simplifiée a été établie à partir de l'étude comparative des ARNr 16S et 18S.

2. La systématique

La systématique est la science des classifications des organismes vivants. Elle regroupe trois disciplines :

2.1. La classification : taxonomie ou taxinomie (du grec taxi : arrangement et nomos : loi). Etablis des groupes taxonomiques qui sont des ensembles d'organismes vivants apparentés sur des critères (selon leur similitude et leur parenté évolutive) et distincts des autres groupes.

2.2. La nomenclature : affecte à chaque groupe (taxon), une dénomination conventionnelle. Les noms scientifiques sont des mots latins. La nomenclature désigne l'espèce par deux noms latins. Ces nom sont écrits selon le système binomial du botaniste suédois Carl Von Linné. La première partie du nom est le nom du Genre, la seconde partie (épithète) est celui de l'espèce. Le genre : écrit en Italique. Avec sa première lettre en majuscule. Après sa citation le nom du genre est abrégé à sa première lettre. Ex : *Escherichia coli*, *Mycoplasma pneumoniae*. L'espèce : écrite en Italique (ou souligné). Avec sa première lettre en minuscule. La famille : Le nom est fondé sur un genre valide, il est féminin, pluriel et se termine par – aceae.

2.3. L'identification : permet d'intégrer des souches bactériennes inconnues à l'un des taxons préalablement définis. L'identification des bactéries implique l'utilisation d'un protocole

méthodologique de plusieurs étapes, afin d'assimiler une souche inconnue à une espèce déjà définie et classée. Pour cela, il sera retenu : des observations microscopiques, avec ou sans colorations spécifiques qui permettent de déterminer des caractères morphologiques ou structuraux (forme cellulaire, type de regroupement, présence ou absence de spores, GRAM, capsule, mobilité...), des tests déterminants (type respiratoires, recherche de la catalase, recherche de l'oxydase...), profils métabolique (mise en évidence des produits ou les métabolites intermédiaires de leur métabolisme par l'utilisation de galeries multi-tests. La confusion entre taxinomie et systématique : la systématique étudie la diversité biologique et permet de classer, d'organiser les taxons dans un ordre logique.

3. La notion d'espèce

-La définition de l'espèce est différente pour les organismes à reproduction sexuée et asexuée. Une espèce bactérienne est un ensemble de souches qui ont en commun un certain nombre de propriétés stables et différents de façon significative des autres groupes de souches.

-Les classifications sont souvent construites au moyen de la taxinomie numérique dans laquelle la similitude générale des organismes est déterminée en utilisant un ordinateur pour calculer et analyser des coefficients d'association.

-L'étude de la transformation et de la conjugaison des bactéries est parfois utile en taxinomie. Cependant, il faut prendre garde aux erreurs qui peuvent résulter de caractères portés par des plasmides.

-Les protéines reflètent directement les séquences d'ARN et sont utilisées pour comparer les génomes de différents organismes.

-Le contenu en GC d'un ADN est facilement déterminé, il a une valeur taxinomique car il est indirectement la séquence en bases.

-L'hybridation entre acides nucléiques est utilisée pour comparer des séquences d'ADN ou d'ARN et pour déterminer ainsi des parentés stiques.

-Le séquençage des acides nucléiques est la méthode la plus puissante et la plus directe de comparer des génomes. Les études phylogénétiques sont le plus souvent faites sur les séquences

d'ARNr 16S et 5S. Le séquençage et la comparaison de chromosomes procaryotes entiers sont actuellement en cours.

-Les relations phylogéniques sont souvent montrées sous la forme de diagrammes ramifiés ; appelés arbres phylogéniques. Ces arbres peuvent être racinés ou non racinés et sont créés de plusieurs façons différentes.

-Pour produire des arbres phylogéniques, on utilise les séquences d'ARNr, d'ADN ou de protéines. Souvent, les membres d'un groupe posséderont une séquence d'ARNr caractéristique particulière qui les distinguera des membres des autres groupes taxinomiques.

-Les séquences d'ARNr 16S et d'autres propriétés moléculaires suggèrent une division des procaryotes en deux groupes très différents : les bactéries et les archéobactéries qui se différencient par la composition de la paroi cellulaire, par les lipides membranaires, la structure de l'ARNI les ribosomes et beaucoup d'autres propriétés.

4. La classification de Bergey

En résumé, la classification de Bergey a connu une certaine évolution comme suit :

- Le plus remarquable travail de classification des bactéries, édité dès 1923 au USA sous le nom : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ; qui donne le système accepté pour la taxinomie des procaryotes. Son objectif initial était le regroupement des informations phénotypiques disponibles pour l'identification des espèces bactériennes reconnues, afin de permettre l'identification de souches inconnues. C'est une classification de référence actuelle des bactéries, basée sur les données phylogénétiques.

- La première édition du Bergey fournit une classification essentiellement phénétique et de nombreux taxons n'y sont pas phylogéniquement homogènes. Pour classer les procaryotes on utilise des caractères faciles à déterminer comme la forme de la cellule, la réponse à la coloration de Gram, le rapport à l'oxygène, la mobilité et le mode de production d'énergie.

- La seconde édition du Bergey est phylogénique et répartit les procaryotes en deux domaines et 25 phylums (figure 2).

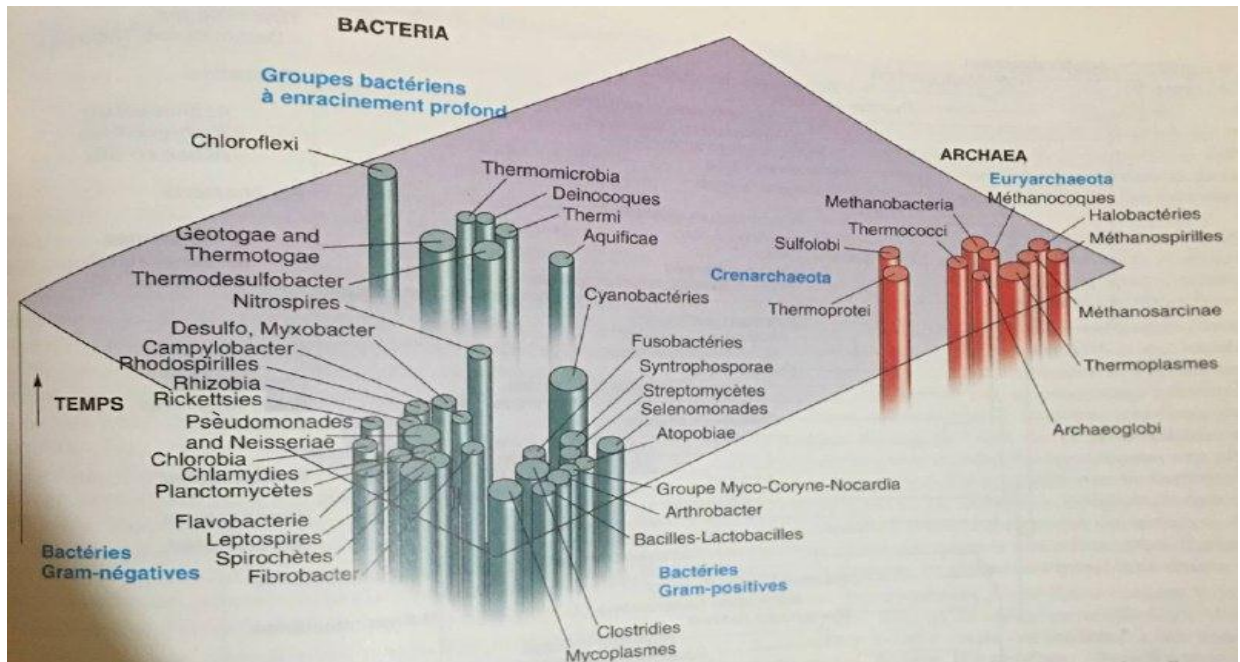


Figure 2. Les principaux groupes de procaryotes et leurs apparentements. La taille des disques est approximativement proportionnelle au nombre Bacte de procaryotes séquencés dans le groupe. Les groupes procaryotes étroitement apparentés sont regroupés. Les deux domaines procaryotes (Bacteria et Archaea) sont clairement séparés. Les cylindres s'estompent à la base pour montrer que l'ancienneté de ces groupes est incertaine. Livre MICROBIOLOGIE. PRESCOTT. HARLEY. KLEIN. 2 éditions françaises. Traduction de la 5^{ème} édition américaine par Claire Michelle Bacq-Calberg et Jean Dusart. de boeck. P 443.

- Les comparaisons de séquences d'acides nucléiques, particulièrement les séquences d'ARNr 16S, constituent la base de cette nouvelle classification.
- La seconde édition aura cinq volumes :

a) Volume 1. Les Archéobactéries et les Bactéries des branches les plus anciennes et les Bactéries phototrophes. Ce volume décrit les archéobactéries, les cyanobactéries, les bactéries vertes sulfureuses et non sulfureuses, les deinocoques, et autres groupes des branches les plus anciennes.

b) Volume 2. Les Protéobactéries. Toutes les protéobactéries (bactéries pourpres) sont placées dans ce volume et sont réparties en cinq groupes principaux, sur la base des séquences de leurs ARNr et autres caractéristiques: c-protéobactéries B-protéobactéries y-protéobactéries 8-protéobactéries e-protéobactéries.

c) **Volume 3.** Les Bactéries Gram-positives pauvres en GC. Ce volume contient les bactéries Gram-positives, dont la teneur en GC est inférieure à 50%. Les clostridies. Les bacilles, les streptocoques et les staphylocoques sont quelques-uns des groupes principaux. C'est ici aussi que sont placés les mycoplasmes.

d) **Volume 4.** Les Bactéries Gram-positives riches en GC. Les bactéries Gram-positives dont la teneur en GC est supérieure à 50 55% sont dans ce volume. Sont localisés ici *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et les actinomycètes.

e) **Volume 5.** Les Planctomycètes. Spirochètes, Fibrobactéries. Bactéroides et Fusobactéries, Le volume 5 contient une variété de différents groupes bactériens Gram-négatifs. Les exemples les plus importants en pratique sont les chlamydies et les spirochètes.

5. Les grands groupes de bactéries

Les bactéries sont réunies dans le règne des Procaryotae qui comprend quatre divisions définies sur la base de la présence ou l'absence d'une paroi cellulaire, et sur sa nature, quand elle est présente. Cependant, ce critère commun peut réunir des bactéries très hétérogène par : leurs morphologies, leurs types trophiques, leurs modes de reproduction, leur écologie. Les trois premières divisions sont formées d'Eubactéries dont les deux premières possèdent une paroi alors que la 3eme en dépourvue. La 4^{eme} division regroupe l'ensemble des Archaeobactéries qui ont pour la plupart une paroi mais elle est de structure et de composition différente de celle des Eubactéries. Les 4 divisions de bactéries sont les suivantes :

1. Gracilicutes: Gracilis cutis : peau fine. Eubactéries possédant une paroi de type GRAM négatif, c-à-d composée de deux éléments : le peptidoglycane et la membrane externe qui leur est spécifique.

2. Firmicutes: Firmus cutis : peau dure. Eubactéries ayant une paroi type GRAM positif, c-à-d formée d'un seul élément le peptidoglycane.

3. Ténéricutes: Tener cutis : peau tendre. Eubactéries dépourvues de paroi, leur membrane cytoplasmique constituant leur enveloppe externe.

4. Mendosicutes: mendosus cutis : peau défectueuse. Archaeobactéries qui en général possèdent une paroi mais certaines espèces ont dépourvues. Quand elle est présente, la paroi est de

composition chimique différente de celle des Eubactéries mais elle possède le même type de structure et le même rôle. Dans la deuxième édition du manuel de Bergey, les procaryotes sont divisés en deux domaines : les Archaea (Archaeobacteria) et les Bacteria (Eubacteria), qui comprennent 34 phylums. 29 pour Eubacteria et 5 pour Archaeobacteria. Tous ces organismes sont formés de cellules procaryotes. Chaque domaine est divisé en embranchement (phylum), chaque embranchement en classes.

6. La phylogénie

La phylogénie est l'étude de l'histoire évolutive d'un groupe d'organisme à partir d'un ancêtre commun. Elle permet de regrouper les organismes selon leurs liens de parenté (parenté génétique). Les principaux taxons par ordre décroissant (hiérarchie taxinomique) (figure 3). La classification des microorganismes consiste à les placer dans des niveaux taxonomiques hiérarchiques (rangs taxonomiques). Le rang le plus élevé est le domaine, dans chaque domaine, chaque microorganisme est placé dans un phylum, une classe, un ordre, une famille, un genre et une espèce. Certains microorganismes sont aussi attribués à une sous espèce. Les groupes microbiens de chaque niveau ont des noms avec un suffixe spécifique, indicatif du rang ou niveau. Ainsi les noms de famille se terminent par *aceae* et les noms des ordres par *ales*. Parfois les ordres sont subdivisés en sous ordres dont les noms se terminent par *inaeae*.

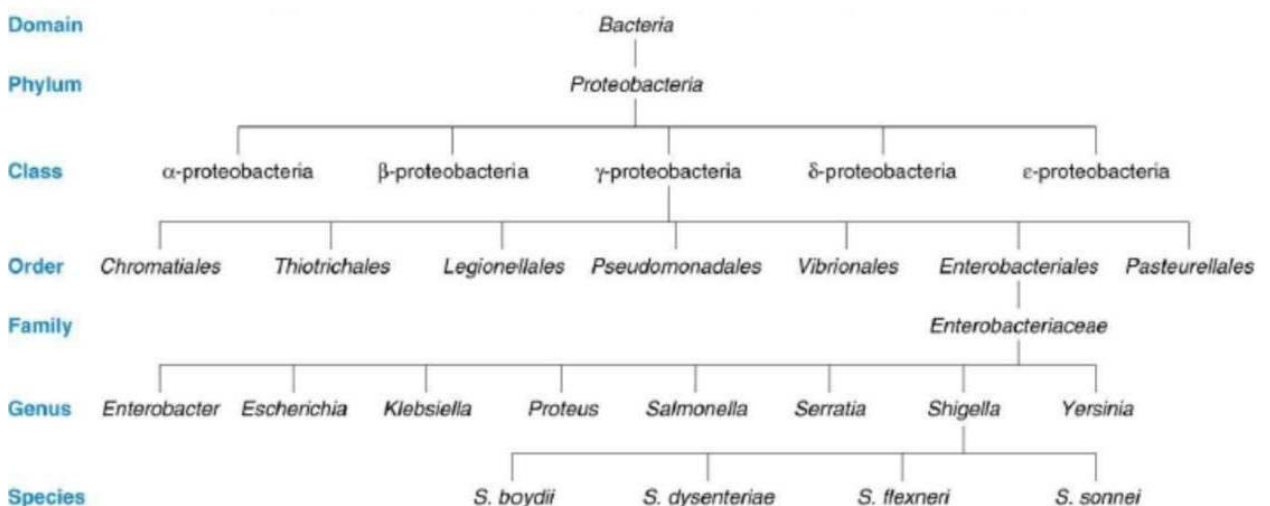


Figure 3. Structure hiérarchique en taxinomie. Livre MICROBIOLOGIE. PRESCOTT. HARLEY. KLEIN. 2 éditions françaises. Traduction de la 5^{ème} édition américaine par Claire Michelle Bacq-Calberg et Jean Dusart. de boeck. P 425.

CHAPITRE II

LA DIVERSITE DES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES BNL-LEGUMINEUSE

CHAPITRE II. La diversité des associations symbiotiques BNL -Légumineuse

L'azote atmosphérique, constituant majeur de l'air (79%) représentant la principale réserve naturelle d'azote pour la biosphère. Cependant, il se retrouve principalement sous sa forme moléculaire diatomique N₂, un gaz relativement inerte, peu réactif et non assimilable par la plupart des êtres vivants excepté certains procaryotes appelés diazotrophes en sont capables. La réduction de N₂ en présence de catalyseur par le procédé de HaberBosch, représente un coût très élevé du fait qu'elle nécessite des températures et des pressions très élevées. La fixation biologique de l'azote représente aujourd'hui à l'échelle mondiale un apport environ 1,5 fois supérieur à celui des engrais. Elle est estimée à environ 195 millions de tonne d'azote par an (Smil, 2002) et constitue la voie d'entrée majeure de l'azote dans la majorité des écosystèmes (Galloway et *al.*, 2004).

1. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est le fait de certains microorganismes qui possèdent un complexe enzymatique appelé nitrogénase (figure 4) qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique N₂ en ammoniac (NH₃). Le bilan de la réaction de fixation biologique de l'azote, est comme suit :



Ce complexe enzymatique permet à ces microorganismes procaryotes de réduire l'azote moléculaire en une forme d'azote assimilable par les plantes (ammoniac) via un processus dit "fixation biologique de l'azote" permettant aux végétaux de satisfaire leurs besoins en composés azotés (protéines, acides nucléiques...).

