

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf

*Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie*

Spécialité: Biotechnologie Végétale

THESE

Présentée par

SELAMI Nawel

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

**Etude des Associations Symbiotiques de *Retama monosperma* :
Approches Morphologique, Anatomique et Ultrastructurale,
Caractérisation Moléculaire des Isolats**

Thème

Soutenue le

devant la commission d'examen composée de :

M^r BOUDJEMAA	A. Professeur à l'USTOMB Oran	Président
M^{me} KAID-HARCHE	M. Professeur à l'USTOMB Oran	Encadreur
M^r TIMMERS	T. Directeur de Recherches à l'INRA de Toulouse-FRANCE	Examineur
M^{me} FORTAS	Z. Professeur à l'Université d' Es-sénia	Examinatrice
M^r DJABEUR	A. Professeur à l'USTOMB Oran	Examineur
M^r SABAOU	N. Professeur à ENS-Kouba Alger	Examineur

Année universitaire : 2014/2015

Remerciements

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur **Boudjema A.** qui m'a honoré de présider le jury.

Je remercie vivement Madame le Professeur **Fortas Z.** et Monsieur le Professeur **Djabeur** et tout autant Monsieur le Professeur **Sabaou N.** de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie Madame le Professeur **Kaid-Harche M.** pour m'avoir proposé ce sujet de thèse passionnant et avoir dirigé mon travail, je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche.

Un très grand merci à Monsieur le Docteur **Timmers T.** directeur de recherche au CNRS de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fourni d'excellentes conditions de travail au sein de son équipe à l'INRA et pour sa collaboration sur le tout le travail, pour son aide au fil de cette thèse dans l'interprétation et la mise en valeur des résultats obtenus.

Je remercie chaleureusement Madame le Docteur **Auriac M. C.** Ingénieur de recherche au CNRS de m'avoir aidé, guidé et assisté dans la partie de microscopie, et pour sa gentillesse et sa patience qu'elle a manifestée à mon égard durant mon stage à l'INRA de Toulouse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur **Catrice O.** Ingénieur de recherche pour son aide précieuse et son assistance technique dans la partie de Cytométrie en Flux, et je leur en suis très reconnaissante.

Je tiens à remercier vivement Madame le Docteur **Capela D.** chercheur au CNRS, pour sa disponibilité et pour son aide précieuse dans la partie de biologie moléculaire

Je dédie ce travail,

A la mémoire de mon **père** ;

Aux êtres les plus chères à mon cœur, ma **mère** et ma **sœur** ;

A Tous mes **collègues** qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute considération.

Résumé

R. monosperma est une légumineuse arbustive capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des bactéries du sol, Rhizobia. Cette interaction aboutit à la formation de nodules au niveau du système racinaire de la plante. Comme l'étude de l'interaction symbiotique entre *R. monosperma* et les Rhizobia n'a pas été largement étudiée et Compte tenu du rôle primordial que joue cette espèce dans la bio-fertilisation et la stabilisation des dunes mobiles, nous nous sommes proposés dans la présente thèse d'établir la première étude détaillée de la morphologie et l'anatomie des nodules de *R. monosperma*. En effet, des nodules sauvages collectés des dunes côtières d'Oran, ont fait l'objet d'une (i) étude anatomique et ultrastructurale par microscopie photonique et électronique ; (ii) analyse génétique des microsymbiotes basée sur les séquences de gènes ARNr 16S, *atpD*, *glnII* et *recA* ; (iii) Analyse de l'endoréduplication chez *R. monosperma* par cytométrie en flux. La caractérisation génétique des microsymbiotes de *R. monosperma* indique que ces bactéries sont taxonomiquement très proche voir identique aux microsymbiotes de *R. sphaerocarpa* récemment identifiés par Guerrouj *et al.* (2013) et nommée *Bradyrhizobium retamae*. L'étude anatomique et ultrastructurale révèle que les nodules de *R. monosperma* sont à croissance indéterminée, de type genistoïde. Le cordon d'infection typique de la majorité des légumineuses est absent dans les nodules de *R. monosperma* et la diffusion de l'infection est assurée par la division des cellules nouvellement infectées. La zone fixatrice d'azote est homogène aux cellules complètement infectées et le réseau de cellules non envahi commun à la plupart des légumineuses est absent. De plus, le taux d'endoréduplication indispensable pour la différenciation des bactéroïdes dans les nodules indéterminés est trop faible voir nul dans les nodules de *R. monosperma*. En outre, plusieurs bactéries bénéfiques comme *Methylobacterium* et *Pseudomonas koreensis* ont été isolées à partir de nodules racinaires de *R. monosperma*. Dans cette étude, les premiers stades du processus de colonisation par *Methylobacterium* sp et *P. koreensis*, sont visualisés conjointement au microscope photonique et électronique. Des résultats préliminaires, témoignent clairement que *P. koreensis* et *Methylobacterium* sp se comportent comme bactéries endophytes associatives qui peuvent nicher à l'intérieur des tissus de *R. monosperma*, sans lui induire de maladies symptomatiques.

Mots clés

Retama monosperma. Association symbiotique. Microscopie. *Bradyrhizobium*. Bactéries endophytes.

Abstract

Retama species play a central role for dune stabilization and re-vegetation and contribute to the bio-fertilization of semi-arid and arid ecosystems. The symbiotic interaction of *Retama* species with rhizobia remains largely unstudied. So the first detailed study of their anatomy and ultrastructure by light and electron microscopy showed that nodules of *R. monosperma* belong to the genistoid type of indeterminate nodules. Infection threads, typical for most nodules of legumes, are absent in nodules of *R. monosperma* and bacterial spread is associated with plant cell division. The nitrogen fixation zone is homogenous with only invaded cells and a network of non invaded cells found in many nodules, is absent. Moreover, endoreduplication does not take place in bacteroids in nodules of *R. monosperma*. The characterization of symbionts present in *R. monosperma* nodules based on 16S rRNA, *atpD*, *glnII* and *recA* genes sequence analysis indicated that these bacteria were taxonomically very close to the *Retama* symbionts recently identified (Guerrouj *et al.*, 2013) and named *Bradyrhizobium retamae*. Some beneficial bacteria as *Methylobacterium* and *pseudomonas koreensis* isolated from root nodules of *R. monosperma* can colonize epi- and endophytically this species. In this study, the early steps of the colonization process of *Methylobacterium* sp, was studied on *R. monosperma* roots to determine if this beneficial strain can colonize a non-natural host plant. Technique of light and electronic microscopy was used to visualize the colonization behavior of such bacteria. The results showed that 10 days after inoculation, the strain could colonize the root hair zone, root elongation zone, as well as root emergence sites by establishing different forms of bacterial structures. Further observations showed that the strain could be also entophytic inside the endorhiza of *R. monosperma*. These preliminary results allow us to suggest that *Methylobacterium* can establish populations as well as subpopulations on and inside *Retama* plants revealed by electron microscopy.

Keywords

Retama monosperma. Symbiotique Association. Microscopie. *Bradyrhizobium*. Endophytic bacteria.

ملخص

Retama monosperma هي شجيرة بقولية قادرة على التعايش مع بكتريا المثبتة للنيتروجين , الريزوبيا. نتيجة هذا التفاعل هو تشكيل عقد بكتيرية على جذور النبتة. ونظرا للدور الرائد لهذا التعايش في تثبيت الكنثان أمتنقلة و خاصة في التخصيب البيولوجي لتربة, اقترحنا في هذه الأطروحة الدراسة التفصيلية الأولى في تشريح العقيدات بكتيرية ل *R. monosperma*.

جمعت العقيدات البرية من الكنثان الساحلية في وهران، وكانت موضوعا لدراسة تشريحية وتركيبية باستعمال المجهر الضوئي والإلكتروني. التحليل الجيني للبكتيريا على أساس تسلسل ARN 16 S، والجينات *atpD* ، *glnII* و *Reca* .

التوصيف الوراثي للبكتيريا المتعايشة مع *R. monosperma* يشير إلى أن هذه البكتيريا هي تصنيفيا مطابقة للبكتيريا المتعايشة مع *R. sphaerocarpa* ، التي تم تحديدها مؤخرا من قبل *Guerouj et al. (2013)* والتي تم تسميتها *Bradyrhizobium retamea* وتكشف الدراسة التشريحية والتركيبية لعقيدات *R. monosperma* أن نموها غير محدود, من نوع *genistoide*. الحبل النموذجي المتواجد في معظم عقد البقوليات غائب في *R. monosperma* ونشر البكتيريا يتم بتقسيم الخلايا الحاملة للبكتيريا حديثا. منطقة تثبيت النيتروجين متكونة من خلايا متجانسة والخلايا خالية من البكتيريا و المتواجدة عند معظم البقوليات غائبة. وبالإضافة إلى ذلك، فإن معدل الإستنساخ الداخلي الضروري لتمييز البكتيري في العقد *R. monosperma* منخفض جدا. و من جهة أخرى تم إثبات تواجد بكتيريا مفيدة مثل *Methylobacterium* و *Pseudomonas koreensis* و التي تم عزلها من العقد . و بواسطة المجهر الضوئي والإلكتروني. تشير الملاحظات أنه بعد 10 أيام من التلقيح بأن هذه البكتيريا تتصرف كجمعيات بكتيرية يمكنها أن تنمو و تتكاثر داخل أنسجة *R. monosperma* دون التسبب لها في المرض.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	01
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. LA SYMBIOSE RHIZOBIA-LEGUMINEUSE	05
I.1 Les Légumineuses	
I.2 Les micro-organismes fixateurs d'azote atmosphérique	07
I.2.1 Les fixateurs symbiotiques d'azote	
I.3. Spécificité d'hôte	09
I.4. Etat d'avancement sur la Génomique des Rhizobia	
I.5. Mise en place de la symbiose Rhizobia-Légumineuse	10
I.5.1. La pré-infection	
1.5.2. L'infection	13
1.5.3. Le développement du nodule	15
I.6. Nouvelles avancées sur la symbiose Rhizobia-Légumineuse	18
II. INTERACTION BACTERIES ENDOPHYTES-PLANTE	20
II.1. Rhizosphère et bactéries rhizosphériques	
II.2.Importance des bactéries endophytes associatives	24
II.2.1.Capacité métabolique des endophytes associatives	
II.2.2.Détection des gènes <i>nif</i> et <i>fix</i> chez les endophytes associatives par PCR	25
II.2.3.Solubilisation des phosphates	
II.2.4.Production des phytohormones par des bactéries endophytes associatives	27
II.2.5.Bio-protection des plantes par des bactéries endophytes associatives	28

III. ETAT D'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES SUR LE GENRE <i>RETAMA</i> ET SES MICROSymbIOTES	
III.1. Les rétames	30
III.2. Description générale du genre <i>Retama</i>	31
III.2.1. Description de <i>Retama monosperma</i>	
III.3. Distribution géographique du genre <i>Retama</i> , en Algérie et dans le monde	33
III.4. Systématique du genre <i>Retama</i>	36
III.5. Importance écologique de <i>R. monosperma</i>	38
III.6. Importance pharmaceutique et économique	
III.7. Les rétames et substances naturelles	39
III.8. Etats d'avancement sur la connaissance des symbiotes associées au genre <i>Retama</i>	40

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

43

I. Position, Bioclimat et Description du Site de Prélèvement	
II. Matériel biologique	
III. Méthodes	
III.1. Prospection et étude morphologique des nodules et leur distribution	
III.2. Etude histologique des nodules	44
III.2.1. Microscopie photonique et électronique	
III.2.2 Microscopie à épifluorescence	45
IV. Analyse génétique des bactéries nodulant <i>R. monosperma</i>	46
V. Quantification de l'ADN par Cytométrie en Flux	
VI. Isolement des bactéries endophytes des nodules de <i>R. monosperma</i>	47
VI.1. Analyse génétique des isolats	48
VII. Conditions de germination des graines de <i>R. monosperma</i>	
VII.1. Stérilisation	

VII.2. Germination des graines	
VII.3. Système de culture des plantes de <i>R. monosperma</i>	
VII.4. Inoculation des plantes	
VIII. Etude histologique des racines de <i>R. monosperma</i> après inoculation	49
VIII .1. Microscopie photonique et électronique	

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION 50

I. Prospection, morphologie et répartition des nodules	
II. Analyse génétique des bactéries	51
III. Structure anatomique des nodules de <i>R. monosperma</i>	52
IV. Ultrastructure des tissus internes du nodule	54
V. Analyse de l'endoréduplication chez <i>R. monosperma</i>	56
VI. Identification des bactéries endophytes isolées des nodules de <i>R. monosperma</i>	67
VII. Observation microscopique du processus de la colonisation des racines de <i>R. monosperma</i> par <i>P. koreensis</i>	68
VIII. Observation microscopique du processus de la colonisation des racines de <i>R. monosperma</i> par <i>Methylobacterium</i> sp	71

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 75

ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

- Figure 1** : Photographie de diverses Légumineuses.
- Figure 2** : Phylogénie des Fabacées.
- Figure 3** : Les symbiontes bactériens au sein des protéobactéries.
- Figure 4** : Arbre phylogénétique de représentants des Rhizobia basée sur l'ARN 16S
- Figure 5** : Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses
- Figure 6** : Présentation simplifiée d'un facteur Nod.
- Figure 7** : Principales réponses observées dans les racines en réponse aux facteurs Nod.
- Figure 8** : Processus d'infection de la racine et mise en place du nodule chez *M. truncatula*.
- Figure 9** : Modes d'infection chez la Légumineuse semi-aquatique *Sesbania rostrata*
- Figure 10** : Relation entre les grands groupes de légumineuses et de leur temps d'évolution par rapport aux caractères de nodulation.
- Figure 11** : Morphologie de nodule de Légumineuse.
- Figure 12** : Représentation schématique des deux principaux types de développement nodulaire chez les Légumineuses.
- Figure 13**: Représentation schématique de différents nodules racinaires de type indéterminé.
- Figure 14** : La symbiose Rhizobia-Légumineuse : avec ou sans facteur Nod ?
- Figure 15** : comparaison Schématique entre le processus de nodulation dépendant au facteur Nod (NF-dépendent) et indépendant ((NF)-Independent).
- Figure 16** : Place du genre *Retama* dans la phylogénie des Fabacées.
- Figure 17**: **a.** *Retama raetam* (Forssk.) Webb, **b.** *Retama monosperma* (L.) Boiss., **c.** *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.
- Figure 18** : Photographie d'un arbuste de *R.monosperma*.
- Figure 19** : **a.** Photographie de la fleur papilionacée de *R. monosperma* ; **b.** Photographie du fruit.
- Figure 20** : Répartition géographique du genre *Retama* dans le bassin Méditerranéen.
- Figure 21** : Classification du genre *Retama*.
- Figure 22** : Les étapes hypothétiques illustrant l'origine des espèces du genre *Retama*.
- Figure 23** : Arbre Phylogénétique basée sur l'alignement de 569 bp de séquences de nucléotides de IGS entre les gènes 16S et 23S rRNA.
- Figure 24** : Arbre phylogénétique montrant le maximum de vraisemblance basée sur les séquences de gènes presque complets de 16S rRNA de *B. retamae* Ro19T et les espèces restantes de *Bradyrhizobium*
- Figure 25**: La rhizosphère.
- Figure 26** : Différents tissus du riz utilisés pour détecter la présence des bactéries endophytes.
- Figure 27**: Localisation de l'expression de *nifH::gusA* et *nif::gfp* bactérien, après 14 jours d'inoculation du riz avec *Azoarcus* sp.
- Figure 28** : Représentation Schématique de la solubilisation du phosphore dans sol par les rhizobactéries.
- Figure 29** : Station de prélèvement du matériel végétal (nodules de jeunes plants, graines et des échantillons de sol prélevés de la rhizosphère des touffes de *R. monosperma*).
- Figure 30** : Photographie du site d'échantillonnage à Cap-Falcon.
- Figure 31**: Photographie d'un jeune plants de *R. monosperma*
- Figure 32** : Morphologie générale des nodules racinaires de *R. monosperma* dans les conditions naturelles.
- Figure 34** : Section Semifine dans la zone apicale du nodule de *R. monosperma*
- Figure 35** : Sections Semifines de la région périphérique des nodules de *R. monosperma* montrant l'endoderme nodulaire sous excitation.
- Figure 36** : Niveaux de ploïdie des différents organes de *R. monosperma* et de bactéroïdes isolées de nodules tel que déterminé par cytométrie en flux.

Figure 37: Vérification des niveaux de ploïdie et de la quantité d'ADN par Cytométrie en Flux.

Figure 38: Photographie des colonies de souches de bactéries endophytes.

Figure 39: Effet bénéfique de l'inoculation par *P. koreensis* sur la croissance des jeunes plants de *R. monosperma*.

Figure 40: Colonisation intracellulaire des cellules du cortex externe par *P. koreensis*.

Figure 41 : Apparition de renflements à la base des racines latérales 10 jours après inoculation par *Methylobacterium*.

Tableau 1 : Récapitulatif de la répartition géographique du genre *Retama* dans le monde.

Tableau 2 : Noms chimiques de quelques alcaloïdes isolés de *R. monosperma*, *R. raetam*, *R. sphaerocarpa*.

Tableau 3 : Effet des souches PGPR sur la morphologie de la plante.

Tableau 4: PGPR utilisées comme agent de bio contrôle contre différents maladies pathogènes.

LISTE DES ABREVIATIONS

ARN : acide ribonucléique

GFP : protéine verte fluorescente d'*Aequoria victoriae* ("Green Fluorescent Protein")

GUS : β -glucuronidase d'*Escherichia coli* codée par le gène *uidA*

ADN : acide désoxyribonucléique

UV : ultraviolet

Tris : tris hydroxyméthyl aminométhane

dNTP: désoxyribonucléotide triphosphate

PCR Polymerase Chain Reaction

YEMA: Yeast Extract Mannitol Agar

EST : Expressed Sequence Tagged

ADNr : ADN dont la transcription donne lieu à l'ARN ribosomal

ARNr : ARN ribosomale

Go Taq : *Thermus aquaticus* (bactérie qui vit dans les sources chaudes)

°C : Degré Celsius

s : Seconde

% : Pourcentage

g : Gramme

Mg : Milligramme

M : Molaire

mM : Millimolaire

cm : Centimètre

mm : Millimètre

μ m : Micromètre

pb : Paire de base

kb : Kilo base

xg : l'accélération de la centrifugation

min : minutes

INTRODUCTION GENERALE

L'azote constitue une réserve inépuisable dans l'atmosphère qui contient 78% de N², alors que dans les sols, les quantités d'azote assimilable par les plantes sont faibles, ce qui constitue souvent un des principaux facteurs limitant les productions agricoles, comme tous les organismes eucaryotes, sont incapables d'utiliser l'azote moléculaire N². Seuls certains procaryotes, appelés fixateurs d'azote, sont capables de réduire l'azote moléculaire en ammoniacque assimilable par les plantes. Ils existent des fixateurs libres et des fixateurs symbiotiques tels que des bactéries appelées communément Rhizobia ou BNL «Bactéries Nodulant les Légumineuses» (Moulin, 2002), qui s'associent à la majorité des plantes de la famille des Légumineuses. Cette association symbiotique étroite Rhizobia-Légumineuse est un modèle d'interaction à bénéfice mutuelle étudié depuis plus d'un siècle (Hopkins, 2003), ainsi ces plantes, par leurs intérêts agronomique, alimentaire et écologique, se trouvent actuellement au centre des préoccupations des instances internationales. Leur importance est due entre autres à leur contribution, chaque année, à la fixation d'environ 65 millions de tonnes d'azote atmosphérique intégrés dans la biosphère (Graham et Vance, 2003). Nombreuses sont donc les investigations entrepris dans le domaine de la rhizobiologie cependant la compréhension de la spécificité des interactions entre les partenaires symbiotiques ainsi que leurs vaste diversité taxonomique reste à ce jour incomplète.

Les études dans le milieu méditerranéen ont été jusqu'à présent principalement focalisées sur les légumineuses cultivées et leurs symbiotes. Alors que Jusqu'à présent l'avancée de recherche dans la connaissance des BNL associées aux légumineuses spontanées est lente. Pourtant, par leur vaste répartition géographique dans le bassin Méditerranéen, ces plantes jouent un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols. Les écosystèmes méditerranéens sont sujets à l'effet des conditions climatiques particulières caractérisées par des précipitations rares ou irrégulières et par de longues périodes estivales sèches. Ces contraintes climatiques combinées avec une pression anthropique, conduisent généralement à une perturbation du couvert végétal couplée avec une érosion rapide des sols. En conséquence, une désertification progressive s'installe, se traduisant par un appauvrissement des sols en nutriments et en matière organique et par la perte ou la diminution de la densité et de l'activité microbienne du sol. Afin de pallier à ces problèmes et sauvegarder la fertilité des sols, plusieurs programmes de développement forestier ont été entrepris dans de nombreuses régions du monde.

L'utilisation des espèces arborescentes pionnières, adaptées aux aléas climatiques et pouvant s'installer sur les sols érodés, reste la solution la plus préconisée. Ainsi, certains pays

ont opté pour l'usage des arbres et arbustes appartenant à la famille de légumineuse (Nuti, 1989; Brewbaker *et al.*, 1990). Ces espèces ont le privilège d'assimiler biologiquement l'azote moléculaire à travers les relations qu'elles tissent avec des bactéries endophytes de la famille des *Rhizobiaceae* et /ou des bactéries dites endophytes associatives qui jouent des rôles importants dans l'amélioration de leur croissance *via* l'apport des phytohormones, la solubilisation et libération des éléments nutritifs tels les phosphates, ainsi que *via* leur rôle bioprotecteur contre des agents pathogènes (Gaur, 1990; Chaintreuil *et al.*, 2000; Baldani et Baldani, 2005; Li *et al.*, 2005). L'utilisation de légumineuses endémiques de l'Algérie pourrait contribuer à la restauration des terrains appauvris et dégradés. Le genre *Retama* fait partie de ces espèces à grand potentiel mais très peu utilisée dans notre pays. Toute fois, un programme de stabilisation, re-végétation et de bio-fertilisation est actuellement mis en place dans les régions semi-arides méditerranéennes, incluant un certain nombre d'espèces de plantes parmi les quelles les espèces de *Retama* en forme une majeure partie (Caravaca *et al.*, 2003b).

Le genre *Retama* appartient à la tribu des Genisteeae de la sous famille des Faboideés et contiennent trois espèces *Retama monosperma*, *R. raetam* et *R. sphaerocarpa* (Ozenda, 1977). Ces trois espèces sont endémiques des régions méditerranéen, largement reparti sous forme de peuplements spontanés dans les dunes côtières et désertiques ayant d'énormes intérêts socio-économiques et écologiques. Vu sa capacité de développer des stratégies d'adaptation morphologique, physiologique et biochimique vis à vis de différents degrés de contraintes hydriques et Par leur aptitude a établir des association avec les Rhizobia , les espèces du genre *Retama* constituent donc un élément important à prendre en compte pour introduire l'azote combiné dans les sols pauvres et arides et joue un rôle cruciale dans la formation des îles de fertilité "island of fertility" où peuvent se développer plusieurs espèces annuelles et d'autres espèces ligneuses (Pugnaire *et al.*, 1996). Cette association se caractérise par la formation de nodules au niveau des racines au sein du quel les Rhizobia réduisent l'azote atmosphérique. Dans cette interaction à bénéfice mutuelle, la plante fournit une niche protectrice et de l'énergie aux bactéries qui en échange synthétisent de l'ammoniac pour leur hôte. L'initiation de cette symbiose implique l'échange et la reconnaissance spécifique de signaux émis réciproquement entre la plante et la bactérie. Les facteurs Nod, signaux bactériens vers la plante, sont les plus étudiés. Ces composés ont en effet un rôle biologique très important, car ils déclenchent l'organogenèse du nodule et sont indispensables pour l'infection et la colonisation de la plante hôte.

Les premières investigations menées pour l'identification des bactéries nodulant spécifiquement le genre *Retama* indiquent que les microsymbiotes appartiennent au genre *Bradyrhizobium* (Boulila *et al.*, 2009; Rodríguez-Echeverría et Pérez-Fernández, 2003). Ce genre bactérien, classiquement associé à la grande majorité des légumineuses tropicales, est caractérisé par un large spectre d'hôtes qui lui permet de fixer efficacement l'azote dans les nodules de nombreuses espèces tropicales. Récemment, une étude détaillée de la diversité phylogénétique basée sur les séquences de gène ARN r 16S et les gènes de ménages *recA*, *atpD* et *glnII* isolées à partir de nodules de *R. sphaerocarpa* et *R. monosperma* qui proviennent respectivement d'Espagne et du Maroc, a permis la découverte d'une nouvelle espèce rhizobiale nommée *B. retamae* sp. Nov, (Guerrouj *et al.*, 2013).

Les études sur l'interaction symbiotique entre *R. monosperma* et *B. retamae* ont été jusqu'à présent limitée à la caractérisation génétique des microsymbiotes, alors que le mode de l'infection et de l'organogenèse des nodules n'a pas été décrit, et c'est dans ce contexte que s'intègre une partie de notre travail.

Du fait du potentiel environnementale de la symbiose Rhizobia et *R. monosperma*, basé sur ses propriétés engrais vert, l'objectif principale de ce travail de thèse a donc consisté à aborder la compréhension de la mise en place de cette interaction.

Dans le 1^{er} chapitre, la synthèse bibliographique s'articule en trois volets. En premier lieu, un état des connaissances générales sur la symbiose Rhizobia-Légumineuse ; Un deuxième volet a été consacré à une revue bibliographique sur les bactéries du sol pouvant vivre en tant qu'endophytes associatives avec diverses plantes ; Un accent particulier est ensuite porté sur l'état des connaissances sur le genre *Retama* et ses microsymbiotes.

Au cours de cette thèse, nous avons (i) caractérisé les bactéries associées à *R. monosperma* par une approche polyphasique selon des techniques génotypiques (séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, et séquençage des gènes de ménages), (ii) procédé à l'étude anatomique et ultra structurales des nodules pour déterminer leur compartimentation interne, (iii) Analysé l'endoréduplication chez *Retama monosperma* par cytométrie en flux.

Dans un autre axe de recherche, nous nous sommes intéressés à (i) l'isolement des bactéries endophytes associées au nodules de *R. monosperma* et l'examen de leur diversité via l'approche moléculaire basée sur le séquençage des segments de gènes ARN r 16S, (ii) visualiser conjointement au microscope photonique et électronique le comportement des bactéries endophytes vis-à-vis *R. monosperma* après inoculation.

Enfin, une conclusion générale reprend les principaux résultats et présente des perspectives de travaux complémentaires afin d'argumenter et de valoriser les hypothèses énoncées.

CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La Symbiose Rhizobia-Légumineuse

L'azote est le principal nutriment qui limite la croissance végétale, certaines plantes ont réussi à s'affranchir de cette limitation en établissant des relations symbiotiques avec des microorganismes, capables de fixer l'azote atmosphérique via un complexe enzymatique, la nitrogénase, un complexe enzymatique qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique en ions ammonium (NH_4^+) assimilables par la plante. Plusieurs symbioses fixatrices d'azote existent et sont classées en fonction des types de bactéries diazotrophes qu'elles impliquent: les cyanobactéries, *Frankia* et *Rhizobium*. Le sujet de cette thèse porte sur la symbiose fixatrice d'azote entre les plantes de la famille des Légumineuses et les bactéries appartenant au groupe des *Rhizobia*. Au cours de ces associations à bénéfice mutuelle, la plante fournit l'énergie, et le micro-organisme l'azote assimilable (NH_3) à partir de l'azote de l'air (N_2).

La symbiose entre les plantes de la famille des Légumineuses et les bactéries de la famille des *Rhizobia* est une des plus efficaces en termes de fixation azotée. En effet, les Légumineuses cultivées en association avec leurs symbiontes fixent 40 à 60 Mt d'azote par an, alors que 3 à 5 Mt d'azote sont fixées par les Légumineuses des écosystèmes naturels (Graham et Vance, 2003).

L'association symbiotique entre les Légumineuses et leurs symbiontes rapporte autant d'azote que l'industrie mondiale des engrais. Face à une indépendance galopante en engrais azotés pour l'agriculture dite durable. La rotation des cultures avec les Légumineuses est indispensable pour économiser les fertilisants chimiques, très coûteux en énergie fossile et contribuant à l'effet de serre via l'émission de grandes quantités d'oxyde nitrique (Crutzen *et al.*, 2007).

I.1. Les Légumineuses

Les plantes qui établissent des symbioses fixatrices d'azote avec les *Rhizobia* appartiennent toutes à la superfamille des Fabaceae (anciennement nommées Légumineuse) à l'exception de *Parasponia tomentosa* qui appartient à celle des Ulmacées. La superfamille des Fabaceae contient environ 20 000 espèces, la plaçant en seconde position après les *Poaceae* en termes de diversité. Les Fabaceae présente une grande diversité (Fig. 1).



Figure 1 : Photographie de diverses Fabaceae ou Légumineuses. **a** : *Genista pilosa*¹ ; **b** : *Lupin bleu*² ; **c** : *Medicago sativa*³ ; **d** : *Aeschynomene indica*⁴ ; **e** : *Cytisus andreanus*⁵ ; **f** : *Vicia sativa*⁶.

¹<http://www.vertde terre.com/nature/vegetal>

²<http://www.mooseyscountrygarden.com/perennial-plants/blue-lupin>

³http://www.missouriplants.com/Bluealt/Medicago_sativa_page.html

⁴http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aeschynomene_indica_2.JPG

⁵<https://www.google.fr/search?hl=fr&biw=1280&bih=697&noj>

⁶http://fr.wikipedia.org/wiki/Vesce_commu

Et sont divisées en trois sous-familles: les Mimosoideae, les Caesalpinoideae et les Papilionoideae (Fig. 2). La majorité des Légumineuses d'intérêt économique appartient aux Papilionoideae (Terefework *et al.*, 2000) que l'on subdivise généralement en deux groupes :

les Légumineuses dites « Phaséolides » (*Phaseolus*, *Vigna*, *Glycine*, *Aeschynomene*, *Cajanus*...) principalement des zones tropicales, et les Légumineuses dites « Galégoïdes » (*Trifolium*, *Medicago*, *Pisum*, *Lens*...) principalement des zones tempérées. Ces plantes ne sont pas toutes capables de noduler, même si cela est le cas de 97% des Papilionoideae, de 90% des Mimosoideae, et seulement de 23% des Caesalpinioideae (Soltis et *al.*, 1995).

Ainsi, la majeure partie des Légumineuses (88% des espèces étudiées ; Faria et *al.*, 1989) interagit avec des Rhizobia pour former des nodules fixateurs d'azote (Hirsch et *al.*, 2001) et comprend donc des candidats potentiels pour l'agriculture en tant qu'engrais vert azoté ou pour l'enrichissement des sols. De plus, de nombreuses Légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales (Graham et Vance, 2003) et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. On peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le niébé (*Vigna unguiculata*), la lentille (*Lens esculenta*), ou encore la cacahuète (*Arachis hypogea*).

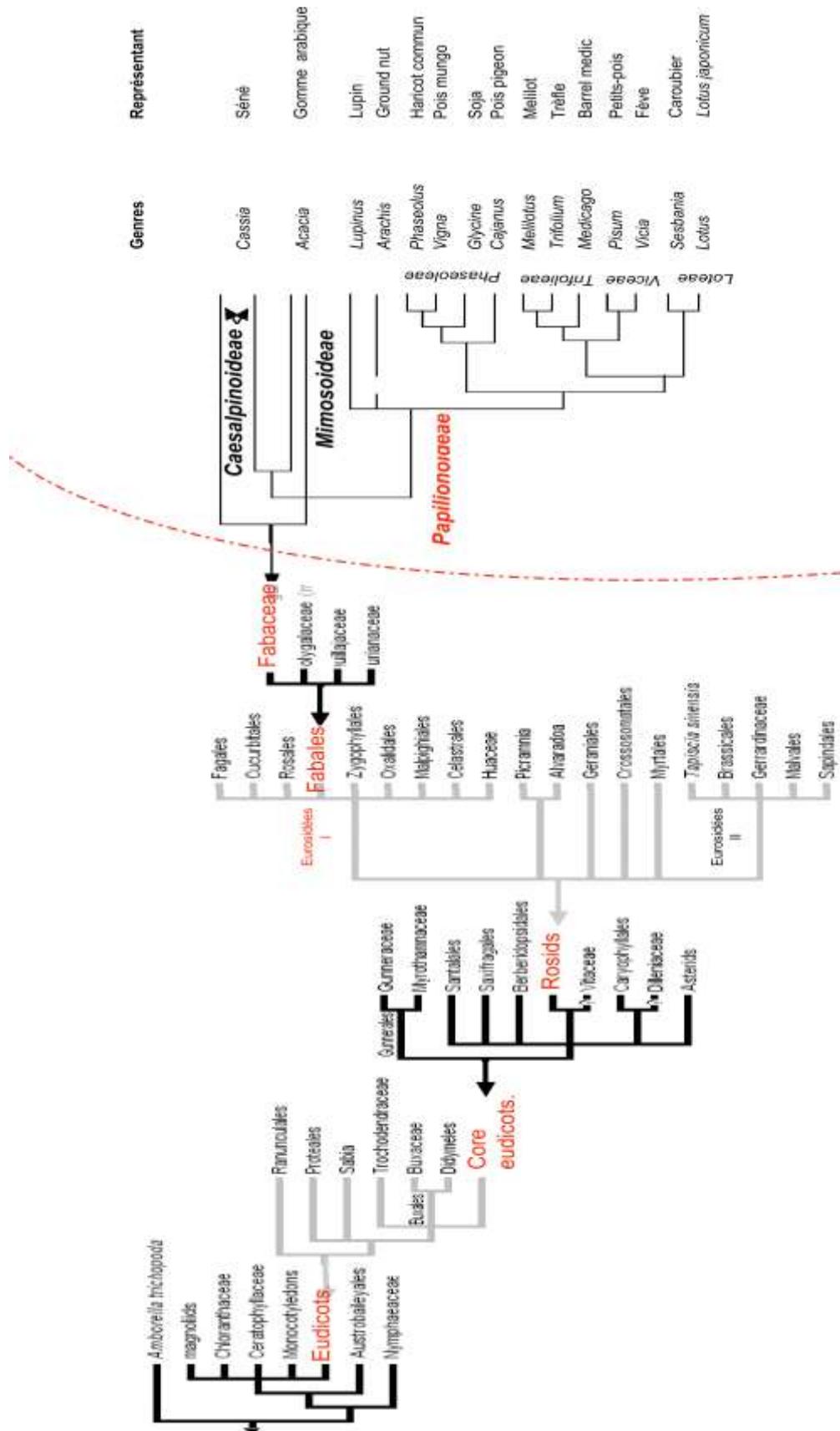


Figure 2 : Phylogénie des Fabaceae. Les Fabaceae sont regroupées en trois grandes sous-familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae*, comprenant de nombreuses espèces cultivées. D'après <http://www.tolweb.org/angiosperms> et Young et al. (2003).

I.2. Les Micro-organismes fixateurs d'azote atmosphérique

Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à deux des trois règnes primaires : les archaebactéries et les eubactéries (Young, 1992). Cette large diversité couvre des bactéries anaérobies, aérobies, les bactéries photosynthétiques, cyanobactéries et actinomycètes. Certains fixateurs d'azote sont associés à des plantes ou demeurent à l'état libre dans le sol et les eaux.

Les fixateurs libres présentent une diversité de genre :

- Bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Acetobacter*, *Azobacter*, *Azospirillum*) ;
- Bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou aérobies facultatives (*Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*) ;
- Bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*)
des cyanobactéries (*Synechococcus*).

La fixation biologique de l'azote atmosphérique se fait grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant plusieurs réactions de réduction dont celle du diazote (N₂) en ammoniacque (NH₃), forme de l'azote assimilable par les végétaux. Le microorganisme produit alors de l'ammoniacque pour le partenaire végétal en échange de molécules carbonées issues de la photosynthèse.