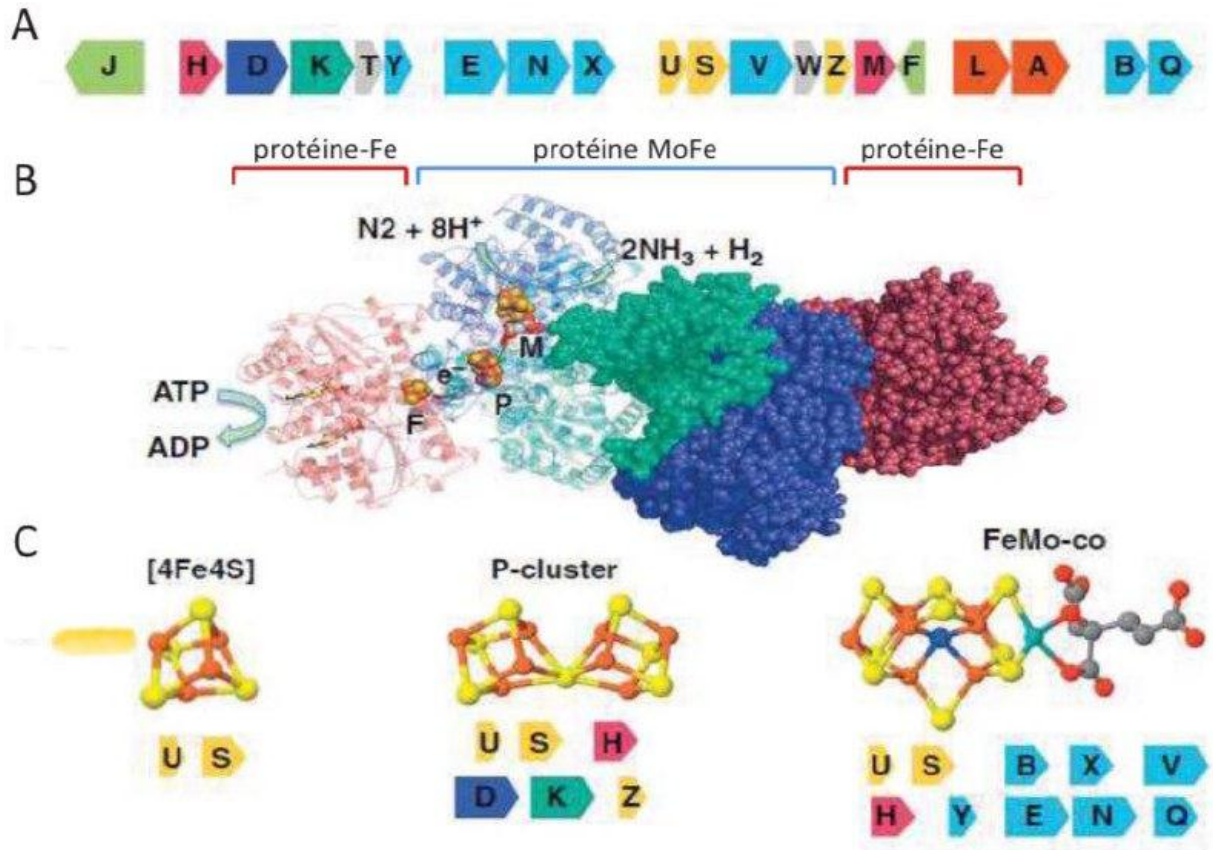


Figure 4. Structure de la nitrogénase et organisation des gènes impliqués dans sa biosynthèse.

A. Organisation du cluster de gènes de fixation d'azote nif d'une bactérie fixatrice d'azote, *klebsiella oxytoca*. La couleur des gènes se rapporte à la structure en 3 dimensions représentée en B.

B. Structure enzymatique du complexe nitrogénase.

C. Organisation atomique des trois différents métallos clusters de la nitrogénase. Les gènes nif impliqués dans la biosynthèse de chaque métallos cluster sont représentés en dessous. (Adapté de Oldroy et Dixon, 2014).

2. Diversité des micro-organismes fixateurs d'azote

Les microorganismes fixateurs d'azote ou diazotrophes appartiennent à deux des trois règnes primaires : les archaebactéries et les eubactéries.

L'étude phylogénétique de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S) des eubactéries, montre que des fixateurs sont présents dans de très nombreux groupes bactériens. La propriété de fixation d'azote semble très ancienne et a certainement joué un rôle prépondérant dans l'établissement et le maintien de la vie sur terre.

Chez les eubactéries, la fixation d'azote est associée à une large diversité de métabolismes: des anaérobies jusqu'aux aérobies, des bactéries photosynthétiques, des cyanobactéries et des actinomycètes. Certains fixateurs d'azote vivent à l'état libre dans le sol et les eaux et d'autres sont associés à des plantes (symbioses vraies ou associatives). Parmi les bactéries du sol qui forment des nodosités sur les racines des plantes (symbioses vraies) : les espèces rhizobiennes s'associent aux légumineuses et au seul genre *Parasponia* de la famille des Ulmacées (Ravenand Edwards, 2001).

Plus de 200 espèces bactériennes fixatrices d'azote ont été recensées. Elles appartiennent à 10 grands groupes phylogénétiques : les Archaebactéries, les bactéries vertes sulfureuses, les Campylobacter, les Cyanobactéries, les Firmibactéries, les Héliobactéries, les Protéobactéries, et les Thallobactéries (Young 1991; Young, 1992; Lechene et *al.* 2007) et Gama proteobactéries (figure 5). En fonction de leur relation avec les plantes, les bactéries fixatrices d'azote sont classiquement, réparties en deux groupes : les diazotrophes libres et les diazotrophes symbiotiques.

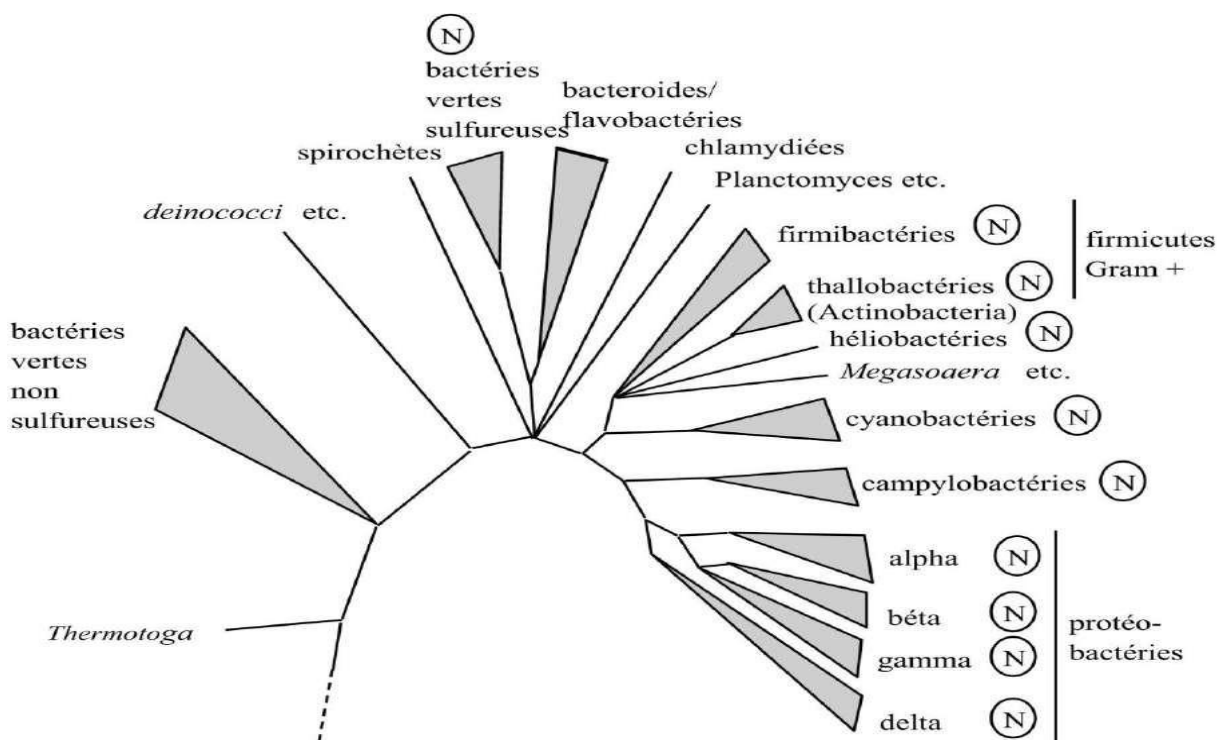


Figure 5. Arbre des grands groupes phylogénétiques des eubactéries basé sur les séquences d'ADNr 16S (d'après Young, 1992). Les groupes fixateurs d'azote sont indiqués par N.

2.1. Les fixateurs libres

L'estimation du taux de fixation d'azote par les bactéries du sol est de l'ordre d'environ de 1 kg par hectare (Elmerich, 1993). Ils englobent les fixateurs libres rhizosphériques comme des espèces du genre *Pseudomonas* (Beauchamp et al. 2006), *Azotobacter* (Beauchamp et al. 2006), *Beijerinckia* (Baldani and Baldani 2005), des Cyanobactéries : *Nostoc punctiforme*, *Nostoc calcicola*, *Anabaena variabilis*, *Gloeocapsa sp.*, *Phanocapsa sp.* etc. (Surendra Singh 2006; Prasanna and Nayak 2007), des bactéries aquatiques photosynthétiques *Rhodobacter* (Masepohl et al. 2005), *Rhodospirillum* (Selao et al. 2008). Selon Benyamina (2012), les fixateurs libres comprennent des genres très divers : des bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *diazotrophicus*), des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou des aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygène (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*). Certains fixateurs libres dont *Azospirillum*, *Azotobacter paspali*, *Alcaligenes* et *Campilobacter* ont été décrits comme formant de véritables associations avec les racines des plantes (Elmerich et al., 1993).

2.2. Les fixateurs symbiotiques

Ces symbioses constituent les systèmes fixateurs les plus efficaces réalisant un couplage entre la fixation d'azote et la photosynthèse. Dans ces associations fixatrices d'azote, le microorganisme induit l'apparition de structures différenciées, appelées nodules, chez le partenaire végétal, et lui fournit une grande partie de l'azote nécessaire à sa croissance. C'est le cas d'Actinomycètes du genre *Frankia* (bactéries Gram positif, filamenteuses et sporulantes) capables de former des interactions symbiotiques en nodulant des plantes ligneuses appartenant à 23 genres d'angiospermes regroupés dans 8 familles *Betulaceae*, *Myricaceae*, *Casuarinaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* et *Datisceae* (Provorov et al., 2002 ; Normand et al., 2007). C'est le cas aussi des systèmes associant des plantes de la famille des Fabacées et certaines bactéries Gram négatif, communément et collectivement appelées les "rhizobia" ou Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL) ainsi que plusieurs espèces de *Parasponia*, de la famille des *Ulmaceae*, qui peuvent également développer des nodules fixateurs d'azote avec certaines bactéries (Trinick et Hadobas, 1989 ; Young et Johnston, 1989 ; Davey et al. 1993). Selon Unkovich et al. (2008), la fixation symbiotique constitue le plus important processus biologique de dimension planétaire.

3. L'association Rhizobium Légumineuse

L'association symbiotique entre les légumineuses et les rhizobia est très diverse et implique de nombreuses espèces, aussi bien chez le partenaire végétal que chez le partenaire bactérien.

3.1. Diversité de la famille des fabacées (partenaire végétal)

La famille Légumineuse (*Fabaceae* ou leguminosae) est largement répandue dans le monde entier (Rundel, 1989); Elle est constituée de 727 genres et 19 325 espèces (G. Lewis et al, 2005) représentant la troisième plus grande famille des *Angiospermes* (plantes à fleurs) après les *Orchidaceae* et *Asteraceae*. Systématiquement, elle fait partie de l'ordre *Fabales* conjointement avec les *Quillajaceae*, *Polygalaceae* et *Surianaceae* (APGIII, 2009 ; <http://www.tolweb.org/angiosperms>). Des études récentes ont prouvé l'origine monophylétique de la famille des légumineuses (Doyle J. J., 2003; Wojciechowski M. F., 2003 ; Wojciechowski, et al, 2004). Le fruit (gousse) est le caractère déterminant qui donne à la famille des légumineuses son nom, bien que les membres de cette famille soient divers dans leurs fruits en raison des différents mécanismes de dispersion des graines (Doyle J. J., 1994). Elle est classée en

trois sous-familles en se basant, principalement, sur les différences morphologiques de leurs fleurs (Allen et Allen, 1981) : *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae* (Sprent, 1995).

-La sous famille des *Césalpiniacées* contient environ 150 genres et 2250 espèces au sein de 4 tribus. Principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales d'Afrique. Actuellement seul 23 % des espèces testées sont connues pour être nodulées par les rhizobia. Ces espèces se retrouvent dans les tribus des *Caesalpinieae* et *Cassieae*. Les tribus *Cercideae*, *Detareae* et *Amhertieae* sont très peu nodulées (de Faria et al., 1989);

-La sous famille des *Mimosacées*, contenant également 4 tribus, sont composées surtout d'arbres et d'arbustes présents dans les régions subtropicales d'Afrique, d'Amérique, d'Asie et d'Australie. Cette sous-famille possède à l'heure actuelle 62 genres et environ 3270 espèces, dont la majorité (90 %) sont nodulées parmi les 10 % testées (de Faria et al., 1989);

-La sous-famille *Papilionidae (Faboidae)*

C'est la plus grande des trois sous-familles contenant 28 tribus. Les espèces de cette sous-famille sont présentes dans le monde entier avec 476 genres et 13 860 espèces (Wojciechowski et al., 2004) dont 97 % parmi les espèces testées (21 % du total) sont nodulées par les rhizobia. Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes mais comprennent aussi des arbres et des arbustes (Al-Taweil et al., 2009; de Faria et al., 1989 ; Rachie et Silvestre, 1977).

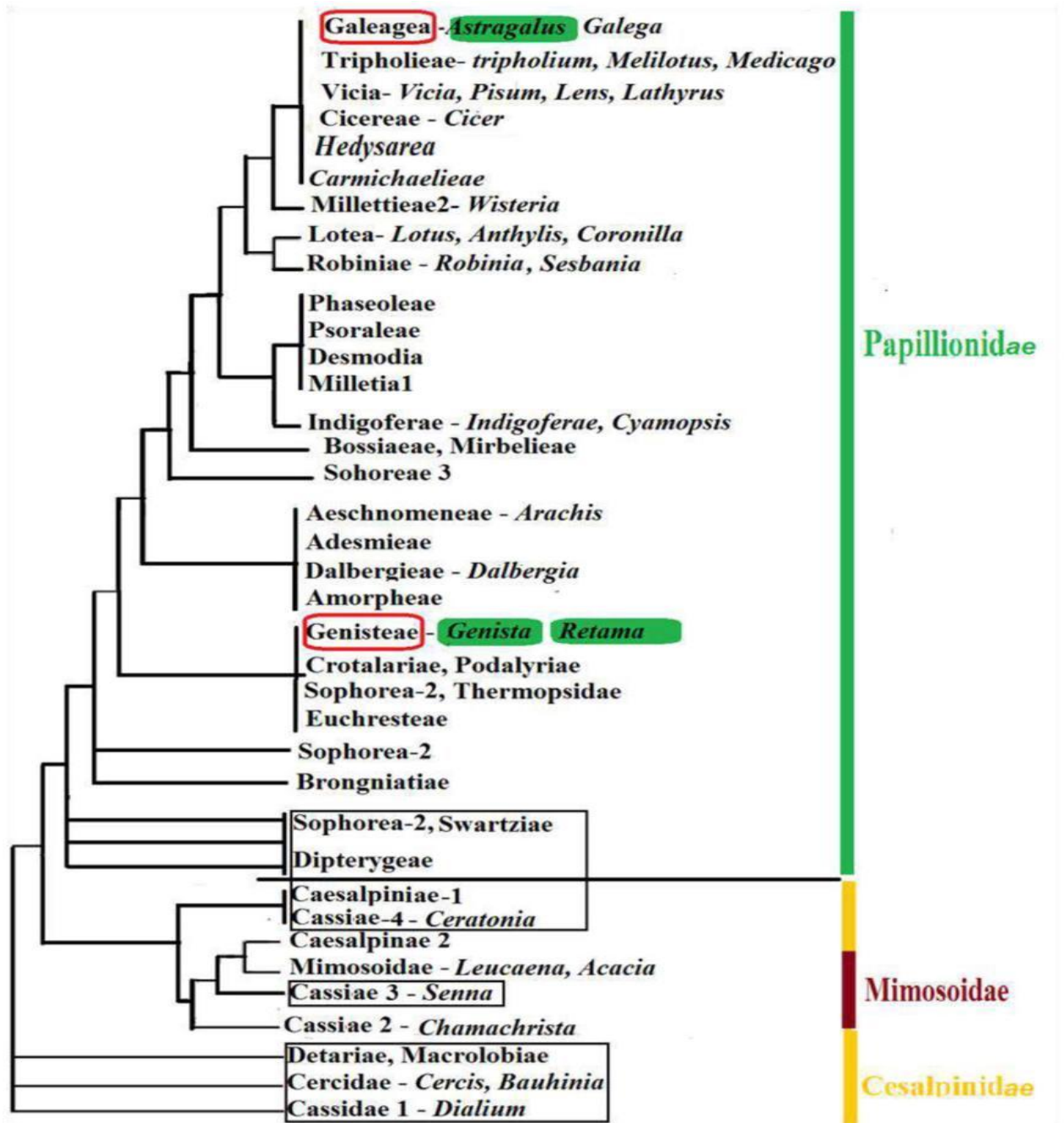


Figure 6. Phylogénie des Légumineuse d’après l’analyse des séquences du gène chloroplastique *rbcl* (Doyle et al. 1998 modifiée par Chaich 2018). Les trois sous-familles *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae* sont représentées par les barres verticales de couleur. Les tribus et genres encadrés ne forment pas de nodules. Les deux tribus et trois genres contenant les légumineuses sahariennes étudiées sont encadrées en **vert**.

3.2. Diversité des “Rhizobia” (partenaire microbien)

Le terme « rhizobia » est un terme générique donné aux bactéries du sol qui sont capables d’induire des nodules sur les racines ou les tiges des Légumineuses hôtes, y compris la non légumineuse *Parasponia* (Trinick MJ et al. 1988) et d’y fixer l’azote atmosphérique en symbiose (Moulin et al., 2001; Sawada et al., 2003). Endosymbiontes, ce sont des bactéries aérobies Gram négatives, non-obligatoires, mobiles, non sporulantes et taxonomiquement diversifiés.