I.2.1. Les Fixateurs symbiotiques d'azote

Il existe deux types majoritaires de symbioses fixatrices d'azote impliquant un microorganisme et un hôte végétal : la symbiose actinorhizienne et la symbiose rhizobium-Légumineuse. Ces deux symbioses ont pour particularité d'aboutir à la formation d'un nouvel organe chez les plantes, le nodule, au sein duquel la bactérie fixe l'azote atmosphérique.

- **Les Rhizobia**, Le groupe des Rhizobia comprend une diversité de bactéries, qui sont définies par leur capacité à induire la formation de nodules fixateurs d'azote sur les racines ou les tiges des Légumineuses hôtes, y compris la non légumineuse *Parasponia* et à réduire l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par la plante. Tous les Rhizobia caractérisés sont des bactéries Gram-négatives (au contraire des actinomycètes), présentes dans le sol et appartenant aux sous-classes α et β des protéobactéries. Il a été recensé 44 espèces de bactéries capables d'établir une symbiose avec les Légumineuses, réparties en 12 genres, génétiquement très différents.

Selon une analyse phylogénétique basée sur l'ARN 16S, elles sont dispersées dans 12 genres parmi neuf groupes monophylogénétiques (Sawada et al., 2003)(Fig 3). La plupart des

espèces se trouvent dans la sous-classe α , dont Quatre genres (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*) constituent les symbiontes prédominants de la plupart des espèces de Légumineuses rencontrées à travers le monde. En outre, des lignées supplémentaires d' α protéobactéries, formant des nodules et ayant une distribution géographique réduite et un spectre d'hôtes limité, ont été découvertes depuis quelques années : *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988 ; Moreira et al., 2006), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001a et b ; Jaftha et al., 2002), *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005 ; Zurdo-Pineirro et al., 2007), *Devosia* (Rivas et al., 2002). Par ailleurs, des symbiontes de Légumineuses ont également été trouvés dans au moins deux lignées de B protéobactéries (Fig 3), *Burkholderia* (Moulin et al., 2001 ; Chen et al., 2003, 2005) et *Cupriavidus* (Chen et al., 2003 ; Barrett et Parker, 2006).

Il est intéressant de noter que certaines espèces de Rhizobia sont très proches des bactéries pathogènes comme *Agrobacterium tumefaciens* ou *Ralstonia solanacearum*. Bien que les Rhizobia soient étudiées depuis plus de 100 ans, des symbiontes ont été identifiés pour moins de 10% des 720 genres de Légumineuses. Il est donc probable que de nouveaux genres de Rhizobia soient découverts parmi les sous-classes α et B des protéobactéries et peut-être même parmi d'autres taxons.

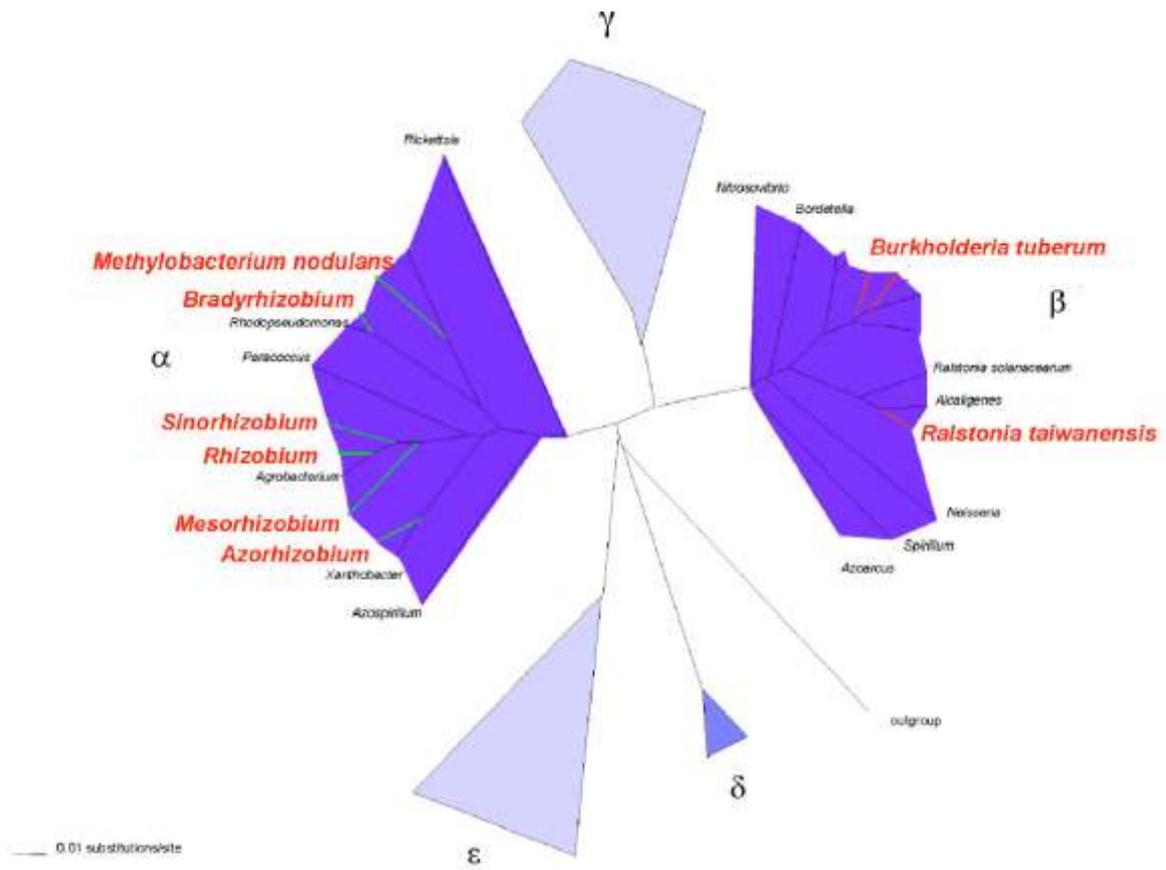


Figure 3 : Les symbiontes bactériens au sein des protéobactéries
 (www. Rhizobia. Co. Nz/taxonomy/Rhizobia. Html)

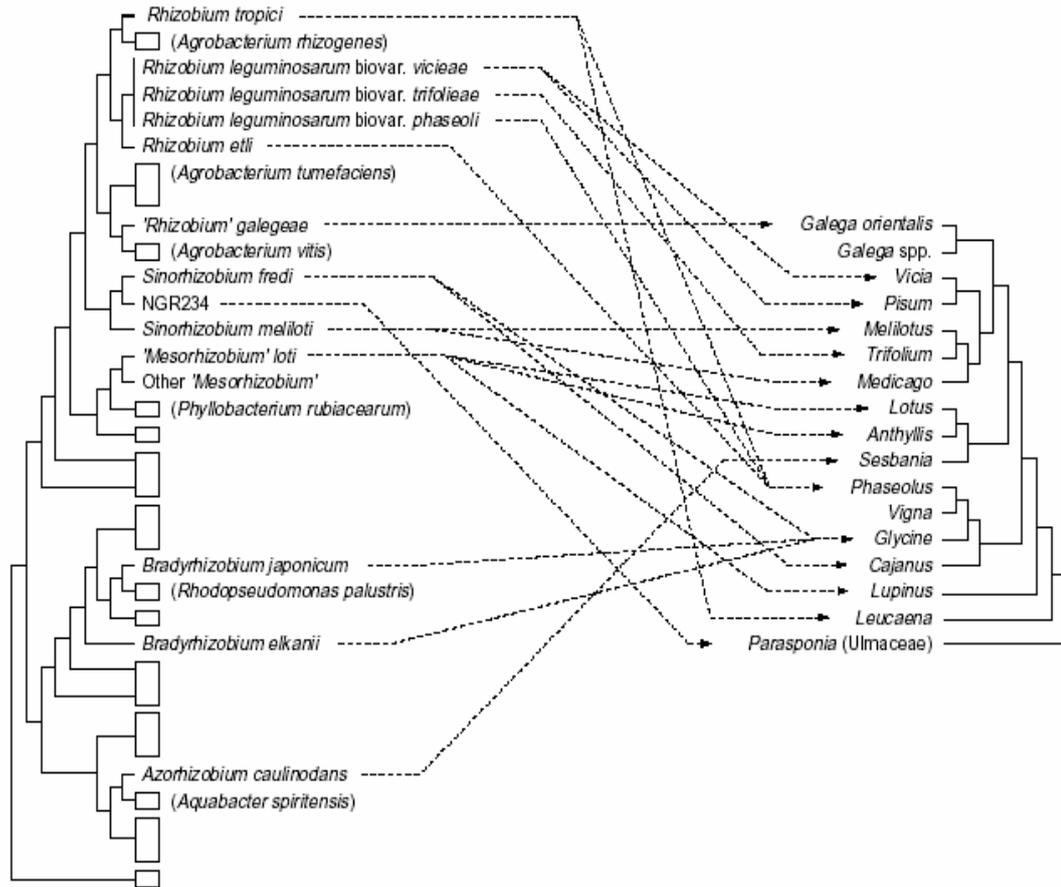


Figure 4 : Arbre phylogénétique de représentants des Rhizobia basée sur l'ARN 16S. Les rectangles indiquent des genres non symbiotiques, dont des représentants sont donnés entre parenthèses. A droite, un arbre phylogénétique d'espèces représentantes des Légumineuses base sur les séquences du gène *rbcL*. Les flèches connectent les Rhizobia et leurs hôtes. Le large spectre de NGR234 est juste représenté par sa capacité à noduler *Parasponia*. Bien que les spectres d'hôtes soient plus larges que ceux indiqués, le manque de corrélation entre les deux arbres apparaît clairement. D'après Doyle (1998).

I.3. Spécificité d'hôte

Les associations entre l'hôte et le symbiote sont spécifiques et dans certains cas exclusives (**Fig. 4**). Par exemple, *Sesbania rostrata* n'établit cette symbiose qu'avec *Azorhizobium caulinodans*. D'autres Légumineuses peuvent entrer en symbiose avec plusieurs espèces de bactéries, comme *Phaseolus vulgaris* (haricot) avec les symbiotes *Rhizobium tropicii*, *R. leguminosarum biovar. phaseoli* et *R. etli*. La réciproque est aussi vraie avec par exemple le cas de *R. leguminosarum biovar. viciae* qui peut noduler la vesce et le pois (*Vicia sativa* et *Pisum sativum*) (Doyle, 1998). Seules exceptions à cette règle, les souches de *Rhizobium* NGR234 et *R. fredii* USDA257 possèdent un spectre d'hôte étendu (Pueppke et Broughton, 1999). NGR234 est en effet capable de noduler 112 genres de légumineuses ainsi que la seule non-légumineuse *Parasponia andersonii*. Quant à *R. fredii* USDA257, cette souche bactérienne peut noduler 79 genres de Légumineuses (Pueppke et Broughton, 1999).

I.4. Etat d'avancement sur la génomique des Rhizobia

Ces dernières années, le développement de programmes de séquençage d'EST a permis le séquençage de Six souches :

Mesorhizobium loti MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000),

Bradyrhizobium japonicum USDA110 (Gottfert *et al.*, 2001 ; Kaneko *et al.*, 2002),

Sinorhizobium meliloti 1021 (Barnett *et al.*, 2001 ; Galibert *et al.*, 2001),

Rhizobium etli CFN42 (Gonzalez *et al.*, 2003 ; Gonzalez *et al.*, 2006),

Rhizobium leguminosarum 3841 (Young *et al.*, 2006),

Bradyrhizobium sp. BTAi1 et ORS278 (Giraud *et al.*, 2007).

Pour d'autres Rhizobia seules les îles symbiotiques ou les plasmides symbiotiques ont été séquencés. C'est le cas par exemple de *Rhizobium* sp. NGR234 (plasmide symbiotique de 536kb ; Freiberg *et al.*, 1997) ou *Mesorhizobium loti* R7A (île symbiotique de 611kb ; Sullivan *et al.*, 2002).

Récemment, le séquençage de deux espèces du genre *Bradyrhizobium* photosynthétique révèle qu'il existe deux groupes de *Bradyrhizobium* photosynthétiques. Le groupe I est composé de bactéries contenant les gènes *nod ABC* et formant des nodules sur toutes les espèces du genre *Aeschynomene*. Le groupe II, au contraire, se compose de bactéries dans lesquelles les gènes *nod ABC* sont absents et sont capables de noduler que très peu d'*Aeschynomene* (*A. sensitiva* et *A. indica* par

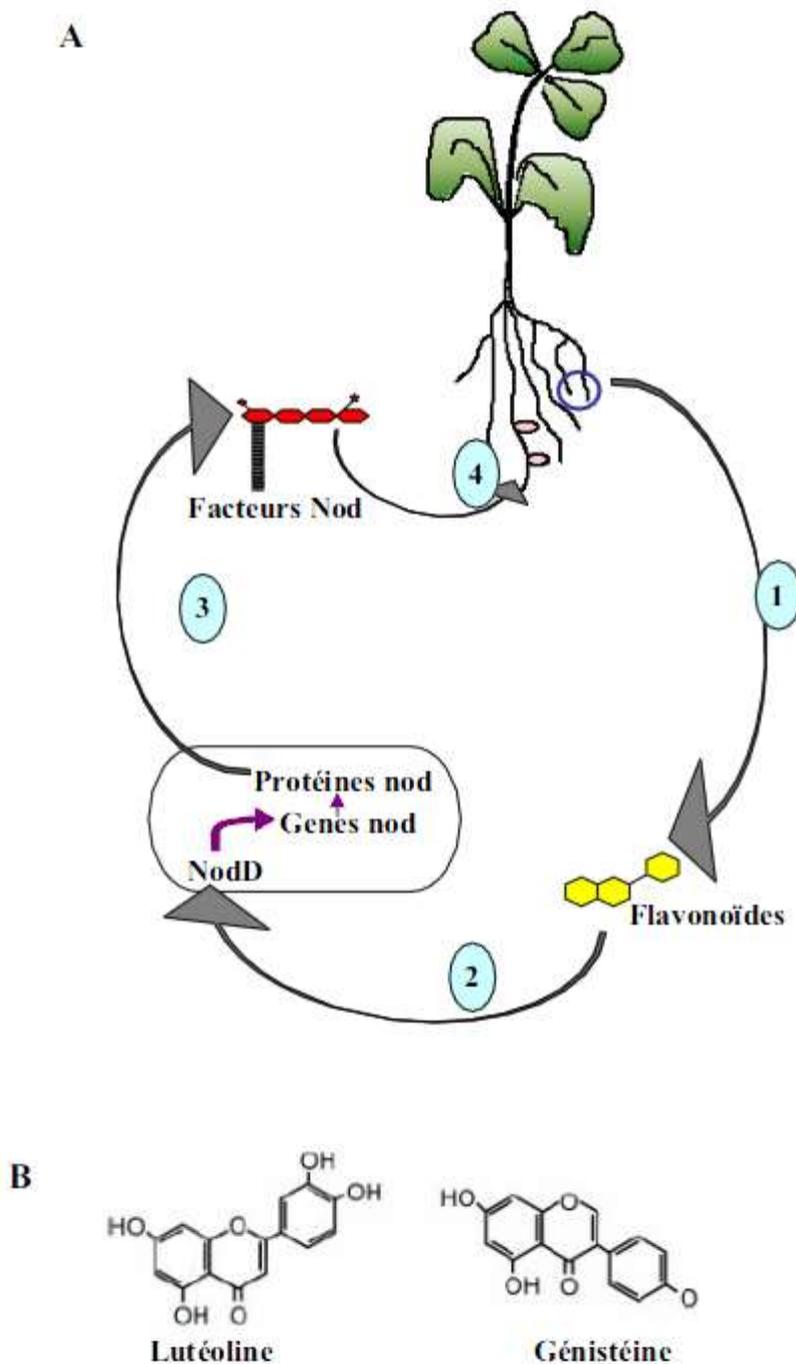


Figure 5 : Dialogue moléculaire entre les Rhizobia et les Légumineuses

A. (1) Les racines de la plante hôte secrètent des flavonoïdes. (2) Les flavonoïdes sont perçus par les Rhizobia et activent la protéine NodD à l'origine la transcription des gènes *nod*. (3) Les gènes *nod* permettent la synthèse et l'excrétion des facteurs Nod. (4) Les facteurs Nod sont perçus par les racines de la plante et induisent les premières réponses morphogénétiques à l'origine de la formation des nodules.

B. Structure de deux flavonoïdes : la luteoline, secrétée par *Medicago truncatula* et la genistéine, secrétée par *Glycine max*. B. D'après Brencic et Winans (2005).

exemple) (Chaintreuil *et al.*, 2001). Ce sont les seules Rhizobia caractérisés ne possédant pas de facteurs Nod ni de regroupement de leurs gènes symbiotiques en île ou sur des plasmides.

I.5. Mise en place de la symbiose Rhizobia/Légumineuse

L'établissement de la symbiose entre une Légumineuse et son rhizobium spécifique se manifeste par la formation de nodules, Le site de fixation symbiotique.

Le nodule se forme en trois étapes majeurs : la pré-infection, qui correspond au dialogue moléculaire se mettant en place entre les deux partenaires symbiotiques ; l'infection, correspondant à l'entrée des bactéries libres dans la Légumineuse, et enfin le développement du nodule.

I.5.1. La pré-infection

-Dialogue moléculaire et signalisation symbiotique

L'interaction entre le partenaire végétal et les Rhizobia débute par un échange de signaux moléculaires (Long, 1996). Ce dialogue moléculaire débute par l'exsudation via les racines des Légumineuses de composés phénoliques, principalement des flavonoïdes (Fig.5.b) qui sont capables d'activer la transcription des gènes *Nod* chez les Rhizobia (Fig.5.a). Le produit du gène *NodD*, synthétisé de façon constitutive est impliqué dans la reconnaissance de ce signal et dans l'activation de la transcription des autres gènes *Nod* (gènes *nod*, *noe* et *nol*). Cette reconnaissance représente un premier niveau de spécificité de la symbiose. La transcription des autres gènes *Nod* a pour effet la synthèse des facteurs Nod qui sont les molécules bactériennes reconnues à leur tour par la plante (Miklashevichs *et al.*, 2001). Cette reconnaissance du facteur Nod par la plante représente un second niveau de spécificité de la symbiose.

Les facteurs Nod sont des lipo-chito-oligosaccharides qui comprennent généralement un squelette de 3 à 5 N-acetylglucosamines liées en α (1-4) avec une acétylation sur le sucre non réducteur terminal sur lequel est branché un acide gras insaturé de 16 ou 18 atomes de carbone (Fig. 6) (Cullimore *et al.*, 2001).

Selon les espèces rhizobiales, l'acide gras est plus ou moins long, et les sucres comportent différentes décorations. Le (s) type (s) de facteur (s) Nod produit (s) ainsi que leur quantité permettent une reconnaissance spécifique de chaque Rhizobia par son partenaire végétal. Leur structure amphiphile leur permet une intégration rapide dans les membranes. Cependant, ils seraient incapables de traverser la membrane végétale, un récepteur membranaire serait donc nécessaire pour permettre leur détection par la plante (Cullimore *et al.*, 2001).

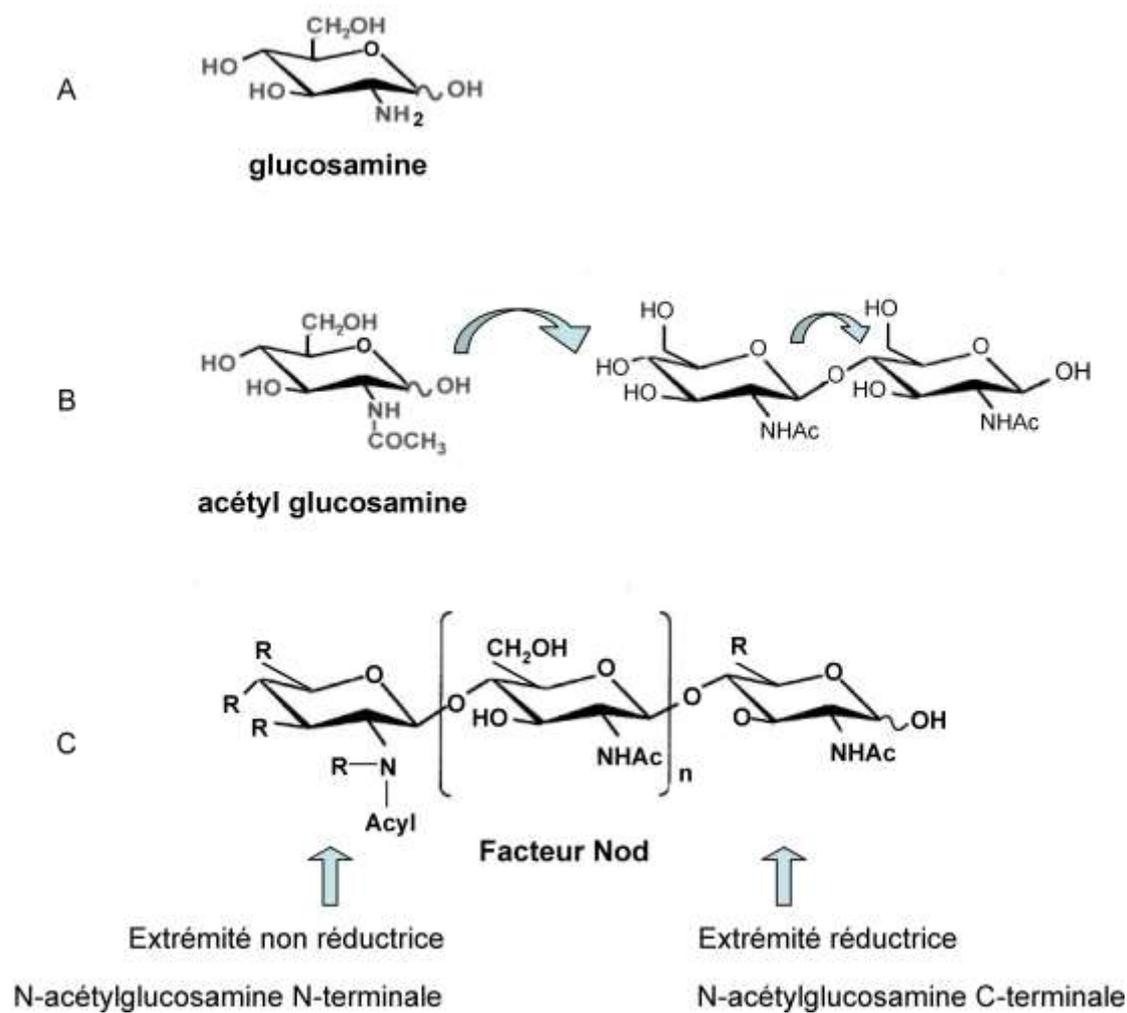
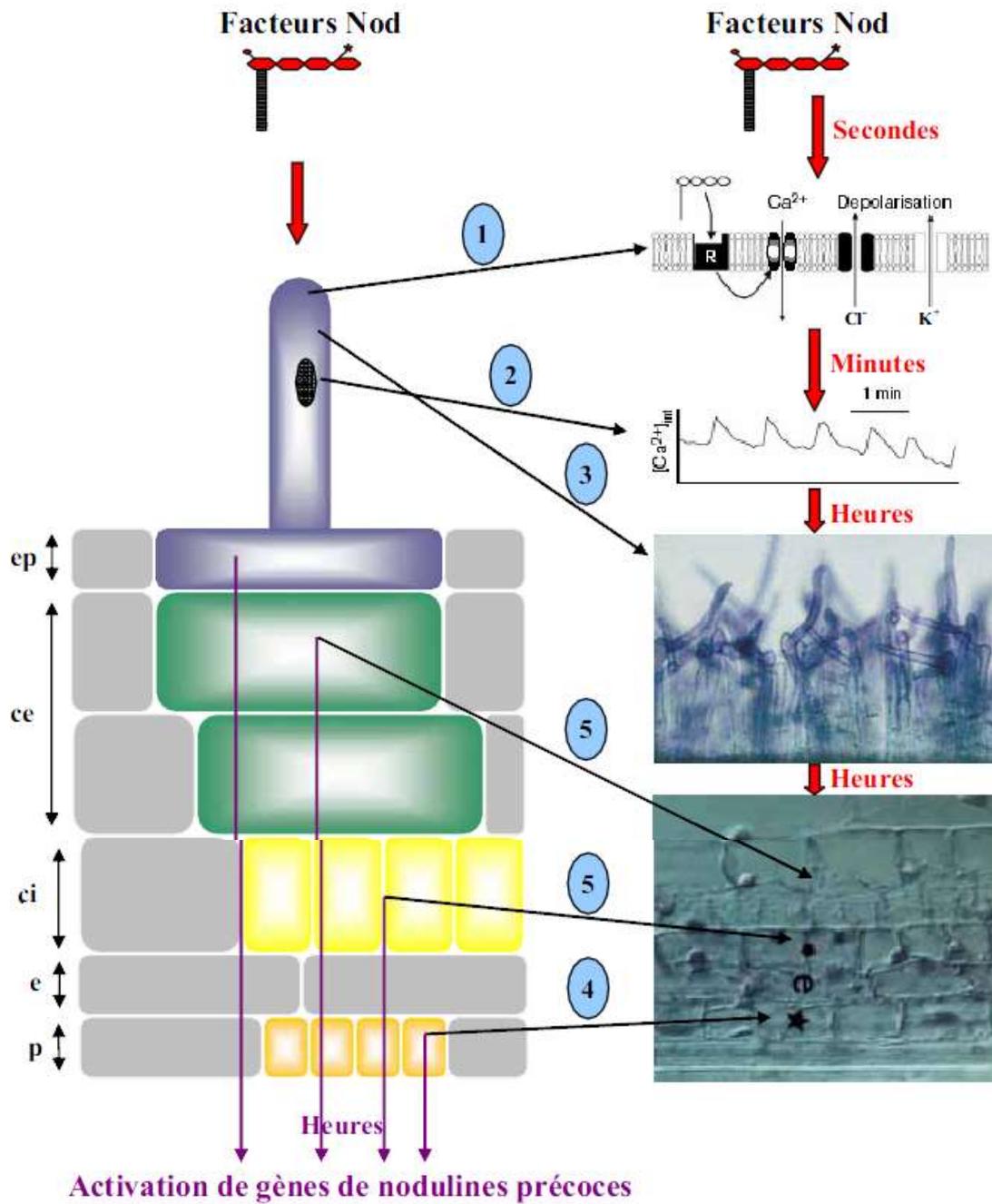


Figure 6 : Présentation simplifiée d'un facteur Nod (Cullimore et *al.*, 2001).

L'application exogène de facteurs Nod purifiés provoque certaines des réactions qui sont observées en réponse à l'inoculation par des Rhizobia (Fig7): (1) elle élicite la déformation des poils absorbants, (2) provoque une forte dépolarisation membranaire, accompagnée d'une alcalinisation du cytoplasme et d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, sous forme d'oscillations de calcium (Walker *et al.*, 2000 ; Wais *et al.*, 2000). (3) Stimule des divisions cellulaires, (4) induit l'expression de gènes *Enod* (Early Nodulin) spécifiquement exprimés dans les nodules et peut même produire dans certains cas (5) la formation de nodules (Miklashevichs *et al.*, 2001 ; Cullimore, 2001). La plupart de ces réponses ont lieu pour de très faibles concentrations de facteurs Nod (1pM-1nM) et dans la

zone de la racine susceptible de former des nodules (Cullimore *et al.*, 2001). Ces réponses ne requièrent pas toutes d'un même niveau de spécificité par rapport aux décorations des facteurs Nod. L'existence d'au moins deux récepteurs a donc été proposée : un récepteur peu spécifique pourrait activer la déformation des poils absorbants et la formation du cordon d'infection, tandis qu'un autre récepteur plus spécifique induirait l'expression des gènes *Enod* uniquement en réponse au facteur Nod correspondant au Rhizobia compatibles (Miklashevichs *et al.*, 2001). Outre le calcium, des protéines G pourraient également intervenir dans la transduction du signal produit par les facteurs Nod : une application de mastoparan -un agoniste des protéines G- induit l'expression d'*Enod12* alors que l'application d'un antagoniste des protéines G supprime l'induction de ce même gène par des facteurs Nod (Pingret *et al.*, 1998) .



Activation de gènes de nodulines précoces

Figure

7 : Principales réponses observées dans les racines en réponse aux facteurs Nod. Suite à l'application de facteurs Nod purifiés sont observées dans l'épiderme : en quelques secondes, au niveau de l'extrémité du poil absorbant, une dépolarisation de la membrane (1), puis des oscillations calciques perinucleaires dans le poil absorbant (2) et en quelques heures, la déformation des poils absorbants (3) et l'activation de gènes de nodulines. Dans les tissus internes, sont observées : l'activation des cellules du péricycle (4) et du cortex (5), puis la division de ces cellules et l'activation de gènes de nodulines. Etoile, divisions des cellules du péricycle ; astérisque, divisions des cellules du cortex ; ep, épiderme ; ce, cortex externe ; ci, cortex interne ; e, endoderme ; p, péricycle. D'après Downie et Walker (1999) ; Catoira *et al.*(2000) et Timmers *et al.*(1999).

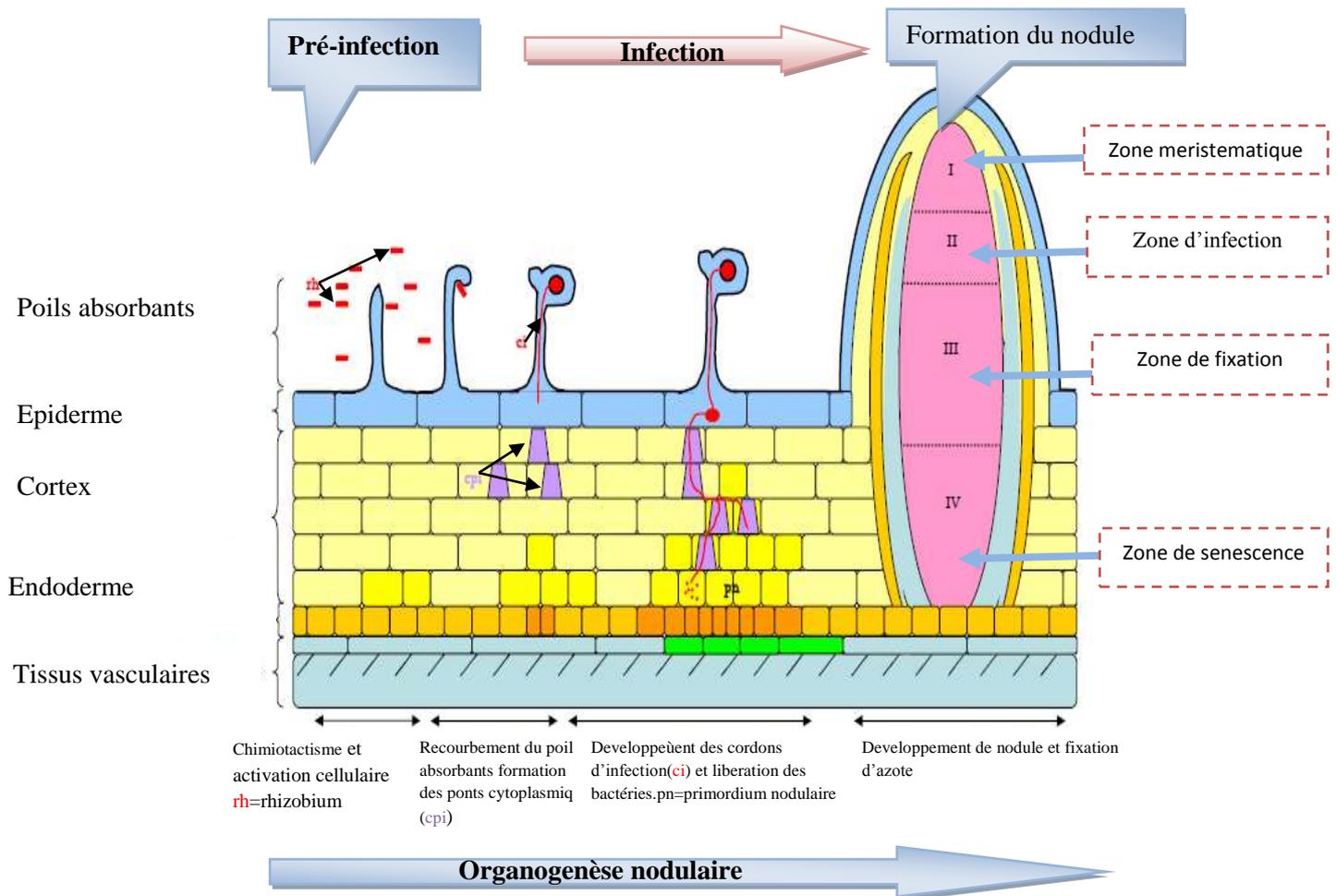


Figure 8 : Processus d'infection de la racine et mise en place du nodule chez *M. truncatula*. Les Rhizobia (rh) attirés par la présence des racines de l'hôte, adhèrent et se développent à la surface racinaire. La capture des bactéries au sein du recourbement d'un poil absorbant permet la formation d'un cordon d'infection (ci) qui véhicule les bactéries dans la racine en traversant les cellules qui s'y sont préparées en mettant en place un cordon de pré-infection (cpi). La production par les rhizobiums de facteurs Nod, associée au déroulement du processus infectieux, induit l'activation du programme d'organogénèse qui débute par la mise en place d'un primordium nodulaire (pn) où sont relarguées les bactéries. Ce processus aboutit à la formation d'une nodosité fixatrice d'azote mature, qui présente quatre zones spécifiques : le méristème (I), la zone d'infection (II), la zone de fixation (III) et la zone de sénescence (IV). D'après Timmers *et al.* (1999).

1.5.2. L'infection

Il existe une variabilité dans le type d'infection et dans la morphologie des nodules chez les Légumineuses. Les Rhizobia sont capables de pénétrer à l'intérieur des Légumineuses via deux modes d'infection distincts (Sprent et Raven, 1992 ; Sprent, 1993).

- **Par voie intracellulaire** (Fig.8): Ce processus concerne la majorité des Légumineuses tempérées est le plus étudié et le mieux connu, il a été observé chez le pois, la luzerne ou encore le soja. Dans ce cas, l'infection fait intervenir les poils absorbants, dans ce cas, les Rhizobia pénètrent dans 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 (Gage, 2004).

Simultanément à l'infection des poils absorbants, certaines cellules du cortex interne se différencient et se divisent à plusieurs reprises, formant un primordium nodulaire. Quand les cordons d'infection atteignent le primordium, certaines cellules cessent de se diviser et entrent dans des cycles répétés d'endoréduplication. Elles sont alors envahies par des Rhizobia qui sont relâchés des cordons d'infection (Cermola *et al.* 2000; Brewin, 2004). Ensuite, la pénétration de la bactérie est faite par endocytose.

Finalement, les cellules végétales infectées et les bactéries infectantes se différencient en cellules capables de fixer et d'assimiler l'azote. La structure néoformée, qui se compose des bactéries qui se différencient dans des bactéroïdes enfermés dans une membrane de cellules de la plante, un symbiosome.