Les arbres phylogénétiques montrent que ces espèces symbiotiques, sont liées de manière taxonomique à des parents proches non symbiotiques. La nodulation des légumineuses par des espèces bactériennes était, dans un passé récent, limitée à un nombre d'espèces bactériennes appartenant aux alphaprotéobactéries dans les genres *Rhizobium* (Frank, 1889), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Allorhizobium* (de Lajudie et al., 1998), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*) (de Lajudie et al., 1994) et *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982). Actuellement avec les explorations continues de légumineuses dans de nouvelles régions biogéographiques et avec le développement d'outils taxonomiques modernes, de nouvelles espèces de rhizobium ont également été décrites dans d'autres genres de la classe α -protéobactéries (Vandamme et al., 1996). Ainsi, des espèces bactériennes fixant de l'azote atmosphérique ont été incluses dans les genres *Devasia* (Rivas et al., 2002), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005), *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005) et *Shinella* (Lin et al., 2008). Les deux autres genres de rhizobia connus appartiennent à la classe des β -Protéobactéries et il s’agit de *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Moulin et al., 2001 ; Chen et al., 2001). La découverte de nouvelles espèces ainsi que des remaniements dans les anciens genres de *rhizobias* sont en évolution permanente. Maynaud et al. (2012) a identifié une nouvelle espèce *Aminobacter anthyllidis* nodulant la légumineuse *Anthyllis vulneraria*, *Microvirga lupini* et *Microvirga lotononidis*, nodulant *Lupinus texensis* et *Microvirga zambiensis* est un symbion de *Listia angolensis* (Ardley et al., 2012). Mousavi et al., (2014) ont prouvé que quelques espèces forment un clade distinct au sein du genre *Rhizobium* mettant en évidence un nouveau genre appelé *Neorhizobium*. Le Tableau ci-dessous résume l’ensemble des espèces de rhizobia connues et validées en 2015.

Tableau 1. Liste des genres et des espèces de rhizobia actuellement connues (DIOUF 2015).

Genre/Espèce	Plante hôte	Référence
Aminobacter (01 espèce)		(Maynaud <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. anthyllidis</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	(Maynaud <i>et al.</i> , 2012)
Azorhizobium (02 espèces)		(Dreyfus <i>et al.</i> , 1988)
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	(Dreyfus <i>et al.</i> , 1988)
<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	(Maria de Souza Moreira <i>et al.</i> , 2006)
Bradyrhizobium (10 espèces)		(Jordan, 1982)
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae</i> et <i>Loteae</i>	(Vinuesa <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2013)
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i> , <i>Glycine</i>	(Van-Berkum & Eardly, 2002)
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	(Kuykendall <i>et al.</i> , 1992)
<i>B. iriomotense</i>	<i>Glycine max</i>	(Islam <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. japonicum</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	(Jordan, 1982)
<i>B. jicamae</i>	<i>Glycine max</i>	(Ramirez-Bahena <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. liaoningense</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	(Xu <i>et al.</i> , 1995)
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Lespedeza</i> spp.	(Ramirez-Bahena <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i> spp.	(Yao <i>et al.</i> , 2002)
Burkholderia (07 espèces)		(Gillis <i>et al.</i> , 1995)
<i>B. caribensis</i>	<i>Mimosa pudica</i>	(Achouak <i>et al.</i> , 1999; Chen <i>et al.</i> , 2003)
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i> spp.	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata</i> , <i>M. scabrella</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus carnosa</i>	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
Cupriavidus (01 espèce)		(Makkar & Casida, 1987)
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa pudica</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2001; Vandamme & Coenye 2004)
Devosia (01 espèce)		(Nakagawa <i>et al.</i> , 1996)
<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	(Rivas <i>et al.</i> , 2003)
Ensifer (10 espèces)		(Chen <i>et al.</i> , 1988)
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i> spp.	(Toledo <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	(Nick <i>et al.</i> , 1999a; Young, 2003)
<i>E. fredii</i>	<i>Glycine max</i>	(Scholla & Elkan, 1984; Young, 2003)
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	(Nick <i>et al.</i> , 1999)
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Indigofera</i> spp.	(Wei <i>et al.</i> , 2002)
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.	(Rome <i>et al.</i> , 1996)
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i>	(de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003)
<i>E. saheli</i>	<i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i>	(de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young 2003)
<i>E. terangaie</i>	<i>Acacia</i> , <i>Sesbania</i>	(de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young 2003)
<i>E. xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1988; Young 2003)
Mesorhizobium (30 espèces)		(Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
<i>M. abyssinicae</i>	<i>Acacia abyssinica</i>	(Degefu <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2010)
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	(Wang <i>et al.</i> , 1999)
<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2011)
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana</i> spp.	(Guan <i>et al.</i> , 2008)
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	(Velázquez <i>et al.</i> , 2001)
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Nour <i>et al.</i> , 1994; Jarvis <i>et al.</i> , 1997)

CHAPITRE II. La diversité des associations symbiotiques BNL -Légumineuse

<i>M. gobiense</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	(Han, Han, <i>et al.</i> , 2008)
<i>M. hawassense</i>		(Degefu <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. huakuui</i>	<i>Astragalus sinicus, Acacia spp.</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1991; Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	(Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum, Glycine max</i>	(Nour <i>et al.</i> , 1995; Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	(Vidal <i>et al.</i> , 2009a)
<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	(Nandasena <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	(de Lajudie <i>et al.</i> , 1998)
<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	(Zheng <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	(Zhou <i>et al.</i> , 2010)
<i>M. sangaii</i>	<i>Astragalus luteolus, A. ernestii</i>	(Zhou <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	(Gao <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana spp.</i>	(Lu <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. shonense</i>		(Degefu <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus spp.</i>	(Zhao <i>et al.</i> , 2012)
<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>	(Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2012)
<i>M. tarimense</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	(Han <i>et al.</i> , 2008)
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	(Gao <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. thiogangeticum</i>		(Ghosh & Roy, 2006)
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1995; Jarvis <i>et al.</i> , 1997)
Methylobacterium (01 espèce)		(Sy <i>et al.</i> , 2001)
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i>	Jourand <i>et al.</i> , 2004
Microvirga (04 espèces)		(Ardley <i>et al.</i> , 2012)
<i>M. lotononidis</i>	<i>Listia angolensis</i>	(Ardley <i>et al.</i> , 2012)
<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus texensis</i>	(Ardley <i>et al.</i> , 2012)
<i>M. vignae</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	(Radl <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. zambiensis</i>	<i>Lupinus texensis, Listia angolensis</i>	(Ardley <i>et al.</i> , 2012)
Ochrobactrum (03 espèces)		(Holmes <i>et al.</i> , 1988)
<i>O. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Imran <i>et al.</i> , 2010)
<i>O. cytisi</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	(Zurdo-Piñeiro <i>et al.</i> , 2007)
<i>O. lupine</i>	<i>Lupinus albus</i>	(Trujillo <i>et al.</i> , 2005)
Phyllobacterium (04 espèces)		(Valverde <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. leguminum</i>	<i>Astragalus algerianus</i>	(Mantelin <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	(Sánchez <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. ifriqiyense</i>	<i>Lathyrus numidicus</i>	(Mantelin <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium, Lupinus</i>	(Valverde <i>et al.</i> , 2005)
Rhizobium (36 espèces)		(Frank, 1889)
<i>R. alamii</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	(Berge <i>et al.</i> , 2009)
<i>R. alkalisolii</i>	<i>Caragana intermedia</i>	(Lu <i>et al.</i> , 2009)
<i>R. azibense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Mnasri <i>et al.</i> , 2014)
<i>R. calliandrae</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	(Rincón-Rosales <i>et al.</i> , 2013)
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Segovia <i>et al.</i> , 1993)
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	(Tian <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. freirei</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Dall'Agnol <i>et al.</i> , 2013)
<i>R. galegae</i>	<i>Galegae orientalis, G. officinalis</i>	(Lindstrom, 1989)
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Amarger <i>et al.</i> , 1997)
<i>R. grahamii</i>	<i>Dalea leporina</i>	(López-López <i>et al.</i> , 2012)
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1997)
<i>R. herbae</i>		(Ren <i>et al.</i> , 2011)
<i>R. jaguaris</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	(Rincón-Rosales <i>et al.</i> , 2013)
<i>R. laguerreae</i>	<i>Vicia faba</i>	(Saïdi <i>et al.</i> , 2014)
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia, Trifolium, Phaseolus</i>	(Frank, 1889; Jordan, 1984)
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2003)
<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Valverde <i>et al.</i> , 2006)
<i>R. mayense</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	(Rincón-Rosales <i>et al.</i> , 2013)
<i>R. mediterraneum</i>	<i>cicer arietinum</i>	(Nour <i>et al.</i> , 1995)
<i>R. mesoamericanum</i>	<i>Dalea leporina</i>	(López-López <i>et al.</i> , 2012)
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia, Dalbergia</i>	(Lin <i>et al.</i> , 2009)
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>	(Gu <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	(van Berkum <i>et al.</i> , 1998)
<i>R. multihospitium</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	(Han, Wang, <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. paranaense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Dall'Agnol <i>et al.</i> , 2014)
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	(Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008)
<i>R. sphaerophysae</i>	<i>Sphaerophysa salsula</i>	(Xu <i>et al.</i> , 2011)
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	(Squartini <i>et al.</i> , 2002)
<i>R. taibaishanense</i>	<i>Kummerowia striata</i>	(Yao <i>et al.</i> , 2012)
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	(Hou <i>et al.</i> , 2009)
<i>R. tropici</i>	<i>P. vulgaris, Leucaena</i>	(Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991)
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	(de Lajudie <i>et al.</i> , 1998)
<i>R. vallis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
<i>R. vignae</i>	<i>Vigna radiata</i>	(Ren <i>et al.</i> , 2011)
Shinella (01 espèce)		(An, 2006)
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	(Lin <i>et al.</i> , 2008)

Source (DIOUF F., 2015)

3.3. Particularités du génome des rhizobia

Selon Osterås et *al* (1995), le génome des symbiotes de la famille des *Rhizobiaceae* se distingue de celui d'autres procaryotes, par la taille (6 à 9 Mb), la présence de plasmides dont la taille varie de 200 Kb à 1,5 Mb (mégaplasmides). Le séquençage complet des génomes ou plasmides de rhizobia montrent une localisation condensée des gènes de nodulation sur des régions symbiotiques (plasmidiques ou chromosomiques). Dans le cas de *Sinorhizobium meliloti*, le plasmide porte la majorité des gènes *nod* et *nif* impliqués dans le processus de nodulation et de fixation. Le plasmide pSymB possède une diversité importante de gènes dont les gènes de synthèse EPS (exopolysaccharides) qui interviennent dans la mise en place de la symbiose.

Le plasmide symbiotique de *Sinorhizobium sp.* NGR324 possède la majorité des gènes *nod* et une dizaine de gènes impliqués dans la synthèse de polysaccharides ; des homologues des gènes *exo* étant localisés sur le chromosome (Broughton et *al.*, 2000).

Chez *Mesorhizobium loti*, les îlots symbiotiques chromosomiques contiennent, outre les gènes *nod* et *nif*, des gènes impliqués dans des voies métaboliques du carbone ou la synthèse d'acides aminés. Selon ce même auteur (Osterås et *al.*, 1995), il existerait trois classes de séquences répétées à savoir :

- Première classe : elle regroupe les duplications de gènes structuraux ou de loci symbiotiques, tel l'opéron *nifHDK* chez *Sinorhizobium sp.* NGR324 ;
- Seconde correspond à des séquences d'insertion impliquées dans l'acquisition de fonctions accessoires (gènes de résistance aux antibiotiques) et intervenant dans les réarrangements chromosomiques et l'intégration plasmidique. ;
- La troisième classe : regroupe des éléments plus courts (inférieur à 300Kb) correspondant à des séquences intergéniques dites "Rhizobium-specific Intergenic Mosaic Element" très présents dans le génome des "rhizobia". Ces éléments seraient des sites de recombinaisons homologues issus de réarrangements génomiques, permettant ainsi une fluidité et une évolution génomique.

Le séquençage du génome d'*Agrobacterium tumefaciens*, bactérie taxonomiquement proche de certains rhizobia, présente des similarités entre les déterminants de la pathogénicité et de la symbiose (Rhizobium-Légumineuse).

4. Etablissement de l'association symbiotique Rhizobium-Légumineuse

La mise en place de la symbiose fixatrice d'azote entre les rhizobia et leurs plantes-hôtes requiert un certain nombre de mécanismes (Figure 7), au cours desquels les bactéries doivent mener en parallèle deux processus : l'infection des racines de la plante hôte et l'induction d'une organogénèse, qui conduit à la différenciation d'un nouvel organe, le nodule (Dénarié et *al.*, 1992).

5. Dialogue moléculaire entre les partenaires de la symbiose

Les interactions légumineuses-rhizobiums se produisent dans la rhizosphère suite à la libération de molécules carbonées (sucres, acides organiques, hormones, vitamines et substances phénoliques) par exsudation, sécrétion, ou autolyse des vieilles cellules de la racine (Seneviratne et Jayasinghearachchi, 2003). Les rhizobia vivent alors sous une forme libre dans le sol mais ne peuvent fixer l'azote que lors d'associations symbiotiques avec une plante hôte. Au cours de l'interaction symbiotique, les rhizobiums induisent la formation de structures végétales spécialisées, appelées nodules (Sprent et *al.*, 2017).

L'organogénèse des nodules comporte plusieurs étapes (Patriarca et *al.*, 2004) qui débutent par un dialogue moléculaire (flavonoïdes, facteurs Nods), nécessaire à la reconnaissance mutuelle entre la plante et ses symbiotes (Oldroyd, 2013). Dans les conditions de faible teneur en azote, les racines des légumineuses sécrètent des flavonoïdes spécifiques, chimioattractifs, détectables par les bactéries (Gulash et *al.*, 1984; Kape et *al.*, 1991,). Les rhizobia reconnaissent ces flavonoïdes et sont attirés vers la plante. Selon Ferrer et *al.* (2008), plus de 10 000 flavonoïdes ont été identifiés et leur synthèse semble être omniprésente chez les plantes (Figure 7).

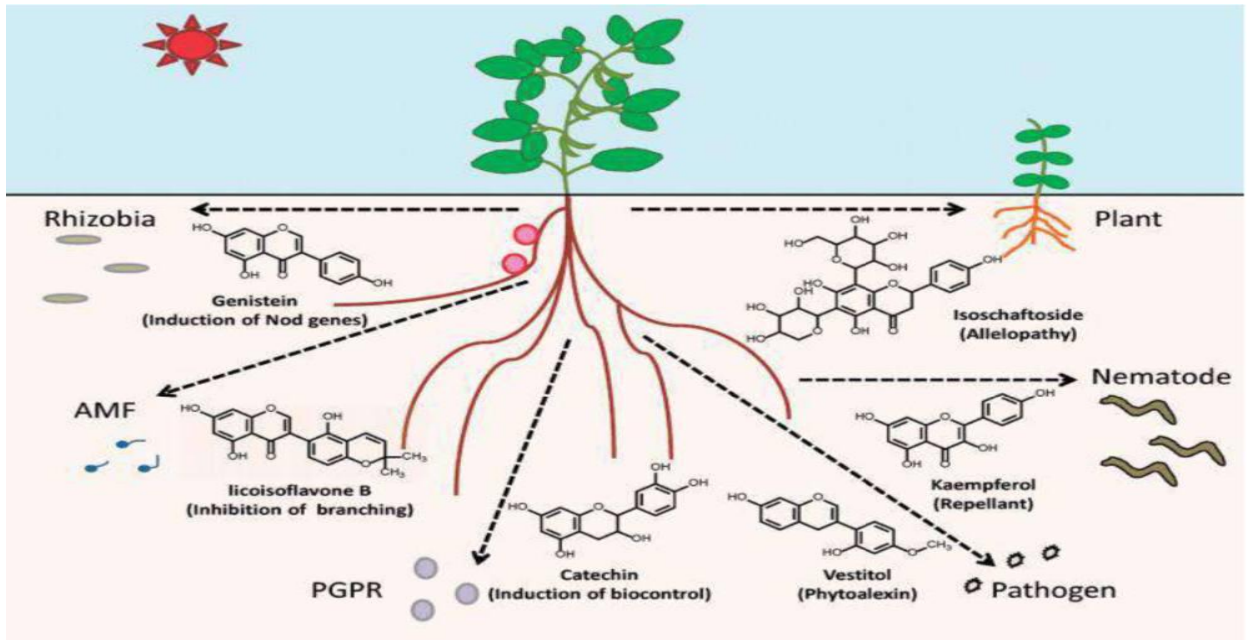


Figure 7. Représentation schématique des fonctions des flavonoïdes biologiquement actifs médiant diverses communications biologiques dans la rhizosphère. Les cercles roses représentent les nodules (Sugiyama et Yazaki, 2014).

6. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des molécules issues de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Leur synthèse a lieu dans la plupart des organes des plantes et ont des rôles variés comme par exemple la pigmentation des fleurs (anthocyanines), la défense en réponse aux pathogènes (phytoalexines), la germination du tube pollinique, ou la signalisation symbiotique. Molécules composées de trois cycles aromatiques, il en a été découvert plus de 4000. Elles sont classées suivant l'arrangement des cercles aromatiques qui les composent et des substitutions qu'ils portent. Les principales classes de flavonoïdes sont les Chalcone, Flavanone, Flava-3-ol, Flavone, Isoflavone, Flavonol et Anthocyanine (Taylor and Grotewold, 2005).

Les flavonoïdes participent au dialogue moléculaire qui s'établit entre l'hôte et les bactéries. La structure et la quantité de flavonoïdes produites dépendent de l'espèce végétale, ce qui permet aux rhizobia de distinguer leurs hôtes parmi d'autres légumineuses (Hirsch et *al.* 1999). Ils agissent comme des molécules signal exsudés dans la rhizosphère à travers les racines de la plante. Ces signaux peuvent être reconnus par un récepteur bactérien spécifique, NodD (produits du gène *nodD*), qui agit comme un activateur de transcription pour d'autres gènes de nodulation (*NodA*, *NodB* et *NodC*), qui synthétisent ensemble la structure du squelette de Facteurs Nod

(FNs) (Cohen et *al.*, 2001 ; Subramanian et *al.*, 2007; Franche et *al.*, 2009; Sugiyama et Yazaki, 2011). L'induction de l'expression des gènes nod par les flavonoïdes a été étudiée dans le cas de l'interaction « luzerne - *S.meliloti* » en tant que modèle (Peck et *al.*, 2006) et montre que seul le flavonoïde spécifique à l'hôte, la lutéoline, régule l'expression des gènes nod, tandis que les flavonoïdes non inducteurs tels que la naringénine ne le font pas.