-**Par voie intercellulaire** ou "**Crack Entry**": ce mécanisme est connu chez de nombreuses Légumineuses, d'origine essentiellement tropicale ou sub-tropicale notamment les espèces tolérantes à l'immersion. Dans ce mode d'infection, existe une variabilité selon la plante hôte. Ainsi l'infection se fait généralement au niveau de passages libérés par l'émergence des racines latérales ou adventives, par des blessures ou parfois directement à travers la lamelle moyenne entre deux cellules du rhizoderme (Pawłowski et Bisseling, 1996). Par exemple dans le cas, de la Légumineuse semi-aquatique *Sesbania rostrata*, deux types d'infection sont possibles : par invasion des poils absorbants (RHC) ou par crack entry au niveau de la base des racines latérales (RLB) (Fig. 9). Lors de l'infection par *crack entry*, les bactéries pénètrent directement dans le cortex externe au niveau des émergences de racines

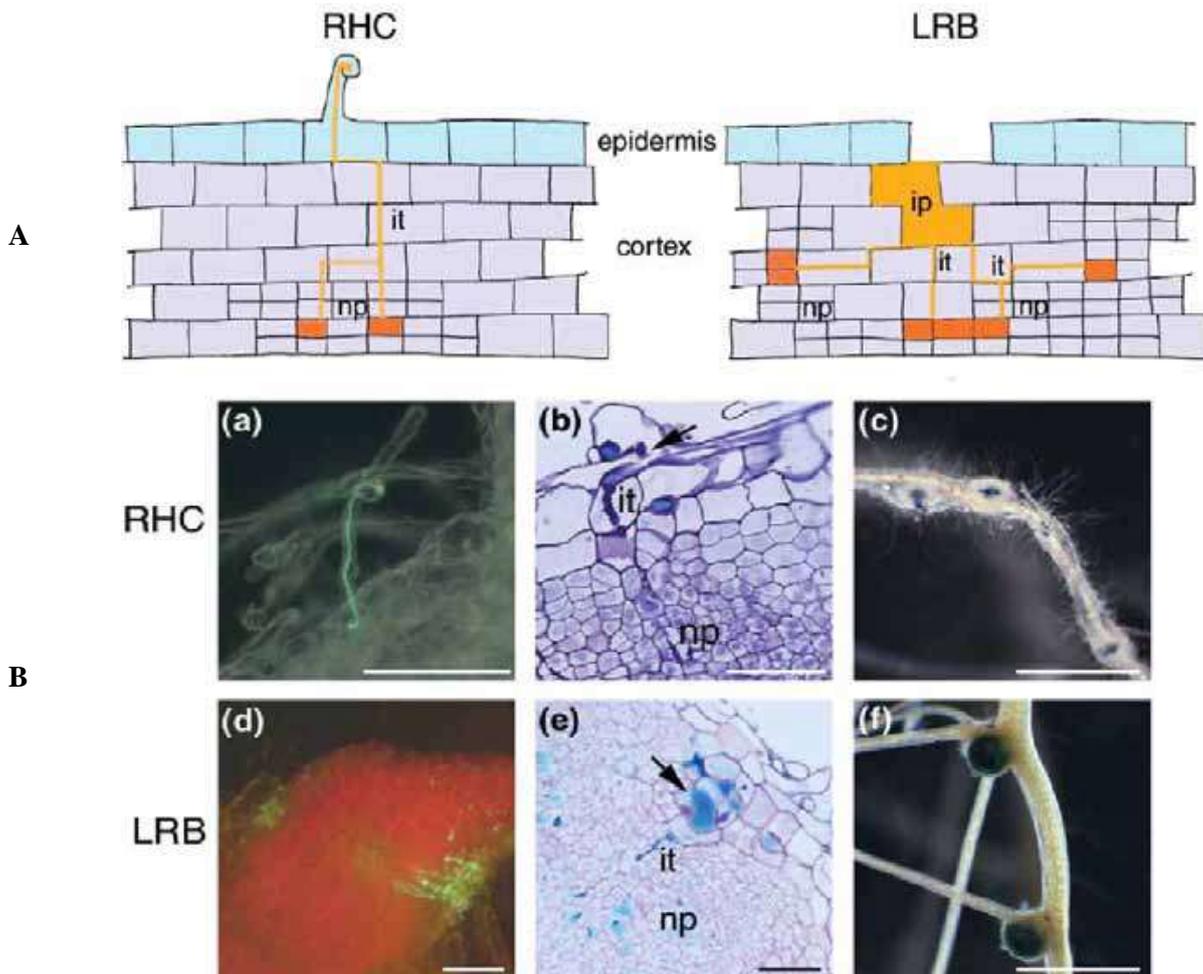
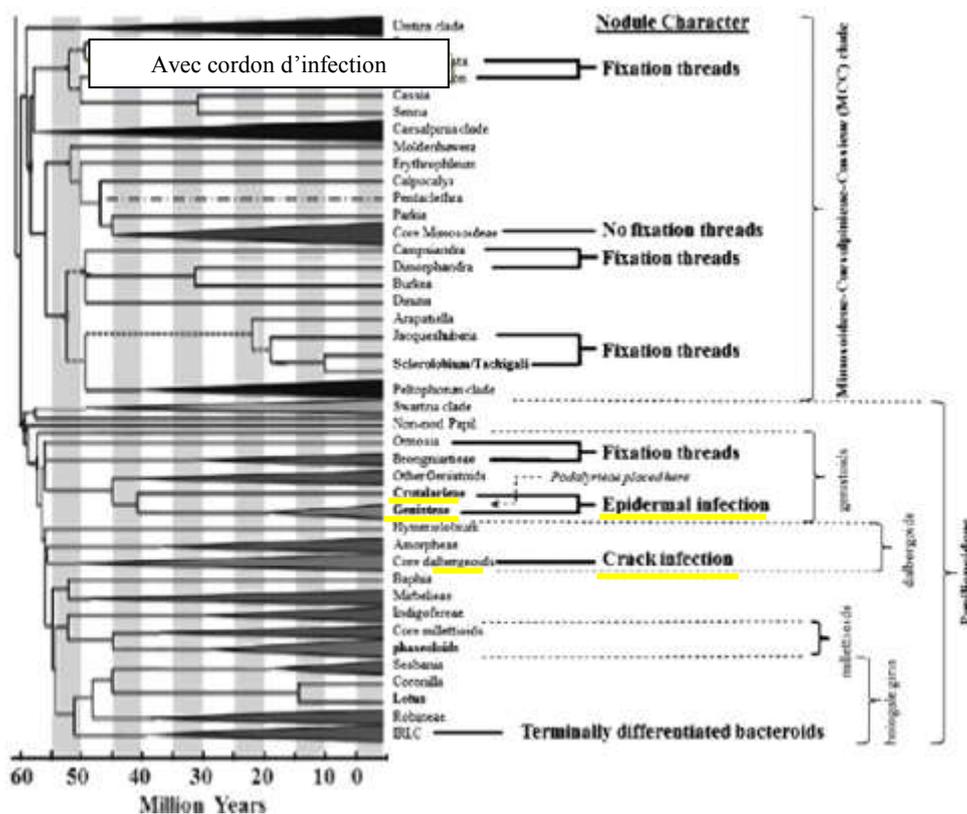


Figure 9 : Modes d'infection chez la Légumineuse semi-aquatique *Sesbania rostrata*

A. Comparaison des deux modes d'infection possibles chez *S. rostrata* inoculée par *A. caulinodans*. A gauche, le mode d'infection intracellulaire (RHC) observé en condition aérée et inhibé par l'éthylène. Les bactéries (en orange) sont piégées dans les crosses élaborées par les poils absorbants et induisent la formation d'un cordon d'infection (it) intracellulaire dans le poil. Le cordon pénètre de façon intracellulaire vers les cellules du primordium nodulaire (np) où les bactéries sont libérées dans les cellules végétales. A droite, le mode d'infection intercellulaire (LRB) en condition hydroponique et nécessitant la présence d'éthylène. Les bactéries (en orange) colonisent les espaces intercellulaires entre les cellules corticales et induisent la formation d'une poche d'infection, à partir de laquelle des cordons d'infection (it) intercellulaires et intracellulaires guident les bactéries vers les cellules du primordium (np), où elles sont libérées. **B. a-c.** Mode d'infection à travers la courbure des poils absorbants (RHC). **(a).** Les bactéries, marquées avec la GFP entrent dans le poil absorbant recourbé en crosse de berger. **(b).** Section colorée au bleu de toluidine montrant l'infection du primordium nodulaire. **(c).** Le produit final : nodules distribuées sur la racine. **d-f.** Mode d'infection par crack entry à la base des racines latérales (LRB). **(d).** Nodule en développement à la base d'une racine latérale. Le site d'entrée est visualisé par les bactéries marquées avec la GFP. **(e).** Section colorée au bleu de toluidine montrant une poche d'infection (flèche) à partir de laquelle un cordon d'infection (it) se développe vers le primordium nodulaire (np). Les bactéries sont visualisées par une coloration GUS. **(f).** Le produit final : des nodules situés à la base des racines latérales. D'après Goormachtig *et al.* (2004).

latérales et forment des poches d'infection dans ces cellules, présentant des signes de mort cellulaire. Puis, des cordons d'infection se développent à partir de ces poches pour infecter les primordia nodulaires formés au niveau du cortex interne moyen (Goormachtig *et al.*, 2004a). Paradoxalement, Chez d'autres Légumineuses, les nodules ne présentent pas de cordon d'infection C'est le cas d'*Arachis hypogaea* (Chandler, 1978), de plusieurs espèces d'*Aeschynomene* (Suessenguth et Beyerle, 1936; Arora, 1954; Yatazawa *et al.*, 1984) et de quelques espèces de *Stylosanthes* (Ranga Rao, 1977; Chandler *et al.*, 1982). Un autre mode d'infection, qui n'impliquent ni les poils absorbants ni des déchirures de l'épiderme de la racine mais dans les quels les Rhizobia pénètrent directement entre les cellules épidermiques intactes, c'est le cas de la Légumineuse arborescente primitive, *Mimosa scabrella* (Faria *et al.* 1988) (Fig. 10).



Figure

10 : Relation entre les grands groupes de légumineuses et de leur temps d'évolution par rapport aux caractères de nodulation. D'après Sprent *et al.* (2013). Modifié à partir de Doyle (2011).

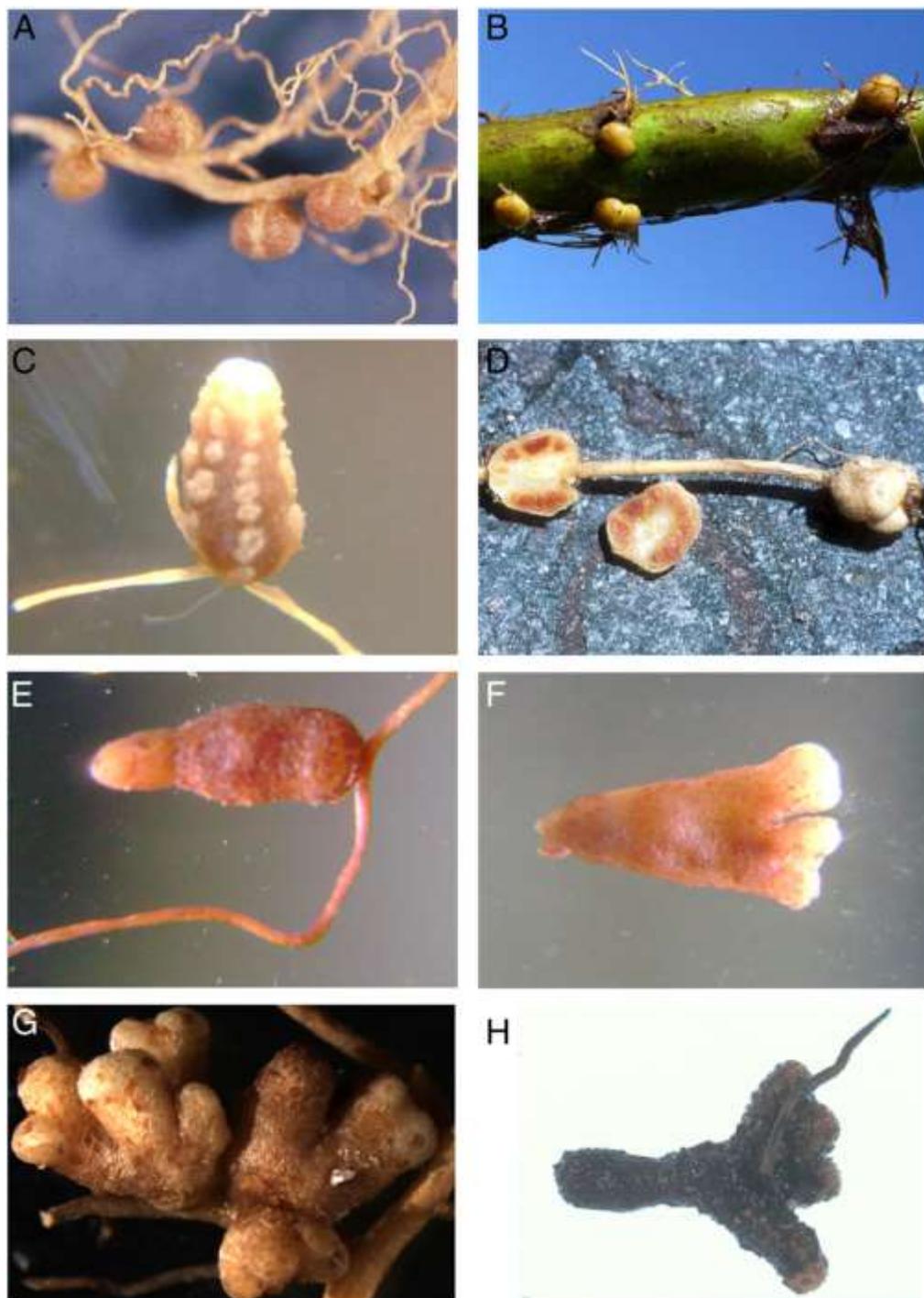


Figure 11 : Morphologie de nodules de légumineuses tropicales : A, déterminé, desmodioide. Ces nodules sont plus ou moins sphérique; B, déterminé, aeshynomenoide. Ces nodules sont souvent associés aux racines latérales ou adventives et sont dépourvues de lenticelles; C, un nodule indéterminé de type desmodioid; D, lupinoide; E, nodules indéterminé ramifié. F, nodule indéterminé avec un seule ou plusieurs lobes; G, indéterminé avec plusieurs lobes ; H, boisé, la plupart des nodules possédant un cordon d'infection. Reproduit d'ILDON, avec permission *in* Sprent *et al.* (2013).

1.5.3. Le développement du nodule

En parallèle et simultanément à l'infection de la racine par les bactéries se développe un nouvel organe qui formera une niche pour les bactéries : le nodule ou nodosité. Le nodule mature se compose de deux parties : les tissus internes, où l'on trouve les cellules infectées par les bactéries et où la fixation d'azote a lieu ; et les tissus externes qui assurent les échanges avec le reste de la plante et la protection des tissus internes.

Selon la terminologie proposée par Hirsch en 1992, les tissus périphériques nodulaires sont au nombre de trois : le cortex nodulaire, à l'extérieur, qui dérive de l'épiderme racinaire ; l'endoderme et le parenchyme nodulaire (ou cortex interne) (Hirsch, 1992). Au sein du parenchyme nodulaire se trouvent les traces vasculaires connectées au cylindre central de la racine. Ces vaisseaux périphériques assurent la nutrition du nodule et permettent l'exportation de l'azote fixé vers le reste de la plante.

On distingue généralement deux types de nodules : les nodules « indéterminés » et « déterminés ».

- Deux types de nodules déterminés / indéterminés

Le type de nodule dépend de la plante hôte et non de son symbionte. Généralement les Légumineuses tempérées (pois, luzerne, trèfle...) forment des nodules indéterminés, alors que les Légumineuses tropicales (soja, haricot...) forment habituellement des nodules déterminés (Hirsch, 1992) (Fig. 11). Cependant, certaines plantes comme *Sesbania rostrata* peuvent former des nodules des deux types selon les conditions environnementales (Fernandez-Lopez *et al.*, 1998). C'est notamment selon le site d'initiation des divisions cellulaires du cortex que les deux types de nodules se distinguent. Les nodules indéterminés se développent à partir des cellules du cortex interne alors que les nodules déterminés se développent à partir des cellules du cortex externe (Fig. 12. a).

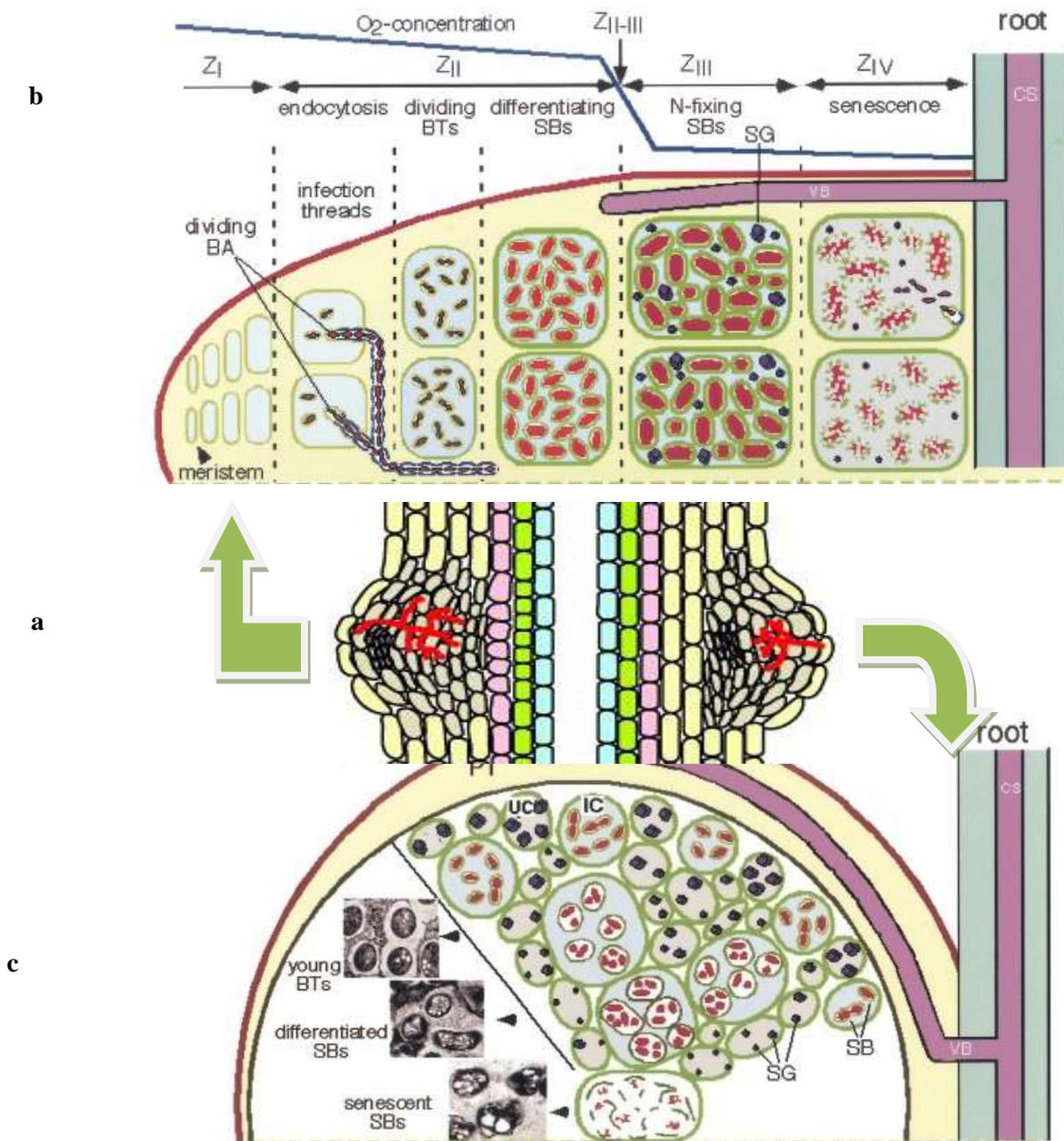


Figure 12 : Représentation schématique des deux principaux types de développement nodulaire chez les Légumineuses. **a.** schéma indiquant les différents sites d'initiation des divisions cellulaires du cortex (current opinion in plant biology).

b. Schéma nodule allongé de type indéterminé. BA, bactéries; BTs, bactéroïdes; SBs, symbiosomes; SG, grain d'amidon; CS, cylindre central; VB, faisceaux vasculaire.

c. Schéma de nodule sphérique de type déterminé. PT, tissu périphérique; IC, cellules envahies; UC, cellules non envahies. D'après Eduardo *et al.* (2002).

Les nodules indéterminés sont caractérisés par la présence d'un méristème persistant. Des cellules sont constamment ajoutées à la partie distale du nodule, ce qui lui confère une forme allongée (Hirsch, 1992 ; Crespi et Galvez, 2000). Toutes les étapes de développement nodulaire sont présentes au sein d'un même nodule selon un gradient de différenciation de la partie distale (méristème) à la partie proximale (racine). Ainsi le nodule est typiquement divisé en cinq zones (Fig. 12. b; Fig.13) : la zone méristématique (I) ; la zone d'infection (II) où les bactéries sont libérées ; l'interzone (II-III) riche en amyloplastés ; la zone de fixation (III) où l'azote atmosphérique est fixé par les bactéroïdes ; la zone de sénescence (IV) où bactéroïdes et cellules végétales dégénèrent et la zone saprophytique (V) apparaissant plus tardivement et constituant une niche pour les bactéries non différenciées (Vasse *et al.*, 1990 ; Timmers *et al.*, 2000). Au contraire, les nodules déterminés ont une activité méristématique qui disparaît très tôt après l'initiation du nodule. La croissance du nodule se fait par élargissement des cellules, donnant une forme arrondie au nodule. Il n'y a pas de différenciation spatiale du nodule, juste une différenciation temporelle (Fig. 12. c).

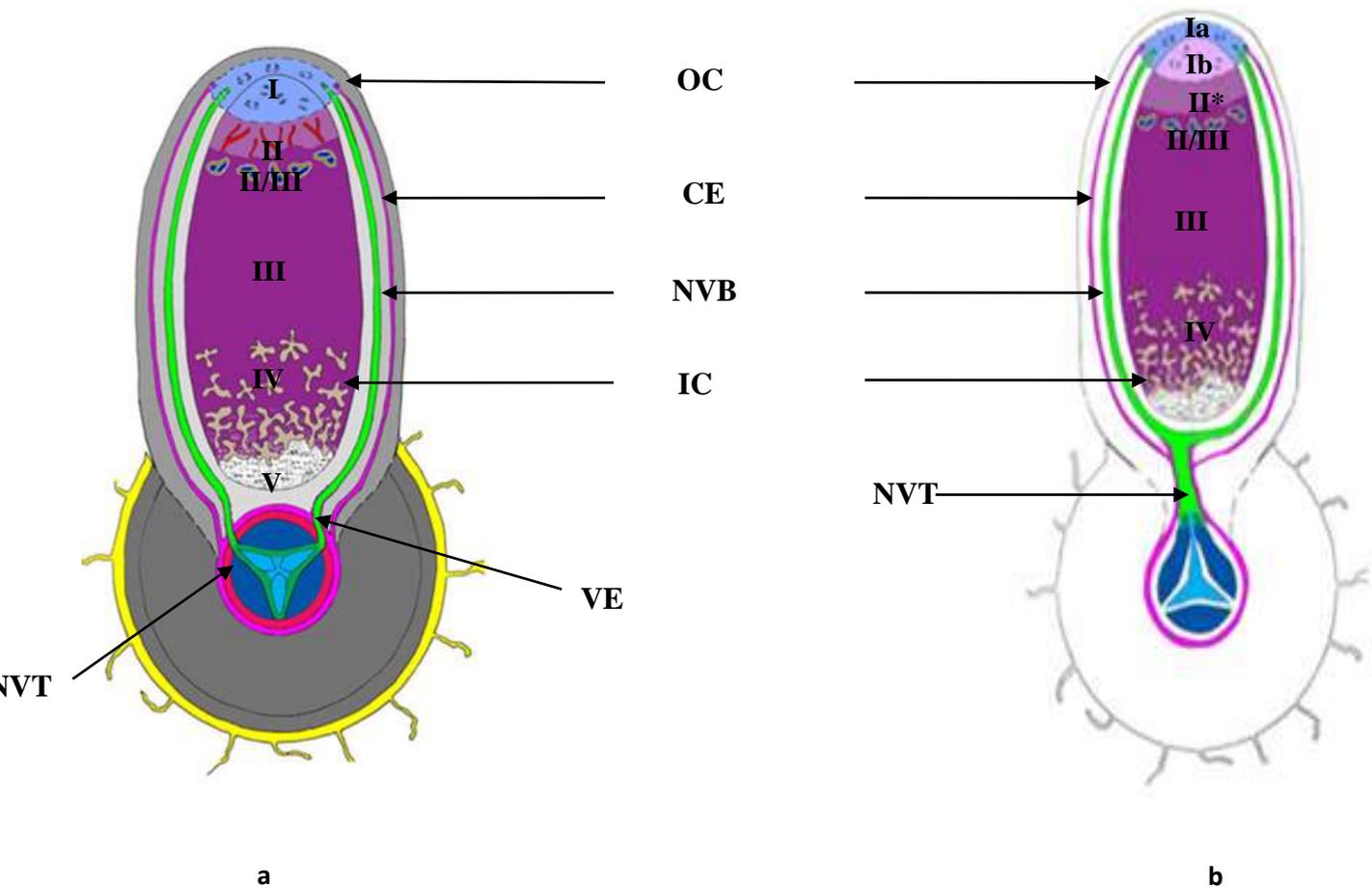


Figure 13 : Représentation schématique de différents nodules racinaires de type indéterminé. a: caractéristiques anatomiques générale d'un nodule qui s'est développée à partir d'une infection face au pôle du phloème : I - méristème nodulaire non infecté , II - zone d'infection par pénétration du cordon , II / III - interzone II / III riche en large amyloplastés, III - zone de fixation de N2 , IV - zone de sénescence , V - zone saprophyte . Zones II–V représente des cellules hôtes à différents stades de différenciation de bactéroïdes. Ce tissu est entouré de couches corticales : cortex externe (OC) des cellules non spécialisées, endoderme corticales (CE) avec une monocouche de cellules lignifiées qui s'ajoute aux cellules spécialisées localisées dans le cortex interne (IC), CE est en continuité avec l'endoderme de la racine. Système Vasculaire du nodule est constitué de faisceaux vasculaires (NVB) qui bifurquent à partir de trace vasculaire (NVT), et connectent le nodule avec les tissus vasculaires racinaires. **b:**caractéristiques anatomiques générale dans différents nodules typique des Genisteae. Ia partie non infectée du méristème du nodule au quelle s'ajoute des cellules pour le développement des tissus corticale du nodule et l'extension des faisceaux vasculaire NVB, Ib : partie infectée du méristème nodulaire au quelle s'ajoutent des cellules pour le développement des bactéroïdes, II* zone de différenciation dont les tissus contiennent des bactéroïdes. Note: la différence de NVT, est du à l'origine des cellules hôtes contenant les bactéroïdes à partir des cellules sub-rhizodermiques. D'après Lotocka *et al.* (2012).

1.6. Nouvelles avancées sur la symbiose Rhizobia-Légumineuse

-La Nodulation en absence de Facteurs Nod

Il est communément approuvé que les facteurs de nodulation sécrétés par les Rhizobia sont incontournable dans l'initiation de la formation de nodules sur les plantes hôtes. Alors que, récemment, Giraud et *al.* (2007) ont démontré par la comparaison des génomes de deux souches de bactéries fixatrices d'azote (*Bradyrhizobium* sp. ORS 278 et BTAi1) nodulants des Légumineuses du genre *Aeschynomene* ne contenant ni le gène *nodA* ni le gène *nodC*, qui sont essentiels pour la synthèse des facteurs Nod. Ceci signifie que ces bactéries possèdent une voie alternative pour initier le dialogue conduisant à la formation de la nodulation chez les Légumineuses (Fig. 14).

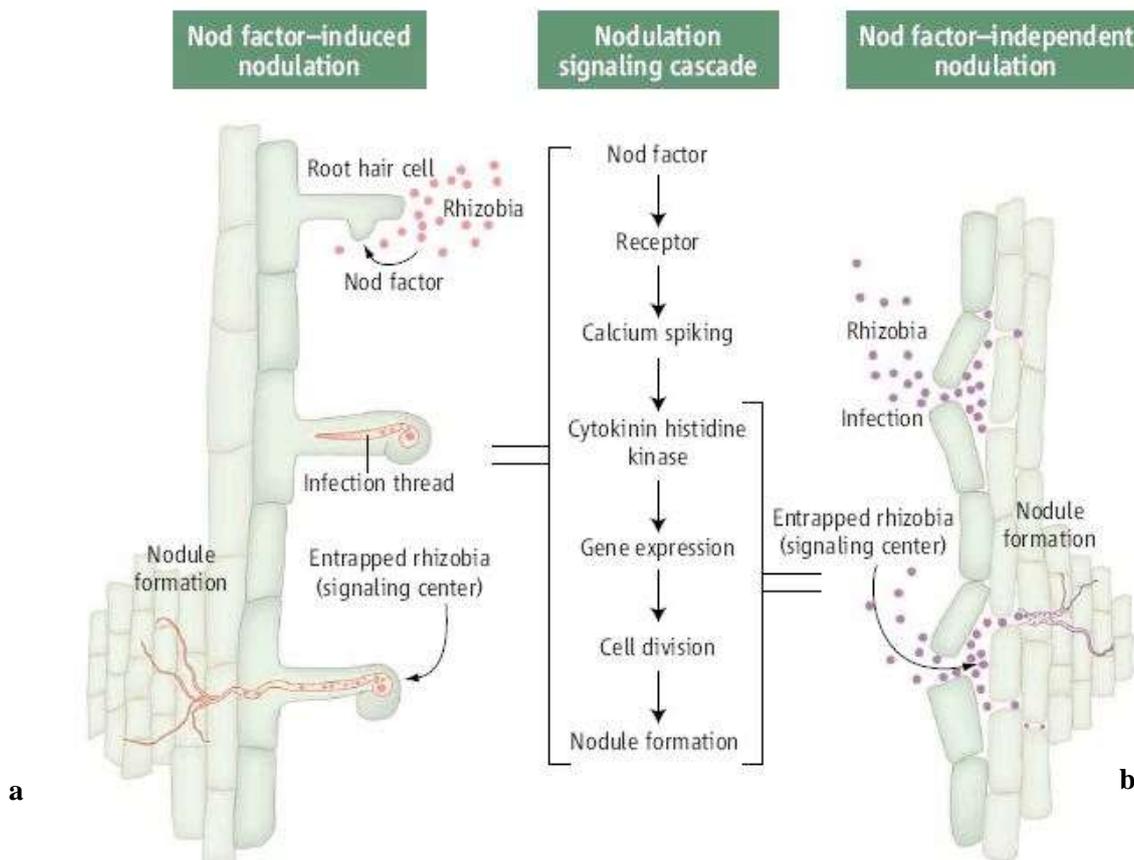


Figure 14 : La symbiose Rhizobia-Légumineuse : avec ou sans facteur Nod ?

Les facteurs Nod sont produits par la bactérie symbiotique infectant la légumineuse hôte et initie la formation de nodules fixateurs d'azote (a). La nodulation facteur Nod-indépendante résulte d'une colonisation bactérienne par une rupture de l'épiderme de la racine.

(b). L'augmentation de la sensibilité pour le signal cytokinine-like peut permettre à la cascade de signalisation du facteur Nod d'être contournée menant à la nodulation et à l'infection sans facteur Nod. D'après Downie (2007).

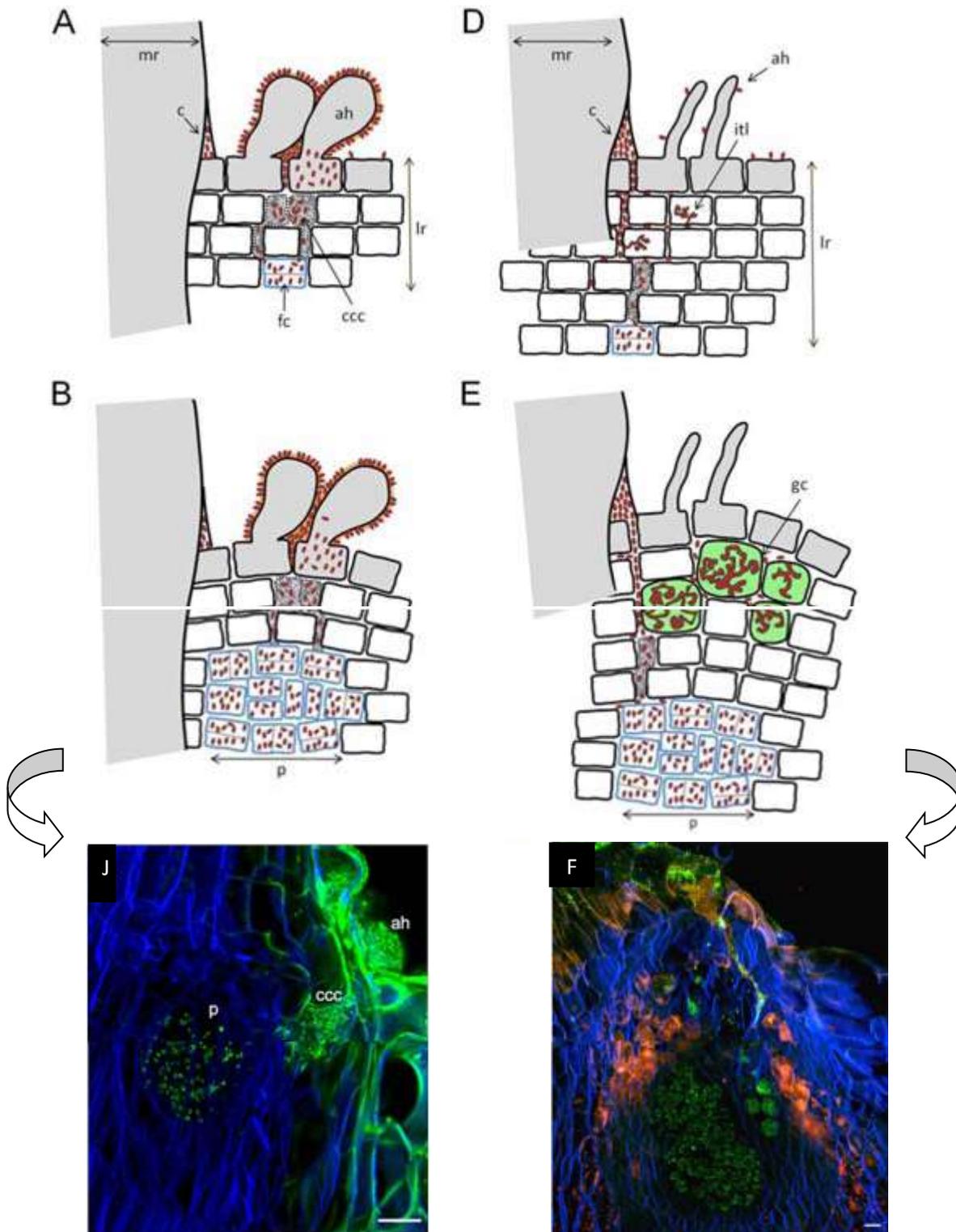


Figure 15: Comparaison Schématique entre le processus de nodulation dépendant au facteur Nod (NF-dépendent) et indépendant (NF)-Independent). de A à j, *Aeschynomene indica* et D à F, *A. afraspera*, respectivement. A et D Les stades de nodulation 1 à 2 jours postinoculation (dpi); B et E, 3 to 4 dpi; Abréviations: mr, racine principale; lr, racines latérales; c, crack; ah, poils absorbants; ccc, cellules corticales dégradées; p, primordium; fc, effondrement de cellules primordium nodulaire; gc, cellules géantes; o, excroissance; itl, cordon d'infection, v, vascularisation; ciz, zone centrale d'infection. Cellules épidermiques (gris) et cellules corticales (blanc). J, vue d'ensemble générale de la progression des bactéries à l'intérieur des racines latérales. Barre, 20 μm ; F, vue d'ensemble générale de la progression des bactéries à l'intérieur des racines latérales. ccc, cellules cortical dégradées; ah, poils absorbants; p, primordium. D'après Bonaldi *et al.* (2011).