7. Les facteurs Nods

Les facteurs Nod (NFs) sont des molécules symbiotiques de nature lipo-chitooligosaccharidiques produites par les rhizobia (Lerouge et *al.*, 1990). Ceux produits par *S.meliloti* consistent en un squelette oligomérique de chitine, constitué de quatre ou cinq résidus N-acetylglucosamines (GlcNAc) liés en β (1-4) (Figure 8). Une chaîne d'acide gras polyinsaturée (majoritairement un C16 :2) est greffée par N-acylation sur l'atome d'azote du résidu glucosamine situé à l'extrémité non réductrice du squelette de chitine. Sur l'extrémité non réductrice, le résidu glucosamine est aussi O-acétylé en C6 tandis qu'à l'extrémité réductrice, il est O-sulfaté en C6. Chez les autres espèces de rhizobia, les NFs sont tous des lipo-chitooligosaccharides, principalement des tétramères et des pentamères dont les substitutions portées par le sucres réducteur et non réducteur varient selon les espèces de rhizobia étudiées (Denarie et *al.*, 1996). Les gènes *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, nécessaires à la synthèse et au fonctionnement de la nitrogénase, sont conservés chez tous les diazotrophes.

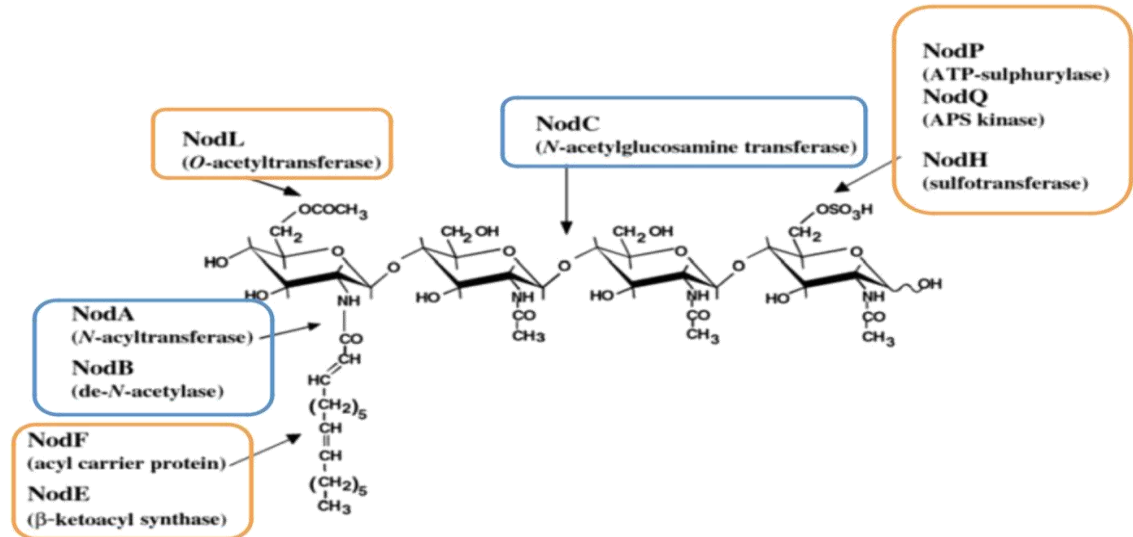


Figure 8. Structure du facteur Nod majoritaire de *S.meliloti* et enzymes nécessaires à sa synthèse.

Le facteur Nod de *S meliloti* consiste en un tetramère de N-Acetyl-Glucosamine sur lequel sont greffées un acide palmitoléique (C16:2) et un groupement acétate du coté non-réducteur, et un groupement sulfate du coté réducteur. Les enzymes responsables de la production des NFs sont indiqués en gras et leur activité enzymatiques entre parenthèses. Les enzymes communs à toutes les bactéries sont encadrés en bleu. Les enzymes responsables des décorations spécifiques des NFs de *S.meliloti* sont encadrés en orange.D'aprèsWais et al., 2000.

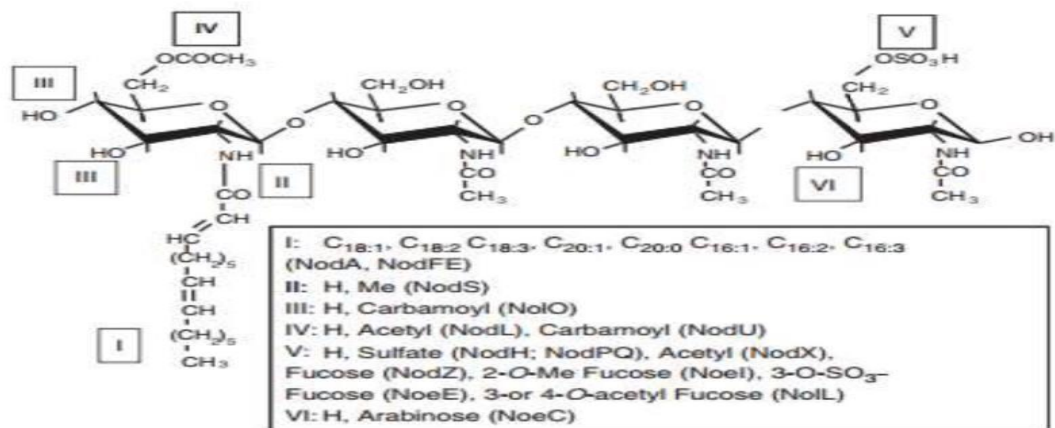


Figure 9. Schéma montrant la diversité des facteurs Nods (FNs) (Downie, 2010).

Les FNs sont des molécules de signalisation composées de lipochitooolysaccharides sécrétés par le rhizobium et répondent de façon spécifique selon l'espèce végétale (figure 9) (Guerts et

Bisselling, 2002; Geurts et *al.*, 2005 ; Oldroyd et *al.*, 2011). Les FNs ont un rôle très important car ils déclenchent l'organogenèse du nodule et sont indispensables dans les processus d'infection et de colonisation de la plante hôte (Long, 1996; Guerts et Bisselling, 2002), notamment la déformation des poils radiculaires, la dépolarisation de la membrane, les oscillations intracellulaires du calcium et l'initiation de la division cellulaire dans le cortex racinaire, ce qui établit un méristème et un primordium nodulaire (Gage, 2004). Après reconnaissance entre les deux partenaires symbiotiques, il s'ensuit un attachement des bactéries à la surface des poils absorbants. Selon Van Damme et *al.* (2004) et Laus et *al.* (2006), des lectines produites par les plantes à la surface des poils absorbants sont responsables de cet attachement en liant des polysaccharides de surface des rhizobia. Enfin, les fibrilles des rhizobia et les protéines de type adhésines /Ca²⁺ dépendantes (ricadhésines) qu'elles produisent seraient aussi impliquées dans cet attachement (Smit et *al.*, 1987). A la suite de l'attachement des bactéries, une déformation des poils absorbants est observée (Figure 10). Chez *M.sativa*, les premières déformations des poils absorbants apparaissent entre 12h et 24h après inoculation avec la bactérie (Wais et *al.*, 2002).

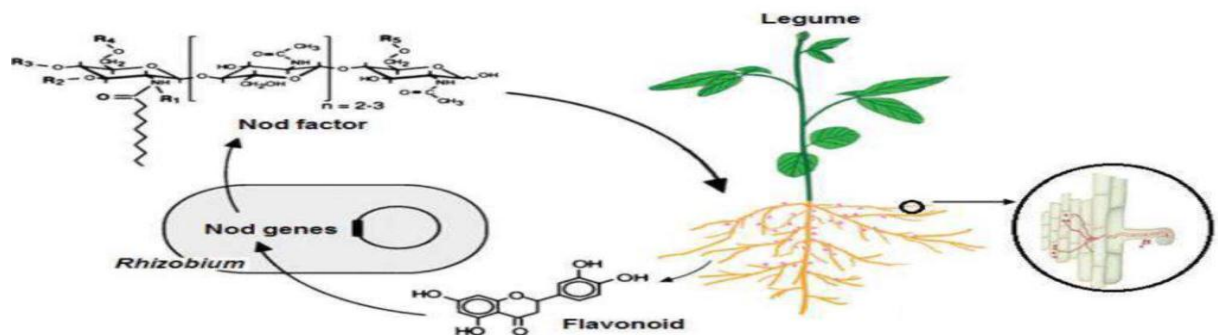


Figure 10. Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/légumineuse (Lindstrom et *al.*, 2010).

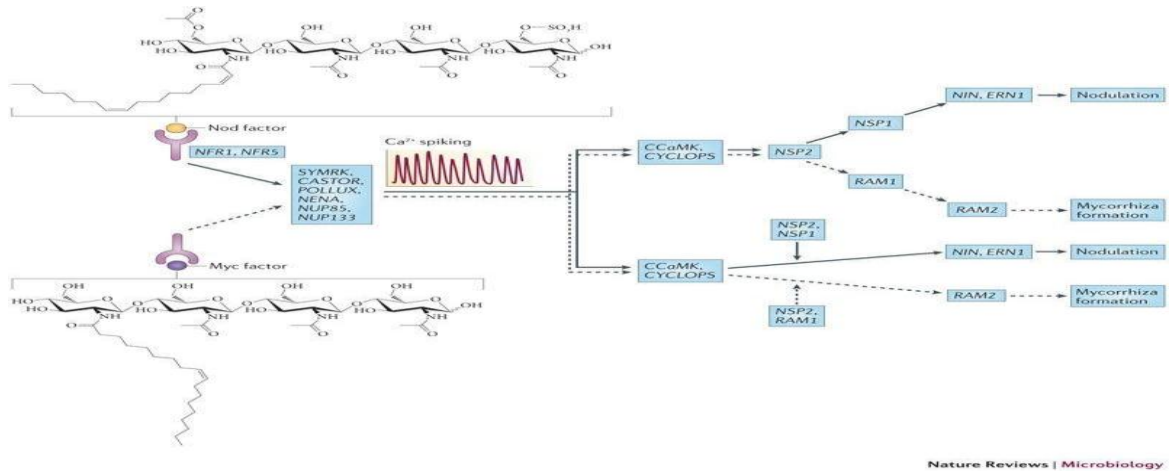


Figure 11. Signalétique des facteurs Nod et a structure des facteurs Nod de *Sinorhizobium meliloti*, symbionte de *Medicago truncatula*,(haut), est comparée à la structure des facteurs Myc, lipochitoooligosaccharide non-sulphaté, produite par un champignon arbusculaire *Glomus intraradices* (bas) (Oldroyd,2013).

8. Formation du nodule fixateur d'azote

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (Foucher et Kondorosi 2000; Limpens et Bisseling 2003). Les rhizobia pénètrent la cellule végétale par la formation d'un cordon d'infection qui traverse d'abord le poil absorbant et se ramifie ensuite dans les cellules corticales guidant ainsi les bactéries vers les couches cellulaires intérieures (Gage, 2004). Selon Schump et Deakin (2010), simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire (figure 9). Quand les cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules arrêtent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréduplication.

9. Organogenèse du nodule

L'organogenèse nodulaire se met en place parallèlement à la progression d'infection (Figure 12). Le primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, se différencie en nodule mature (Brewin, 1991 ; Trevaskis et al., 2002). Les bactéries sont libérées du cordon dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose par lequel elles sont internalisées dans un compartiment constituant le symbiosome entouré d'une membrane pér bactérodienne d'origine végétale (Brewin, 2004 ; Gage, 2004). Cette membrane assure la séparation des bactéries de la

cellule hôte et contrôle l'échange de signaux et de nutriments entre les deux partenaires (Udvardi et Day, 1997). Une fois dans le symbiosome, les cellules bactériennes subissent de profonds changements physiologiques et morphologiques, se différenciant en bactéroïdes, formes fixatrices d'azote adaptées aux nouvelles conditions environnementales présentes dans le nodule (Mergaert et *al.*, 2006).

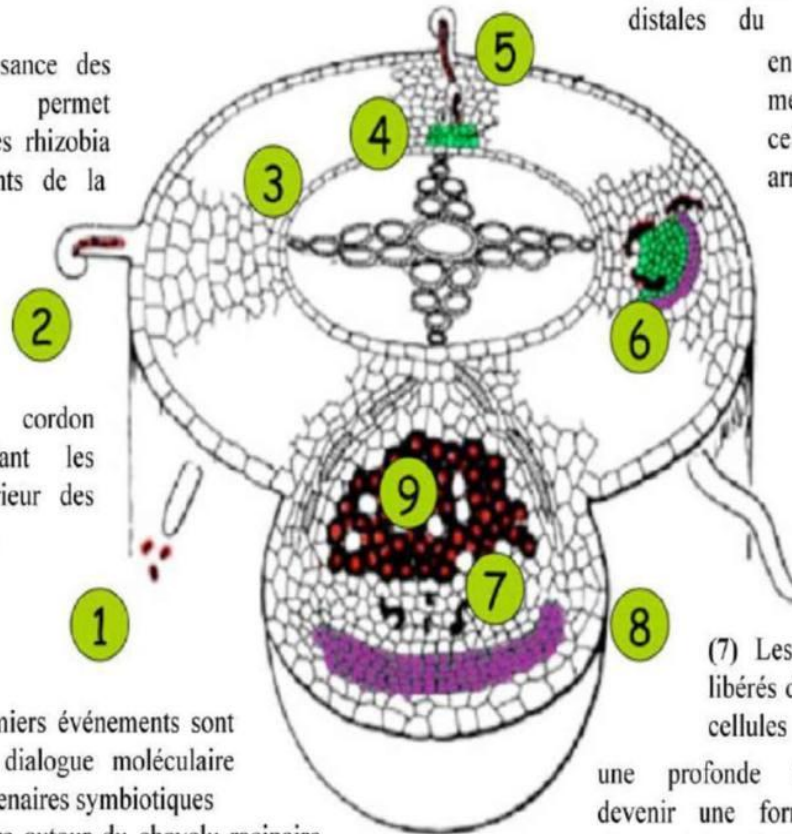
(4) Des divisions successives mènent à la formation d'un primordium nodulaire.

(5) Les cordons d'infection avancent vers le primordium.

(3) En même temps, des cellules corticales en face du site d'infection sont activées, se différencient et se divisent.

(6) Quand ils atteignent les cellules du primordium, les rhizobies sont libérés dans le cytoplasme des cellules hôte. Les cellules les plus distales du primordium, non envahies, forment un méristème tandis que les cellules infectées arrêtent de se diviser et débutent un processus de différenciation en cellules fixatrices d'azote.

(2) La reconnaissance des facteurs Nod permet "l'attachement" des rhizobies aux poils absorbants de la racine marquant ainsi le début de l'infection par la formation de structures tubulaires ou cordon d'infection guidant les rhizobies à l'intérieur des tissus de la plante.



(1) Les deux premiers événements sont amorcés par un dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques dans la rhizosphère autour du chevelu racinaire. Les flavonoïdes exsudés par la racine sont détectés par les rhizobies et mènent à la synthèse d'un signal réciproque bactérien nommé le facteur Nod.

(7) Les rhizobies récemment libérés dans le cytoplasme des cellules végétales subissent une profonde transformation pour devenir une forme mature fixatrice d'azote, le bactéroïde.

(8) L'activité du méristème est persistante et le processus d'infection continu. Par conséquent, le nodule formé est composé de différentes zones différentes : la zone I correspondant au méristème, la zone II correspondant à la zone de différenciation et l'infection, La zone III composée de cellules hôtes remplies de bactéroïdes fixateurs d'azote (9) et une zone IV ou zone de sénescence.

Figure 12. Schéma global du processus d'infection jusqu'à la formation du nodule fonctionnel Chez *Medicago*. (Bonaldi, 2010).

CHAPITRE III

***Méthodes et techniques appliquées à
l'étude de la diversité des BNL***

CHAPITRE III. Méthodes et techniques appliquées à l'étude de la diversité des BNL.

La diversité des rhizobiums peut être évaluée par un ensemble de méthodes, principalement, toutes basées sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques.

1. Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques incluent toutes les techniques qui reposent sur la détermination des caractéristiques morphologiques, biochimiques, et/ou physiologiques des bactéries via des techniques standardisées (Vandamme et *al.*, 1996; Graham et *al.*, 1991). Les critères morphologiques fournissent des renseignements concernant les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, présence de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores) et l'aspect des colonies observées sur la boîte de culture (taille, forme, couleur, état de la surface).

Les principales méthodes biochimiques (Api 20 à Api80, etc.....) sont basées sur la détermination de l'activité de différents enzymes caractéristiques de certains groupes de bactéries.

L'étude des caractères physiologiques impliqués dans l'identification bactérienne repose sur la détermination de la vitesse de croissance, la capacité d'utiliser différentes sources de carbone, la croissance à différentes variations de température, du pH, de sels, d'antibiotiques et de métaux lourds. Ces analyses physiologiques sont souvent influencées par les facteurs environnementaux. Les caractéristiques phénotypiques classiques sont toujours admises comme étape primordiale pour la description et l'identification de souches d'une même espèce (Vandamme et *al.*, 1996). 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.

2. Méthodes génotypiques

Les premières techniques moléculaires utilisées dans la classification bactérienne étaient basées sur le taux de GC* ou l'étude du profil plasmidique. Les méthodes dominantes de la taxonomie moderne visent la caractérisation très précise en ciblant les molécules d'ADN. Ceci est la conséquence des progrès technologiques.