Ainsi, des travaux portant sur deux souches de *Bradyrhizobium* : *BTAi1* et *ORS278*, capables de former des nodules au niveau des racines et des tiges de deux Légumineuses tropicales tolérantes à l'immersion (*Aeschynomene sensitiva* et *A. indica*) (Fig. 14 et 15). Le séquençage complet des génomes de ces deux souches a démontré l'absence de gènes *nodA* et *nodC* (Giraud *et al.*, 2007). Ces bactéries, bien que capables de noduler avec certains partenaires végétaux, ne sont donc pas capables de produire le squelette lipochitooligosaccharidique des facteurs Nod classiques.

Un argument supplémentaire confirmant la non implication des facteurs Nod dans la nodulation de *A. sensitiva* et *A. indica* par *BTAi1* ou *ORS278* a été obtenu en utilisant un mutant de *Bradyrhizobium* sp. *ORS285*, une souche productrice de facteurs Nod. En effet, la bactérie *ORS285* est capable de noduler *A. sensitiva* ou *A. afraspera*, mais un mutant *nodB* d'*ORS285* n'est plus capable d'induire des nodules sur *A. afraspera*, espèce qui n'est pas nodulée par *BTAi1* ou *ORS278*, mais est toujours capable de noduler *A. sensitiva* (Giraud *et al.*, 2007). Il semble clair maintenant que chez *A. sensitiva* et les *Aeschynomene* du même groupe d'inoculation croisée, la présence des facteurs Nod ne soit pas indispensable à la mise en place de la nodulation. Il reste à élucider le déroulement du dialogue moléculaire entre les deux partenaires et la nature des molécules capables de suppléer l'absence de facteurs Nod.

Ces données suggèrent qu'un dérivé de la purine, qui pourrait être une molécule de type cytokinine, joue un rôle essentiel lors de la formation des nodules chez *A. sensitiva* et probablement *A. indica* (Giraud *et al.*, 2007). Cette hypothèse est cohérente avec le fait que plusieurs souches de *Bradyrhizobium* produisent des cytokinine (Sturtevant et Taller, 1989 ; Boiero *et al.*, 2007).

II. INTERACTION BACTERIES ENDOPHYTES-PLANTE

II. 1. Rhizosphère et bactéries rhizosphériques

La rhizosphère est la région du sol directement influencée par les racines (Fig. 16). On distingue en général le rhizoplan qui est l'interface racine/sol et le sol rhizosphérique situé au voisinage direct de la racine et soumis à son influence. La rhizosphère est donc un environnement particulier où les flux de matières et d'énergie entre le sol et la plante sont particulièrement intenses (Lynch, 1990). La plante y mobilise l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son développement et à sa croissance, induisant aussi des modifications importantes du potentiel de l'eau et des concentrations ioniques du sol rhizosphérique. En outre, les échanges ioniques et gazeux entre les racines des végétaux et le sol, contribuent à modifier de manière notable le pH, le potentiel d'oxydo-réduction de la rhizosphère et, par suite, la biodisponibilité de nombreux éléments minéraux nutritifs ou non (Hinsinger, 1998).

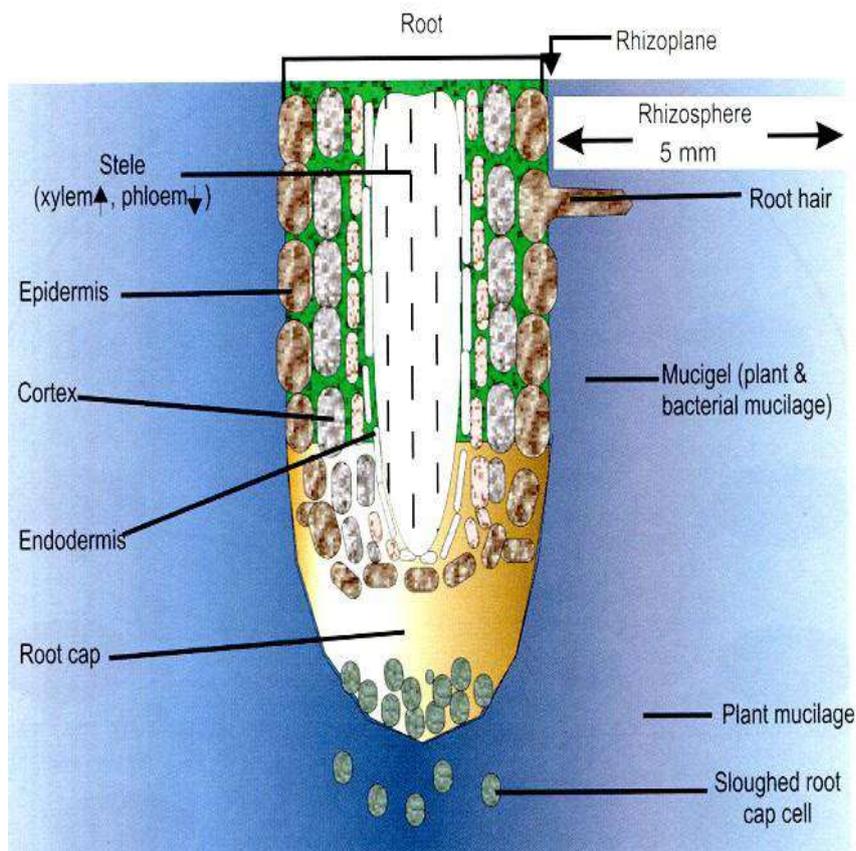


Figure 16 : La rhizosphère d'après Maier *et al.* (2000).

Depuis 1904, diverses études ont décrit la taxonomie des bactéries dans la rhizosphère qui sont appelés rhizobactéries, qui peuvent être neutres, pathogènes ou bénéfiques à leurs hôtes (Raaijmakers *et al.*, 2009). Parmi eux, les PGPR (rhizobactéries favorisant la croissance : *Plant Growth Promoting rhizobactéria*).

Les PGPR ont été tout d'abord décrit par Kloepper et Schroth en 1978, et qui sont connus par leurs effets bénéfiques sur le développement de la plante, de la santé et le rendement par des mécanismes directs ou indirects (Compant *et al.*, 2005a).

Bien que les PGPR peut être présent dans la rhizosphère dans des conditions naturelles ou après leur utilisation, une sous-partie de leur population ne peut pas seulement être présente dans la rhizosphère, mais peut aussi entrer à l'intérieur de cellules et de coloniser diverses parties de la plante (Compant *et al.*, 2005a, 2010a).

Certaines bactéries du sol peuvent en effet pénétrer dans les plantes. Ces PGPR et / ou endophytes peuvent être isolés à partir des hôtes naturels mais aussi d'autres environnements. Elles peuvent être isolées en effet à partir de cultures, d'autres plantes (Lugtenberg et Kamilova, 2009), mais également des recherches sur de nouvelles PGPR compétente et endophytes ont conduit à la découverte que certaines souches peuvent être également isolés à partir des environnements difficiles tels que le sol du désert et pourraient être utilisés dans l'amélioration de la culture pour (Compant *et al.*, 2010a; 2010b).

Dans des conditions naturelles ou après l'inoculation, les PGPR ont été suivis pour connaître leurs niches de colonisation. Pour visualiser la colonisation, différents outils microscopiques ont été employée (Gamalero *et al.*, 2003.). De nombreuses études ont porté sur la colonisation par PGPR de la rhizosphère des plantes et des rhizoplan pour expliquer les pré-étapes des effets bénéfiques des PGPR. Benizri *et al.* (2001) avait décrit, par exemple, que l'interaction entre les plantes hôtes et divers membres de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, et *Burkholderia* à donner des informations sur les processus de colonisation. Il a été démontré que ces microorganismes peuvent coloniser la rhizosphère et que la colonisation peuvent se produire sur la surface de certaines cellules rhizodermiques ou sur le rhizoplan (surface de la racine), après inoculation (Benizri *et al.*, 2001). Des cellules bactériennes ont été visualisés comme des cellules individuelles attachées à la surface des racines, puis en doublets sur le rhizoderme, formant une chaîne de bactéries comme observé dans le cas *Pseudomonas fluorescens* DF57 sur les racines de l'orge (Hansen *et al.*, 1997).

De nombreuses bactéries ont été visualisées sur la surface de la racine, concentrée dans les rainures entre les cellules de l'épiderme (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997). Divers autres exemples ont montré la colonisation de la surface des racines par les bactéries bénéfiques.

Cependant, bien que la colonisation des plantes par des bactéries bénéfiques peut se produire sur toute la surface de certaines cellules rhizodermiques (Benizri et al., 2001), il peut être constaté que le système racinaire n'est pas colonisé d'une manière uniforme par différentes souches bactériennes dans la culture de plantes en champs ou dans des conditions de laboratoire. Comme décrit par Gamalero *et al.* (2004), la répartition et la densité de la souche d'inoculant *P. fluorescens* A6RI peut varier en fonction de la zone des racines de la tomate. Juste après l'inoculation, les bactéries ont été distribuées au hasard comme des cellules individuelles sur toute la racine primaire. Les cellules bactériennes ont été également observées près de la jonction entre les parois longitudinales de cellules épidermiques (Gamalero *et al.*, 2004).

Comme décrit précédemment plusieurs PGPR ne colonisent pas seulement la rhizosphère et le rhizoplan mais aussi pénètrent dans les plantes et colonisent les tissus internes (Compant *et al.*, 2005a; Hallmann et Berg, 2006). En effet, plusieurs études récentes ont confirmé que les plantes abritent un grand nombre de communautés d'endophytes qui découlent de l'environnement du sol (Berg *et al.*, 2005b). Les bactéries endophytes colonisent activement divers tissus végétaux, et établissent des liens à long terme (Hardoim *et al.*, 2008.). Les endophytes peuvent être détectés à l'intérieur du système racinaire suite à la colonisation de la rhizosphère et rhizoplan. Cela a été démontré avec différents genres de bactéries revues récemment par Rosenblueth et Martinez-Romero (2006) et c'est le cas pour certaines des bactéries telles que *Burkholderia* PsJN, *Enterobacter asburiae* JM22 (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997; Compant *et al.*, 2005b). Cependant beaucoup d'autres bactéries pourraient également entrer dans la racine et pourrait être à l'intérieur des plantes. Pour entrer à l'intérieur du système racinaire, le processus de pénétration d'endophytes ne nécessite pas automatiquement de mécanisme actif et presque toutes les bactéries de la rhizosphère peuvent être en effet endophytiques à n'importe quel stade de leur vie (Hardoim *et al.*, 2008). La pénétration peut avoir lieu à des fissures, comme ceux qui se produisent sur les sites d'émergence des racines ou créés par les microorganismes nuisibles, ainsi que par l'extrémité des racines (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998; Fig. 3). Lorsque les bactéries colonisent les racines, ils peuvent envahir les cellules par voie inter et / ou intracellulaire et peuvent pénétrer dans les tissus centraux. De cette façon, ils pourraient atteindre les couches centrales avant la différenciation de l'endoderme bien que l'endoderme est également accessible via la sécrétion d'enzymes dégradant la paroi cellulaire (Compant *et al.*, 2010a). Une autre voie d'entrée par la sécrétion d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaire peuvent être impliqués dans la propagation et la pénétration bactérienne à l'intérieur de la plante. La production d'enzymes de dégradation

de la paroi cellulaire a été détectée dans PGPR et / ou bactéries endophytes pénétrant à l'intérieur de cellules via la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (Hallmann *et al.*, 1997). Les endoglucanase, cellulases et pectinases sont des enzymes produites par de nombreuses bactéries endophytes tels que *Azoarcus* sp. BH72 (Hurek *et al.*, 1994), *Azospirillum irakense* KBC1 (Khammas et Kaiser, 1991), et *Pseudomonas fluorescens* 89B-61 (Benhamou *et al.*, 1996; Quadt- Hallmann *et al.*, 1997) ont été effectivement corrélée à l'entrée de endophytes dans le système racinaire. La dégradation enzymatique des parois cellulaires végétales par ces bactéries a cependant été observée seulement quand ils ont colonisé l'épiderme racinaire mais jamais après la colonisation des espaces intercellulaires du cortex de la racine, ce qui suggère que l'endophytes peut induire la production de cellulases et de pectinases que pour la pénétration dans la plante hôte. Certains des PGPR peuvent coloniser non seulement le cortex racinaire interne mais certains sont également en mesure de franchir la barrière de l'endoderme (Compant *et al.*, 2010a; Figure 2).

Ce processus de colonisation du système vasculaire a été mis en évidence et expliqué pourquoi l'endophytes pourrait se trouver dans les parties aériennes de la plante. Il a en effet été démontré que des endophytes bactériens pourraient être trouvés dans différentes parties végétatives de plantes, comme les racines, tubercules, mais aussi à l'intérieur des tiges et / ou feuilles (Hallmann, 2001; Gray et Smith, 2005; Compant *et al.*, 2005b).

II.2. Importance des bactéries endophytes associatives

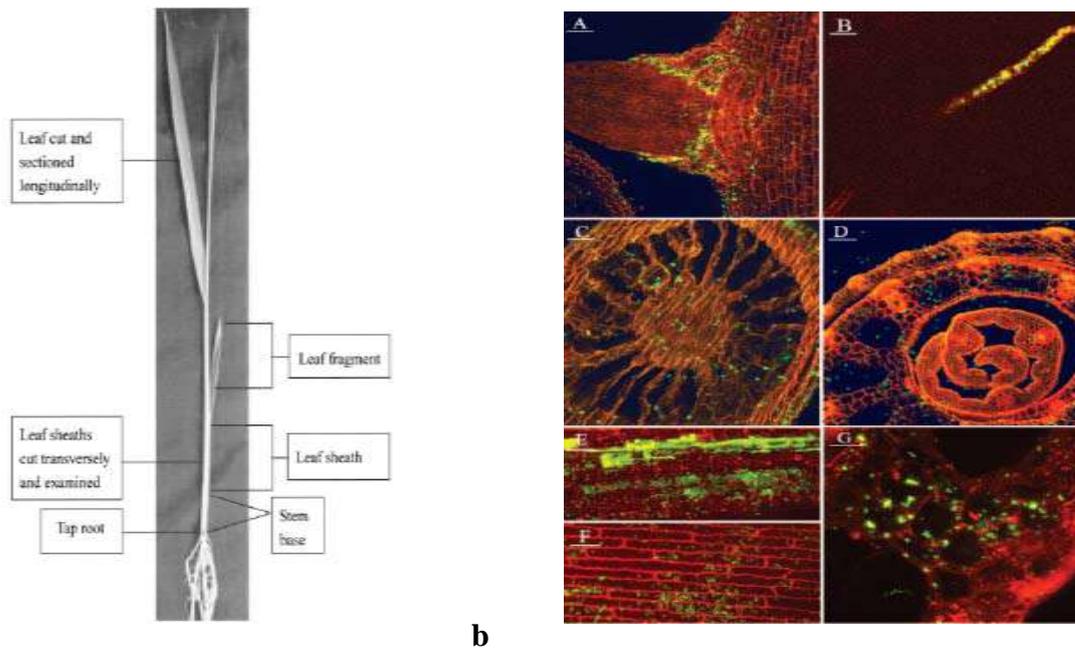
Autre fois les bactéries endophytes ont été considérées comme bactéries pathogènes latents qui ne provoquent ni dommage ni apport bénéfique pour les plantes (Thomas et Graham, 1952). Durant ces dernières années, de nombreux auteurs ont rapporté l'implication de ces endophytes dans l'amélioration de la croissance des plantes, la résistance aux agents pathogènes et de la production agricole (Benhamou *et al.*, 2000; Sturz et Nowak, 2000).

II.2.1. Capacité métabolique des endophytes associatives

Dans le but de les sélectionner et de les améliorer pour une agriculture durable, l'estimation de la capacité métabolique des diazotrophes endophytes dans la plante hôte s'est avérée indispensable. Des gènes convenables pour la fusion transcriptionnelle ont été élaborés à savoir, les gènes *nifH::gusA*, codant pour β -glucuronidase (GUS) de *Escherichia coli* (Jefferson *et al.*, 1987) et d'*Azoarcus* sp. (Egener *et al.*, 1999) ou *nifH::gfp* codant pour une protéine auto-fluorescente (GFP :Green fluorescent protein) ne nécessitant pas de substrat

diffusible ou coloré (Chalfie *et al.*, 1994). La technique GFP a été utilisée aussi bien pour marquer la cellule bactérienne (Fig. 17) (Bloemberg *et al.*, 1997; Chi *et al.*, 2005; Gage *et al.*, 1996; Tombolini *et al.*, 1997), que pour repérer l'expression des gènes *nif* et *fix* des bactéries endophytes abritées par les plante (Egener *et al.*, 1998; 1999).

Des expériences basées sur l'utilisation des gènes GUS (Fig. 18) ont révélé l'existence d'une haute expression ou activité de la nitrogénase (*nifH::gusA*) au niveau des sites d'émergence des racines latérales, (James *et al.*, 1994; James et Olivares, 1997) et de la zone d'élongation des racines latérales (Egener *et al.*, 1999).



a

b

Figure 17: a. Différents tissus du riz utilisés pour détecter la présence des bactéries endophytes (Chi *et al.*, 2005)

b. Image micrographique du clone *gfp* attaché du type sauvage *S. meliloti* 1021 qui colonise les différents tissus sains du riz (Chi *et al.*, 2005)

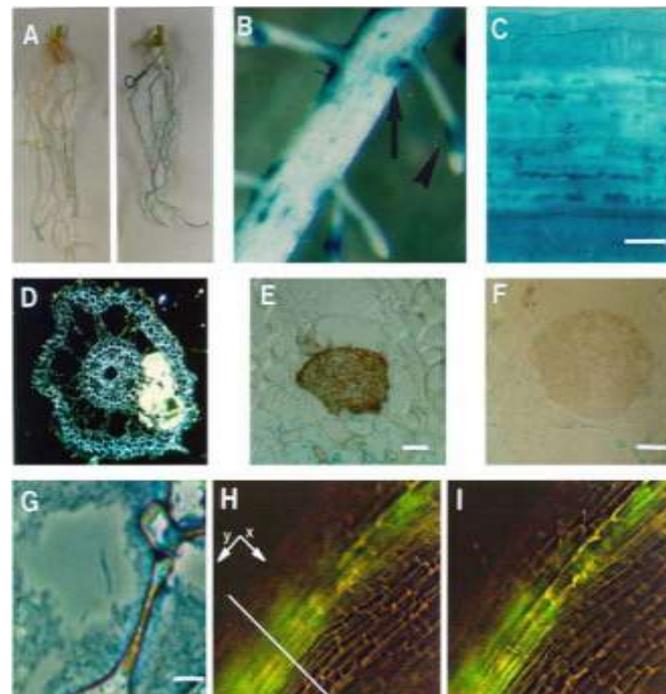


Figure 18: Localisation de l'expression de *nifH::gusA* et *nif::gfp* bactérien, après 14 jours d'inoculation du riz avec *Azoarcus* sp. BH72 (Egener *et al.*, 1999).

II.2.2. Détection des gènes *nif* et *fix* chez les endophytes associatives par PCR

Des études basées sur la technique moléculaire PCR, ont révélé l'existence des gènes impliqués dans la fixation de l'azote (*nif* et *fix*) chez les endophytes associatives, notamment non originaires de rhizobia. Les gènes *nifH*, ont été décelés chez *Azoarcus* sp., associées avec les racines du riz (Egener *et al.*, 1999) et les gènes *nifHD* et *fixABCX*, ont été identifiés chez *Azospirillum brasilense* associées avec les racines de la canne à sucre (Passaglia *et al.*, 1991).

Il est à noter aussi que l'activité de la nitrogénase des diazotrophes endophytes associatives, peut être restreinte par des facteurs environnementaux tels que la température du sol, la pression d'oxygène (Egener *et al.*, 1999) et le niveau de l'azote combiné dans le sol (Merrick et Edwards 1995 ; Egener *et al.*, 1999). Par ailleurs, dans les espaces intercellulaires et les cortex racinaires, ces endophytes trouvent un environnement favorable pour leur prospérité et l'expression de leurs gènes. Chez la canne à sucre et au niveau de la tige, les fluides apoplastiques contiennent une importante concentration en sucres (12.5%, pH5.5) offrant ainsi des conditions optimales aux *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis *et al.*, 1989; Stephan *et al.*, 1991). En outre, la concentration d'oxygène à l'intérieur des racines est estimée à 30µM (Armstrong, 1978) et la puissante respiration des agrégats bactériens réduit cette concentration et instaure ainsi une condition convenable pour l'expression des gènes *fix* dans l'espace intercellulaire (Gilbert et Frenzel, 1998). En conséquence, la tension d'oxygène à l'intérieur des tissus racinaires est permissive à l'activité de la nitrogénase de *Azoarcus* sp. (Egener *et al.*, 1999).

II.2.3. Solubilisation des Phosphates

Le phosphore joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et à l'amélioration de la productivité des plantes(Fig.19). C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Sa concentration dans les sols, varie de 200 à 5000 ppm soit 0,02 à 0,5% (Lindsay, 1979). L'enrichissement du sol en P, suite à des applications de fertilisants, dépend des caractéristiques physicochimiques de ce sol. Dans les sols acides, les oxydes libres et les hydroxydes d'aluminium et de fer fixent le phosphate, tandis que dans les sols alcalins, il est fixé par le calcium, ce qui rend le fertilisant peu efficace. Dans les sols agricoles, la solubilisation des phosphates inorganiques est profondément liée à l'activité des micro-organismes du sol. Plusieurs rhizobactéries

promotrices de la croissance telles que les rhizobia, les *Pseudomonas* et les *Bacillus*, ont été décrites comme étant des bactéries solubilisatrices du phosphate (PSB) (Igual *et al.*, 2001). Les effets bénéfiques de l'inoculation des cultures avec des microorganismes solubilisant le phosphate, ont été décrit par plusieurs auteurs Rodríguez et Fraga, (1999); Sarawgi *et al.* (1999). Les rhizobia sont peut être le groupe le plus prometteur des PSB, du fait de leur capacité à fixer l'azote en plus. Plusieurs publications ont rapporté que les souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* solubilisant le phosphate, améliorent considérablement la croissance et la teneur en phosphore des plantes aussi bien chez les fabacées que chez les non fabacées (Chabot *et al.*, 1996; Peix *et al.*, 2001). Toutefois, l'apport bénéfique des espèces de *Bacillus*, *Escherichia*, *Arthrobacter* et *Pseudomonas*, aux cultures, est estimé de 30 à 35KgP₂O₅/ha (Datta *et al.*, 1982; Mishra, 1985; Gaur *et al.*, 2004). Ainsi, et comme approche alternative pour améliorer la nutrition phosphatée des plantes, Igual *et al.* (2001) suggèrent l'utilisation des bactéries solubilisatrices de phosphates en tant qu'inoculum microbien seul ou en co-inoculation avec d'autres micro-organismes sélectionnés pour d'autres fonctions bénéfiques.

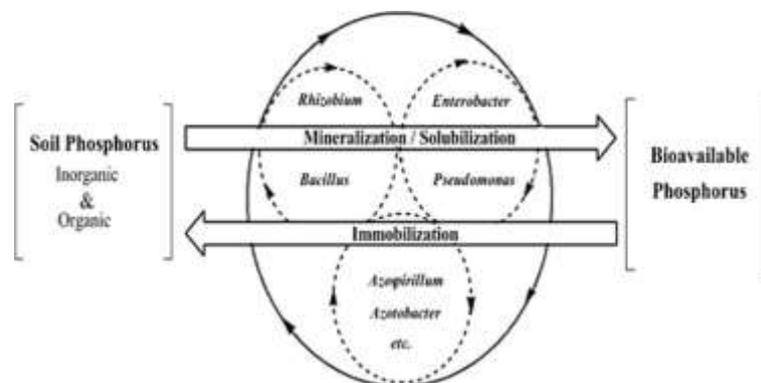


Figure 19 : Représentation Schématique de la solubilisation du phosphore dans sol par les rhizobactéries (Khan *et al.*, 2009)

II.2.4 .Production des phytohormones par endophytes associatives

Les bactéries endophytes sont impliquées directement dans l'amélioration de la croissance et le développement des plantes par la production de diverses phytohormones (Patriquin *et al.*, 1983; Kloepper *et al.*, 1991; Lazarovits et Nowak, 1997). En dehors de leur rôle dans la fixation biologique de l'azote, les espèces de *Azospirillum* inoculées à diverses plantes, ont pu stimuler la production des auxines, des acides gibbérellines et des cytokinines (Hartmann et Zimmer, 1994). *Gluconacetobacter diazotrophicus* apportée en tant qu'inoculum a eu des effets positifs sur la production des phytohormones, activant ainsi le développement des racines initiales dont bénéficie toute la plante (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993)(Tableau. 1). Des résultats similaires ont été trouvés avec le riz inoculé avec *S.meliloti* et *A. caulinodans*. Contrairement aux témoins, leur présence dans la plante du riz a induit une accumulation significative des AIA et gibbérellines dans les racines et les feuilles (Chi *et al.*, 2005). Ces endophytes induisent, non seulement, la production des phytohormones exogènes mais aussi, l'élévation du niveau d'hormone endogène chez les plantes céréalières (Chabot *et al.*, 1996 ; Lupway *et al.*, 2004). Nombreuses sont les bactéries endophytes qui favorisent et améliorent la croissance des plantes. Quoique le mécanisme de stimulation demeure inconnu. Rodelas *et al.* (1993) ont montré que les endophytes microbiens synthétisent et diffusent des composés chimiques promoteurs de la croissance comme les phytohormones (auxines, cytokinines et gibbérellines), les riboflavines et les vitamines (thiamine, niacine et l'acide pantothénique), ce qui suggère que ces composés peuvent être des molécules candidates pour favoriser la croissance des plantes. En effet, l'inoculation de diverses plantes avec différentes espèces d'*Azospirillum* a entraîné une bonne accumulation d'auxines, de gibbérellines et de cytokinines (Hartmann et Zimmer, 1994).

Tableau 1 : Effet des souches PGPR sur la morphologie de la plante

Espece de plante	Souches PGPR	Changement de morphologie	Références
Brassica campestris	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	Elongation des racines	Madhaiyan <i>et al.</i> (2006)
<i>B. campestris</i>	<i>Bacillus circulans</i> DUC1, <i>B. firmus</i> DUC2, <i>B. globisporus</i> DUC3	Elongation des racines	Ghosh <i>et al.</i> (2003)
Vigna radiata L.	<i>Pseudomonas putida</i>	Inhibition de la production d'éthylène	Mayak <i>et al.</i> (1999)
Zea mays L	<i>Enterobacter sakazakii</i> 8MR5 ; <i>Pseudomonas</i> sp. 4MKS8, <i>Klebsiella oxytoca</i> 10MKR7	Accroissement des paramètres agronomiques du Maïs	Babalola <i>et al.</i> (2003)
Zea mays L.	<i>Pseudomonas</i> sp	Elongation des racines chez le Maïs	Shaharooni <i>et al.</i> (2006)

II.2.5. Bio-protection des plantes par des bactéries endophytes associatives

Les bactéries endophytes ayant une association étroite avec la plante, constituent un choix intéressant comme agents de biocontrôle (Tableau. 2). Les endophytes représentent une source importante de composés actifs biologiquement, dont certains sont actifs contre les pathogènes des plantes (Strobel, 2003). En plus de l'antagonisme direct contre les organismes pathogènes, ces bactéries bénéfiques peuvent induire une forme de résistance systémique chez les plantes. Cette induction est généralement due aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram négative, mais d'autres molécules comme les sidérophores et l'acide salicylique sont aussi que sont aussi des molécules candidates. Les LPS induisent une série de gènes protecteurs, parmi eux ceux qui codent pour les protéines liées à la pathogénèse (PR) Sturz *et al.* (1999) ont constaté que 61 des 192 endophytes bactériens isolés à partir des tissus de la tige de la pomme de terre étaient des agents de biocontrôle effectifs contre *Clavibacter michiganensis* sp, *sepedonicus* sp. Plusieurs chercheurs ont isolé et étudié l'antagonisme et l'effet des endophytes comme agents de biocontrôle (Sessitsch *et al.*, 2004). Et ont suggéré que les bactéries endophytes peuvent être utilisées comme pré-traitement des graines avant leurs cultures. Le traitement préalable des graines de concombre (*Cucumis sativus* L.) avec une bactérie endophyte, *Serratia phymuthica* a provoqué la

suppression de l'effet du champignon, *Pythium ultimum* causateur des maladies symptomatiques chez ces plantules (Benhamou et al., 2000)

Tableau 2: PGPR utilisées comme agent de biocontrôle contre différents maladies pathogènes

PGPRs	Cultures	Maladie	Références
<i>Bacillus amylolique faciens</i>	Tomate	Tomato mottle virus	Murphy et al. (2000)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tobac	Tobacco necrosis virus	Park and Kloepper (2000)
<i>Pseudomonas sp</i>	Arachide	Rhizoctonia bataticola	Gupta et al. (2002)
<i>Bacillus sp</i>	Comcombre	Cotton aphids	Stout et al. (2002)
<i>Pseudomonas sp</i>	Medicago	Acyrtosiphon kondoi	Kempster et al. (2002)

III. ETAT D'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES SUR LE GENRE *RETAMA* ET SES MICROSymbIOTES

III.1. Les Rétames

Les Légumineuses du genre *Retama* (Fig. 20), comptant quatre espèces (*R. monosperma* (L.) Boiss., *R. raetam* (Forssk.) Webb, *R. sphaerocarpa* (L.) Boiss. et *R. dasycarpa* (Cosson.). Ce sont des plantes pérennes arbustives appartenant à la sous-famille des *Papilionideae* et à la tribu des *Genisteae* et sont largement distribués dans le Nord de l'Afrique, dans les îles Canaries, dans le sud de l'Europe et dans l'Est de l'Asie (Zohary, 1959).

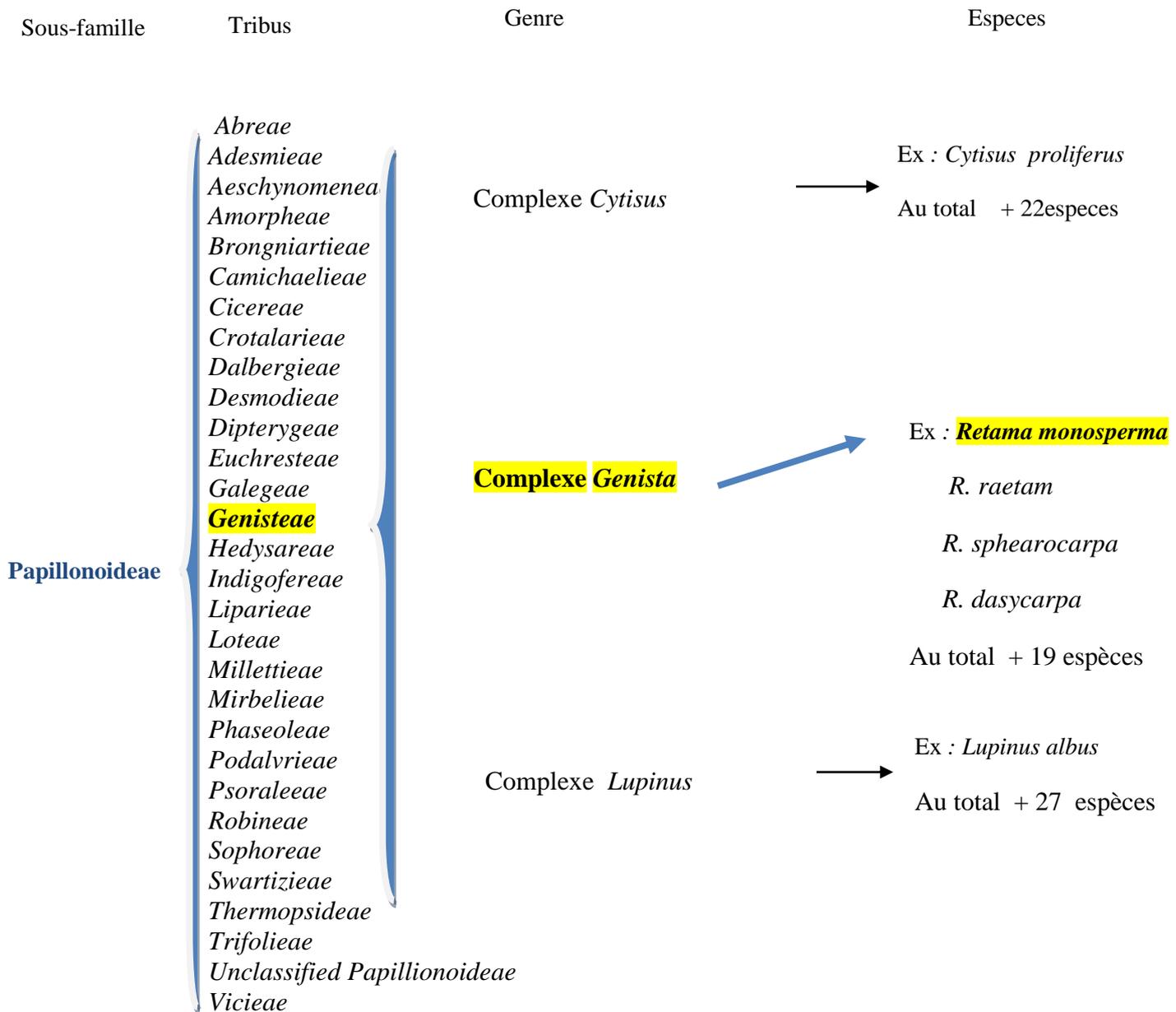


Figure 20 : Place du genre *Retama* dans la phylogénie des Légumineuses.

III.1.1. Description générale du genre *Retama*

Retama est un arbuste ou arbrisseau de un à quatre mètres, portant de longs rameaux ‘joncailles’ dépourvus ou avec peu de feuilles dans le but de s’adapter au milieu désertique où l’eau est rare. La chlorophylle se trouve dans l’écorce des rameaux qu’ils sont donc verts et remplacent les feuilles dans le phénomène d’assimilation chlorophyllienne. Les stomates sont rares et sont confinés dans des cryptes revêtues entourées de poils où l’air y est toujours humide et l’évaporation est fortement réduite. Les tiges sont rigides et leurs parois externes sont épaisses et l’épiderme est recouvert d’une épaisse cuticule (Shalaby *et al.*, 1972). Les fleurs sont en grappe de couleur blanche ou jaune selon les espèces (Shalaby *et al.*, 1972) (Fig. 21). Les gousses sont sub-globuleuses ou ovoïdes et indéhiscentes (Maire, 1952-1987).

Les racines sont profondes et touchent en permanence les couches humides du sol. Elles peuvent accéder dix mètres (Zohary, 1962) et même vingt cinq mètres de longueur pour les trois espèces; *R. raetam*, *R. monosperma* et *R. sphaerocarpa* (Haase *et al.*, 1996).

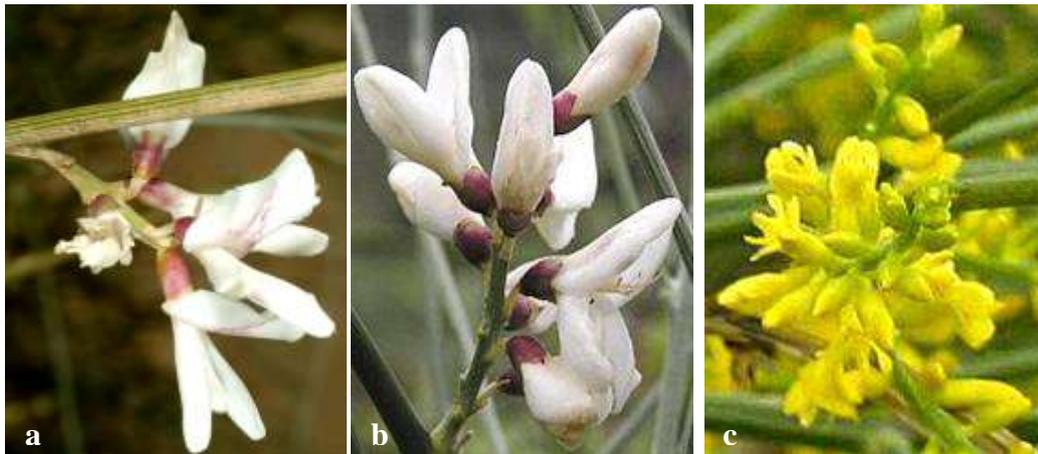


Figure 21: a. *Retama raetam* (Forssk.) Webb ¹, b. *Retama monosperma* (L.) Boiss ², c. *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss ³.

¹https://www.flickr.com/groups/medicinal_aromatic_wild_edible_plants/pool/with/1672091441/light

²<http://www.flickr.com/photos/39929718@N07/4099268124/>

³<http://blogmanualidadeslamusa.blogspot.com/2012/05/porque-retama-plantas-pirofitas-que.html>

Consulté le 11/04/2013.

II.1.1. Description de *Retama monosperma*

C'est un arbuste dressé pouvant atteindre trois à quatre mètres de hauteur (Fig. 22), à tiges ligneuses portant de longs rameaux verts, flexibles et soyeux, d'un vert argenté à un gris argenté, fortement sillonnés. Les feuilles minuscules sont alternes, caduques, de forme linéaire, lancéolée. Leur durée de vie est brève, de quelques jours à quelques semaines, ce qui constitue une bonne adaptation à la sécheresse estivale..

La floraison est généreuse en fin d'hiver, début du printemps. Les petites fleurs papilionacées sont de couleur blanchâtre (Fig. 23. a), très odorantes et groupées en grappe. Ces grappes sont semblables à celles de la *R. raetam* mais souvent plus denses. Les fruits sont de petites gousses arrondies (moins de 2cm), acuminées (qui se termine en pointe) (Fig. 23. b). Elles contiennent une, ou plus rarement deux graines de couleur brun rouge foncé.



Figure 22 : Photographie d'un arbuste de *R. monosperma*



Figure 23 : a. Photographie de la fleur papilionacée de *R. monosperma* ; b. Photographie du fruit (flèche blanche) de *R. monosperma* ¹.

III.1.2. Distribution géographique du genre *Retama*, en Algérie et dans le monde

R. monosperma est ré pondue dans les dunes du littoral, dans les forêts claires, pâturages rocailleux des collines et des basses montagnes des régions bien arrosées, semi-arides et arides (Maire, 1952-1987). Selon Maire (1952-1987), c'est la sous-espèce *eu-monosperma* variété *Webbii* qui est ré pondue sur le littoral atlantique depuis Tanger jusqu'à Sous au Maroc. Tandis que la sous-espèce *Bovei* variété *oransis* est commune sur le littoral depuis Cherchell jusqu'au Maroc. La sous-espèce *Bovei* et variété *Webbii* sont endémique du Maroc et d'Algérie.

R. raetam est une plante du bassin méditerranéen. Son air d'extension va du Maroc jusqu'en Syrie. Cette espèce est rencontrée particulièrement en Algérie et Maroc en Libye en Tunisie en Egypte au Moyen orient: Israël, Syrie, l'Arabie Saoudite, Palestine, Liban en Portugal en Espagne. Elle est rencontrée aussi en Grande Bretagne, Sicile et Australie. En Algérie, *R. raetam* colonise les dunes et les lits des oueds, c'est une plante des sables et est rencontrée au Sahara Septentrional et atteint au sud le Tademaït et le Hamada de Tinghert (Quezel et Santa, 1962).

¹<http://josenaturaleza.blogspot.com/2012/03/retama-monosperma-l-boiss-fam-fabaceae.html>. Consulté le 20/05/2014.

La variété *rigidula f. phaeocalyx* est assez commune dans les Aurès méridionaux, Boussaâda, dunes des hauts plateaux et de l'Atlas Saharien. Tandis que la variété *duriaei f. numidica* est commune sur le Littoral du Nord (Maire, 1952-1987).

R. sphaerocarpa est une plante qui croit dans les pâturages rocaillieux et argileux des montagnes, forêts claires, bords des torrents dans les steppes (Maire, 1952-1987). Cette espèce est répondue en Espagne, au Portugal et en Afrique du nord et très rare au Sahara. En Algérie, *R. sphaerocarpa* est signalée à Ain Sefra, Oued M'zab, Constantine, Maillot, Bouira (Quezel et Santa, 1962).

La variété *eu-sphaerocarpa* est commune dans le Haut Tell, dans les Hauts Plateaux, dans les Aurès et dans l'Atlas Saharien (Maire, 1952-1987). La variété *atlantica* est signalée par Maire (1952-1987) à Djebel Amour.

R. dasycarpa est une espèce endémique du Maroc. Cette espèce pousse dans les forêts claires et pentes rocailleuses des moyennes montagnes semi-arides, aux bords des torrents des montagnes arides. Elle est connue dans le grand Atlas occidental et central, des Seksaoua aux Ftouaka, de l'Autre-Atlas aux Monts Tifenin.

En Algérie, La carte de répartition géographique des espèces du genre *Retama* a été établit grâce aux prospections personnelles de Benmiloud-Mahieddine (2013) (Fig.24).

Dans le monde, la carte de distribution géographique de ce genre n'est pas encore établie ni d'ailleurs sa répartition dans le bassin méditerranéen, mais d'après IDLIS la localisation du genre *Retama* est reportée dans le tableau. 3.



Figure 24 : Répartition géographique du genre *Retama* dans le bassin Méditerranéen (Benmiloud-Mahieddine, 2013)

Tableau 3 : Récapitulatif de la répartition géographique du genre *Retama* dans le monde selon ILDIS¹

	<i>R. monosperma.</i> Boiss	<i>R. raetam</i> (Forsskal) Webb	<i>R. sphaerocarpa.</i> Boiss
Afrique	Algérie (N) Maroc (N) Egypte (N)	Algérie (N) Maroc (N) Tunisie (N) Libye (N) Egypte (N) Saharaoccidentale (N)	Algérie (N) Maroc (N) Tunisie (N)
Europe	Italie (I) Portugal (N) Espagne (N)	Grande Bretagne (I) Sicile (N)	Bulgarie (I) Portugal (N) Espagne (N)
Australie	Australie (I) Tasmanie (I)		
Moyen orient		Les frontières Israélo-jordanienne (N) Les frontières Libano Syrienne (N) Arabie Saoudite (N) La péninsule du Sinai (N)	Argentine (I)
Amérique du sud	Argentine (I)		

(N) : native. (I) : introduite

¹ILDIS: International Legume Database and Information Service In : http://www.systematics.reading.ac.uk/Mr_Linnaeus/ILDIS/Ret.mono.ILDIS.html. Consulté le 10/04/2010

III.1.3. Systématique du genre *Retama* Selon la nouvelle classification, le genre *Retama* et ses espèces suivent le taxon suivant:

Règne: Végétal

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Eu-angiospermes

Classe: Eudi-cotylédones

Sous classe: Rosides

Fabides (APG III, 2009)

Famille: Fabaceae

Sous famille: Papilionaceae

Tribu: Genisteae

Genre: *Retama*

Espèce: *monosperma* (L.) Boiss.

raetam (Forsskal) Webb

sphaerocarpa (L.) Boiss.

dasycarpa. Cosson.

Nom vernaculaire: R'tem.

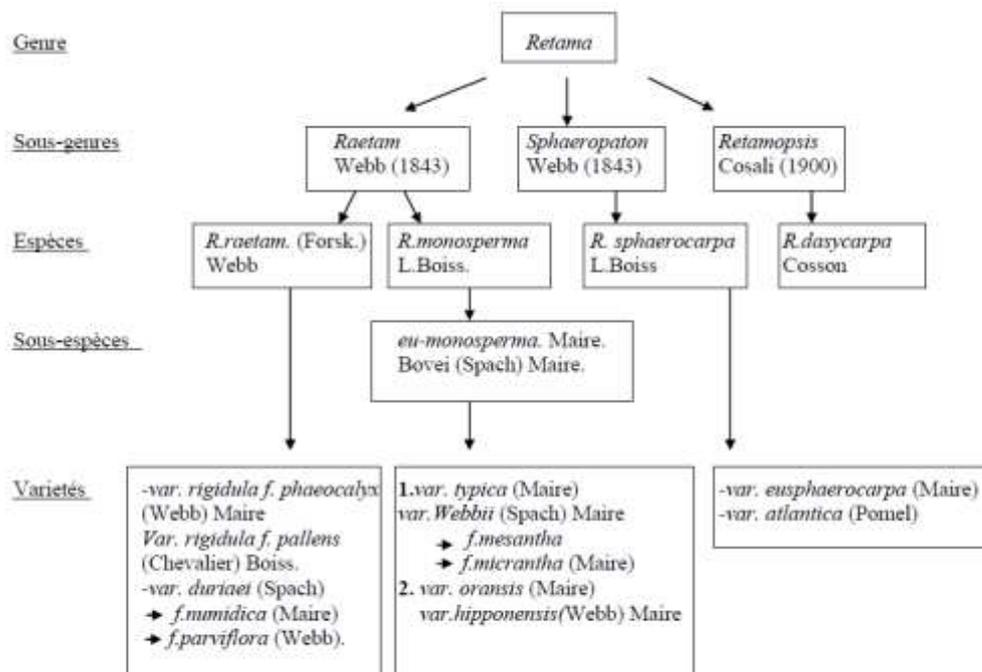


Figure 25: Classification du genre *Retama* selon Maire (1952-1987).

-Etat de connaissance sur la taxonomie du genre *Retama*

Les premières investigations cytogénétiques ont révélées l'existence d'un seul cytotype ($2n=2x=48$), chez *R. raetam* d'Algérie (Reese, 1957), et le même nombre chromosomique chez *R. monosperma* et *R. raetam* au Portugal (Farnandez and Queiros, 1978), ainsi que chez *R. sphaerocarpa* (Gallego-Martin et al. 1988). L'hypothèse d'une polyploïdie secondaire a été avancée chez ce groupe de taxons (Gallego-Martin et al., 1988).

Récemment, des analyses cytogénomiques menées par Benmiloud-Mahieddine (2013), ont démontrées par des modèles de remaniements chromosomiques qui pourraient expliquer l'évolution du caryotype chez *Retama* comme proposés dans la Figure 26. Ce modèle explique qu'un certain nombre de restructurations chromosomiques (translocations, insertion de transposons et certaines pertes de séquences de gènes ribosomiques), sont à l'origine de la divergence des espèces dans ce genre.

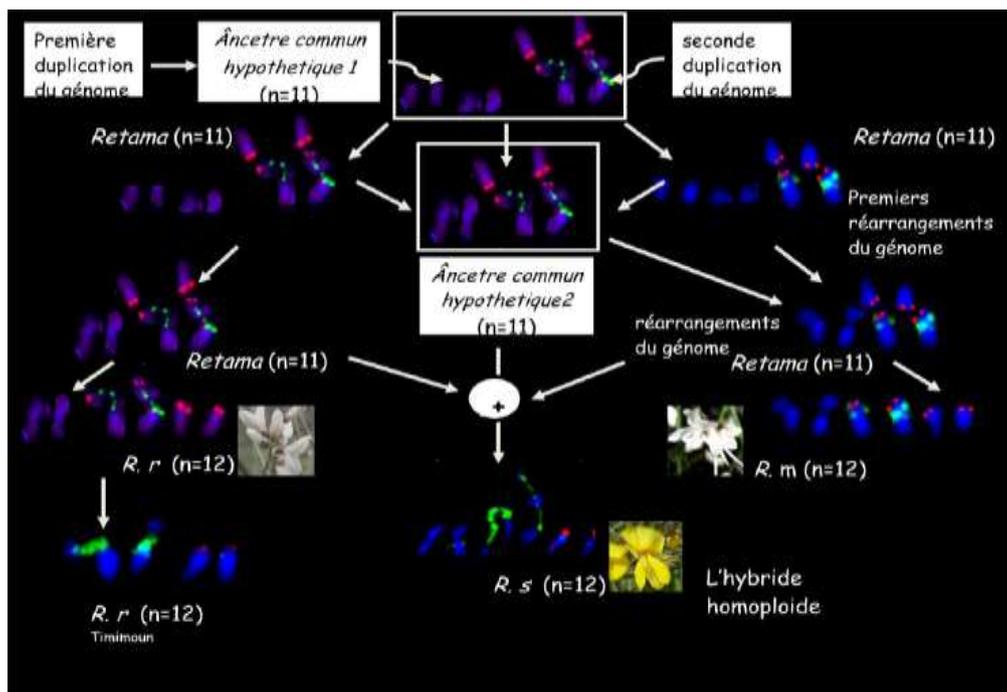


Figure 26 : Les étapes hypothétiques illustrant l'origine des espèces du genre *Retama* (Benmiloud -Mahieddine , 2013)

III.1.4. Importance écologique du genre *Retama*

En Algérie, *Retama* occupe une place considérable dans la flore ligneuse des dunes côtière et dunes sablonneuses du désert. Grâce à son potentiel fixateur d'azote, cette légumineuse arborescente joue un rôle écologique important dans la formation des îles de fertilité "island of fertility" où peuvent se développer plusieurs espèces annuelles et d'autres espèces ligneuses (Pugnaire *et al.*, 1996).

Son expansion dans les zones arides et semi-arides Algérien, est due à son adaptation aux conditions environnementales difficiles qui caractérisent l'habitat de dune, comme la rareté de l'eau et les nutriments, la mobilité du substrat et les embruns salins. En effet une étude récente a confirmé que *R.monosperma* peut tolérer une salinité relativement élevée (Gallego Fernández *et al.*, 2010). Par ailleurs, grâce à son système racinaire important, pouvant atteindre une vingtaine de mètres (Haase *et al.*, 1996). Cette espèce joue un rôle considérable dans la stabilisation des sables dunaires mobiles. Il a été montré que L'expansion de *R. monosperma* dans les zones côtières du SW d'Espagne a stabilisé le système de dunes dans une période de 15-40 ans (Muñoz Vallés *et al.* , 2005) , par une réduction de la mobilité à la fois du substrat et du sable et par l'installation d'autres espèces végétales . Ainsi la fixation des dunes permet l'augmentation de la couverture végétale , et aussi la teneur du sol naissante , ce qui soulève à la fois l'humidité et la disponibilité de l'azote organique (Olson , 1958 ; Connell et Slatyer , 1977; Muñoz Vallés *et al.* , 2011a).

Il est intéressant de noter aussi que dans le cadre du programme de végétation dédiés aux régions dégradées dans les conditions semi-arides méditerranéennes *R. sphaerocarpa*, associées au *Pistacia lantiscus* ont été utilisées pour augmenter l'approvisionnement physico-chimique de la qualité du sol (Caravaca *et al.*, 2003).

III.1.5. Importance pharmaceutique et économique du genre *Retama*

Les espèces du genre *Retama* présentent de nombreuses vertus thérapeutiques, grâce aux alcaloïdes et aux flavonoïdes qu'elles renferment dans ces organes. Des extraits phénoliques, isolés à partir des plants en fleurs de *R. monosperma* ont induit une activité inhibitrice de cellules tumorales de certains cancers cérébraux humaines et peuvent être donc utilisés dans la préparation des médicaments destinés à combattre le cancer (Merghoub *et al.*, 2009 ; Belayachi *et al.* , 2014). En outre, Maghrani *et al.* (2003), a démontré que des extraits de *R. raetam* ont une activité hypoglycémique chez des rats diabétiques. De plus un effet antioxydant significatif a été évalué chez *R. raetam* (Conforti *et al.* ,2004) et récemment chez

R. monosperma par Belmokhtar *et al.* (2014). Aussi, González-Mauraza *et al.* (2013), a démontré qu'un extrait aqueux isolé à partir de *R. monosperma* avait une activité anti-inflammatoire chez le rat (comme modèle de la maladie de Crohn),

III.1.6. Les Rétames et Substances Naturelles

Les rétames ont fait l'objet de nombreuses études pour leur toxicité quant aux métabolites secondaires qu'elles produisent, ce sont des plantes productrices de substances naturelles biologiquement actives. Vingt-huit alcaloïdes ont été isolés à partir des trois espèces du genre *Retama* d'après El-Shazley *et al.* (1996) (Tableau. 4).

Tableau 4 : Noms chimiques de quelques alcaloïdes isolés de *R. monosperma*, *R. raetam*, *R. sphaerocarpa*

	retamine	
	anagyryne	
<i>R. monosperma</i>	cytisine lupanine	El-Shazley <i>et al.</i> , 1996
	sphaerocarpine	
<i>R. raetam</i>	Methylcytisine sparteine N- cytisine retamine anagyryne lupanine	El-Shazley <i>et al.</i> , 1996
<i>R. sphaerocarpa</i>	retamine alpha-sparteine cytisine sphaerocarpine	El-Shazley <i>et al.</i> , 1996

Quant aux flavonoïdes et iso-flavonoïdes, plusieurs études montrent que la partie aérienne des différentes espèces du genre *Retama* sont très riches de ces molécules citons les exemples de: 7-hydroxy-6'-methoxy-3'. 4'methylenedioxyisoflavone 7-o- α -glucoside (6'methoxypseudobaptigenin 7-o- α -glucoside), un isoflavone de type genistein 7-o- α -glucoside (genistin), le daizein 7-o- α -glucoside (daizein) (López-Lázaro *et al.*, 1998) et un flavonol glucoside unique, rhamnazin-3-o- α -glucopyranosyl-(1 α 5)- α -arabinofuranoside chez *R. sphaerocarpa* (Martin-Cordero *et al.* 1999). Il est intéressant de noter aussi que *R. raetam* et *R. sphaerocarpa* contiennent de rare flavones, des retamatrioside (Louaar *et al.*, 2005) et qu'un nouveau iso-flavonoïde a été identifié chez *R. retam*, genistein 7-O-xylosyl 8-C-glucoside (Akkal *et al.*, 2010).

III.1.7. Etat d'avancement sur la connaissance des symbiotes associés au genre *Retama*

Plusieurs études de la diversité des bactéries nodulant les trois espèces du genre *Retama*, ont été menées en Espagne, en Algérie et au Maroc. Ces études révèlent que *Retama*, forment le plus souvent des nodules avec des souches à croissance lente qu'avec des souches à croissance rapide. En effet, les premières caractérisations génotypiques et phylogénétiques de bactéries isolées des nodules de *R. sphaerocarpa* poussant en Espagne (régions semi aride du centre d'Espagne), démontre que ces bactéries, sont à croissance lente et appartenait au genre *Bradyrhizobium* (Rodriguez-Echeverria *et al.*, 2003) et qui sont ensuite classé comme *Bradyrhizobium canariense* par Ruiz-Diez *et al.* (2009). En outre, Une nouvelle analyse phylogénétique des Rhizobia associées aux *R. raetam* et *R. sphaerocarpa* menée au nord-est de l'Algérie a apporté des nouveautés. En effet, cette étude révèle que les bactéries sont rattachées à un groupe monophylétique de *Bradyrhizobium* défini par Menna *et al.* (2009). Dans le quel les isolats de *Retama* forment trois sous groupes basés sur les séquences IGS de l'ADNr 16S et les gènes de ménage (*recA*, *glnII*, *dnaK*, *atpD*), et qui pourraient former trois nouvelles espèces sœurs (Fig. 27).

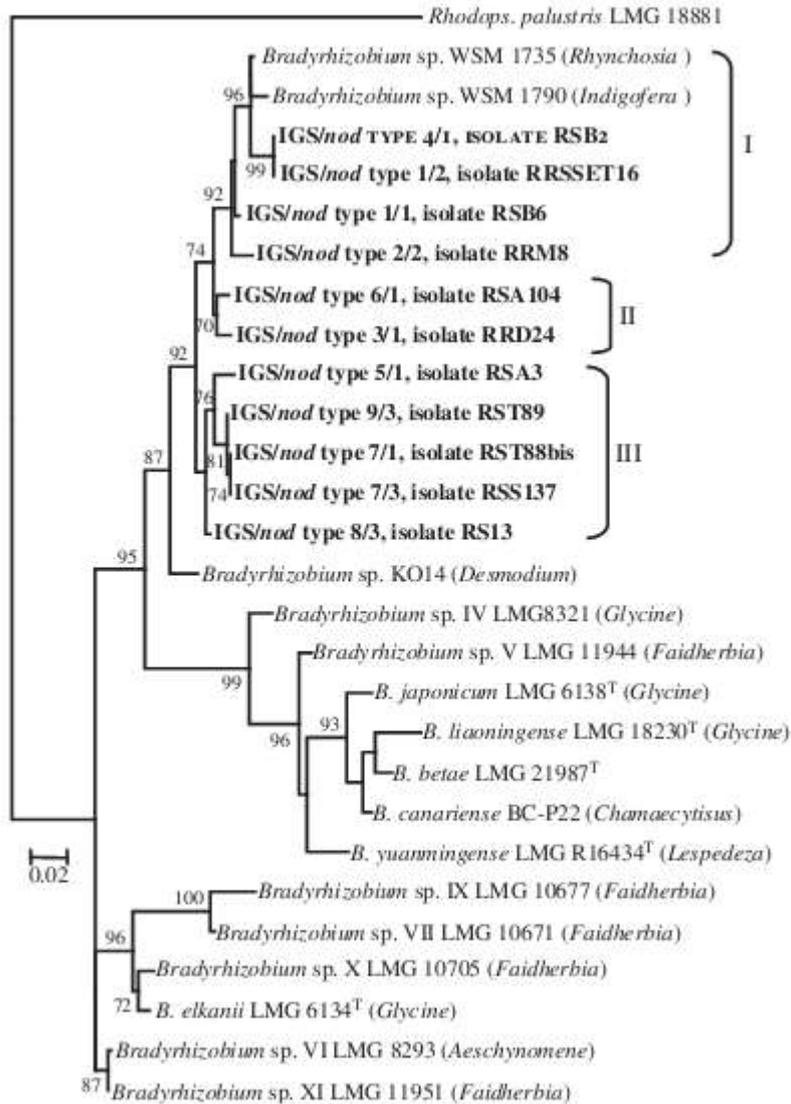


Figure 27: Arbre Phylogénétique basée sur l’alignement de 569 bp de séquences de nucléotide de IGS entre gènes 16S et 23S rRNA. Seules les valeurs de probabilité X 70%, évalués en utilisant aLRT test (SH-like [2]), sont indiqués au point de branchement. La barre d’échelle indique la substitution par site. Les isolats de *Retama* sont indiqués en gras avec leur haplotypes IGS et nodC, les deux premières lettres codent pour l’origine de la plante : RR, *R. raetam*; RS, *R. sphareocarpa*. La lettre,,,T**** indique le type de souche de l’espèce. Les abréviations des genres de bactéries sont les suivants: B, *Bradyrhizobium*; Rhodops, *Rhodopseudomonas*. Numeros d’accession des séquences extrait à partir des GenBank sont les suivants: LMG 18881, AJ534608; WSM 1735, AJ891244; WSM 1790, AJ891246; KO14, AB367716; LMG 8321, AJ279317; LMG 11944, AJ279287; LMG 6138 T , AJ279264; LMG 18230T , AJ279301; LMG 21987T , AJ631967; BC-P22, AY386706; LMG R16434T , AJ534605; LMG 10677, AJ534597; LMG 10671, AJ279272; LMG 10705, AJ534592; LMG 6134T , AJ279308; LMG 8293, AJ279311; LMG 11951, AJ534594. D’après Boulila *et al.* (2009).

Récemment, une étude détaillée de la diversité phylogénétique de souches bactériennes isolées à partir nodules de *R. sphaerocarpa* et *R. monosperma* qui proviennent respectivement d'Espagne et du Maroc. Cette analyse basée sur les séquences de gène ARN r 16S et les gènes de ménages *recA*, *atpD* et *glnII* a permis la découverte d'une nouvelle espèce rhizobiale nommée *B. retamae* sp. Nov, (Guerrouj *et al.*, 2013). Cette nouvelle espèce est classée avec *B. elkanii*/*B. pachyrhizi* dans le groupe II de *Bradyrhizobium* (Fig. 28).

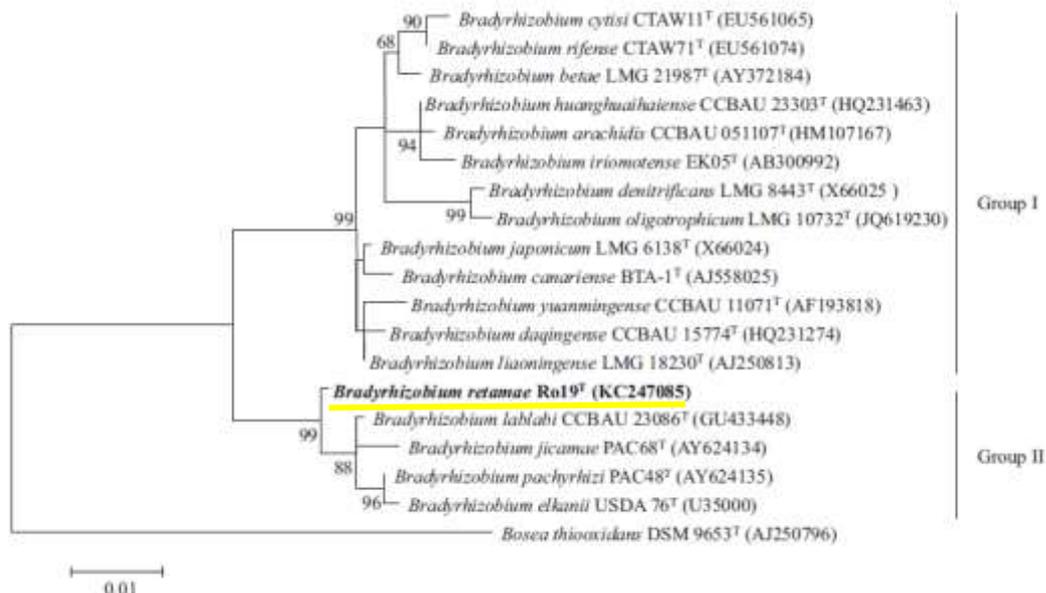


Figure 28 : Arbre phylogénétique montrant le maximum de vraisemblance basée sur les séquences de gènes presque complets de 16S rRNA de *B. retamae* Ro19^T et les espèces restantes de *Bradyrhizobium*. Les nombres sur les branches indiquent les valeurs de *bootstrap* (1000). Bar, 1 substitution par 100 nucléotides. D'après Guerrouj *et al.* (2013).

Très récemment, d'autres analyses phylogénétiques de différents souches isolées des nodules de *R. sphaerocarpa* poussant dans la péninsule ibérique indiquent que *R. sphaerocarpa* s'associe avec les mêmes espèces rhizobiales déjà décrites. En effet, cinq espèces ont été détectées dont *B. canariense*, *B. elkanii*, *B. pachyrhizi* sont les plus dominants par rapport au *B. retamae*. Par cette étude, il a été montré que *B. canariense* a été détectée uniquement dans les sols à pH neutre et acide, alors que *B. retamae* existe uniquement dans les sols alcalins (Rodrigues-Echverria *et al.*, 2014).

Bien que la collection de bactéries nodulant *Retama* sont dominées par les souches à croissance lente, il a été montré récemment que *phyllobacterium myrsinacearum* et *Rhizobium radiobacter* ont été isolées à partir des nodules de *R. sphaerocarpa* poussant en Espagne (Ruiz-Diaz *et al.*, 2009 ; Ruiz-Diaz *et al.*, 2012).

Il est intéressant de noter que les espèces de *Retama* s'associent efficacement avec des champignons mycorhiziens. En effet L'inoculation mycorhizienne de *R. monosperma* par le *Glomus mosseae* contribué une augmentation de la biomasse et de la nutrition phosphatée et azotée chez cette plante (Hatimi, 1997). Il été démontré aussi que l'inoculation de *R. sphaerocarpa* par *Glomus intraradices*, *Glomus deserticola* et *Glomus mosseae* (champignon mycorhizien à vésicules arbusculaires) permet une augmentation de la taille de la plante de 47% par rapport aux plants témoins et aussi d'augmenter leur teneur en azote total, d'améliorer leur absorption phosphorique (Caravaca *et al.*, 2003) et d'augmenter les activités de tous les enzymes antioxydants chez *R. sphaerocarpa* (Alguacil *et al.*, 2003).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

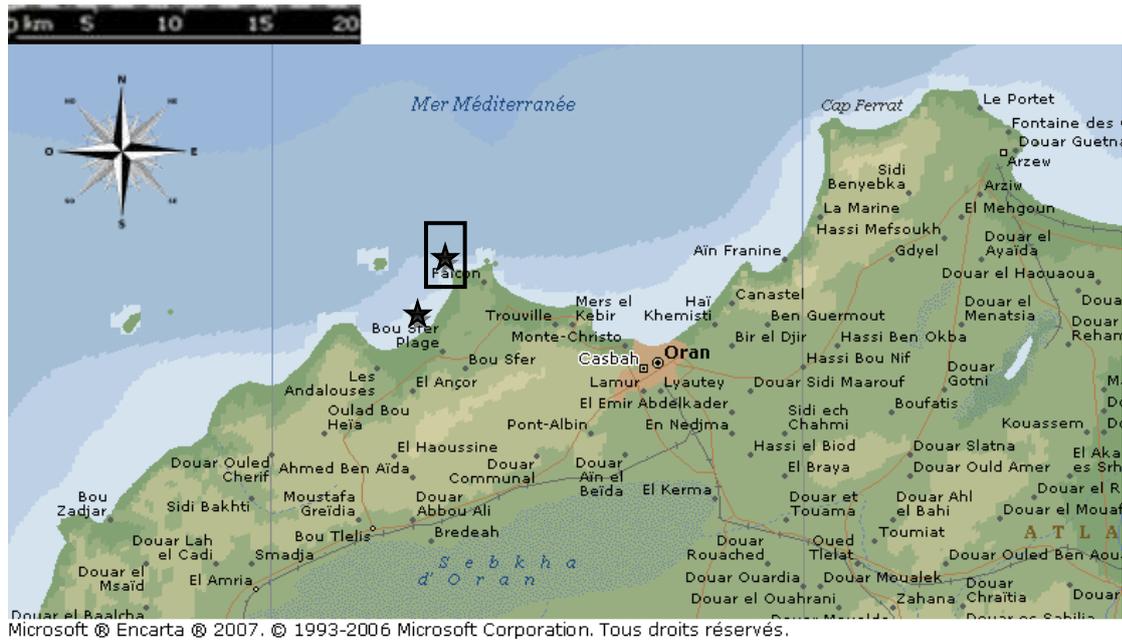


Figure 29 : ★ Station de prélèvement du matériel végétal à étudier (nodules, graines et des échantillons de sol prélevés de la rhizosphère des touffes de *R.monosperma*).



Figure 30 : Photographie du site d'échantillonnage à Cap-Falcon, Janvier 2012.

I. Position, bioclimat et description du site de prélèvement

La station de prélèvement est un complexe dunaire qui se situe sur le littoral oranais, et qui s'étend de la région de Cap-Falcon jusqu'à Bousfer (N. 35°988 W. 00°352) (Fig. 29). Cette station fait partie de l'étage bioclimatique semi-aride. Elle se caractérise par des étés chauds et secs qui durent sept mois et demi et des hivers rigoureux. L'humidité relative est élevée (environ 70 %) et reste constante tout au long de l'année. Les températures moyennes varient entre 18,5 et 32°C pendant la saison chaude, et 5 à 20°C en Hiver. Les quantités moyennes des précipitations sont d'environ 322 mm (Aime *et al.*, 1982). Ces données climatiques concordent avec ceux fournies par l'ONM (Office National Météorologique d'Oran). A cette aridité climatique s'ajoutent les effets de vents violents qui accentuent le déficit hydrique de la végétation. Ces conditions climatiques sont responsables d'une certaine fragilité du couvert végétal. Sur ce site naturel, nous constatons une dominance des touffes de *R. monosperma* (Fig. 30), par rapport à d'autres espèces végétales. Les rétames colonisant ces dunes sablonneuses, mesurent environ 2 mètres de hauteur et sont entourées de jeunes plants de 1 à 10 cm issus de semis.

II. Matériel biologique

Des nodules à différents stades de développement ont été prélevés à partir de jeunes plants de *R. monosperma* issus de germination d'environ 1 à 4 mois, poussant dans les conditions naturelles. La période de prélèvement s'étalait du mois de Janvier jusqu'au mois d'Avril.

III. Méthodes

III.1. Prospection, étude morphologique des nodules et leur répartition

La recherche in situ des nodules de *R. monosperma* présente dans le site décrit précédemment (voire carte) a été conduite aussi bien sur les plantes adultes que sur les jeunes plants. La prospection a touché environ 100 plants. Les nodules ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique (la forme, taille, la couleur le nombre, et leur répartition sur le système racinaire). L'étude du système racinaire des jeunes plants mesure environ 20 cm. La forme des nodules racinaires sont classée selon Corby (1988).

III.2. Etude histologique des nodules

III.2.1. Microscopie photonique et électronique

-Fixation

En totale, environ 30 nodules racinaires régulièrement prélevés au cours de leur développement ont été fixés sous vide à température ambiante pendant 30 min dans le Glutaraldéhyde 2.75 % dans un tampon Cacodylate de Sodium 0.2M à pH 7.2. Ensuite la fixation se poursuit pendant 90 min à température ambiante dans une nouvelle solution fixatrice. Le matériel fixé est ensuite rincé 3 fois pendant 1 heure dans un tampon de cacodylate Sodium pH 7.2.

-Post-fixation

Les échantillons sont post-fixés pendant 1 heure dans une solution de Tetroxyde d'Osmium (OsO_4) à 2 % dans un tampon Cacodylate de Sodium 0.2M. Et ensuite lavés dans la même solution de tampon (3x1h).

-Déshydratation

Le matériel post-fixé est déshydraté dans une série de bains d'alcool éthylique à degré croissant :

Bain EtOH 20°2x15min ;
Bain EtOH 40°2x15min ;
Bain EtOH 60°2x15min ;
Bain EtOH 80°2x15min ;
Bain EtOH 90°2x15min ;
Bain EtOH absolu...2 x 30min.

-Imprégnation par la résine

Le milieu d'imprégnation est la résine Spurr (Spurr, 1969). Le Spurr est préparé à partir de 4 réactifs selon les valeurs suivantes : ERL 4206 :10 ; DER 736 : 6; NSA : 26; S-1 :0.4. Les valeurs indiquées sont en gramme.

Les échantillons sont traités par le mélange résines \solvants selon les proportions suivantes :
Mélange $1/4$ résine de Spurr, $3/4$ EtOH pendant 8 à 12 heures.
Mélange $1/2$ résine de Spurr, $1/2$ EtOH pendant 8 à 12 heures.
Mélange $3/4$ résine de Spurr, $1/4$ EtOH pendant 8 à 12 heures.
2 bains de résines de Spurr pure pendant 8 à 12 heures.