* Taux de GC : Le taux de GC d'une séquence d'ADN correspond au pourcentage de guanine (G) et de cytosine (C) que contient une molécule d'ADN. Ces deux bases azotées constituant font partie des constituants de l'ARN et de l'ADN.

2.1. Séquençage de l'ADNr16S

Les travaux de Carl Woese (1987) ont véritablement révolutionné l'approche taxonomique en microbiologie. Ils ont démontré que les séquences d'AND ribosomiaux (ADNr 23S, 16Set5S) présentes sous forme d'opérons étaient des marqueurs évolutifs relativement robustes de l'ensemble du génome, utiles pour l'étude des relations phylogénétiques et l'évolution des espèces microbiennes au cours du temps chez tous les microorganismes. Ces opérons peuvent être présents en un ou plusieurs exemplaires sur le chromosome (JensenetStraus,1993). C'est principalement l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S qui est le marqueur moléculaire le plus utilisé dans l'analyse des relations phylogénétiques bactériennes au niveau genre et espèces. Ce gène a comme avantage d'être présent chez tous les bactéries, d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables, de présenter une taille d'environ 1500 pb aisément séquençable et de fournir une séquence suffisamment informative (Ludwig, 2007 ; Woese, 1987). Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" pour l'amplification in vitro par PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage (Weisburg et al.,1991). Dans les années 1990, l'ADN 16S est devenu le marqueur taxonomie le plus important chez les rhizobiums conduisant à la répartition des genres inclus dans la famille *Rhizobiaceae* et la création d'un nouvel ordre appelé "rhizobiales" proposé dans le *Bergey's Manual* (Kuykendall et al.,2005). Ainsi l'analyse phylogénétique de l'ADNr16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce. Stackebrandt et Goebel (1994) ont montré qu'en dessous de 97% de similarité de séquences ARNr 16S deux souches représentent potentiellement des espèces différentes. Plusieurs chercheurs ont utilisés l'ADNr comme une approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de rhizobiums (Laguerre et al. 1994 ; Vandamme et al., 1996). Des études phylogénétiques récentes portant sur le séquençage d'autres gènes de ménage ont été utilisées pour la détection et l'identification des espèces bactériennes. Ces gènes codent pour des protéines vitales Assurant la maintenance du fonctionnement cellulaire (Stackebrandt et 2002;Maiden, 2006).

Des systèmes d'identification fiables peuvent être établis après la classification des microorganismes. De nombreuses techniques de typage moléculaire (Figure 13) ont été développées sur la base de la réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) : (PCR-RFLP, AFLP, RAPD, ERIC-PCR, REP-PCR, MLSA ...), relativement rapides à réaliser et simples à analyser. Ces outils sont actuellement les plus couramment utilisées dans les études de diversité des BNL (Zakhia et de Lajudie, 2006).

Ces méthodes sont basées sur l'analyse des molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau de l'ensemble du génome, soit en ciblant certains fragments du chromosome ou de plasmides bactériens. Les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN bactérien permettent des comparaisons beaucoup plus fines entre les bactéries et une classification plus rigoureuse. Si la classification des rhizobiums était longtemps basée sur leur capacité de nodulation et leurs caractéristiques morphologiques, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (Woese et *al.*, 1984), puis d'autres gènes dans le cadre des études MLSA, s'est progressivement imposé comme critère essentiel pour la taxonomie et la classification phylogénétique des rhizobiums indépendamment de leur caractéristiques phénotypiques ou symbiotiques (Rivas et *al.*, 2009).

Parmi les techniques les plus couramment employées :

2.2. PCR-RFLP du gène de l'ARNr 16S

Dans la méthode PCR-RFLP ou Polymorphisme de Fragments de Restriction, la PCR est combinée avec des enzymes de restriction. L'ADNr 16S ou 23S avec ou sans l'IGS (espace intergénique entre les gènes de l'ADNr 16S et 23S), ou bien d'autres gènes impliqués dans la symbiose ou la fixation d'azote, sont amplifiés avec des amorces universelles définies en alignant les séquences disponibles, le produit de la PCR est ensuite digéré par les enzymes de restriction (Zakhia et de Lajudie, 2006).

Cette technique fournit principalement des profils spécifiques (Gurtler et *al.*, 1991; Jayaro et *al.*, 1991; Vaneechoutte et *al.*, 1992; Ralph et *al.*, 1993; Laguerre et *al.*, 1994).

Dans l'étude de la collection des BNL isolées de nodules, la PCR-RFLP du gène codant pour les ARNr 16S (l'ADNr 16S) est employée pour grouper les souches.

Plusieurs gènes peuvent être ciblés l'ADNr 16S (Laguerre et *al.*, 1994; Zakhia et *al.*, 2004), les gènes de nodulation *nodC*, de fixation d'azote *nifH* (Laguerre et *al.*, 2001).

Cette technique, très utilisée dans le passé, reste très performante, rapide, informative et relativement accessible à de nombreux laboratoires (Zakhia et de Lajudie, 2006).

2.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

L'AFLP est une approche moléculaire pour explorer le polymorphisme de séquences représentatives d'un génome entier. Elle a été décrite par Zableau et Vos (1993).

L'ADN génomique total est digéré par des enzymes de restriction de deux sortes: une qui reconnaît un site de coupure fréquent (4 bases de l'ADN) et une autre qui reconnaît un site de coupure rare (6 à 8 bases). Ensuite il y a ligation des fragments de restriction avec deux adaptateurs dont les extrémités 3' sont complémentaires aux sites de restriction et contenant une base différente pour empêcher la restriction d'avoir lieu de nouveau. Cette étape est suivie d'une amplification sélective des fragments de restriction par l'utilisation d'amorces homologues ou adaptateurs et contenant chacun deux ou trois bases sélectives à leurs extrémités 3'. De ce fait, une partie seulement des fragments de restriction sera amplifiée. Le marquage au P32 ou au fluorochrome de l'amorce correspondant au site rare de coupure permet de visualiser par l'autoradiographie (Zakhia et de Lajudie, 2006).

2.4. RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ou AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)

La technique du polymorphisme de l'ADN par amplification aléatoire (RAPD) a été introduite en 1990 (Williams et al., 1990; Welsh et Mc Cleland, 1990).

Le principe de cette méthode est d'effectuer des réactions de PCR avec une seule amorce dont la séquence est courte (9 à 10pb) et choisie au hasard. Le nombre de sites correspondant à l'amorce utilisée peut varier d'une souche à une autre au sein de la même espèce. Après séparation des produits de PCR sur gel d'agarose, on obtient un profil de bandes caractéristique de la souche étudiée. Le choix des amorces est empirique.

2.5. REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) ou (Repetitive Element PCR)

La méthode de REP-PCR a été introduite par Versalovic et al. (1991). Le but de cette méthode est de caractériser des souches bactériennes par des profils électrophorétiques obtenus en amplifiant des séquences répétitives appelées séquences REP. Ce sont des séquences répétitives de 38pb de longueur, ayant 6 positions dégénérées et une boucle de 5pb variables se trouvant entre les deux séquences palindromiques conservées.

2.6. L'analyse de séquence multi locus ou MLSA

La classification des bactéries basée sur le seul gène d'ARNr 16S a montré ses limites à différencier les espèces proches (Valverde A. et al, 2006; Ramírez-Bahena MH et al; 2008) car elle permet la description d'espèces de rhizobium non nodulantes. Dans ce but plusieurs gènes métaboliques (housekeeping) ont été proposés dans plusieurs groupes de bactéries (Maiden M et al., 2006). Chez les rhizobia, les deux premiers gènes analysés étaient *recA* et *atpD* (Gaunt MW et al., 2001) et actuellement ils ont été séquencés dans beaucoup d'espèces rhizobiales montrant leur utilité dans la différenciation des espèces dont les gènes 16S ARNr sont pratiquement identiques (Valverde A. et al, 2006; Ramírez-Bahena MH et al; 2008). Par la suite, de nouveaux schémas d'identification et d'analyse phylogénétique des bactéries MLSA (Multilocus séquence analysis) et MLST (Multilocus séquencetyping) basés sur l'analyse de plusieurs gènes d'entretien ont été appliqués à des analyses phylogénétiques de groupes concrets de rhizobia comme *Ensifer* (Martens M et al., 2007 et 2008; van Berkum P et al., 2006) et *Bradyrhizobium* (Vinuesa P et al., 2008; Rivas R et al., 2009). Ces études indiquent que le séquençage des gènes de ménage sont plus efficaces que l'hybridation ADN-ADN pour l'évaluation de la parenté génétique entre les espèces *Ensifer* et appuient la suggestion par exemple *Ensifer xinjiangensis* et de *Ensifer fredii* (Martens M et al., 2008). Le comité ad hoc pour la réévaluation de la définition des espèces a suggéré que les espèces devraient être identifiables par des méthodes facilement disponibles (phénotypiques et génomiques) et qu'une approche prometteuse à cet égard est la détermination d'un minimum de gènes d'entretien (Stackebrandt E. et al., 2002) et de Zeigler (2003) ont suggéré qu'une analyse de moins de cinq gènes d'entretien adéquats pourrait être suffisante pour une classification fiable. Pour cette raison, dans les dernières descriptions de nouvelles espèces de rhizobia, l'analyse d'au moins deux gènes de ménage a été incluse couramment pour connaître les espèces apparentées les plus proches avant d'effectuer des expériences d'hybridation ADN-ADN.

En plus des gènes de ménage (gènes noyau), certains gènes "auxiliaires" ou "accessoires" impliqués dans la symbiose des légumineuses sont couramment inclus dans la description des espèces de rhizobia et dans certaines analyses MLST (Silva C et al., 2005; Vinuesa P et al., 2005). Les gènes symbiotiques des rhizobiums sont codifiés dans les plasmides et dans les îles symbiotiques (Barnett MJ et al., 2001 ; Crossman LC et al, 2008 ; Lee KB et al., 2008) . Les gènes de nodulation, quant à eux, sont utiles pour définir des symbiovars au sein d'espèces rhizobia (Villegas MC et al, 2006 ; Mnasri B et al, 2007).

TECHNIQUES ET RESOLUTION TAXONOMIQUE

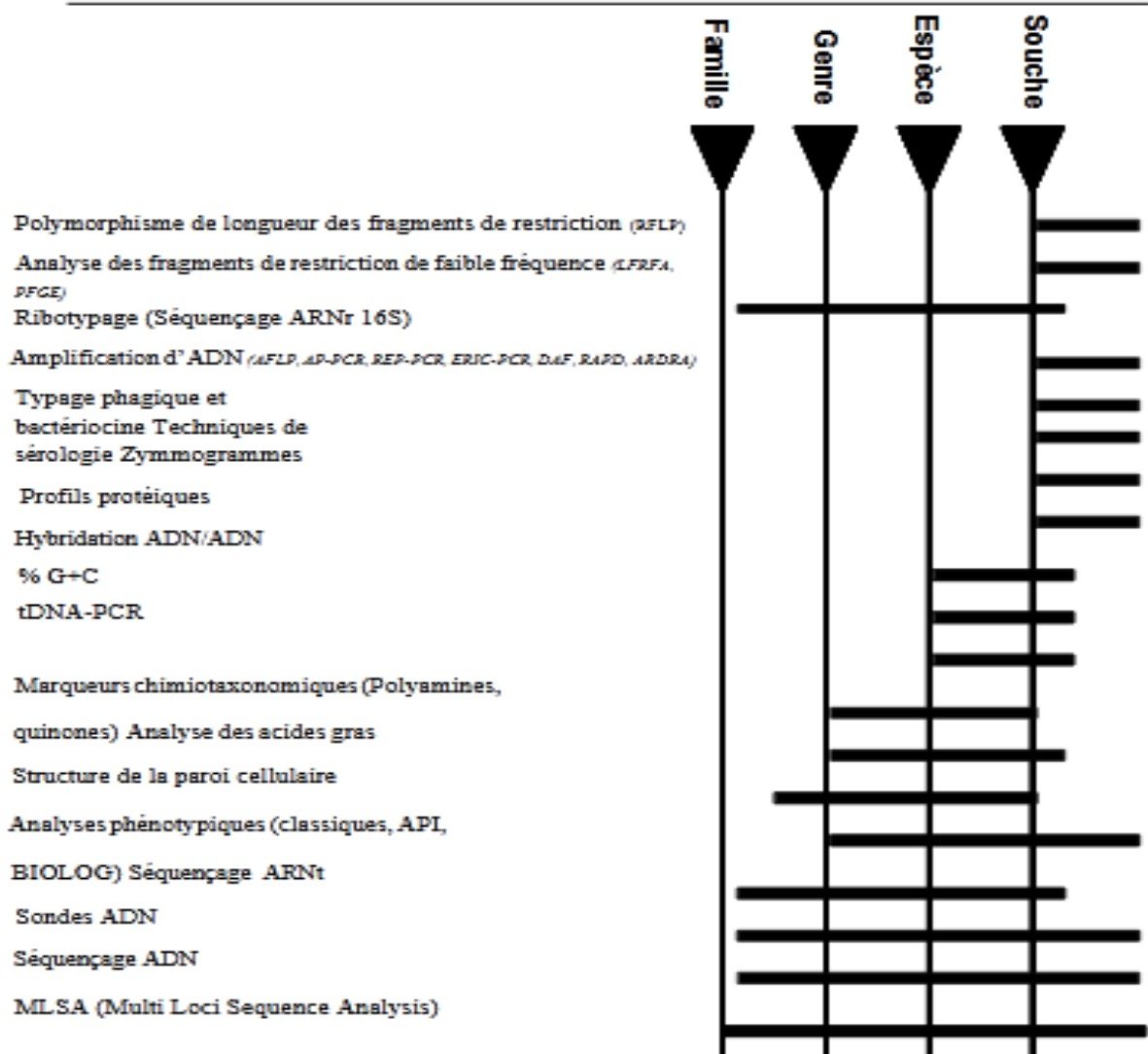


Figure 13. Niveau de résolution taxonomique des différentes techniques (Vandamme et *al.*, 1996; Nzoue A., 2008).

Nous présentons ici, une brève description de certaines méthodes utilisées pour l'étude taxonomique de tout type de bactéries.

3. Les outils de la taxonomie polyphasique bactérienne

La taxonomie dite polyphasique proposée par Colwell (1970), est utilisée pour décrire des taxa à tous les niveaux (Murray *et al.*, 1990). Elle intègre l'ensemble des informations génotypiques, phénotypiques et phylogénétiques recueillies sur la cellule bactérienne. L'information génotypique est fournie par les acides nucléiques ADN et ARN présents dans toutes les cellules, tandis que l'information phénotypique est donnée par les protéines et leurs fonctions, par différents marqueurs chimio taxonomiques et plusieurs autres caractères exprimés (Vandarnne *et al.*, 1991).

4. Les gènes de ménage

Les gènes de ménage (housekeeping gene) sont par définition les gènes qui assurent les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules. Le séquençage d'un ou de plusieurs "gènes de ménage" (MLSA ou Multilocus Sequence Analysis) est actuellement utilisé dans de nombreuses études populationnelles et de taxonomie en rhizobiologie (Merabet, 2007).

La technique MLSA offre l'avantage de fournir des résultats comparables entre les laboratoires. Elle a été recommandée par le *ad hoc* comité pour la réévaluation de l'espèce bactérienne (Stackebrandt *et al.*, 2002).

Des études récentes (Wertz *et al.*, 2003; Zeigler, 2003; Naser *et al.*, 2005; Adékambi et Drancourt, 2004) confirment que les séquences de gènes de ménage peuvent prédire les relations entre génomes et peuvent être utilisées dans l'identification au niveau de l'espèce (Merabet, 2007).

Zeigler (2003) suggère que l'information donnée par le séquençage de moins de cinq gènes de ménage a un pouvoir identique ou même supérieur à celui obtenu par les hybridations ADN:ADN.

Cette discrimination est possible à condition de bien choisir les gènes qui seront analysés et propose les critères suivants pour leur sélection, à savoir:

- (i) Universellement présents dans les génomes ;
- (ii) Idéalement présents en copie unique sur le génome ;
- (iii) Les séquences doivent être assez longues pour contenir un nombre d'informations suffisant mais aussi suffisamment courtes pour pouvoir être séquencées.

5. Phylogénie et construction d'arbres

5.1 Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques

La phylogénie moléculaire permet de comprendre les relations de parenté, de retracer l'historique évolutif d'une espèce ou d'un groupe taxonomique supérieur des organismes. De nos jours, l'AND et les séquences de protéines sont largement utilisées pour déduire la phylogénie des organismes. Les arbres phylogénétiques basés sur certains gènes marqueurs permettent de schématiser et d'appréhender ces relations rapidement. Nous citons trois méthodes principales et différentes pour la reconstruction des arbres phylogénétiques : Distance (phénétique), Maximum de parcimonie, Maximum de Vraisemblance.

5.1.1 Méthodes de distance

Ce sont des méthodes de reconstruction d'arbre phylogénétique sans racine basée sur la recherche d'OTU (Operational Taxonomic Units), qui, le plus souvent est équivalent à une séquence. Ces méthodes sont rapides et bien adaptées aux séquences présentant un degré de similarité élevé. Plusieurs méthodes ont été développées pour construire un arbre phylogénétique à partir d'une matrice de distance.

- UPGMA « Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean »: c'est une méthode très simple, basée sur le groupement des séquences les plus similaires, indépendamment de leur vitesse d'évolution et de leurs parentés phylogénétiques, sans déterminer d'ancêtre commun (Goodfellow, 1971). En règle générale, on lui préfère maintenant des méthodes plus avancées.

- La méthode de Neighbor-Joining (NJ), développée par Saitou et Nei (1987), est une amélioration de la précédente autorisant des différences de vitesse d'évolution entre branches. C'est actuellement la plus utilisée pour reconstruire des phylogénies par méthode de distance. Cette méthode a l'avantage d'être rapide et bien adaptée aux séquences présentant un degré de similarité élevé.