-Inclusion

Les échantillons sont introduits dans des gélules contenant la résine ou dans des moules, ensuite placées à l'étuve à 70°C. La polymérisation dure une nuit

-Réalisation de coupes semi-fines et ultrafines

Les blocs de résines sont taillés sous forme de pyramide tronquée de façon à délimiter l'échantillon. Les sections semi-fines et ultra-fines sont réalisées en utilisant un couteau en diamant, Diatome (Leica) sur un ultra microtome de type Reichert OMU2. Pour la microscopie photonique, les coupes semi-fines flottantes sont récupérées à l'aide d'un anneau puis déposées sur une lame. Après séchage sur plaque chauffante, les semi-fines adhérant sur les lames sont colorées au bleu de Toluidine à 0.1 % (w/v) et de bleu de méthylène à 0.2 % (w/v) dans une solution de borax à 1 %. Les sections sont ensuite observées au moyen d'un microscope, Axioplan imaging Zeiss. Pour la microscopie électronique, les sections ultra-fines flottantes sont récupérées en posant la grille en cuivre sur la coupe. Après séchage des grilles avec du papier filtre, les coupes sont contrastées par de l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb (Reynolds 1963). Les sections sont ensuite rincées plusieurs fois avec de l'eau ultra pure puis séchées et observées au microscope électronique à transmission Jeol 1200EX ou Hitachi HT-7700.

III.2.2. Microscopie à épifluorescence

Pour les observations au microscope à épifluorescence, les nodules ne sont pas post-fixés dans le tétr oxyde d'Osmium, mais sont directement déshydratés par bains successifs de 15 minutes dans de l'éthanol 10%,30%, 50%, 75%, 95% puis trois fois 100%. Les échantillons déshydratés sont inclus dans une résine Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Les coupes fines (10 µm) sont réalisées sur bloc de résine au moyen d'un couteau en acier d'un microtome rotatif MT355S (Leica).

La fluorescence a été observé sur des coupes non colorées en utilisant un microscope Zeiss avec un filtre 01 (excitation: 365/12, em: LP397) ou un filtre 44 (excitation: BP475/40, em: 530/50).

IV. Analyse génétique des microsymbiotes de *R. monosperma*

Quatre nodules sont collectés de jeunes plants de *R. monosperma* poussant dans la même station d'échantillonnage pour l'étude anatomique des nodules décrite précédemment. Ces nodules fraîchement récoltés sont stérilisés dans l'hypochlorite de sodium à 2.6% pendant 15 min, ensuite rincés avec de l'eau distillée stérile et écrasés.

-Amplification et séquençage des fragments de gènes de l'ARNr 16S, *atpD*, *glnII* et *recA*

Pour l'identification des bactéries nodulant *R. monosperma*, des amplifications de l'ADN bactérien sont directement réalisées par PCR sur les nodules écrasés et traités avec polyéthylène glycol alcalin (PEG) comme décrit par Chomczynski et Rymaszewski (2006) (voire annexe : tableau 1).

Les séquences partielles des gènes : *atp*, *recA* et *glnII* sont obtenus en utilisant les amorces décrites par Vinuesa *et al.* (2005). Les séquences de fragment de gène *atpD* sont obtenu en utilisant les amorces *atpD* 255F (GCTSGGCCGCATCMTSAACGT C) et *atpD* 782R (GCCGACACTTCMGAACCNGCCTG). Et les séquences de fragment de gène *glnII* sont obtenu en utilisant les amorces *glnII* 12F (YAAGCTCGAGTACATYTTGGCT) et *glnII* 689R (TGCATGCCSGAGCCGTTCC A). Les fragments partiels de gène *recA* sont amplifiés avec les amorces *recA* 41(TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG) et *recA* 640R (ACATSACRCCGATCTT CATGC). La partie de gènes ARNr 16S a été amplifiée en utilisant les amorces suivantes:16S-9F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') et16S-1577R (5'-AA GGA GGTGATCCAGCCGCA-3'), et aussi l'ADN polymérase GoTaq (Promega), avec une étape de chauffage à 50 °C pour 30 s et une étape d'élongation à 72 °C pendant 90s.

Les produits de PCR ont été purifiés en utilisant le gel Wizard SV et le système de nettoyage (Promega) et séquencés sur les deux brins en utilisant les amorces utilisées pour l'amplification.

Toutes les séquences étaient effectuée en utilisant "ABI Prism BigDye terminator chemistry sur un séquenceur automatique ABI3730 (ABI, Foster City, CA).

V. Quantification de l'ADN par cytométrie en flux

- Modalité d'échantillonnage et extraction des noyaux

Pour la mesure de niveau de ploïdie dans les noyaux par la cytométrie en flux, des racines, tiges, feuilles et nodules sont fraîchement prélevées de jeunes plantes de *R. monosperma*. Des échantillons d'environ 50 mg de chaque organe, sont finement hachés à l'aide d'une lame de rasoir dans 500 µL de Tampon Galbraith's (Galbraith *et al.*, 1983) additionné de 1 % polyvinylpyrrolidone (pvp) 10,000 (Sigma P6755) et 5 µg/mL RNase A (Roche).

Ce mélange a été ensuite filtré sur un tamis en nylon de 50 µm et colorées avec de l'iodure de propidium (30 µg / ml de concentration finale).

Les bactéroïdes ont été préparés par broyage de nodules frais dans 50 mM de tampon TES supplémenté avec du KCl (125 mM) , le succinate de sodium (50 mM) , et de la BSA (1 %) comme décrit par McRae *et al.* (1989) . La suspension a été centrifugé à 100 xg pendant 5 min pour enlever les débris et les noyaux . Le surnageant a été ensuite centrifugé 10 min à 3600 xg. Le culot a été remis en suspension par pipetage dans un 300 µl de Tampon McRae sans BSA , et fixé en ajoutant 700 ul d'éthanol absolu . Pour les mesures de cytométrie, 2,5 µl de la suspension bactérienne fixée a été ajouté à 250 µl de Tampon Galbraith (+ RNase A) et colorées avec de l'iodure de propidium (5 ug / ml de concentration finale) . Des analyses de cytométrie de flux ont été répétées trois fois sur un FACScan Becton -Dickinson .

VI. Isolement des bactéries endophytes à partir des nodules de *R. monosperma*

Dans le but d'isoler des bactéries endophytes associées à *R. monosperma*, de jeunes nodules sont, tous d'abord, détachés délicatement des racines des jeunes plants (Fig. 31), rincés à l'eau (plusieurs lavages) pour éliminer les traces de terre ou de sables puis conservés selon Vincent (1970) ou écrasés par la méthode suivante, les nodules sont désinfectés par une solution de chlorure de sodium pendant 15 min suivit de 10 lavages à l'eau distillée stérile. À l'aide d'une pince flambée à l'alcool les nodules sont ramassés et écrasées sur milieu YEM gélosé (Yeast Extract Mannitol) (voire annexe). L'extrait de chaque nodule estensemencé par des stries d'épuisement. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 5 jours. De chaque boîte incubée, des colonies bien isolées sont repiquées sur milieu YEM et incubées à 28°C pendant 48 à 72h. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de culture pure.les souches pures sont mis en collection dans le glycérol à -80 °C au LIPM Toulouse et au LPV2M Oran.

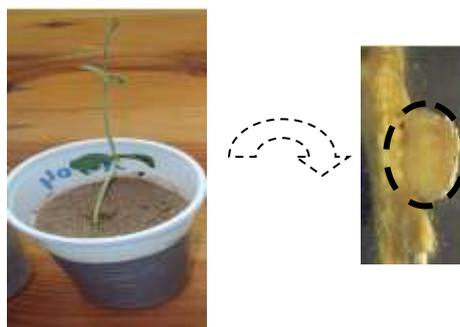


Figure 31 : Photographie d'un jeune plant de *R. monosperma* issu de semis dans les conditions naturelles d'environ 90 jours. La flèche indique un jeune nodule racinaire.

VI.1. Analyse génétique des isolats

Deux souches pures ont été isolés des nodules de *R. monosperma* nommées INR (Isolat – Nodule- *Retama*). L'analyse génétique de ces isolats basée sur le séquençage de l'ARNr 16S est techniquement décrite dans le paragraphe IV.

VII. Conditions de germination des graines de *R. monosperma*

VII.1. Stérilisation

Les graines sont d'abord scarifiées par traitement dans de l'acide sulfurique (97%) pendant 5 à 6 heures, puis rincées au moins 3 fois dans de l'eau stérile. Afin de les stériliser en surface, les graines sont traitées dans une solution de chlorure de sodium pendant 2 min et ensuite rincées abondamment afin d'éliminer les traces de chlore. Cette dernière partie est réalisée en conditions stériles.

VII.2. Germination des graines

Une fois stérilisées, les graines sont déposées sur un milieu gélosé et placées à 25°C pendant 5 jours. Les boîtes de pétri sont retournées afin que les radicules poussent verticalement en dehors de la gélose.

VII.3. Système de culture des plantes de *R. monosperma*

Le choix était de faire une culture *in vitro* dans des tubes en verre et sur un milieu de culture Jensen (voir annexe) (Vincent 1970).

Les tubes sont placés en chambre de culture *in vitro*, pendant 2 jours à (25°C, 16 heures de photopériode, >200 $\mu\text{E}\cdot\text{s}\cdot\text{l}\cdot\text{m}^{-2}$ d'intensité lumineuse).

VII.4. Inoculation des plantes

Les bactéries sorties de la conservation sur glycérol, sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YEM (Vincent 1970) gélosé. La souche INR1 est incubée pendant 24 heures dans une chambre de culture à 28°C et à l'obscurité. Un inoculum se fera par la suite avec le milieu YEM liquide par introduction d'une colonie de la souche. Celui-ci est incubé pendant 24 heures dans la chambre de culture. Cet inoculum INR1 est distribué à raison de 1 ml (DO_{600nm} ~ 1) dans 30 tubes contenant les plantules après 2 jours de leur mise en tube.

La souche INR2 est incubée pendant 6 jours dans une chambre de culture à 37°C et à l'obscurité. Un inoculum se fera par la suite avec le milieu YEM liquide par introduction d'une colonie de la souche. Celui-ci est incubé pendant 4 jours dans la chambre de culture.

Cet inoculum INR2 est distribué à raison de 1 ml (DO_{600nm} ~ 1) dans 30 tubes contenant les plantules après 2 jours de leur mise en tube.

VIII. Etude histologique des racines de *R. monosperma* après inoculation

VIII.1. Microscopie photonique et électronique

Pour une meilleure observation des sites d'infection, 10 jours qui suit l'inoculation, des racines entières ont été éclaircies par trempage dans de l'hypochlorite de sodium comme décrit par Truchet *et al.* (1989). Les échantillons ont été observés par microscopie (Microscope optique, Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Allemagne). Pour les observations histologiques détaillées, les racines inoculées non colorées ont été fixées dans une solution de fixation (Tampon phosphate 0.1M pH 7.2 et glutaraldéhyde 2.5% (v/v)), puis déshydratées dans des bains successifs d'éthanol et finalement incluses dans une résine Technovit 7100 (Hereaus Kulzer, Wehrheim, Allemagne). Les coupes semi-fines (4 à 6µm) de nodules ont été observées par microscopie à fond clair après coloration par une solution au bleu de Toluidine 0.2%. Pour les études de microscopie électronique, après l'étape de fixation au glutaraldéhyde, les racines ont été fixées dans un tampon phosphate contenant 1% d'osmium, et incluses dans de le Spurr (Spurr, 1969) ou dans l'Epon comme décrit par Vasse *et al.* (1993). Les grilles ont été examinées en utilisant un microscope électronique Hitachi H600.

Toutes les expériences ont été répétées trois fois avec des résultats similaires indépendants sur chaque fois 10 plantes. Plusieurs sections ont été utilisées pour visualiser la colonisation et le comportement des bactéries isolées vis-à-vis *R. monosperma*.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Prospection, morphologie et répartition des nodules

Dans le but de décrire la morphologie et la répartition des nodules sur les racines, des prospections sur le système racinaire de *R. monosperma* à différents stades de développement, poussant dans les conditions naturelles des dunes côtières du nord ouest Algérien (Oran) ont été réalisées.

Nos observations sur le terrain montrent que dans le cas des plantes adultes, les nodules apparaissent au niveau des racines latérales et sur les racines adventives dès Janvier. Cette période de l'année, riche en humidité correspond chez la plante à la mise en fleurs. La nodulation s'étend jusqu'à la maturation de la gousse. En saison estivale, certains nodules à proximité de la surface se dessèchent et disparaissent, alors que d'autres persistent dans les profondeurs humides.

-Dans le cas des plantes jeunes, les observations effectuées de Janvier à Juillet ont porté sur 80 à 100 jeunes plants issus de semis, poussant dans les conditions naturelles et en serres. Les nodules apparaissent le plus souvent sur les racines latérales, parfois sur la racine principale et rarement à la base des racines.

La nodulation persiste jusqu'à Juillet chez la majorité des jeunes plants.

Il est intéressant de noter que les nodules sénescents se régénèrent par l'activité du méristème lorsque la période de sécheresse est courte et suivie par une période humide.

-Dans le cas de jeunes plants d'environ 90 jours, Le nombre de nodules qui se répartissent sur un système racinaire mesurant environ 20 cm, varie selon les plantules de 1 jusqu'à environ 10 nodules par plante.



Figure 32 : Morphologie générale des nodules racinaires de *R. monosperma* dans les conditions naturelles. Barre, 3 mm.

-Les nodules jeunes présentent une forme sphérique et une couleur blanchâtre, ensuite évoluent dans le temps en forme allongée et prennent la couleur du sable avec une partie proximale de couleur brunâtre. Les nodules sénescents changent de couleur et deviennent totalement brun et complètement desséchés.

-Les nodules prélevés mesurent le plus souvent entre 1 mm et 1 cm, et présentent des formes diverses (Fig.1). Les nodules qui se rattachent à la racine sont soit unique avec un seul point de croissance (Fig.1.a), soit multilobés avec une vascularisation qui se ramifie dans tous les lobes (Fig.1.b). Généralement les nodules se développent en grappes, soit à partir d'une seule (Fig.1.c) ou multi-origine (Fig. 1.d) et parfois des nodules individuels encerclent toute la racine.

II. Analyse génétique des bactéries

Pour l'identification des bactéries qui colonisent les nodules de *R. monosperma*, une analyse génétique basée sur les gènes ARNr16S, et les gènes de ménages *atpD*, *glnII* et *recA* a été réalisée. A partir de quatre nodules sauvages, Les fragments de gènes bactériens sont directement amplifiés en utilisant des amorces universelles (voire matériel et méthodes) et séquencés. Les quatre nodules présentent les mêmes résultats.

Le consensus des séquences (voire annexe) et l'analyse des nucléotides par blast contre la base de données des nucléotides NCBI (voire annexe) montrent que les séquences des quatre gènes (*ARNr16S*, *atpD*, *glnII* et *recA*) sont à 99% voir 100% identique aux séquences de *Bradyrhizobium retamae* R7Q2, la souche obtenue des nodules de *Retama sphaerocarpa* (Guerrouj *et al.*, 2013).

Ces résultats indiquent que les micros-symbiotes présents dans nos nodules sont taxonomiquement identiques à ceux récemment identifié chez *R. sphaerocarpa* par Guerrouj *et al.* (2013).

III. Structure anatomique des nodules de *R.monosperma*

L'étude anatomique des nodules racinaires collectés à partir de plants de *R. monosperma* poussant dans les conditions naturelles révèle que les nodules sont de type indéterminé avec un méristème persistant. La réalisation de sections sur des nodules à différents stades de développement nous a permis de déterminer la compartimentation internes de ces nodules (planche I).

Le nodule est caractérisé par des tissus spécifiques périphériques et centraux, de l'extérieur vers l'intérieur nous observons que le nodule mature est complètement entouré par

un cortex constitué de plusieurs couches cellulaires au nombre qui varie de 4 ou 5 jusqu'à 12 (Planche I. a).

Les cellules du **cortex externe** apparaissent de couleur brunâtre aux parois probablement hautement lignifiées comme est déduit à partir de l'auto fluorescence sous excitation UV (Fig. 33).

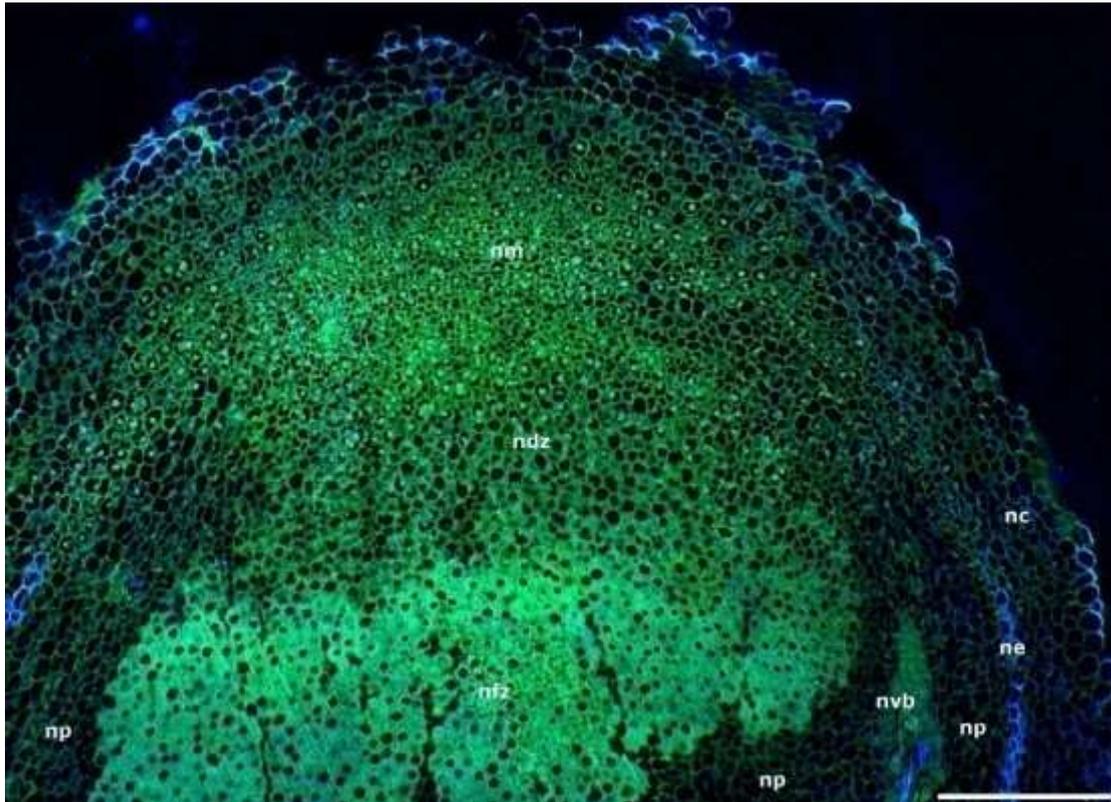


Figure 33 : Section Semifine dans la zone apicale du nodule de *R. monosperma* observée par un microscope à épifluorescence sous excitation UV (ex: 365/12, em: LP397). Les parois cellulaires du cortex externe ont une forte autofluorescence indicative d'une lignification. Aussi l'endoderme du nodule à plusieurs couches fluoresce fortement. nm : méristème nodulaire, nc cortex du nodule, ndz : zone de différenciation du nodule, ne : endoderme du nodule, nfb : zone de fixation d'azote, np : parenchyme du nodule, nvb : faisceaux vasculaire du nodule. Barre, 400 μ m

Le cortex externe est séparé du tissu interne du nodule par l'endoderme qui est en continuité avec l'endoderme de la racine et qui s'ouvre seulement à la partie subapicale du nodule où le méristème nodulaire est situé.

L'**endoderme** nodulaire est constitué de 1 ou plusieurs couches cellulaires à paroi fortement lignifiées résultant en une forte auto fluorescence sous excitation UV (Fig. 34). Et le **parenchyme nodulaire**, qui contient les faisceaux vasculaires.

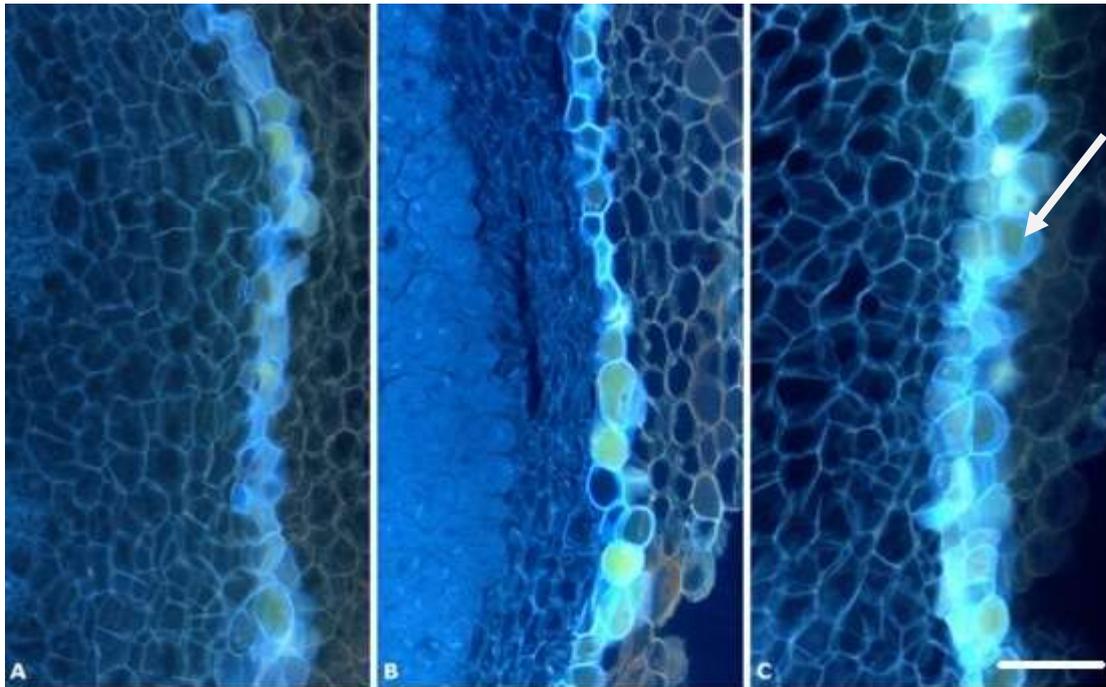


Figure 34 : Sections Semifines de la région périphérique des nodules de *R. monosperma* montrant l'endoderme nodulaire (flèche blanche) sous excitation UV (ex: 365/12, em: LP397). **A.** région apicale du nodule. **B.** région médiane du nodule. **C.** la partie basale du nodule. Barre, 75 μ m.

La zone centrale qui caractérise les tissus internes du nodule contient les bactéroïdes. Plusieurs couches cellulaires parenchymateuses séparent les tissus contenant les bactéroïdes des tissus vasculaires. Les faisceaux vasculaires du nodule possèdent leur propre endoderme d'une seule couche de cellules et un phloème positionné vers l'intérieur et le xylème vers l'extérieur.

La région centrale est divisée en quatre zones selon l'âge du nodule: on peut distinguer de la partie distale à la partie proximale,

- Une **zone méristématique**, dans la quelle nous avons discerné deux parties individualisées, une partie apicale non infectée à la quelle s'ajoute la partie basale envahis exclusivement par des bactéroïdes (Planche I. b et c). Nous avons observé des cellules en

division qui se trouvent dans une vaste zone apicale comprenant le cortex du nodule, la région de cellule souche des nodules et le début de la zone de différenciation. Aucun cordon d'infection n'a été détecté dans cette zone.

-Une **zone de différenciation**, dans cette zone les cellules grandissent de manière isodiamétrique pour devenir quasi sphériques dans la partie proximale (Planche I. d et e). Elles contiennent de nombreuses petites vacuoles qui semblent fusionner et s'organiser dans une vacuole centrale dans les cellules de la zone de fixation l'azote. Concomitante avec l'élargissement du volume de la cellule, nous observons l'augmentation des amyloplastés pour atteindre un maximum à la partie la plus distale de la zone de fixation de l'azote (Planche I. e). Le nombre de bactéroïdes augmente progressivement entre le méristème et la zone de fixation l'azote.

-La **zone de fixation de l'azote**, dans cette zone l'espace cytoplasmique des cellules hôtes est complètement occupé par des bactéroïdes (Planche I. f). Les cellules non envahies n'ont jamais été observées dans la zone fixation de l'azote des nodules de *R. monosperma*.

IV. Ultrastructure des tissus internes du nodule

Les Cellules de la zone méristématique du nodule sont caractérisées par, un cytoplasme relativement dense, un gros noyau en forme ronde ou allongé avec un nucléole, une chromatine dense et uniformément distribuée et la présence de nombreux plastides de tailles et formes variables (planche II). Certains plastides incluent un certain nombre de particules denses aux électrons, les plus probables, des plastoglobules, et dans certains cas des tubules. Dans les sections ultrafines, les cellules contiennent un certain nombre de vacuoles de taille variable, occupant la moitié de l'aire de surface de la cellule. Les vacuoles ont souvent des extensions en forme de tube suggérant qu'ils sont interconnectés et faisant partie d'un seul système vacuolaire.

Le méristème est divisé en une zone distale sans bactéroïdes (planche II. a et b) et une zone proximale, dans laquelle toutes les cellules sont envahies par les bactéroïdes (planche II. b). L'absence du cordon d'infection nous permet de suggérer que les cellules sont directement envahies par les bactéries. Nous ne connaissons pas jusqu'à présent le mode d'infection des Rhizobia pour la nodulation de *R. monosperma*, hors quelques observations (planche II. c et d), nous permet d'émettre une hypothèse qu'un envahissement intracellulaire se fait par dégradation de la paroi des cellules hôtes. En effet, les bactéroïdes

ayant pénétrés la paroi sont inclus dans une matrice dense aux électrons qu'on suggère qu'elle soit d'origine pariétale.

Dans la zone de différenciation, les cellules sont hautement vascularisées et en générale, les bactéroïdes sont allongées, en forme de bâtonnet ou en forme de Y, et contiennent des inclusions dense aux électrons similaire à des polyphosphates. Dans cette zone, les bactéroïdes se divisent activement, ce qui conduit à l'augmentation progressive de la masse bactérienne (Planche III. a et b). Après la division, les bactéroïdes se séparent et restent enfermés individuellement dans un symbiosome ou forment un certain nombre (éventuellement jusqu'à quatre bactéroïdes) dans un symbiosome. Dans la partie proximale de cette zone, la vacuolisation diminue rapidement et Les pro-plastes, les amyloplastes et les mitochondries se déplacent en périphérie du cytoplasme riche en réticulum endoplasmique, et s'orientent parallèlement aux plasmalemmes proches des espaces intercellulaires au sein de la même cellule (Planche III c et d). La progression de bactéries dans le nodule semble se produire exclusivement par la division des cellules de la plante et de la redistribution des symbiosomes entre les deux cellules sœurs. Les bactéroïdes continuent à se diviser jusqu'à ce qu'ils atteignent la zone de fixation de l'azote des nodules où ils occupent une grande partie du volume la cellule. La jonction entre la zone de différenciation et la zone fixation de l'azote n'est pas homogène et elle est marquée à la fois, par une augmentation de la taille et par une modification de la conformation des bactéroïdes (Planche IV. a). Dans les cellules infectées de la zone de fixation, les bactéroïdes présentent une forme sphérique à légèrement elliptique, mesurant environ de 1 μm à environ 2 μm .

Toutes les cellules sont remplies de bactéroïdes et la partie centrale restante est occupée d'une grande vacuole unique avec un noyau oppressée d'un seule coté (Planche IV. b). Ces bactéroïdes peuvent contenir jusqu'à trois inclusions de polyphosphate et d'un ou plusieurs granules de poly-hydroxy-butyrate (PHB) (Planche IV.c et d). Dans la partie la plus proximale du nodule, les bactéroïdes se dégènèrent progressivement, l'espace pér bactéroïdien apparaît plus grand que celui des jeunes bactéroïdes et la lyse est assurée par la cellule. La membrane du symbiosome fusionne avec le tonoplaste, et subissent ensuite une dégradation dans la vacuole (Planche V. a et b). La zone saprophytique comme décrit dans les nodules de *M. truncatula* (Timmers *et al.*, 2000) n'a pas été observée dans les nodules de *R. monosperma* collectées pour cette étude.

V. Analyse de l'endoréduplication chez *R. monosperma*

Chez les Légumineuses, l'endoréduplication est un processus par le quelle, les bactéroïdes au sein des nodules de type indéterminé augmente leur quantité d'ADN.

Dans notre étude, l'analyse de la quantité d'ADN a été réalisé aussi bien sur les bactéroïdes que sur les différents organes (tige, feuilles, racines, nodules) de jeunes plants de *R. monosperma*.

Les résultats obtenus par la cytométrie en flux indiquent nettement qu'aucune endoréduplication d'ADN nucléaire abondante n'a été détectée dans n'importe quelle partie analysée de la plante (Fig. 35). Seuls de faibles niveaux de endoréduplication ont été observées dans les nodules (8C = 2,70%), les tiges (8C = 1,93%), les feuilles et les racines (8C = 0,7%) (Fig. 36a). Le profil de l'endoréduplication du microsymbionte contient quatre pics distincts (Fig. 36b) correspondant aux teneurs en ADN de 1C, 2C, 3C et 4C.

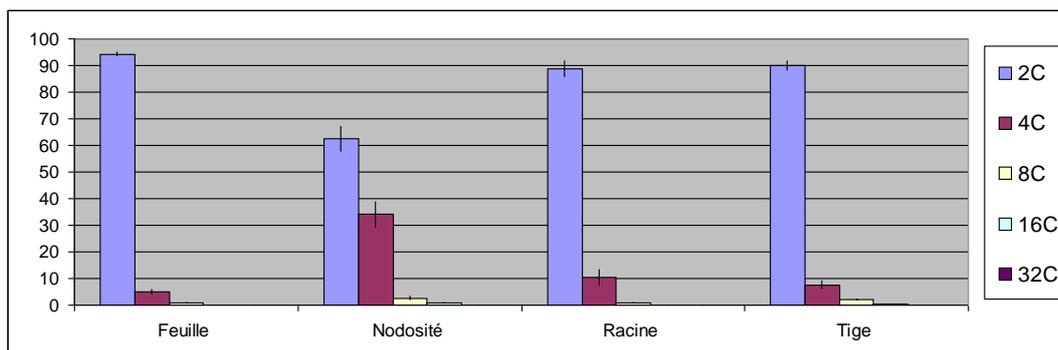
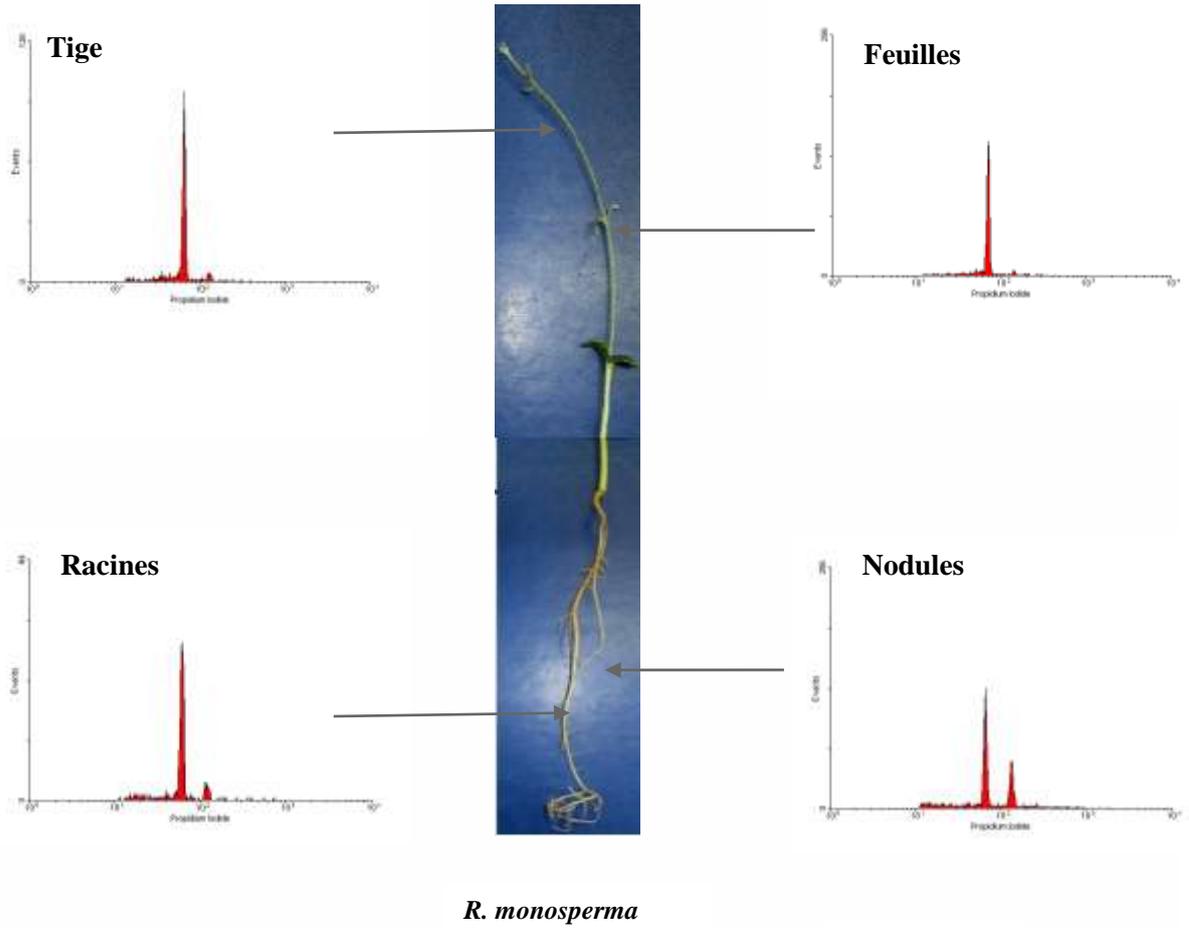
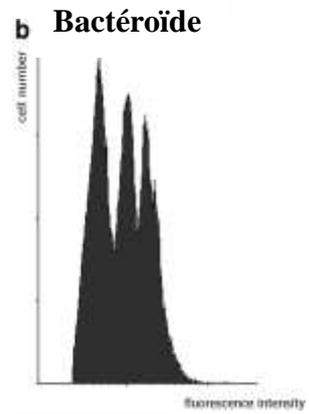
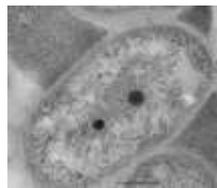


Figure 35 : Niveaux de ploïdie des différents organes de *R. monosperma* et de bactéroïdes isolées de nodules tel que déterminé par cytométrie en flux. a. histogramme montrant le pourcentage de cellules avec un niveau de ploïdie spécifique par un organe de plante.



a



b

Figure 36 : Vérification des niveaux de ploïdie et de la quantité d' ADN par Cytométrie en Flux. **a.** les pics indiquent les niveaux de fluorescence des échantillons correspondants en phase G1 du cycle cellulaire chez *R. monosperma*. **b** .profils de ploïdie de bactéroïdes avec quatre pics correspondant à des niveaux de 1C, 2C, 3C et 4C.

DISCUSSION

Notre étude porte sur la caractérisation morphologique et anatomique des nodules de *R. monosperma*, qui colonisent les côtes oranaises en Algérie. Récemment, des microsymbiotes ont été isolés à partir des nodules racinaires de *R. monosperma* et *R. sphaerocarpa* collectés respectivement du Maroc et de l'Espagne, et identifiés comme *Bradyrhizobium retamea* sp. Nov (Guerrouj *et al.*, 2013). Pour déterminer l'identité de bactéries présentes dans les nodules collectés pour cette étude, nous avons comparé les séquences de l'ARNr 16S et les trois gènes de ménage (atpD, glnII et recA) avec les séquences équivalentes de *B. retamae*. Les résultats révèlent que les séquences sont analogues de 99% à 100% et correspondent aux séquences obtenues à partir de *Bradyrhizobium retamae* R7Q2 (Guerrouj *et al.*, 2013). Ainsi les microsymbiotes identifiés dans les nodules de *R. monosperma* collectée en Algérie sont identiques à ceux identifiés chez *R. sphaerocarpa* provenant d'Espagne, *B. retamae* (Guerrouj *et al.*, 2013 ; Rodrigues-Echverria *et al.*, 2014). Jusqu'à présent *B. retamae* a été isolé à partir des nodules de deux légumineuses étroitement liées, d'autres investigations seront utiles pour étudier le spectre d'hôte qui peut s'étendre au de la de ces deux espèces de légumineuses notamment à ceux appartenant à la tribu des Genisteae, dans cette tribu, les plantes forment un seule groupe d'inoculation croisée comme le cas des isolats des nodules de *Genista tinctoria*. Quelle que soit leur origine, ces isolats étaient capables de former des nodules fixateurs d'azote non seulement sur leur hôte native, mais également sur d'autres plantes de la tribu Genisteae tels que: *Sarothamnus scoparius*, *Lupinus luteus* et *Chamaecytisus ratisbonensis* (Kalita *et al.*, 2006).