5.1.2. Méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood-ML)

C'est une méthode dite de caractères, méthode probabiliste, qui permet d'appliquer les différents modèles d'évolution (par exemple le modèle de Kimura qui prend en compte la différence entre transition et transversion) et d'estimer l'ordre des branchements et la longueur des branches en fonction du changement évolutif. Plusieurs modèles existent pour affiner les reconstructions

phylogénétiques et tester plusieurs paramètres (Yang, 1996). La méthode de ML est considérée comme la plus fiable pour reconstruire l'histoire évolutive des séquences. Par contre, c'est une technique qui nécessite des temps de calcul très longs.

5.1.3 Méthodes de maximum de parcimonie

La méthode de parcimonie permet de construire des arbres de classification hiérarchique après enracinement, qui permettent de refléter la structure de parenté d'un ensemble de taxons. Cette méthode utilise des algorithmes basés sur les caractères plutôt que de distances (Land et Doig, 1960). Plusieurs programmes utilisent la méthode de maximum de parcimonie pour la reconstruction d'un arbre, tel que MEGA 5 (Tamura et *al.*, 2011). Cette méthode est rapide en temps de calcul, mais moins précise que la méthode ML.

5.2. Fiabilité de l'arbre phylogénétique

5.2.1 Evaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques

La robustesse des nœuds d'un arbre phylogénétique peut être évaluée par la technique de ré-échantillonnage grâce au test de "bootstrap". Cette méthode, introduite par Felsenstein (1985), est largement appliquée, avec beaucoup de succès. Elle permet de ré-échantillonner les données introduites dans les programmes de calcul en construisant autant d'arbres qu'il y a eu de ré-échantillonnages. Chaque ré-échantillonnage est un tirage au sort des sites (ou des caractères) avec remise, donc dans chaque réplication de bootstrap certains sites ou caractères peuvent être présents plusieurs fois, tandis que les autres peuvent être absents. Chaque réplication produit un nouvel alignement "artificiel", qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche. Seules les branches avec un fort % (au moins 75%) sont considérées comme robustes.

5.2.2 Enracinement de l'arbre

Pour orienter et enracer un arbre phylogenetique, la séquence choisie doit avoir les caractéristiques suivantes:

- Ni être trop éloignée des autres données, pour ne pas induire des erreurs dans la topologie de l'arbre et pouvoir reconnaître les caractères ancestraux et dérivés.
- Ni être trop proche des séquences pour représenter un vrai "outgroup". L'utilisation de plus d'un "outgroup" améliore en général l'évaluation de l'arbre.

CHAPITRE IV

***Techniques et méthodes récemment
réalisées pour l'étude de la diversité
moléculaire des BNL***

CHAPITRE IV. Techniques et méthodes récemment réalisées pour l'étude de la diversité moléculaire des BNL.

Actuellement, différentes techniques moléculaire utilisées, à travers le monde, pour l'étude de la diversité moléculaire des BNL associées aux différentes espèces et genre de la famille de *Fabaceae*. Dans cette partie du travail, nous avons passé en revue l'évolution des techniques moléculaires durant cette dernière décennie (2009 -2021).

1. Etude de la diversité moléculaire des souches de BNL associées au genre *Retama* tribu des *Genistae* en Algérie (Boulila et al, 2009)

Soixante-sept souches ont été isolés à partir de nodules collectés sur des racines de légumineuses arbustives méditerranéennes *Retama raetam* et *Retama sphaerocarpa* poussant dans sept zones éco-climatiques du nord-est de l'Algérie.

1.1. Méthodologie adoptée

Tous les isolats obtenus des racines de la plante hôte (*R. sphaerocarpa*) ont pu noduler les deux espèces de *Retama* étudiées (*R.sphaerocarpa* et *R.retam*).

Après différentes extractions et purifications, La diversité génétique des isolats de *Retama* a été analysée sur la base du génotypage par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (replf). Il s'agit de l'amplification PCR des fragments la région de l'espaceur inter génique (IGS) du gène de l'ADNr 16S, précisément entre les gènes de l'ARNr 16S et 23S (IGS)). Les gènes symbiotiques nifH et nodC ont été aussi utilisés pour discrimination éventuelle des souches isolées.

NB. Les enzymes de restriction suivantes ont été utilisées : MspI et CfoI pour l'ADNr 16S ; CfoI et HaeIII pour l'IGS; HaeIII pour nifH; HaeIII

1.2. Résultats obtenus

Onze haplotypes attribués au genre *Bradyrhizobium* ont été identifiés. Une différenciation biogéographique significative des populations de rhizobiums a été trouvée, mais un haplotype était prédominant et conservé à travers tous les sites.

Ceci dit, aucune différenciation génétique significative des populations de rhizobiums n'a été décelée par rapport à l'espèce hôte d'origine.

1.3. Conclusion

En conclusion, cette étude n'a pas permis une différenciation génétique significative des populations de rhizobiums par rapport à ceux associées aux racines de l'espèce hôte d'origine. A travers cette étude il en est ressorti que les souches associées au genre *Retama* tribu des *Genistae* sont affiliées au genre *Bradyrhizobium*. On en déduit, que les informations caractérisant l'ADNr 16S ne permettent pas de préciser la position taxonomique des espèces isolées jusqu'à l'espèce.

2. Analyse de séquences multilocus de BNL isolées des nodosités des racines de différents genres de fabaceae (*Lotus*, *Argyrolobium* et *Medicago* au Sénégal et en Tunisie. (Merabet et al. 2010)

Dans cette étude, l'analyse MLSA a été réalisée neuf souches de nodules racinaires isolées de plusieurs légumineuses en Tunisie (*Argyrolobium uniflorum*, *Lotus creticus*, *Medicago sativa*) et au Sénégal (*Lotus arabicus*).

2.1. Méthodologie adoptée

Les isolats obtenus des racines des plantes hôtes d'origine ont fait l'objet de test de nodulation (*Argyrolobium uniflorum*, *Lotus creticus*, *Lotus arabicus* et *Medicago sativa*). A la suite de ce test, ces isolats (09) ont pu noduler les quatre espèces étudiées. En plus de l'ADNr 16S, les souches ont été caractérisées par des tests auxanographiques API 100, la spécificité de l'hôte ainsi que l'analyse de la séquence du gène nodA.

2.2. Résultats obtenus

L'arbre phylogénétique du gène d'ARNr 16S construit (figure 14) a permis de faire ressortir 03 clusters avec des valeurs bootstrap allant de 77 à 97 %. Les souches inconnues sont affiliées à 03 espèces de *E. meliloti* (cluster A avec 97%), *E. teranguae* (cluster C avec 85%) et *E. adhaerens* avec seulement 77 %. Après les tests biochimiques API100 et l'analyse de la séquence du gène nod A ont suggéré de nouvelles espèces à confirmer ultérieurement par une hybridation ADN-ADN.

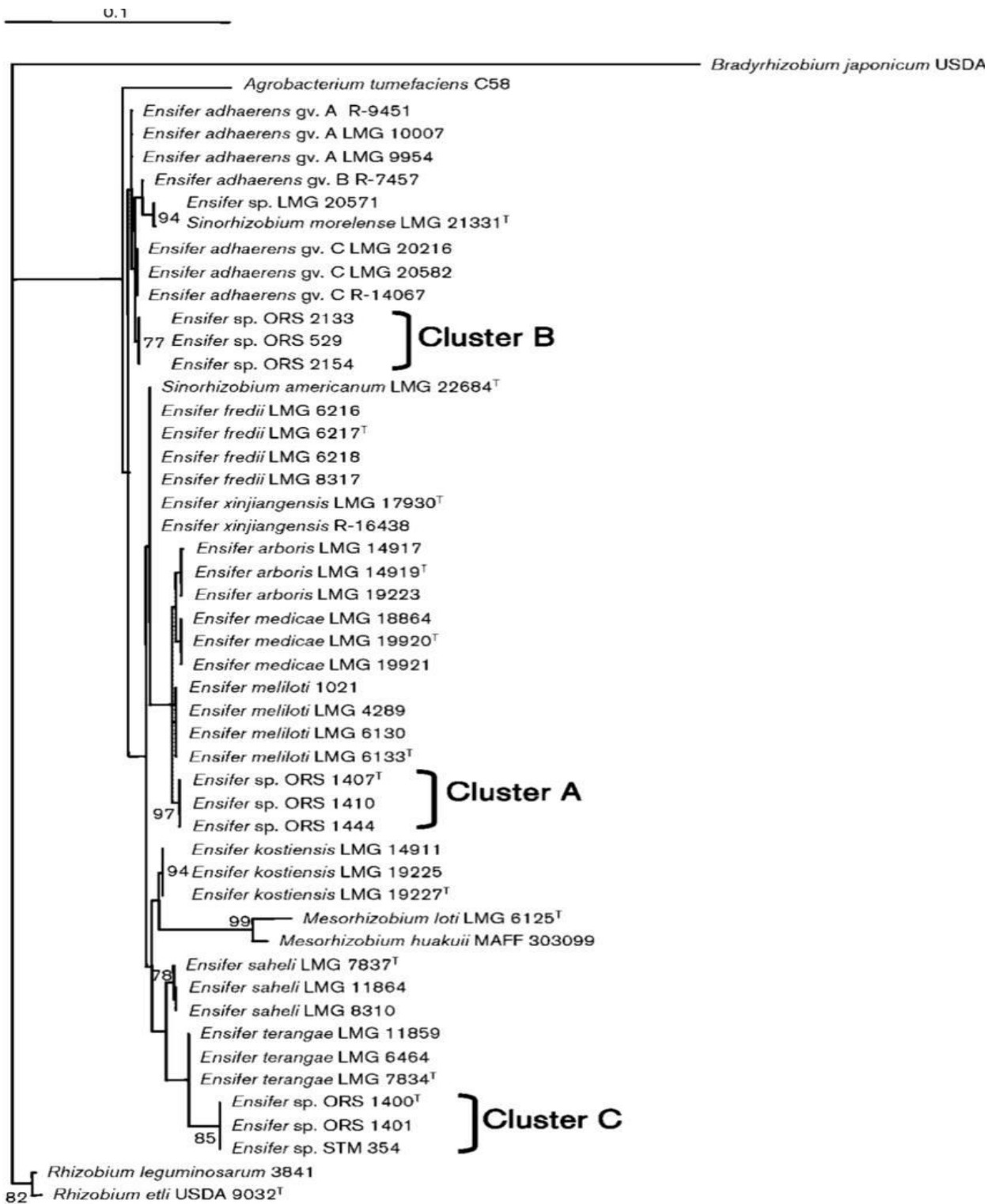


Figure 14. Reconstruction phylogénétique basée sur l'analyse individuelle du gène de l'ARNr 16S.

2.3. Conclusion

Dans ce travail, il a été confirmé que seul le marqueur génétique ARN16S à lui seul ne suffit pas à déterminer les positions taxonomiques infra genre. Malgré l'utilisation du gène nod A et l'api100 comme complémentaire, l'auteur a fini par suggérer l'utilisation du test d'hybridation ADN-ADN pour préciser l'appartenance exacte des nouvelles souches.

3. Etude de la diversité moléculaire des souches de BNL associées à la légumineuse spontanée *G.saharae* du Sahara septentrional est Algerien (Chaich, 2018)

Cinquante-sept souches ont été isolés à partir de nodules associées aux racines de *G.saharae* légumineuse arbustives spontanées dans le Sahara septentrional est d'Algérie.

3.1. Méthodologie adoptée

L'ensemble des isolats obtenus des racines de *G.saharae* (plante hôte d'origine) ont fait l'objet de test de nodulation et ont eu une réponse positive sur la même plante hôte (*G.saharae*) sous conditions contrôlées.

En résumé, l'étude réalisée consiste à l'extraction de l'ADN par la méthode (Chen *et al.*, 1993) et à l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S et ainsi que les gènes de ménage (*recA* et *atpD*).

Pour l'amplification et le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S ; le mélange réactionnel pour la PCR est identique à celui utilisé pour les gènes *recA* et *atpD* sauf, bien entendu, pour les amorces utilisées qui sont celles proposées par Wawrik *et al.* (2005). Avec un cycle identique à celui appliqué pour l'amplification du gène *atpD*, concernant l'amplification, purification visualisation et séquençage sont les mêmes pour les gènes de ménage (*recA* et *atpD*).

Les phylogénies ont été construites à l'aide du logiciel Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011) avec les méthodes suivantes :

- Pour les gènes *recA* et *atpD* : méthode du maximum de vraisemblance avec le modèle d'évolution GTR qui évalue le meilleur arbre en termes de probabilité, en tenant compte d'un modèle d'évolution moléculaire sous-jacent à nos données.

- Pour l'ADN ribosomal 16S : méthode de Neighbour-Joining selon le modèle Kimura à deux Paramètres.
- Une phylogénie bayésienne a, également, été produite à partir du concaténât des alignements des différents gènes de ménage (recA et atpD).

Pour l'estimation de la robustesse des nœuds il a été choisi l'analyse par ré-échantillonnage bootstrap à 1000 répliques pour tous les arbres construits.

3.2. Résultats obtenus

Les analyses phylogénétiques des souches a permis de mettre en évidence une grande diversité génétique des 57 souches de BNL associées à *G.saharae* et ont apporté une précision majeure sur la position taxonomique des souches, qui jusque-là, restait méconnue. Les arbres phylogénétiques construits avec différents marqueurs génétiques (gènes de ménage atpD et recA; gène ribosomiques de l'ARN 16S) ont été tous congruents avec robustesse. Ainsi, la caractérisation moléculaire de 57 souches a permis leur affiliation à trois groupes phylogénétiques distincts: *Neorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium*. Dans leur majorité (plus de 80%), 46 souches appartiennent à *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) et ont été identifiées à *E. meliloti* LMG6133^T.

Cela confirme et apporte plus de précisions aussi le résultat de Mahdhi (2007) a l'affiliation des souches de BNL concernant les *Ensifer* dans le Sahara Tunisien.

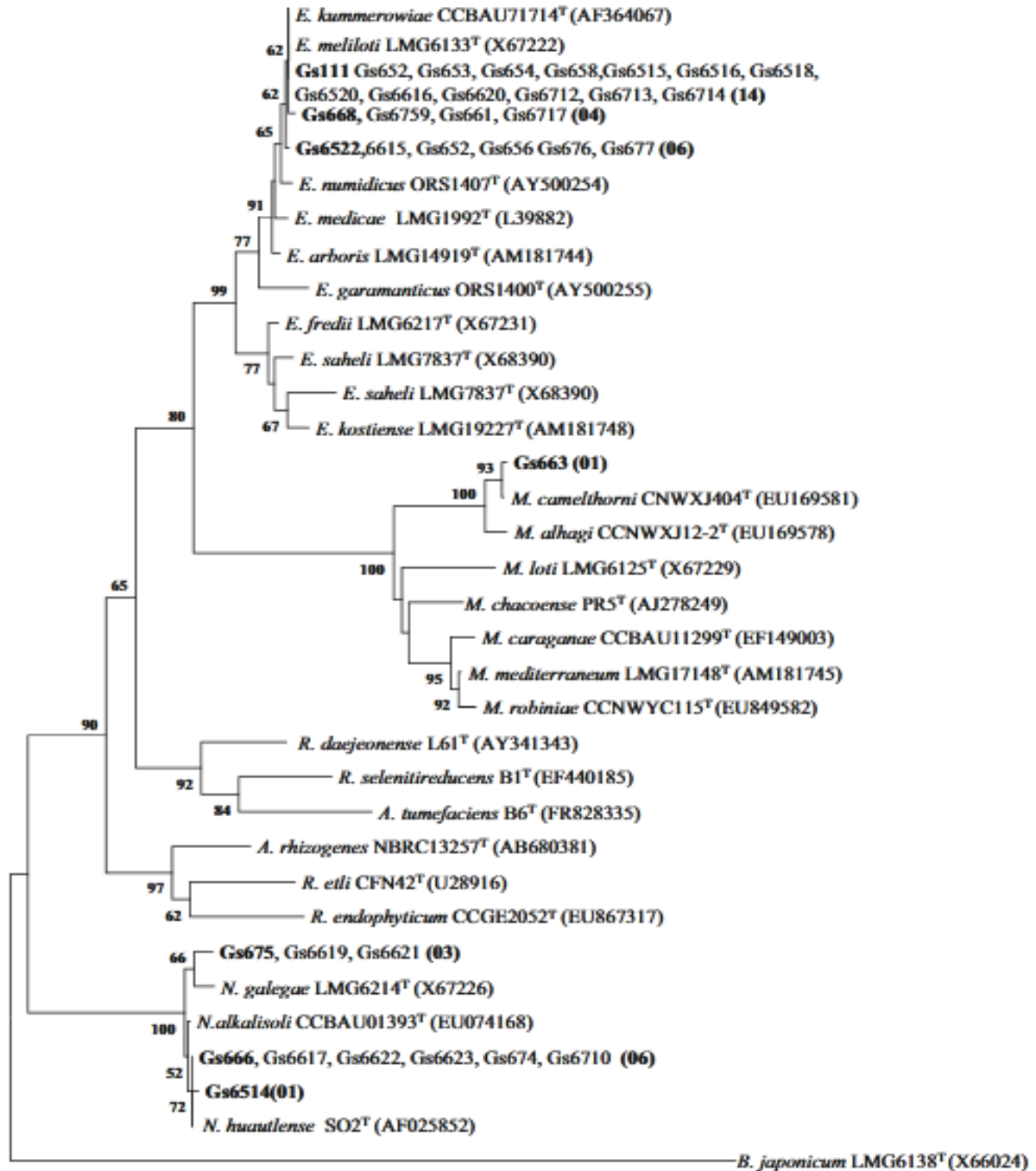


Figure 15. Arbre phylogénétique Neighbour-joining phylogenetic base sur les gènes ARNr 16S. L'analyse faite sur 1298 bp montre la relation entre les souches associées à *Genista saharae* et les souches types. La signifiante de chaque branche est indiquée par une valeur bootstrap ($\geq 50\%$) calculée pour 1000 subsets. Le nombre entre parenthèses représente le nombre de souches dans chaque génoespèce définie dans la présente étude. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions de nucléotides par 100 nucléotides.