Afin de définir les caractéristiques particulières des nodules de *R. monosperma*, nous avons entrepris dans une première étape une étude morphologique des nodules prélevés dans leurs milieux naturels.

Dans notre prospection, nous avons enregistré toutes les formes de nodules comparables à celles décrites par Corby (1988) chez différentes espèces de légumineuses. Toutes les plantes examinées présentent des nodules de forme très variables, globulaire, fusiforme, allongé, bilobé, ou même coralloïde. Cette diversité de forme des nodules de *R. monosperma* présente une exception, vu que généralement, une forme typique de nodule caractérise une espèce

végétale. En effet, comme a été précédemment rapporté par Corby (1988), qu'une forme de nodule peut être typique pour une tribu ou que plusieurs formes de nodules peuvent être possibles dans une seule tribu. Plusieurs études démontrent qu'une forme des nodules était hautement spécifique de l'espèce végétale et ne dépend pas des souches de *Rhizobia* (Nutman, 1956; Dart, 1977 ; Sprent, 2006 ; Rejili *et al.*, 2007 ; Guinel, 2009). Alors que récemment, Chmelíková *et al.* (2012), a observé des nodules chez *Trifolium arvense* en forme d'éventail, d'une taille différente par rapport aux autres plants de la même espèce et qui suggère qu'il est possible que différentes espèces de bactéries pourraient être à l'origine de la formation de cette diversité d'aspect nodulaire dans la même espèce végétale, d'autres investigations approfondies seront nécessaire pour répondre à ce paradoxe.

La forme la plus fréquemment enregistrée des nodules de *R. monosperma* est la forme allongés, le plus souvent avec un aspect ramifié et qui rappelle le nodule de type crotalaroïde, selon la terminologie définie par Corby (1988). Ces nodosités possèdent généralement une forme en éventail avec plusieurs lobes qui émergent à partir d'un seul point d'attachement au niveau de la racine et progressent par diffusion latérale des méristèmes apicales. D'autres formes de nodules de type lupinoïde décrit par Corby (1988), ont été observées, ces nodules progressent par un moulage circulaire autour de la racine et qui caractérisent uniquement le (*Lupinus* sp. L., lupin).

Les nodules de *R. monosperma* se repartissent le plus souvent sur les racines latérales, et peuvent atteindre des tailles considérables jusqu'à 1cm.

D'après, Sprent (2001), Chez les plantes vivaces, les nodules peuvent durer des mois et peuvent également devenir multilobés, indiquant l'activité continue de leurs méristèmes. Aussi, chez *R. monosperma*, nous suggérons que les nodules sont pérennes par l'activité permanente du méristème, quoi que, il est à noter qu'à partir de nos observations, que la nodulation est affectée par les conditions climatiques rudes, en particulier par la carence en eau. En effet en cas de saison sèche prolongée, les nodules se dessèchent et disparaissent, alors que si la période de sécheresse est courte est suivie d'averses, on note un regain de l'activité méristématique et une régénération des nodules comme a été reporté par Sprent (2007), que chez les nodules indéterminés, le méristème offre la possibilité que les nodules peuvent reprendre l'évolution après une période d'arrêt de la croissance en raison de conditions climatiques défavorables comme la sécheresse .

Pour une étude plus détaillée, les nodules à différents stades de développement ont été sectionnés pour l'observation au microscope optique et électronique. L'anatomie générale indique que les nodules de *R. monosperma* ont été identifiés comme étant de type

indéterminé avec un méristème apical persistant. L'observation microscopique de l'organisation tissulaire des nodules de *R. monosperma* permet de les distinguer des nodules de type indéterminés rencontrés dans la majorité des légumineuses, notamment les plus étudiées telles que *Medicago* sp. (Vasse *et al.*, 1990) et *Trifolium* sp. (Łotocka *et al.*, 1997). Cependant, chez *R. monosperma*, le méristème nodulaire est constitué de deux types de cellules distinctes, infectées et non infectées. A partir des cellules méristématiques non infectées, se forme le cortex et les faisceaux vasculaire, tandis que les cellules méristématiques infectées produisent uniquement un tissu envahi exclusivement par des bactéroïdes. Une structure similaire du méristème nodulaire a été précédemment décrite dans les nodules cylindriques de *Cytisus scoparius* (Sajnaga *et al.*, 2001), de *Genista tinctoria* (Kalita *et al.*, 2006) et dans le méristème latéral des nodules du col produit par *Lupinus luteus* (Golinowski *et al.*, 1987; Łotocka *et al.*, 2000).

Typiquement, dans ce type de nodule, le cordon d'infection est absent (Sprent, 2007), aussi dans les nodules de *R. monosperma* nous n'avons pas détecté un cordon d'infection sur l'ensemble des observations réalisées pour cette étude. Dans ce cas, l'infection est typiquement intercellulaire ("crack entry", en anglais), et se fait généralement au niveau de passage libérés par l'émergence des racines latérales (Pawlowski and Bisseling, 1996). En effet, les nodules issus de ce mode sont exclusivement situés à l'aisselle des racines secondaires, ce processus est largement décrit chez la légumineuse semi-aquatique *Sesbania rostrata* (Ndoye *et al.*, 1994; Goormachting *et al.*, 2004), *Arachis*, *Stylosanthes* et *Neptunia* (Rana et Krishnan, 1995; Chandler, 1978; Chandler *et al.*, 1982 ;Subba-Rao *et al.*, 1995). Alors que, les nodules de *R. monosperma* ne sont pas souvent associés aux sites restreints à l'infection intercellulaire. Nous ne sommes pas en mesure de préciser, étant donné, la difficulté à saisir expérimentalement cette étape, quelle zone initiale colonisée et envahie, et comment que les bactéries pénètrent dans le cortex. Cependant, Cette répartition exceptionnelle des nodules a été exclusivement observée chez *Cytisus proliferus* par Vega-Hernández *et al.* (2001). Dans ce cas, l'infection par les poils absorbants via le cordon d'infection a échoué et la stratégie alternative utilisée par les microsymbiotes, pour produire des blessures dans l'épiderme est similaire à celle utilisée par *Bradyrhizobium* sp pour infecter la non légumineuse *parasponia*. Dans ce cas, les cellules corticales externe stimulées par les bactéries se divisent, conduisant à la déstabilisation des cellules épidermiques ultrapériphériques, permettant à la bactérie d'entrer (Lancelle et Torrey, 1984; Bender *et al.*, 1987).

Dans les nodules de *R. monosperma*, La partie proximale de la zone méristématique contient des bactéroïdes intracellulaires, dans cette partie nous n'avons pas observé des bactéries dans les espaces intercellulaires, ni dans les parois et nous ne pouvons pas décrire en détail le processus d'internalisation des bactéries dans les cellules meristématiques initiales. Néanmoins, quelques observations pourraient nous permettre de suggérer que les bactéries pénètrent dans la cellule par dégradation de la paroi, ainsi les bactéroïdes intracellulaires paraissent inclus dans une matrice dense aux électrons probablement d'origine pariétale. Ce type d'invasion intracellulaire est en partie décrit chez *Cytisus proliferus* (Vega-Hernández *et al.*, 2001). A ce stade, les cellules nouvellement infectées se divisent activement par mitose, ainsi les symbiosomes et les organelles sont réparties dans les deux cellules filles. A La division successive des cellules infectées, s'associe la prolifération des bactéroïdes, conduisant au développement du nodule selon un gradient de différenciation et de remplissage cellulaire. En effet, le tissu centrale est uniformément infecté et dépourvu de cellules non envahies.

Dans la zone de différenciation, nous observons clairement la différenciation progressive des amyloplastes et qui atteignent un nombre considérable dans la partie proximale. Ces amyloplastes ont été également observés dans l'interzone. Cette interzone a été précédemment décrite pour la première fois dans le nodule modèle de *Medicago* (Vasse *et al.*, 1990). La plante fournit l'énergie sous forme d'apport carboné et cette énergie est utilisée pour alimenter l'activité nitrogénase au sein des bactéroïdes et fournir des squelettes carbonés pour l'intégration de l'azote. C'est pourquoi, une accumulation de réserves carbonées de la plante, notamment sous forme d'amidon, est généralement observée. En effet, ce dépôt d'amidon dans La partie proximale de la zone de différenciation est hautement significative pour le développement du nodule de *R. monosperma*, car elle représente la transition des bactéroïdes par une modification considérable de leur nombre, forme et de leur taille.

A ce stade, les cellules de la zone fixatrice sont de plus en plus vacuolisées de la partie distale vers la partie proximale, révélant un âge plus avancé des cellules végétales. On note également l'absence du réseau de cellules non-envahies, typiques de la plupart des nodules déterminés et indéterminés. En effet, l'espace cytoplasmique des cellules de la zone de fixation de l'azote est entièrement occupé par des symbiosomes, aucune cellule hôte non infectée n'a été détectée sur l'ensemble des observations. Ainsi le tissu central est uniformément infecté, ce qui nous permet d'affirmer qu'un envahissement a eu lieu, avant division cellulaire plutôt qu'un envahissement par cordon d'infection, et que la diffusion de l'infection et le développement du nodule se fait par division successive des cellules

nouvellement infectées. Cette particularité est partagée avec des nodules dalbergioïde de type déterminé et avec quelques nodules genistoïde de type indéterminé (Sprent 2007). Cela soulève la question de savoir comment l'échange de nutriments a lieu dans ce type de nodules. Les cellules non envahies présents dans les nodules déterminés, les plus étudiées, comme celles du soja, forment un réseau de cellules dans lequel chaque cellule envahie est en moins en contact avec une cellule non envahie (Selker et Newcomb, 1985), et les cellules non envahies jouent un rôle crucial dans l'échange des éléments nutritifs entre les deux symbiotes (Schubert, 1986). Nous ne savons pas jusqu'à présent, Comment cela est réalisé dans les nodules sans ce type de réseau cellulaire ?

Dans les nodules de *R. monosperma*, la différenciation des bactéroïdes est associée à un ensemble de remaniements, comme l'augmentation du volume, et le changement de forme. Ainsi les bactéroïdes étant de forme allongée dans la zone de différenciation se transforment dans la zone fixatrice en une forme sphérique, inhabituellement rencontrée chez la majorité des légumineuses. Une telle modification de conformation est tout de même décrite chez *Arachis* spp. (Sutton, 1983), récemment chez *Crotalaria* spp. (Renier *et al.*, 2011) et *Aeschynomene indica* (Bonaldi *et al.*, 2011). Appartenant respectivement aux tribus Dalbergioïds, Crotalariae, phylogénétiquement éloignées de la tribu des Genisteeae. A titre comparatif, les bactéroïdes de *R. monosperma* et *A. indica* (Bonaldi *et al.*, 2011) présentent une taille uniforme presque conforme entre 1 et 2 µm de diamètre. Alors qu'une taille singulière a été enregistrée chez *Crotalaria* sp de 5 µm de diamètre (Renier *et al.*, 2011).

Il est bien évident que l'étape de différenciation des bactéroïdes est contrôlée par l'hôte (légumineuse) plutôt que par le génotype bactérien (Oke et Long, 1999). Alors que, récemment, Bonaldi *et al.* (2011), a démontré que le destin des bactéries pourrait être différent dans deux espèces étroitement apparentées. Comme les bactéroïdes allongés dans les nodules de *Aeschynomene afraspera*, et ceux de forme sphérique chez *A. indica*. Dans ces deux espèces, l'activité fixatrice d'azote par nodule était deux fois plus élevée pour *A. afraspera* par rapport à *A. indica* (Bonaldi *et al.*, 2011). Les chercheurs se demandaient si la forme allongée est plus efficace en terme de fixation de l'azote. Cette question a été examinée chez l'arachide et le niébé, dans les quelles la même bactérie se différencie respectivement en forme sphérique et allongée (Sen et Weaver, 1984). Contrairement à ce qui a été observé chez l'*Aeschynomene* sp, l'activité fixatrice d'azote est nettement plus élevée dans les nodules hébergeant les bactéroïdes sphériques. Ce qui indique que l'aspect des bactéroïdes ne détermine pas l'efficacité et que d'autres facteurs tels que la taille, l'anatomie

de nodules, le nombre des bactéroïdes, et, sans doute, le contrôle de la nutrition des bactéries par la plante sont probablement plus suggestionnant (Bonaldi *et al.*, 2011).

Dans la zone fixatrice, nous avons observé une interaction physique étroite entre la membrane du symbiosome et la membrane externe du bactéroïde, contrairement à ce qui a été observé dans les jeunes bactéroïdes, cette caractéristique est également décrite dans les nodules d'*A. indica* (Bonaldi *et al.*, 2011). Les cellules hôtes infectées de cette zone présentent deux particularités majeures chez les nodules de *R. monosperma*, (i) la présence de plus de 2 bactéroïdes dans le même symbiosome, ainsi, sur l'ensemble des observations effectuées, nous avons pu mettre en évidence un cas de symbiosome éventuellement partagé par quatre bactéroïdes. Alors que, communément, chez les nodules indéterminés, un bactéroïde unique est retrouvé au sein de chaque membrane de symbiosome. Sauf, un cas de symbiosome partagé par deux bactéroïdes a été observé dans les nodules de *Crotalaria* sp (Renier, 2008) ; (ii) la présence des granules transparente probablement des poly-hydroxybutyrate (PHB) dans les bactéroïdes de *R. monosperma*. Ces observations se trouvent d'une part, confortées par des études antérieures d'ultrastructure du nodule montrant la présence de granules de PHB dans les cellules bactériennes à l'intérieur du cordon d'infection (Paau et Cowles, 1978) et lors du processus de différenciation vers l'état bactéroïdes, les granules de PHB disparaissent, ainsi les bactéroïdes matures sont dépourvus de granules visibles (Korotkova et Lidstrom, 2001). Et d'autre part, appuyées par Ludwig *et al.* (2005), qui suggère que les réserves de poly-hydroxybutyrate (PHB) bactériennes soient mobilisées pendant la différenciation des bactéroïdes pour aider à alimenter l'activité métabolique carbonée nécessaire pour convertir les bactéries libres en de beaucoup plus grands bactéroïdes différenciés.

Dans la zone la plus proximale du nodule, les bactéroïdes sont de forme irrégulière et montrent les signes de dégénérescence, cette zone est connue comme la zone de sénescence communément présente dans les nodules à croissance indéterminée. Timmers *et al.* (2000), a pu mettre en évidence dans les nodules de *Medicago* sp une cinquième zone supplémentaire, connue comme zone saprophytique et qui montre des cellules hôtes contenant des "rhizobiods", Rhizobia à caractère saprophytique plutôt que mutualiste dans leur mode de vie. Cette zone n'a pas été observée dans les nodules de *R. monosperma*.

Généralement, le tissu central infecté est entouré par des tissus périphériques à composition hétérogène (Brown et Walsh, 1994), et se divisent approximativement dans les trois dimensions (Witty *et al.*, 1986). Ainsi, le cortex externe est séparé du cortex interne par l'endoderme. Bond (1948), précise que chez le *Pea* sp, l'endoderme se développe à la base du

nodule dès que le xylème et le phloème se différencie à l'intérieur de la trace provasculaire. Dans la majorité des nodules, l'endoderme présente une seule couche de cellules subérisées avec une paroi cellulaire tertiaire (Ma et Peterson, 2003). Néanmoins, nous avons nettement observé un endoderme à une seule ou à plusieurs couches de cellules fortement lignifiées dans les nodules de *R. monosperma*. Ces observations sont singulières et nécessitent un examen plus approfondi notamment par une étude ultrastructurale du tissu périphérique du nodule.

La différenciation des bactéries en bactéroïdes implique de nombreux remaniements ultrastructural, en particulier chez les plantes formant des nodules indéterminés. Dans ce cas, les cellules bactériennes invasives sont soumises à un programme d'endoréduplication génomique. Ainsi, Les bactéroïdes au sein de ces nodules indéterminés augmentent leur contenu en ADN et leur taille cellulaire, ce qui leur permet d'atteindre une vitesse métabolique plus élevée pour supporter la fixation d'azote (Mergaert *et al.*, 2006). Néanmoins, dans les nodules de *R. monosperma*, l'endoréduplication de l'ADN typique des nodules indéterminés ne se produit pas, alors que chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*, la teneur en ADN peut augmenter jusqu'à atteindre 36C. Dans ces nodules la différenciation et le fonctionnement est strictement associée à l'expression d'un grand nombre de peptides riches en cystéine-spécifique (nodule-specific cysteine-rich peptides) ou (NCRs) et qui sont absents dans nodules de type déterminé (Mergaert *et al.*, 2003; Van de Velde *et al.*, 2010). Les bactéroïdes de ce type de nodules n'atteignent pas une différenciation terminale contrairement au bactéroïdes de nodules de type indéterminé. Bien que la présence ou l'absence de peptides NCRs n'a pas été étudié dans nodules de type genistoïde, l'inapplication à la fois de l'endoréduplication d'ADN et de l'élongation des bactéroïdes dans les nodules de *R. monosperma* suggèrent qu'ils sont les plus susceptibles absents. Si cela est confirmé, cela signifierait que, bien que ces nodules possèdent un méristème persistant, fonctionnellement, ils ressemblent à plusieurs nodules de type déterminé tels que les nodules de *Lotus japonicus*, arachide et du soja.

Typiquement, les nodules sont classés comme déterminé et indéterminé, mais à partir de nos résultats et ceux des autres, une classification plus fonctionnelle, serait pour caractériser les nodules comme appartenant au type avec, ou sans cellules non envahies dans la zone de fixation d'azote, comme proposé précédemment par Sprent (2007). De point de vue évolutif, la nodulation pourrait être classée en deux catégories, la première, un groupe évolue sans formation d'un cordon d'infection et le nodule se développe à partir de quelques cellules qui sont infectées, qui se divisent et grandissent pour former le tissu uniformément envahi. Le

second groupe évolue par la formation d'un cordon d'infection, qui n'entre pas dans toutes les cellules du tissu interne du nodule et les cellules non envahies acquièrent une fonction dans le transport des métabolites.

Dans cette étude, les caractéristiques anatomiques des nodules de *R. monosperma*, y compris la croissance indéterminée, sont communs à la tribu des Genisteae qui comprend le *Lupinus* sp et *Cytisus* sp, dont l'infection est sans cordon d'infection. Quoique certains cordons sont rarement observés chez le *Lupinus* sp ou sont transitoire chez le *Cytisus* sp (James *et al.*, 1997; Vega-Hernández *et al.*, 2001). Selon, Sprent (2007) au moins 25% des légumineuses peuvent avoir ce type d'infection et d'organisation du nodule, mais la recherche jusqu'ici a surtout porté sur le processus d'infection le plus commun, par poils absorbants (Popp et Ott 2011; Oldroyd 2013). Pourtant, la récente découverte de mutants du *Lotus japonicus* avec un transfert de l'infection par poil absorbant vers l'infection intercellulaire montre l'importance de cette étude (Held *et al.*, 2010; Madsen *et al.*, 2010). En outre, le rôle des facteurs Nod et les mécanismes impliqués dans les premières étapes de l'établissement de nodules de type genistoïde ne sont pas claires jusqu'à présent. D'autres investigations sur l'interaction entre *R. monosperma* et *B. retamae* sera d'une aide précieuse pour clarifier ce sujet.

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

Planche I

Histologie des nodules de *R. monosperma*

a. Section longitudinale à main levée du nodule de *R. monosperma* montrant l'anatomie générale, avec une zone méristématique, II : zone de différenciation, III : zone de fixation d'azote. La section est éclaircie à l'hypochlorite de sodium et colorée au bleu de méthylène.

Barre : 1mm

b. Section Semi fine de la région distale du nodule avec un méristème persistant, la zone de différenciation et le début de la zone de fixation d'azote. Barre : 200 μm

c. Détail de la région méristématique du nodule avec a une partie distale sans bactéries et une partie proximale contenant des bactéroïdes. Barre : 50 μm

d. Détail de la zone de différenciation du nodule avec une augmentation du nombre de bactéroïdes de la partie distale à la partie proximale. Barre : 50 μm

e. Détail de la partie distale de la zone fixatrice d'azote riche en amyloplast. Barre : 50 μm

f. Détail de zone fixatrice d'azote aux cellules complètement envahies par des bactéroïdes. Barre: 25 μm

Les sections semifines sont colorées au bleu de toluidine et bleu de méthylène.

Abréviations,

dnm : la partie distale du méristème nodulaire, nc cortex du nodule, ndz : zone de différenciation du nodule, ne : endoderme du nodule, nfz : zone de fixation d'azote, nm : la périphérie de la région méristématique du nodule, np : parenchyme du nodule, nvb : faisceaux vasculaire du nodule, pnm : la partie proximale du méristème nodulaire, Flèche : amyloplast.

Planche I

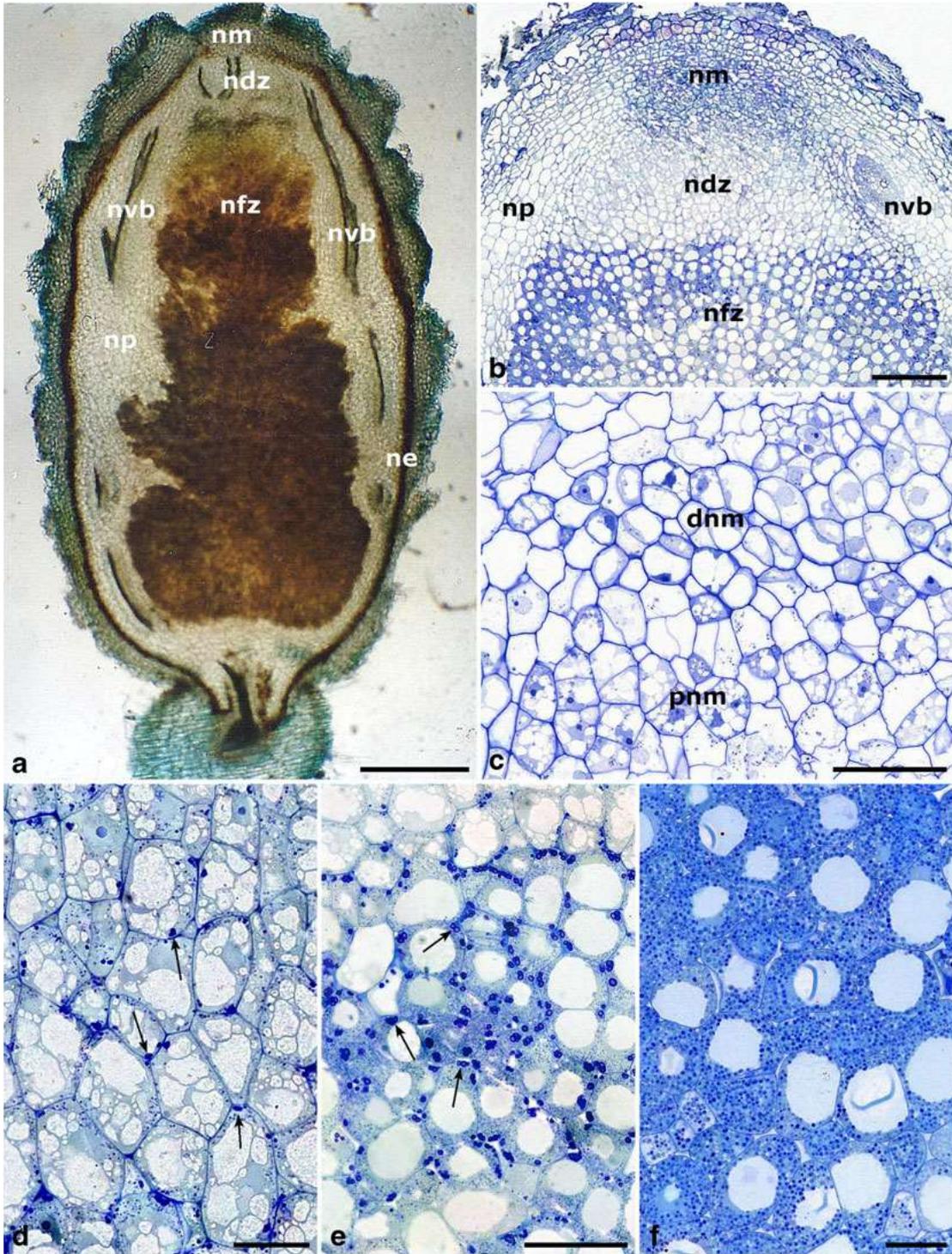


Planche II

L'ultrastructure du nodule de *R. monosperma*

La zone méristématique

a. section ultrafine montrant en détail des cellules méristématiques dépourvu de bactéries, la flèche indique un plastide avec des plastoglobules. Barre, 5 μ m

b. section ultrafine montrant en détail les cellules les plus distales envahies par les bactéroïdes au sein de la région méristématique. Barre, 10 μ m

c. et **d.** section ultrafine montrant en détail des bactéroïdes pénétrantes et intracellulaires dans la partie proximale de la zone méristématique. Barre, 500 nm.

La flèche noire indique les bactéroïdes

Abréviation,

dnm : région distale de la zone méristématique, pnm : région proximale de la zone méristématique, n : noyau, nc : nucléole, v : vacuole, b : bactéroïdes, p : paroi, sp : espace intercellulaire.

Planche II

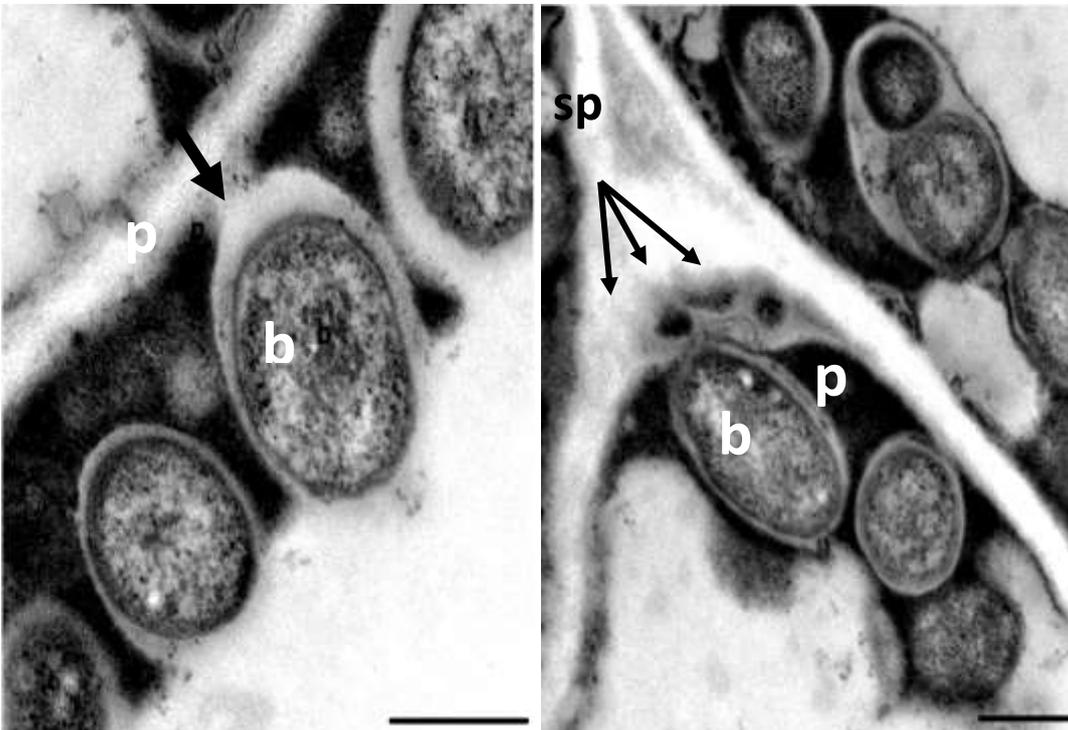
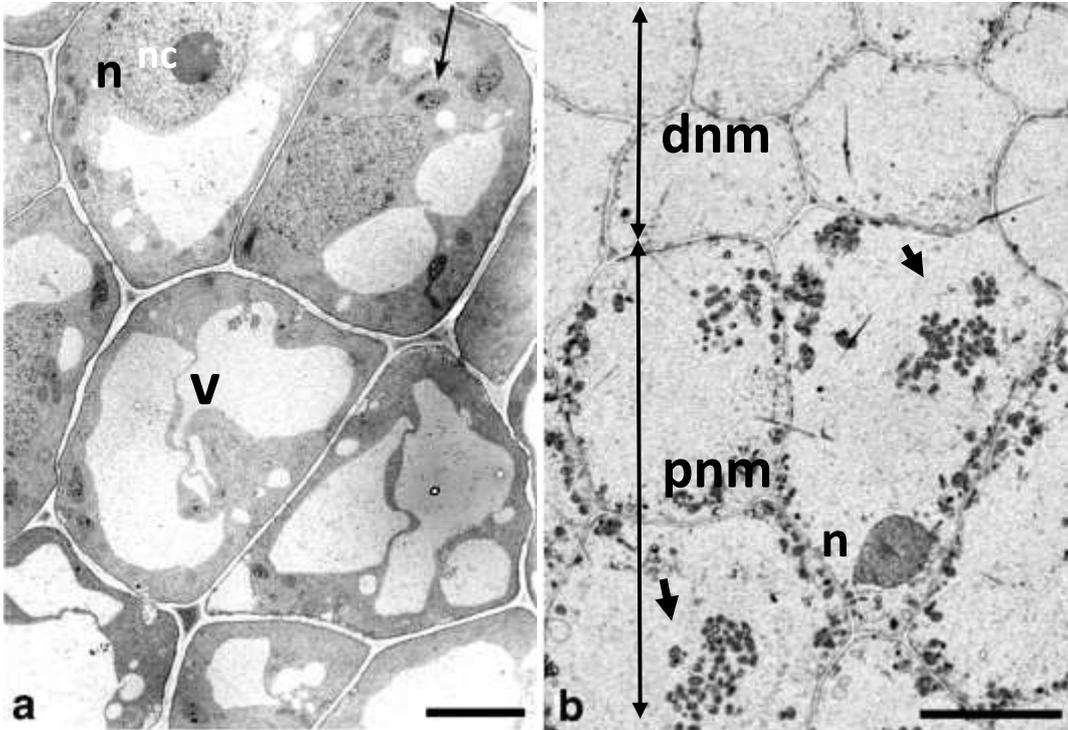


Planche III

L'ultrastructure du nodule de *R. monosperma*

Zone de différenciation

a et b. Détail montrant la partie distale de la zone de différenciation montrant des cellules différenciées et envahies par des bactéroïdes de forme allongée, inclus dans une membrane pér bactéroïdienne. Barre, a. 2 μ m, b. 2 μ m ;

c. Détail dans la partie proximale de la zone de différenciation montrant l'accumulation des amyloplastés à proximité des espaces intercellulaires (flèche rouge), et l'augmentation du nombre des bactéroïdes. Barre, 2 μ m ;

d. Détail dans la partie proximale de la zone de différenciation montrant la transition de la zone de différenciation à la zone de fixation d'azote du nodule (voir la partie supérieure de la micrographie) avec l'augmentation significative du volume des bactéroïdes. Barre, 2 μ m.

Abréviations,

n : noyau, nc : nucléole, v : vacuole, b : bactéroïdes, m : mitochondrie.

La flèche verte indique le réticulum endoplasmique.

Planche III

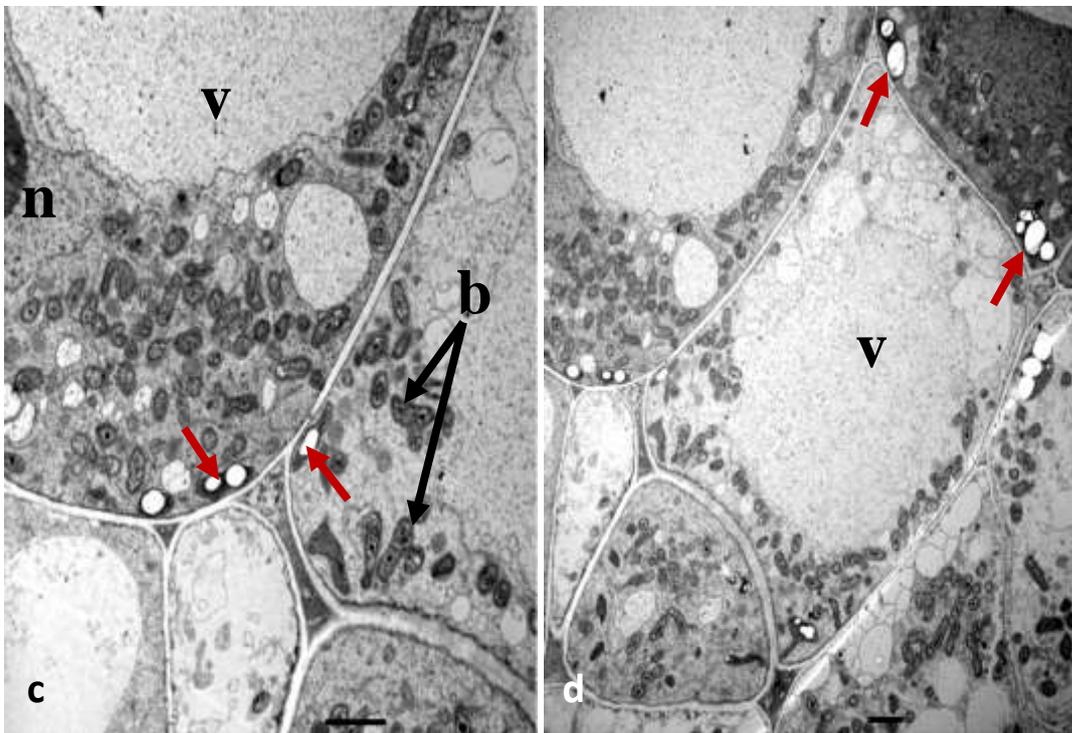
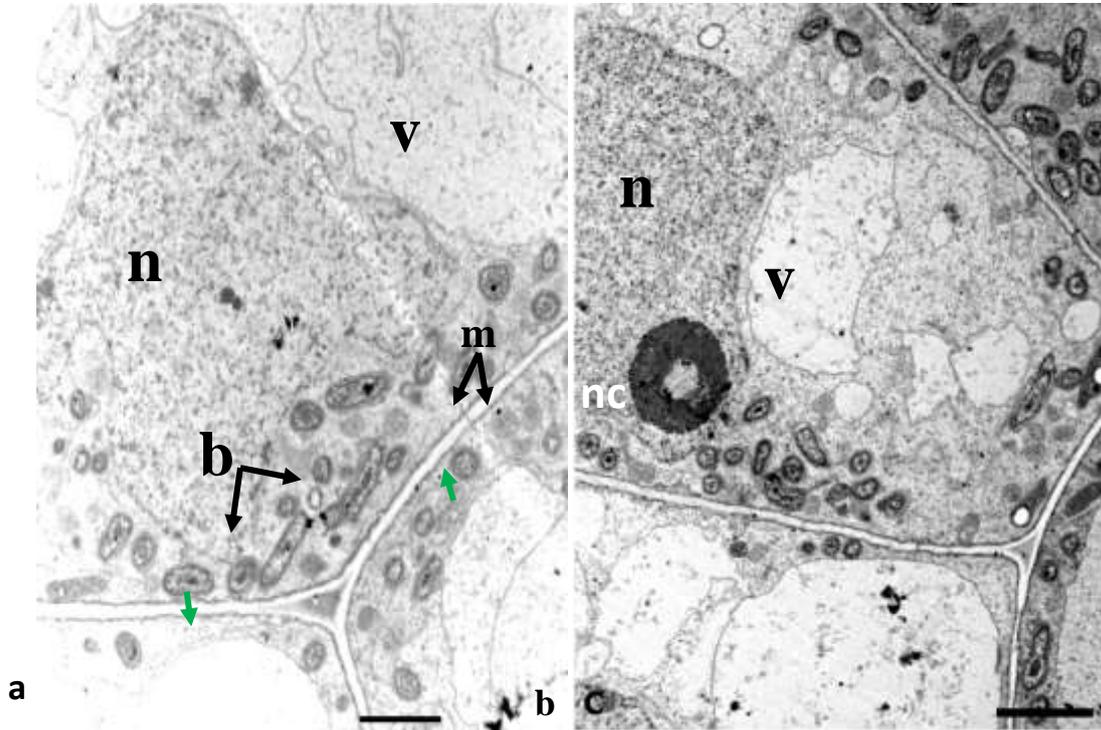


Planche IV

L'ultrastructure du nodule de *R. monosperma*

La zone de fixation

a, b et c : envahissement des cellules de la zone fixatrice d'azote par les bactéroïdes avec un gradient de remplissage. Barre, a. 2 μm , b. 2 μm , c. 2 μm

d : détail de la cellule fixatrice d'azote montrant les bactéroïdes au sein du symbiosome. Barre, 500nm

Leur matériel nucléaire condensé est associé à des granules de polyphosphates (flèche blanche) et des inclusions de polyhydroxybutyrate (PHB) (flèche jaune), qui sont fréquemment observés dans les bactéroïdes.