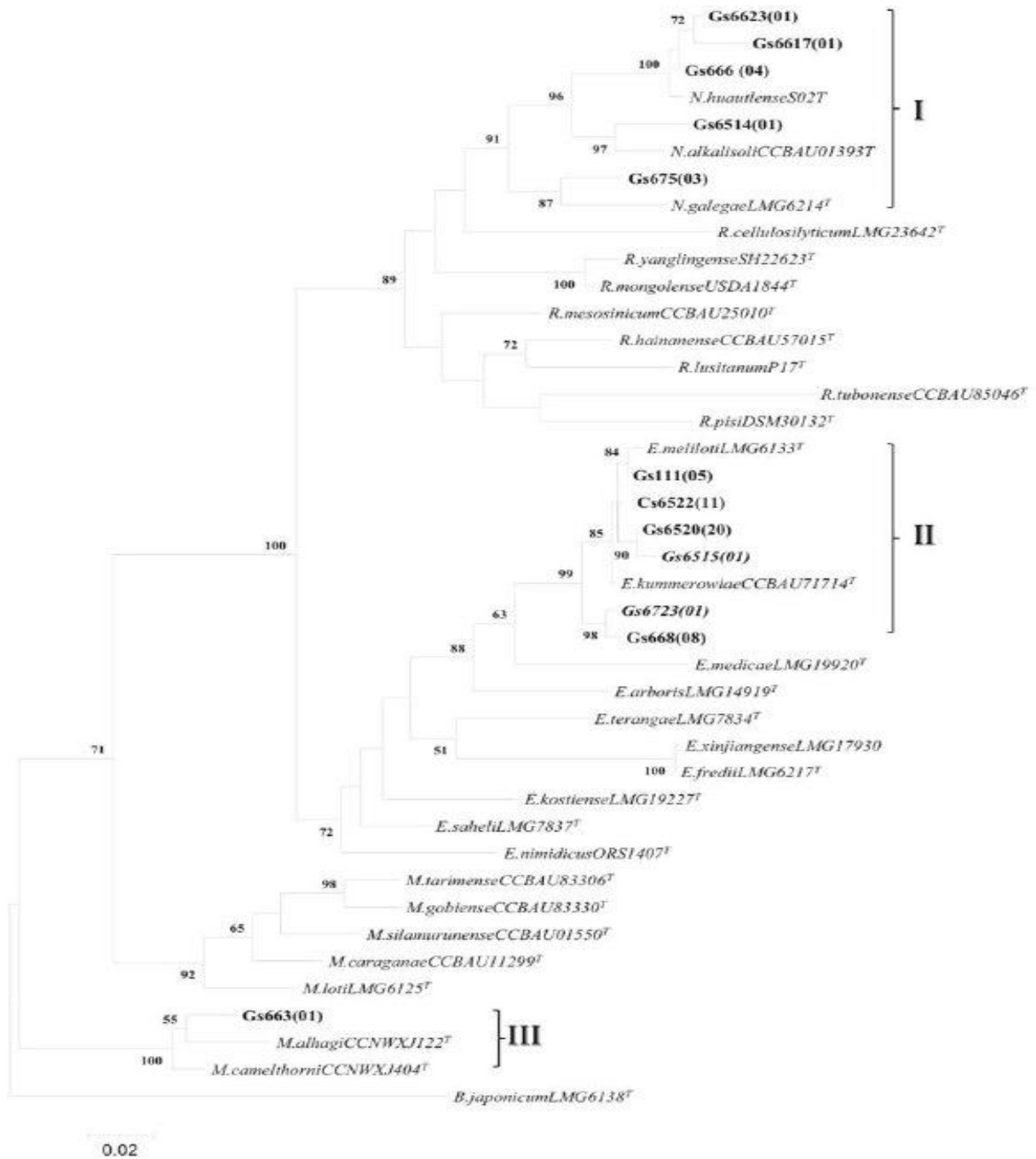


Figure 16. Arbre phylogenetique Maximum-likelihood basé sur les séquences partielles des gènes de ménage atpD et recA concatenés. L'analyse faite sur 684 bp montre la relation entre les souches associées à *Genista saharae* et les souches types. La signifiante de chaque branche est indiquée par une valeur bootstrap ($\geq 50\%$) calculée pour 1000 subsets. Le nombre entre parenthèses représente le nombre de souches dans chaque genospecies définie dans la présente étude. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions de nucléotides par 100 nucléotides.

3.3. Conclusion

Selon les études de Chaïche on conclut que au niveau des rhizosphères de l'espèces de fabacée étudiée *G.saharae* les BNL ont une capacité et spécificité d'établir une association symbiotique fixatrice d'azote.

Selon le même auteur ; les espèces de la tribu des *Genistae* sont connues pour être associées aux *Bradyrhizobiums* en Europe (Fernando et Jésus, 1998; Kalita et Malek, 2004;Rivas et al, 2009) et même au nord d'Algérie (Boulila, 2009).

L'approche génétique MLSA utilisée dans l'étude de Chaich a permis de mettre en évidence une grande diversité génétique des souches de BNL, associées à *G.saharae*. Elle a permis une précision majeure sur la position taxonomique des souches, qui, étaient méconnue.

4. Etude de la diversité moléculaire des souches BNL associés à *Vicia sativa* dans la province du Shanxi au nord de la Chine (2021).

Trois souches de rhizobium à croissance rapide ont été isolées à partir de nodules frais collectés sur des racines de légumineuses de *Vicia sativa L* dans le nord-ouest de la Chine. Ce travail a permis, grâce à la technique MLSA d'identifier une nouvelle espèce au sein du genre *Rhizobium*.

4.1 Méthodologie adoptée

Dans la présente étude, la souche à identifier a été isolée à partir d'un nodule racinaire de *Vicia sativa L* espèce cultivée de la famille *Fabaceae*, reinoculées les 03 souches isolées ont donné un résultat positif car elles ont nodulé la plante hôte d'origine (*Vicia sativa*) et même d'autres espèces de *Fabaceae* (*Vicia villosa* et *Pisum sativum*).

Les isolats ont été caractérisés par une approche phylogénétique. Les mêmes marqueurs génétiques (ARNr 16S et gènes de ménage *recA* et *atpD*) ainsi que le même protocole de Chaich (2018) ont été suivi pour aboutir à la construction des arbres phylogenetiques.

4.2 Résultats obtenus

L'arbre phylogénétique basé sur des séquences partielles de gènes d'ARNr 16S (figure 17), a fait ressortir que les 03 souches sont regroupées avec les souches types (*R.sophorae* CCBAU 03386^T, *R.legumi nosarum* USDA 2370^T (=LMG 14904^T), *R.indigoferae* CCBAU 71042^T, *R.laguerreae* FB206^T, *R.hidalgonense* FH14^T, *R.acidisoli* LMG 28672^T, *R.indicum*, *R.ruizarguesonis* UPM1133^T et *R.anhuiense* CCBA 23252^T). Le cluster forme avec les souches types étaient identique avec une valeur de similitude de 99,8 % avec les 03 souches nouvelle *Rhizobium changzhiense* WYCCWR 11279^T indiquant que cette souche appartient bien au genre *Rhizobium*.

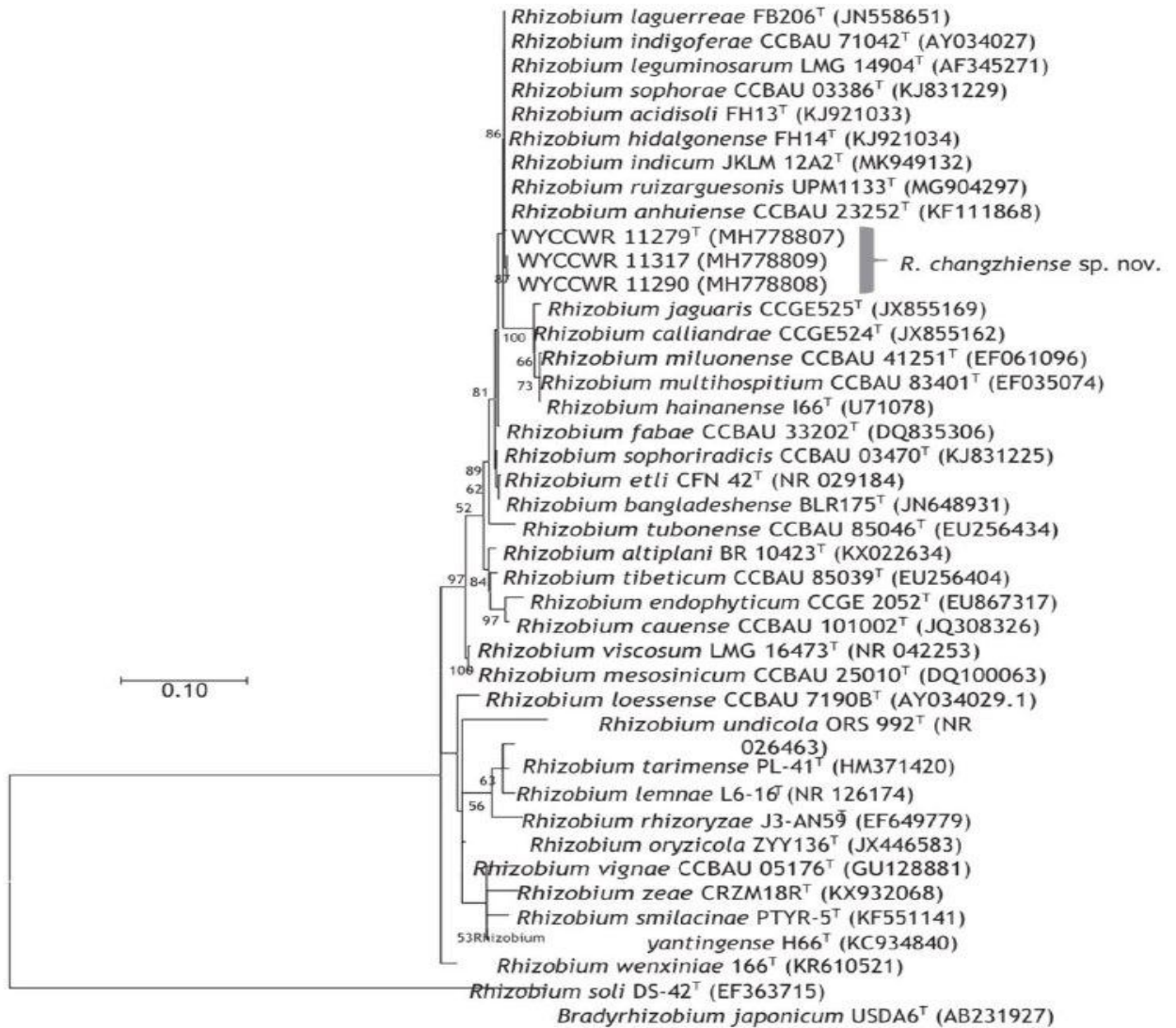


Figure 17. Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale des séquences du gène de l'ARNr 16S montrant les relations des rhizobiums isolés de *Vicia sativa* dans le nord de la Chine. L'arbre a été reconstruit à l'aide du modèle T92+G+I. Des niveaux de confiance bootstrap > 50% sont indiqués aux entre-nœuds. *B. japonicum* USDA 6T a été pris comme groupe externe. Les numéros d'accession des séquences sont présentés entre parenthèses. La barre d'échelle représente 0,1 substitution de nucléotide.

L'utilisation des gènes de ménage a permis d'aller à la détermination précise à l'échelle espèce. En effet, le cluster formé par les 03 souches étudiées (figure 18) avait une valeur de bootstrap de 100 % indiquant clairement qu'il s'agit de nouvelles souches qui ont été identifiées appartenant à l'espèce nouvelle *R. changzhiense* WYCCWR 11279^T.

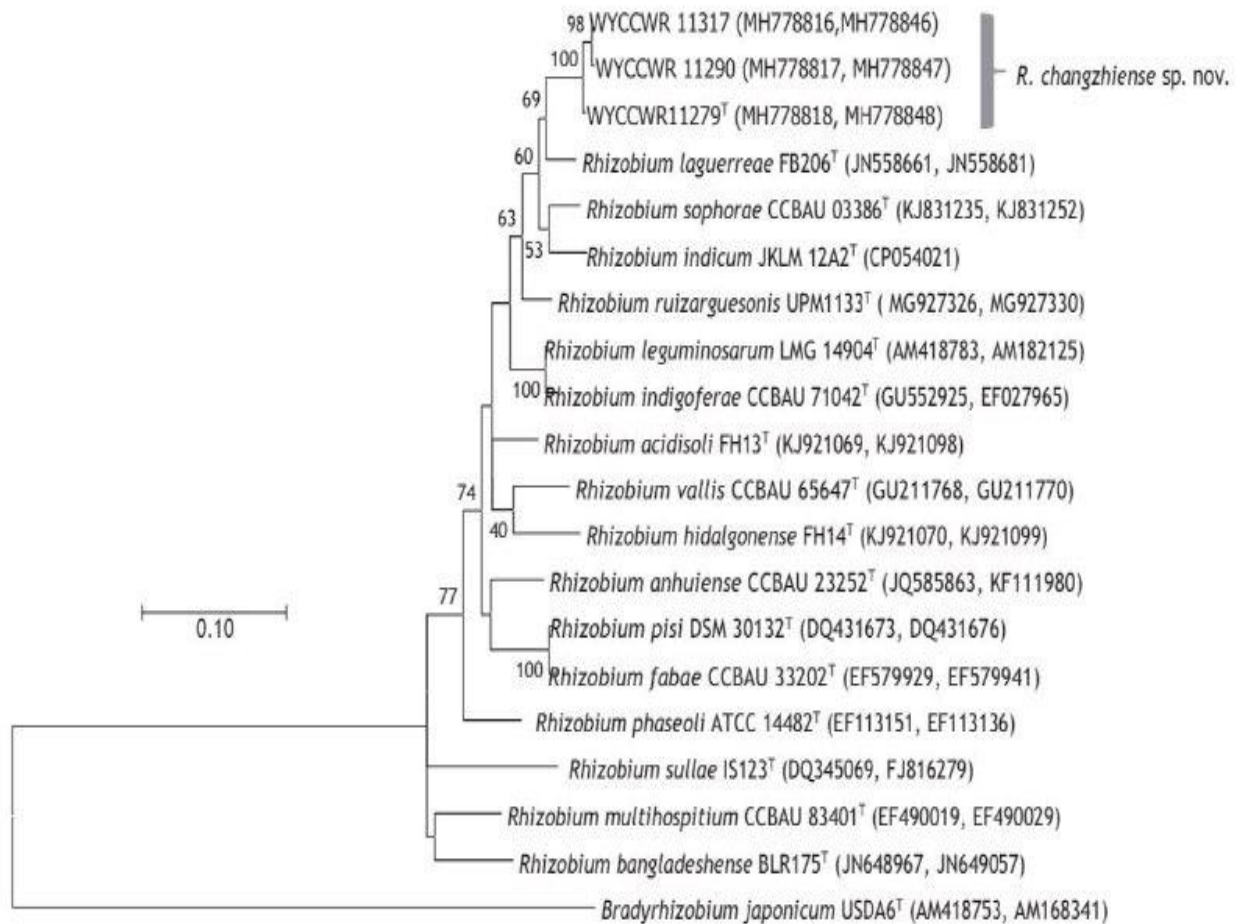


Figure 18. Arbre phylogénétique à vraisemblance maximale basé sur des séquences de gènes *atpD-recA* concaténées montrant les relations entre les rhizobiums isolés de *Vicia sativa* dans le nord de la Chine. L'arbre a été reconstruit à l'aide du modèle T92+G+I. Des niveaux de confiance bootstrap > 50% sont indiqués aux entre-nœuds. *B. japonicum* USDA 6T a été pris comme groupe externe. Les numéros d'accèsion des séquences sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente 0,1 substitution de nucléotide.

4.3 Conclusion

Ce travail confirme les résultats issus de celui de Chaich, concluant que la séquence du gène de l'ARNr 16S permet d'identifier le genre, et les gènes de ménage *recA* et *atpD* précisent la position taxonomique à l'échelle de l'espèce.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion

Il existe un grand nombre des techniques utilisant l'outil de biologie moléculaire pour l'étude de la diversité des populations bactériennes. La technique utilisée dépendra du but de l'étude, du budget, des habitudes du laboratoire, de la complexité de la population étudiée et du temps disponible. Même si les profils automatisés sont les plus faciles à comparer et reproduire, ils ne permettent pas un déséquencage ultérieur. La plupart des études actuelles utilisent et comparent plusieurs méthodes.

De plus, l'approche MLSA s'est avérée être une méthode très fiable à préconiser pour utilisation dans les études de la diversité biologique, permettant d'offrir la position taxonomique à l'échelle espèce de l'ensemble des BNL en vue de dresser la liste totale et leurs affiliation.

Les résultats obtenus au cours des quatre travaux présentés dans ce mémoire, viennent confirmer que les informations caractérisant l'ADNr 16S ne permettent pas de préciser la position taxonomique des espèces isolées jusqu'à l'échelle infra genre (espèce).

Le passage en revue des travaux effectués cette dernière décennie, la technique moléculaire dite MLSA semble être efficace et déterminante, d'autant qu'elle est très utilisée dans l'étude des souches de BNL associées aux différents genres de la famille des *Fabaceae*. En effet, les marqueurs ribosomiques de l'ARN 16S peuvent déterminer le rang taxonomique au niveau genre. Les gènes de ménage *atpD* et *recA* et/ou leur concaténation, quant à eux, permettent aisément à aller à l'échelle espèce.

On peut conclure aussi que cette technique constitue une méthode adéquate à suivre dans l'étude des associations symbiotiques rhizobium dans les milieux vierges ou extrêmes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Amrani S, Noureddine NE, Bhatnagar T, Argandoña M, Nieto JJ, Vargas C (2010) Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. *Syst Appl Microbiol* 33:44–51. doi:10.1016/j.syapm.2009.09.003
- Baele, M., Baele, P., Vaneechoutte, M., Storms, V., Butaye, P., Devriese, LA, Verschraegen, G., Gillis, M. & Haesebrouck, F.(2000). Application de la PCR de l'espaceur intergénique d'ARNt pour l'identification des espèces d'*Enterococcus*. *J Clin Microbiol* 38, 4201–4207.
- Berrada H, Nouioui I, Iraqui Houssaini M, El Ghachtouli N, Gtari M, Fikri Benbrahim K (2012) Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco. *Afr J Microbiol Res* 6:5314–5324. doi:10.5897/AJMR11.1505
- Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, Touraine B, Normand P, Cleyet-Marel JC (2000) Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can J Microbiol* 46:229–236. doi:10.1139/cjm-46-3-229
- Boulila Faridaa, (2009) Depret Géraldine b,c, Boulila Abdelghania, Belhadi Djellalia, Benallaoua Saida, Laguerre Gise`le d,e,f,g,h, Retama species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus *Systematic and Applied Microbiology* 32 245–255. Brockwell J, Searle SD, Jeavons AC, Waayers M (2005) Nitrogen fixation in Acacias: an untapped resource for sustainable plantations, farm forestry and land reclamation. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra
- BOUKAOUS Leyla (2020). Mise en évidence des Bactéries Nodulantes des Légumineuses chez la plante *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans différents écosystèmes de l'Algérie. Université Frères Mentouri Constantine 1.
- Chaïch K., Bekki, A., Bouras N., Holtz M. D., Soussou S. Mauré L., Brunel B., de Lajudie P., Cleyet-Marel J.C. (2017). Rhizobial diversity associated with the spontaneous legume *Genista saharae* in the northeastern Algerian Sahara. *symbiosis*. 71: 111–120 doi:10.1007/s13199-016-0414-y
- Chaïche. K (2018) Diversité des associations Rhizobium-Légumineuses de quelques espèces spontanées du Sahara septentrional. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah Ouargla
- Chen WP, Kuo TT (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21: 2260. doi:10.1093/nar/21.9.2260
- Chen WM, Zhu WF, Bontemps C, Young JPW, Wei GH (2011) *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:574–579. doi:10.1099/ijs.0.022947-0

- Cox MM (2003) The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu Rev Microbiol* 57:551–577. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.09095
- Dalila MOUSSA SASSI (2011). Caractérisation moléculaire (PCR-RFLP) des souches de rhizobiums associées à *Acacia saligna*. MEMOIRE DE MAGISTER. UNIVERSITE D'ORAN ES-SENIA.
- de Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., ... 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(4), 715-733. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-715>
- DEKKICHE SAMIA (2018). Diversités taxonomique et moléculaire des rhizobiums nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum*L.), dans l'Est Algérien. Thèse de Doctorat. Université Frères Mentouri Constantine.
- Farris, JS, Kaëllersjö , M., Kluge, AG & Bult, C. (1995). Construire un test designification pour l'incongruence. *Syst Biol* 44, 570–572.
- Fatou DIOUF (2015). Etude de l'adaptation des souches de *Mesorhizobium* d'*Acacia seyal* Del. et d'*Acacia senegal* (L.) Willd. à la salinité : Diversité génétique, génomique et variabilité des mécanismes de réponse au stress salin. Thèse doctorat, Univ. Cheikh Anta Diop, Dakar. 225 : 10-12
- Ferchichi, A. (1996). La lutte contre l'ensablement et pour la stabilisation des dunes : essai de la fixation biologique des dunes en Tunisie présaharienne. Recherche sur la désertification dans la Jeffara.
- Fernando GA, Jesus M (1998) Biodiversity of rhizobia nodulating *Genista monspessulana* and *Genista linifolia* in Spain. *N Z J Agric Res* 41:585–594. doi:10.1080/00288233.1998.9513342
- G.EORGE, M. G.ARRITY, K.RISTEN L. J.OHNSON, J.ULIA, B.ELL AND D.ENISE, B.S EARLES (2002). Taxonomic Outline of the Prokaryotes *Bergey's Manual™ of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilps SA, Young JP (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:2037–2048. doi:10.1099/00207713-51-6-2037
- Ghosh W, Roy P (2006) *Mesorhizobium thioganicum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:91–97. doi:10.1099/ijs.0.63967-0
- Junjie Zhang,, Shanshan Peng, Mitchell Andrews , Chunzeng Liu, Yimin Shang, Shuo Li, Dong Wang et Xiaoxia Zhang,(2021) , *Rhizobium changzhiense* sp. nov., isolé de nodules efficaces de *Vicia sativa* L. dans le nord de la Chine, *Int. J. Syst. Évol. Microbiol*

- Kalita M, Malek W (2004) Phenotypic and genomic characteristics of Rhizobia isolated from *Genista tinctoria* root nodules. *Syst Appl Microbiol* 27:707–715
- Karanja NK, Wood M (1988) Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: infectiveness and tolerance of acidity and aluminium. *Plant Soil* 112:7–13. doi:10. 1007/BF02181746
- Mahdhi M, Nzoué A, Gueye F, Merabet C, de Lajudie P, Mars M (2007) Phenotypic and genotypic diversity of *Genista saharae* microsymbionts from the infra-arid region of Tunisia. *Lett Appl Microbiol* 45:604–609. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02233.x
- Malick MBENGUE (2010). Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires du LysM-RLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Medicago truncatula*. Thèse de Doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Marie-Mathilde PERRINEAU (2011) Variations géographiques et temporelles de la diversité des bactéries symbiotiques associées à *Acacia mangium*: zone d'origine, zones d'introduction et inoculation contrôlée. Thèse de Doctorat. UNIVERSITE MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC.
- Marmur, J. (1961). Une procédure pour l'isolement de l'acidedésoxyribonucléique à partir de micro-organismes. *J Mol Biol* 3, 208–218.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. & Willems, A.(2008). Avantages de l'analyse de séquences multilocus pour les études taxonomiques: une étude de cas utilisant 10 gènes domestiques du genre *Ensifer* (y compris l'ancien *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 200–214.
- Merabet, (2010). M. Martens, M. Mahdhi, F. Zakhia, A. Sy, C. Le Roux, O. Domergue, R. Coopman, A. Bekki, M. Mars, A. Willems 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
- PRESCOTT. HARLEY. KLEIN MICROBIOLOGIE. 2 éditions françaises. Traduction de la 5^e édition américaine par Claire Michelle Bacq-Calberg et Jean Dusart. de boeck.
- Posada, D. & Crandall, KA (1998). MODELTEST : test du modèle de substitution d'ADN. *Bioinformatique* 14, 817–818.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). La méthode de jonction par voisins : une nouvelle méthode pour reconstruire des arbres phylogénétiques. *Mol Biol Évol* 4, 406–425.
- Saoudi Mouna (2017). Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries nodulant la légumineuse du genre *Phaseolus*. UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI-CONSTANTINE.

- Swofford, DL (2002). PAUP* : Analyse phylogénétique utilisant la parcimonie (et d'autres méthodes), version 4. Sunderland, MA : Sinauer Associates
- Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, DG (1997). L'interface de fenêtres CLUSTAL_X : stratégies flexibles pour l'alignement des séquences multiples aidées par des outils d'analyse de qualité. *Acides nucléiques Res* 25, 4876–4882.
- Udvardi M, Poole PS (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* 64:781–785. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120235.
- Vincent JM (1970) A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook 15.
- VIDAL Céline. (2008). Etude taxonomique, phylogénétique et génétique des bactéries symbiotes des légumineuses métallophiles adaptées aux sites contaminés par le zinc et le cadmium. Thèse de Doctorat. UNIVERSITE MONTPELLIER II
- Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P. & Gillis, M. (2001). Etude d'hybridation ADN-ADN de souches de *Bradyrhizobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1315–1322
- Xavier BAILLY (2006) Recombinaison, spécialisation et spéciation chez les symbiotes du genre *Sinorhizobium* associés aux plantes du genre *Medicago* : des patrons de diversité aux hypothèses évolutives. Thèse de Doctorat. Université MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC.
- Zahran HH (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:968–89
- Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Dreyfus, B. & de Lajudie, P. (2006). Diverses bactéries associées aux nodules racinaires de légumineuses spontanées en Tunisie et premier signalement du gène de type *nifH* dans les genres *Microbacterium* et *Starkeya*. *Microb Ecol* 51, 375–393.
- Zakhia, F. (2004). Diversité des bactéries hôtes de légumineuses méditerranéennes en Tunisie et au Liban. Thèse de doctorat, Université de Montpellier, France (en français).
- Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.-C., Gillis, M., Dreyfus, B. & de Lajudie, P. (2004). Caractérisation des bactéries nodulatrices des légumineuses sauvages (LNB) dans la zone infra-aride de la Tunisie.

Résumé

Le présent travail consiste à passer en revue les différentes techniques moléculaires utilisées, actuellement, à travers le monde, pour l'étude de la diversité moléculaire des Bactéries Nodulantes Légumineuses (BNL) associées aux différentes espèces et genre de la famille de *Fabaceae*. Dans ce travail bibliographique, nous avons passé en revue l'évolution des techniques moléculaires durant cette dernière décennie, qui ont fait ressortir que la technique " Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) " semble être la plus utilisée et la mieux appropriée, aussi pour des considérations économiques. Cette technique se basant sur la phylogénie des gènes ARN 16S et des gènes de ménage s'est révélée la mieux appropriée vu la précision qu'elle donne sur la position taxonomique des BNL, et par conséquent, la plus utilisée. Après analyse critique de l'évolution (2009 à 2021) de l'utilisation des techniques moléculaire à travers le monde, ce modeste travail a permis de mettre le point sur l'importance du marqueur ARN16S dans la détermination des genres, alors que les gènes de ménage permettent de préciser la position taxonomique au niveau de l'espèce. En effet, l'étude de la diversité moléculaire des souches de BNL associées au genre *Retama* "tribu des *Genistae*", dans laquelle, ont été utilisés des marqueurs moléculaire de l'espace inter génique (IGS) du gène de l'ADNr 16S, même associées aux gènes symbiotiques *nifH* et *nodC*, n'a pas permis une différenciation génétique significative des populations de rhizobiums, et donc, seul genre *Bradyrhizobium* a pu être identifié comme BNL associées au genre *Retama* (tribu des *Genistae*) dans le nord d'Algérie. Par ailleurs, selon un autre travail étudiant la diversité moléculaire des souches de BNL isolées des nodosités des racines de différents genres de *Fabaceae* (*Argyrolobium uniflorum*, *Lotus creticus*, *Medicagosativa*) en Tunisie et (*Lotus arabicus*) au Sénégal, il s'avère que le gène ARNr 16S et le gène de nodulation *nodA* n'ont pas pu dépasser des clusters du genre *Ensifer*. Et la position taxonomique (*Ensifer meliloti*, *E. teranguae* et *E. adhaerens*) des espèces n'a été possible que grâce à l'hybridation ADN/ADN. Récemment, l'étude de la diversité moléculaire des souches de BNL associées aux quelques espèces spontanées à "tribu des *Genistae*" dans le Sahara d'Algérie, dans laquelle l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S additionnée des gènes de ménage (*recA* et *atpD*) a permis l'affiliation des souches isolées à l'échelle espèce, à savoir, *E. meliloti* LMG6133^T, *N. Galegae* LMG6214^T, *N. alikalisoli* et *M. camelthorni* CCNWXJ404^T (figure 15). De même et en utilisant les mêmes marqueurs (ARN 16S et gènes de ménage *recA* et *atpD*), un travail réalisé en Chine a permis d'identifier une nouvelle souche *R. changzhienze* WYCCWR 11279^T associée à la *Fabaceae* cultivée *Vicia sativa* L.

Mots clés : Diversité moléculaire, BNL, Fabaceae, MLSA, ARN16S, gènes de ménage.

Abstract

The following research consists of reviewing the different molecular techniques currently used around the world. For the study of molecular diversity of the nodulating Bacteria the legumes (BNL) are associated with the different species of genes of the *Fabaceae* family. In this bibliographical work, we have reviewed the evolution of molecular techniques over the past decade which have shown that the Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) technique seems to be the most widely used and the most appropriate for the economic considerations as well. This technique is based on the phylogeny of 16S rRNA and housekeeping genes proved to be the most appropriate according to the precision it gives on the taxonomic position of the BNL, therefore, the most used. After a critical analysis of the evolution (2009 to 2021) of the use of the molecular techniques around the world, this modest work helped to highlight the importance of the 16s RNA marker in the determination of genera. whereas the housekeeping genes make it possible to specify the taxonomic position at the level of species, in fact the study of molecular diversity of BNL strains associated with the *retama* genre (*Genistae* tribe), In which, molecular markers of the inter genic (IGS) species were used of 16S rDNA gene even associated with Symbiotic gene *nifH* and *nodC* did not permit for a significant genetic differentiation of Rhizobia population and, therefore, only *Bradyrhizobium* gene could be identified. As BNL associated with *Retama* genre (*Genistae* tribe) in northern Algeria. Furthermore, another work studying the molecular diversity of BNL strains isolated from root nodules of different genera *Fabaceae* (*Argyrolobium uniflorum*, *Lotus creticus*, *Medicago stavia*), in Tunisia and (*Lotus arabicus*) in Senegal. The 16S RNAr and the nodulation genes could not exceed clusters of the *Ensifer* genre. The taxonomic position (*Ensifer meliloti*, *E. Teranguae* and *E. adhaerens*) of the species was only possible through DNA/DNA hybridization. Recently, the study of the molecular diversity of BNL strains associated with the some spontaneous species (*Genistae* tribe) in the Algerian Sahara the phylogenetic analysis of sequences of the 16S RNAr genes plus of the housekeeping genes (*recA* and *atpD*) has allowed the affiliation isolated strains to the species scale, as follows. *E. Meliloti* LMG 6133^T, *N. Galegae* LMG 6214^T, *N. alikalisoli* and *M. camelthorni* CCNWXJ404^T (Figure 15). Similarly using the same markers, 16S RNA and *recA* et *atpD*) a work achieved in China has identified a new strain *R. Changzhienze* WYCCWR 11278^T associated with the cultivated *Fabaceae* *Vicia sativa* L.

Key words: molecular diversity, BNL, fabaceae, MLSA, 16S rRNA, housekeeping genes.

المخلص

ينصب هذا العمل على تقييم مختلف التقنيات الجزيئية - المستخدمة حاليا عبر أرجاء العالم - لدراسة التنوع الجزيئي لـ BNL، المرتبطة الأنواع والأجناس المختلفة لفصيلة البقوليات. حيث قمنا من خلال هذا العمل البيولوجي بمتابعة تطور التقنيات الجزيئية على مدار العقد الماضي، والتي بينت أن تقنية (MLSA) هي الأكثر شيوعا وملائمة، حتى بالنظر للاعتبارات الاقتصادية.

و هذه التقنية المستندة إلى تقسيم جينات الحمض النووي الريبوي (ARN) S16 والجينات المنزلية، أثبتت أنها الأنسب، نظرا للدقة التي تعطيها للوضع التصنيفي لـ BNL، فهي بالتالي الأكثر استخداما.

و بعد التحليل النقدي لتطور استخدام التقنيات الجزيئية في جميع أنحاء العالم (من سنة 2009 إلى غاية سنة 2021)، يمكننا هذا العمل المتواضع تبيان أهمية الكاشف الجزيئي ARN16S في تحديد الجنس، في حين أن الجينات المنزلية تجعل من الممكن تحديد الوضع التصنيفي على مستوى النوع.

في الواقع أن دراسة التنوع الجزيئي لسلاسل BNL المرتبطة بجنس *Retama* «قبيلة *Genistae*»، التي استعملت فيها الكواشف الجزيئية في الفضاء بين الجينات (IGS) من الجين 16S ARNr، حتى المرتبط منها بالجينات التكافلية *nifH* و *nodC*. الأمر الذي لم يسمح بالتمايز الجيني الكبير لفصائل الريزوبيا. وبالتالي فإنه يمكن فحسب تحديد جنس *Bradyrhizobium* على أنه BNL المرتبط بجنس *Retama* «قبيلة *Genistae*»، المتواجدة في شمال الجزائر.

بالإضافة إلى ذلك، فإنه وبحسب عمل بحثي آخر تناول التنوع الجزيئي لبراعم BNL المعزولة من العقيدات الجزرية لأجناس مختلفة من البقوليات (*Argyrolobium uniflorum*, *Lotus creticus*, *Medicagosativa*) في تونس و (*Lotus arabicus*) في السنغال، اتضح أن جين ARN16S والإيماءة العقدية *nodA* لا يمكن أن يتجاوز مجموعات من جنس *Ensifer*.

و لم يكن من الممكن وضع التصنيف (*Ensifer meliloti*, *E. teranguae* et *E. adhaerens*) للنوع إلا من خلال تهجين ADN/ADN. و في الأونة الأخيرة فإن دراسة التنوع الجزيئي للسلاسل BNL المرتبطة بالأنواع العفوية القليلة من قبيلة *Genistae* المتواجدة في الصحراء الجزائرية، من خلال التحليل الجيني لسلاسل من ARNr 16S بالإضافة إلى الجينات المنزلية (*recA* et *atpD*)، سمحت بانتماء السلاسل المعزولة إلى سلم النوع، و هي بالخصوص: *E. meliloti* LMG6133^T, *N. Galegae* LMG6214^T, *N. alikalisoli* et *M. camelthorni* CCNWXJ404^T.

وبالمثل، فإن استخدام نفس الكواشف ARN 16S الجينات المنزلية *recA* et *atpD* في عمل أنجز في الصين قد حدد سلالة جديدة من *R. changzhienze* WYCCWR 11279^T مرتبطة بالبقولية *Vicia sativa* L.

الكلمات المفتاحية : التنوع الجيني، BNL، البقوليات، MLSA، ARN16S، الجينات المنزلية.