Abréviations,

n : noyau, nc : nucléole, v : vacuole, b : bactéroïdes, epb, espace pér bactéroïdien, mpb : membrane pér bactéroïdienne, s : symbiosome.

Planche IV

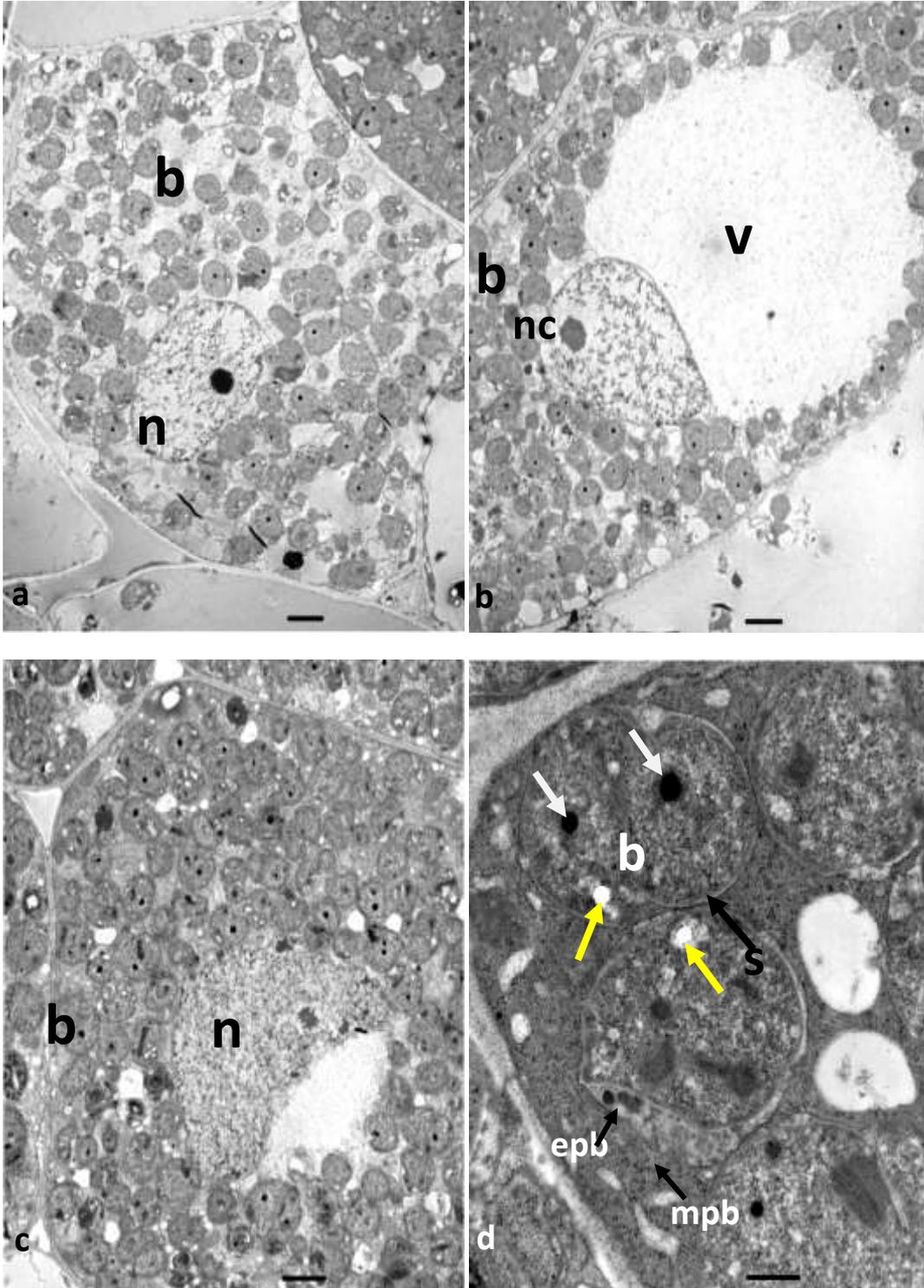


Planche V

L'ultrastructure du nodule de *R. monosperma*

Zone de sénescence

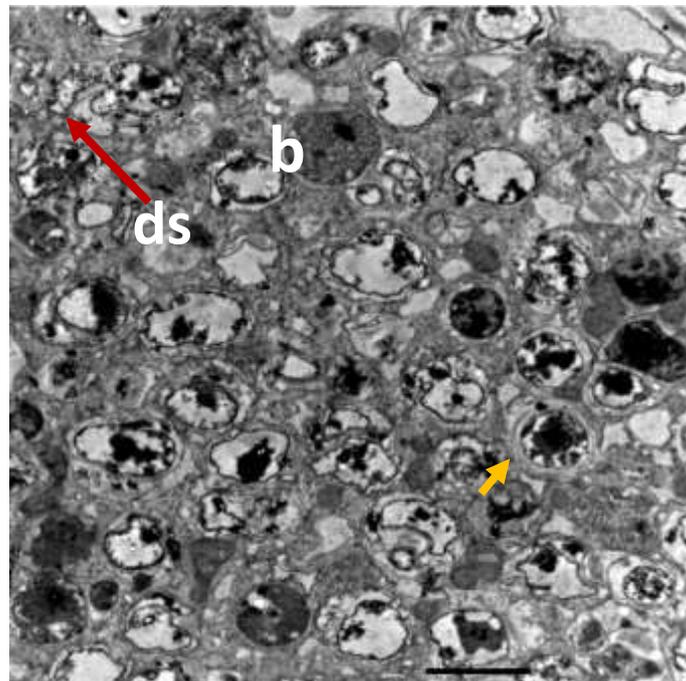
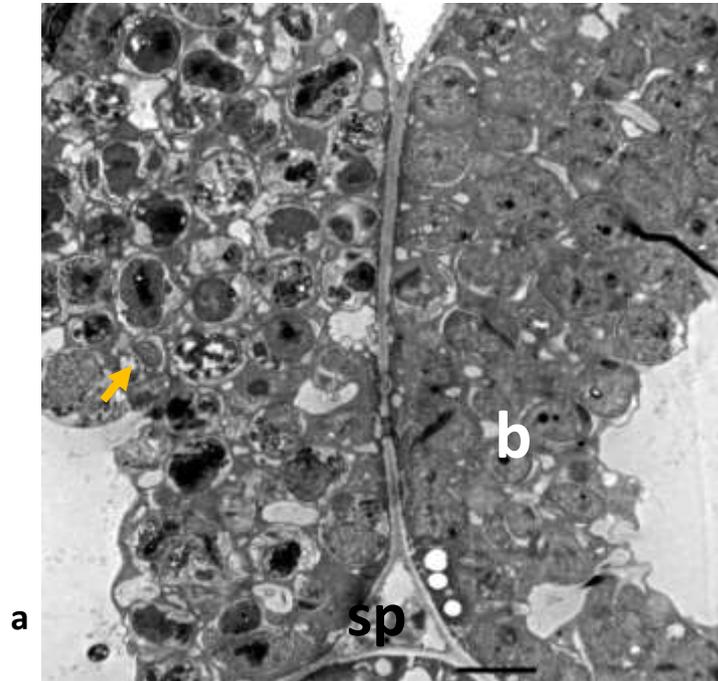
a. coupe ultrafine dans la partie proximale de la zone fixatrice d'azote montrant en détail le début de la sénescence des cellules indiqué sur la microphotographie par la flèche orange (voire la cellule située à gauche). Barre, 2 μ m.

b. coupe ultrafine dans la zone de sénescence montrant en détail une cellule sénescente avec dégénérescence des bactéroïdes indiqué sur la microphotographie par la flèche orange. La flèche rouge indique le début de digestion du symbiosome dans la vacuole. Barre, 2 μ m.

Abréviations,

b : bactéroïdes, ds : dégradation du symbiosome dans la vacuole, sp, espace intercellulaire.

Planche V



VI. Identification des bactéries endophytes isolées des nodules de

R. monosperma

L'isolement des bactéries à partir des nodules de jeunes plants de *R. monosperma* poussant dans les conditions naturelles, nous a permis de collecter et de sélectionner deux souches de bactéries. Les isolats des nodules sont nommés (Isolat –Nodule- Retama). L'isolat INR1 se développe sur milieu YEM et donne des colonies de couleur blanchâtre à jaunâtre après 24 h de culture, à diamètre >1 mm (Fig.37.a).

L'isolat INR 2 se développe sur milieu YEM après 7 jours d'incubation et donne des colonies à diamètre <1mm de diamètre, de couleur rose (Fig.37.b).

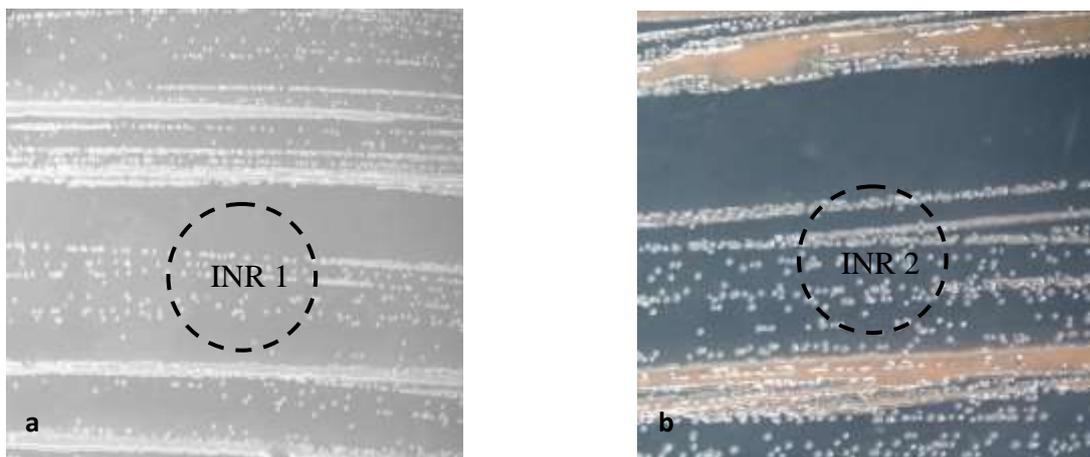


Figure 37: Photographie des colonies de deux souches de bactéries isolées des nodules de *R. monosperma*, nommées respectivement INR 1 et INR 2.

L'identification de ces souches via l'analyse du gène ARNr 16S révèle que INR 1 et INR 2 appartiennent respectivement aux genres *Pseudomonas koreensis* (Kwon *et al.* 2003) et *Methylobacterium* sp. Le genre *Methylobacterium* a été défini par Patt *et al.* (1976) et font partie des alphaprotéobactéries (Hiraishi *et al.*, 1995).

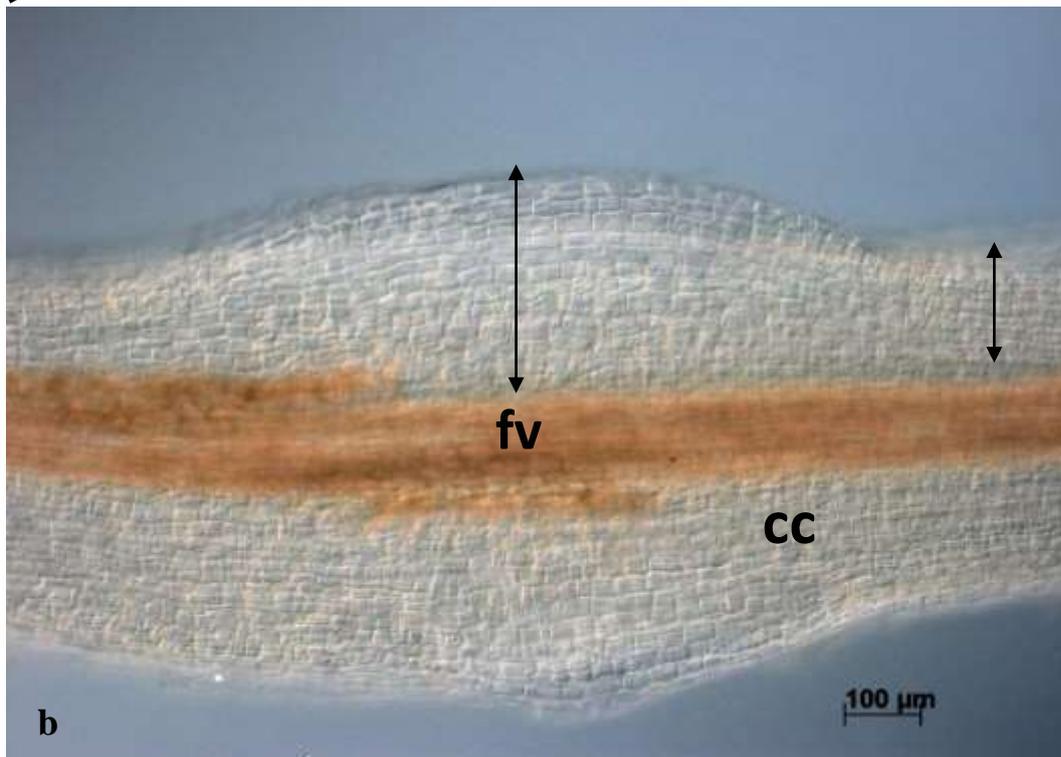
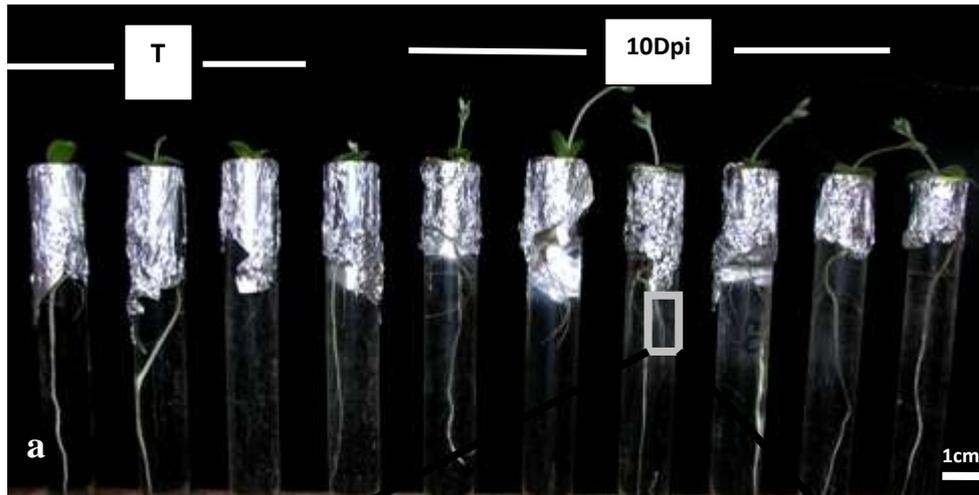


Figure 38: **a.** Effet bénéfique de l'inoculation par *P. koreensis* sur la croissance des jeunes plants de *R. monosperma* 10 jours après inoculation (10Dpi) par rapport au témoin(T). **b.** Apparition de renflements aux niveaux racine latérales éclaircis 10 Dpi.

VII. Observation microscopique du processus de la colonisation des racines de *R. monosperma* par *P. koreensis*

Les résultats montrent que 10 jours qui suit l'inoculation de *R. monosperma* par *P. koreensis*, les plantules témoins non inoculées sont clairement moins développées que celles inoculées (Fig.38.a). Ces observations s'accordent parfaitement avec ce qui a été rapporté par Haas et Defago (2005), qui ont constaté que les espèces de *Pseudomonas* fluorescents sont bien connues pour leurs capacités favorisant la croissance, d'où leur nom de PGPR (*Plant Growth Promoting rhizobactéria*).

Dans la présente étude, l'observation macroscopique des racines entières de *R. monosperma*, montrent la formation d'un certains nombre de renflements réparties aussi bien dans la zone pilifère que dans la zone d'élongation au niveau des racines latérales (Fig.38.b). La visualisation microscopique des sections semifines des sites d'infections, indique que les bactéries colonisent activement la surface des cellules rhizodermiques ou le rhizoplan. Quoique nous n'avons pas pu visualiser des sites d'infections au niveau de la pointe de la racine. Pourtant, Semenov *et al.* (1999), précise que certaines bactéries colonisent préférentiellement les extrémités des racines, tandis que pour d'autres colonisent la zone de la racine riche en poils absorbants, comme niches fournissant haute disponibilité de nutriments y compris les zones de l'exsudation racinaire.

Nos observations montrent que les bactéries ne se limitent pas à coloniser la surface de la racine mais s'insinuent entre les cellules de l'épiderme(ou rhizoderme), celui-ci, est en partie fragilisé (Planche VI) et il est fort probable que *P. koreensis* avait secrété des enzymes lytiques pour créer des fissures et puissent pénétrer dans les espaces intercellulaires épidermiques. Ce type d'infection a été décrit par (Chaintreuil *et al.*,2000) comme infection enzymatique et qui se réalise souvent, par une dégradation cellulosique localisée au niveau de la surface racinaire. En effet, des endoglucanase, cellulases et pectinases produites par *Pseudomonas fluorescens* 89B-61 (Benhamou *et al.*, 1996; Quadt- Hallmann *et al.*, 1997) et qui ont été effectivement corrélée à l'entrée des bactéries dans le système racinaire. Quoique, La pénétration est habituellement passive, et qui a lieu au niveau des craquelures que provoque l'émergence des racines latérales ou secondaires, de la zone d'élongation des racines et des espaces intercellulaires entre les cellules épidermiques et corticales (Chaintreuil *et al.*, 2000; Gough *et al.*,1997a).

Dans la présente étude, Les bactéries sont aussi observées entre les cellules du cortex externe de la racine et semblent former de sous population à l'intérieure de ces cellules (Fig.39). Ce résultat est à vérifier sur des sections ultrafines.

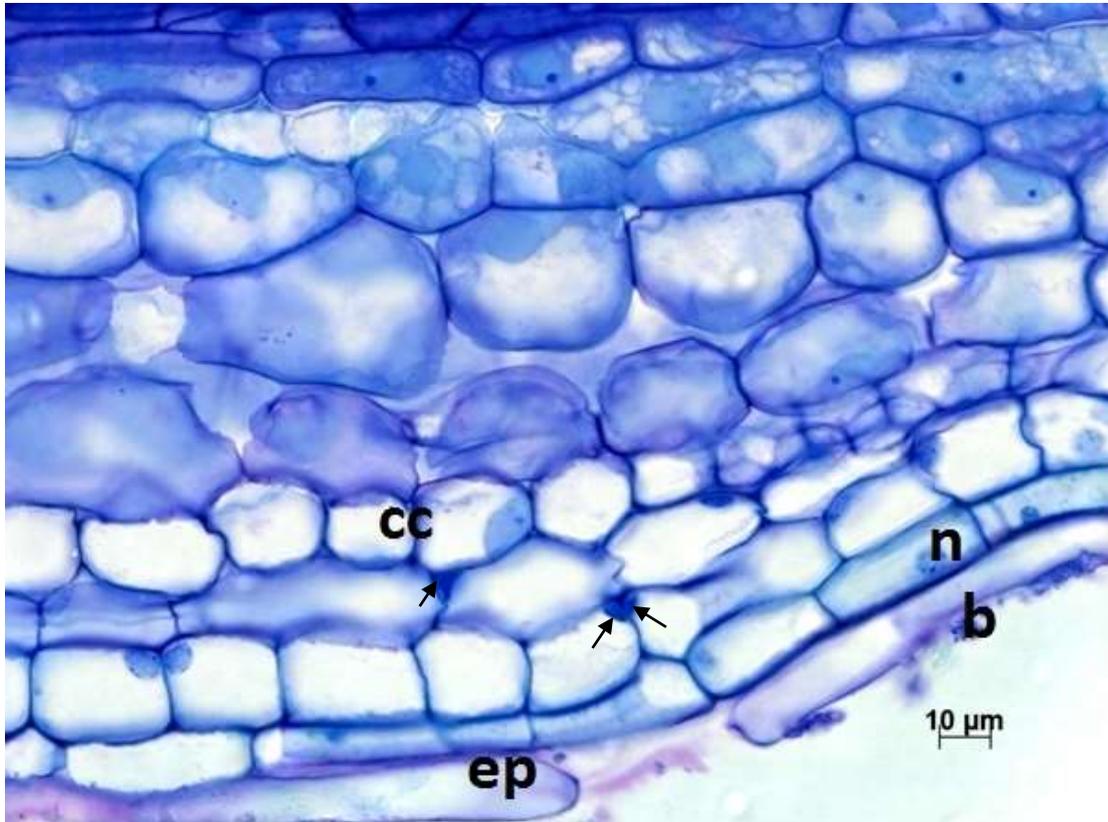


Figure 39 : Colonisation intracellulaire des cellules du cortex externe (flèche noire) par *P. koreensis*, 10 après inoculation. n : noyau, b, bactéries, ep, épiderme, cc : cellules corticales.

Plusieurs études ont examiné le processus de la colonisation par des bactéries bénéfiques (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998; Compant *et al.*, 2010a; Hardoim *et al.*, 2008). Certains peuvent être des colonisateurs systémiques alors que d'autres pourraient être limités à certaines parties de la racine (Benizri *et al.*, 2001; Hallmann, 2001). Dans notre étude, nous avons étudié les premières étapes du processus de colonisation par *P. koreensis*, ainsi, nous avons détecté cette souche que dans le cortex externe de la racine, et non pas dans le système vasculaire. Cela laisse à supposer que la souche *P. koreensis* se limitera à coloniser les cellules corticales de la racine de *R. monosperma*. Cependant, il est possible qu'avec une

prolongation de la durée d'inoculation, les bactéries pourraient atteindre le système vasculaire, bien que ceci doive être démontré.

De nombreuses études ont rapporté que la localisation des bactéries associatives dans les jonctions intercellulaires ou espaces épidermiques n'est pas fortuite. Ces espaces privilégiés offrent aux bactéries, l'opportunité du mouvement, grâce au mucilage qui couvre l'épiderme racinaire et constituent une région à faible tension d'oxygène et à grande abondance carbone comme source d'énergie (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001).

D'autre part, nous observons nettement que *P. koreensis* induisent la stimulation des cellules du cortex externe et interne de la racine (PlancheVII). Ces divisions sont à l'origine des "bumps", rappelant la structure d'un primordium nodulaire. Ces divisions cellulaires pourraient être dues aux phytohormones éventuellement produit par la souche inoculée. En effet, il a été démontré par plusieurs travaux que la cytokinine pourrait développer des nodules de façon spontanée même en absence de *Rhizobia* et que la signalisation aux cytokinine est nécessaire et suffisante pour induire les divisions des cellules corticales et la formation de nodules (Tirichine *et al.*, 2007). Par ailleurs, les cytokinines miment certains processus induits par les FNods, tels que les divisions des cellules corticales et l'induction de gènes de nodulines (par exemple, *ENOD40* et *NIN*) (Cooper et Long, 1994 ; Fang et Hirsch, 1998 ; Murray *et al.*, 2007 ; Tirichine *et al.*, 2007).

Bien que la formation des nodules, s'initie par deux étapes majeures, qui sont l'internalisation de la bactérie et la réactivation mitotique des cellules de la plante, les "bumps" ou les renflements observés n'ont pas évolué en nodules dans nos conditions de cultures pour la souche testée. Peut-être que les conditions optimales de la nodulation ne sont pas réunies (température, milieu de culture...). D'autre part, cela est sûrement dû au fait que *P. koreensis* n'est pas symbiotique (ne fait pas partie des BNL) mais endophyte-associative aux nodules de *R.monosperma*, comme a été rapporté par Muresu *et al.* (2007), qui a mis en évidence la coexistence de *Rhizobia* avec diverses bactéries endophytes de la classe de gammaprotéobactéries, tels que *Pseudomonas viridiflava* dans les nodules sauvages de *Hedysarum*. Autres investigations confirment le même constat, comme Brundu *et al.* (2004) qui a examiné 15 espèces sauvages de *Medicago* dans la Sardaigne et isolait 125 souches à partir des nodules : seulement 29 sont capable de re-noduler leur hôtes dans les conditions hydroponiques ; le reste, 94 isolats à partir des nodules sont saprophytes. En outre, Ben Romdhane *et al.* (2005) qui a démontré que chez *Acacia tortilis*, 25.8% des bactéries associées aux nodules ne sont pas identifiées comme *Rhizobia*. Quoique, récemment, Shiraishi *et al.* (2010) a démontré que *Pseudomonas* sp induisait la formation de nodules

chez *Robinia pseudoacacia* et suggèrent que *Pseudomonas* sp auraient acquis les gènes de nodulation (gènes Nod) ainsi que les gènes de la fixation de l'azote (*nifH*) par transfert latéral de gènes des Rhizobia dans la rhizosphère.

Nos résultats témoignent clairement que *P. koreensis* se comporte comme bactérie endophytes associatives peuvent nicher à l'intérieur des tissus de *R. monosperma*, sans pourtant lui induire de maladies symptomatiques. Par ailleurs il a été récemment démontré que la souche de *Pseudomonas koreensis* 2.74 pourrait être utiliser dans le biocontrôle par leur production de biosurfactant, notamment dans la réduction de la maladies de pomme de terre due aux *Phytophthora infestans* (Hultberg *et al.*, 2010).

VII. Observation microscopique du processus de la colonisation des racines de *R. monosperma* par *Methylobacterium* sp

Dix jours après l'inoculation de *R. monosperma* par *Methylobacterium* sp, nous avons visualisé des renflements au niveau des racines latérales aussi bien sur la base des racines que la zone d'élongation et la zone pilifère (Fig. 40.a).

Les sections au niveau des segments racinaires ont été visualisées conjointement au microscope photonique et électronique. D'une part l'observation des sections semi fines révèlent que *Methylobacterium* sp colonisent la surface de la racine et semble contribuer à la stimulation de la division des cellules corticales (Fig. 40.b).

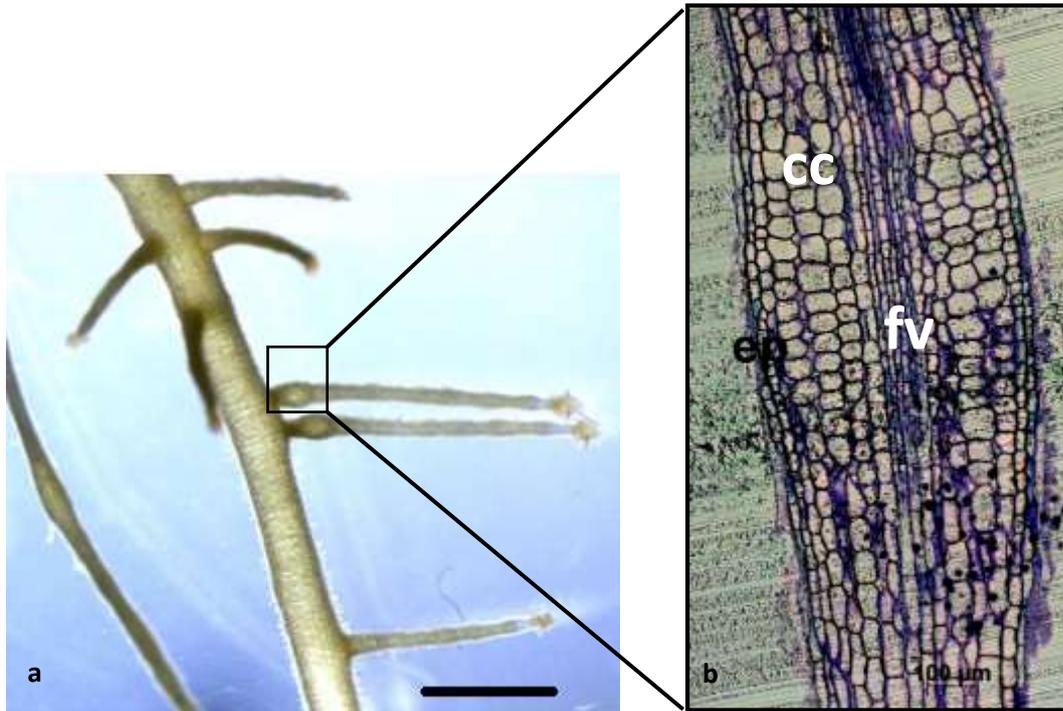


Figure 40 : **a.** Apparition de renflements à la base des racines latérales 10 après inoculation par *Methylobacterium* sp. Barre, 1 cm. **b.** Section semifine au niveau des sites d'infection montrant les divisions corticales. ep : épiderme, fv : faisceaux vasculaire, cc : cellules corticales.

Cette activation des cellules de la racine est possiblement expliquée par le fait que les *Methylobacterium* secrètent des substances favorisant la croissance des plantes, notamment certaines cytokinine comme la zéatine et la zéatineriboside (Ivanova *et al.*, 2000 ; Lidstrom et Chistoserdova, 2002; Senthilkumar *et al.*, 2007). Et que Certaines souches de *Methylobacterium* sont également productrices d'auxines, (Ivanova et Doronina, 2001 ; Doronia *et al.*, 2002 ; Madhaiyan *et al.*, 2007b). Dans ce site, les cellules épidermique (ou rhizodermiques) apparaissent en partie dégradées (Planche VIII. a), d'autre part, sur les coupes ultrafine, nous avons observé que les bactéries envahissent le cortex racinaire à travers des fissures au niveau de l'épiderme (ou rhizoderme) via les espaces intercellulaires (Planche VIII. b. c. d). En effet, Prade *et al.* (1999), expliquent leur présence dans les ciments pectiques intercellulaires par le fait que les bactéries méthylophes tels que *Methylobacterium* décomposent les pectines méthylées constitutives des parois cellulaires végétales et utilise un des premiers sous-produits, notamment, le méthanol. Cette fonction métabolique est appelée méthylophie, elle est facultative chez les *Methylobacterium*. C'est la raison pour laquelle le

nom commun de « Pink Pigmented Facultative Methylophilic bacteria » (PPFM) a été attribué aux bactéries appartenant au genre *Methylobacterium*, pigmentées en rose et méthylophiles (Anthony, 1982 ; Green, 1992). Dans notre étude, les *Methylobacterium* ne se limitent pas à coloniser les jonctions intercellulaires mais pénètrent dans les cellules corticales externes (Planche X), ainsi, les bactéries pénétrantes sont entourées d'un halo blanc, et semblent être émergées dans une matrice dense aux électrons qu'on suggère qu'elle soit une matrice d'infection d'origine partielle. Ces observations nous permettent de supposer qu'une activité lytique s'est produite pour assurer l'internalisation des *Methylobacterium*. Ces observations montrent que les *Methylobacterium* inoculés colonisent les racines de *R. monosperma* de manière intracellulaires, alors que la souche de *Methylobacterium* sp. strain NPFM-SB3, possédant la nitrogénase et les gènes nodA, induisaient chez *Oryza sativa* la formation de paranodule (ou pseudonodule), dans lequel les bactéries pourraient fixer de l'azote et coloniser uniquement les espaces intercellulaires. Ces systèmes englobent toutes les bactéries diazotrophes vivant en étroite association avec la plante hôte et fixant directement l'azote dans les espaces intercellulaires sans être transformées en bactéroïdes et qui sont également qualifiés de fixateurs non symbiotiques (Shenoy *et al.*, 2001). Généralement, les souches de *Methylobacterium* ont été précédemment associées à différentes parties de la plante comme épiphytes (Omer *et al.*, 2004) et endophytes (Elbeltagy *et al.*, 2000), alors que, exceptionnellement, il a été par la suite démontrés que des bactéries du genre *Methylobacterium*, avaient la capacité de former des nodules fixateurs d'azote, en l'occurrence *Methylobacterium nodulans* isolées de *Crotalaria podocarpa* (Jourand *et al.*, 2004a). Toute fois, dans notre étude, les boursoufflures qui apparaissent sur les racines de *R.monosperma* après l'inoculation par *Methylobacterium* n'a pas évoluée en nodules, cela est probablement dû aux conditions de culture au laboratoire qui devaient mieux correspondre aux conditions arides. Cela impliquera la recherche de conditions optimales de culture et de nodulation de ces plantes. Aussi, pour mieux comprendre la nature de cette association épiphytocytophytique, il est nécessaire d'utiliser des techniques moléculaires pour la recherche d'éventuelles gènes de nodulation (Nod) et les gènes de la fixation de l'azote (*nifH*).

L'étude de la diversité des bactéries endophytes associatives suscite d'énormes intérêts, notamment qu'elles sont désignées comme bactéries de future dans le domaine agricole (Seghers *et al.*, 2004).

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

Planche VI

Observation microscopique des sections semifines des racines de *R. monosperma* inoculées par *P. koreensis*

- a. Déchirure de l'épiderme (ou rhizoderme) au niveau de sites d'infection et colonisation de la racine par *P. koreensis*, 10 jours après inoculation. Barre, 20 μm ;
- b. Détail montrant les sites d'infection après inoculation. Barre, 10 μm ;
- c. Microphotographie de *P. koreensis* en phase exponentielle observée au microscope électronique à transmission (flèche noire). Barre, 2 μm .

Abréviations,

ep : épiderme ou rhizoderme, fv : faisceaux vasculaire, cc, cellules corticales, b : bactéries.

Planche VI

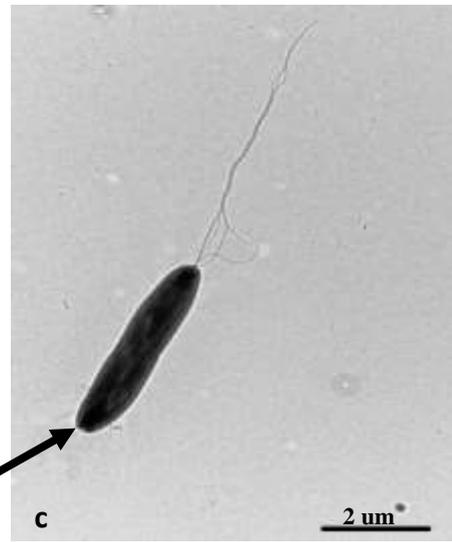
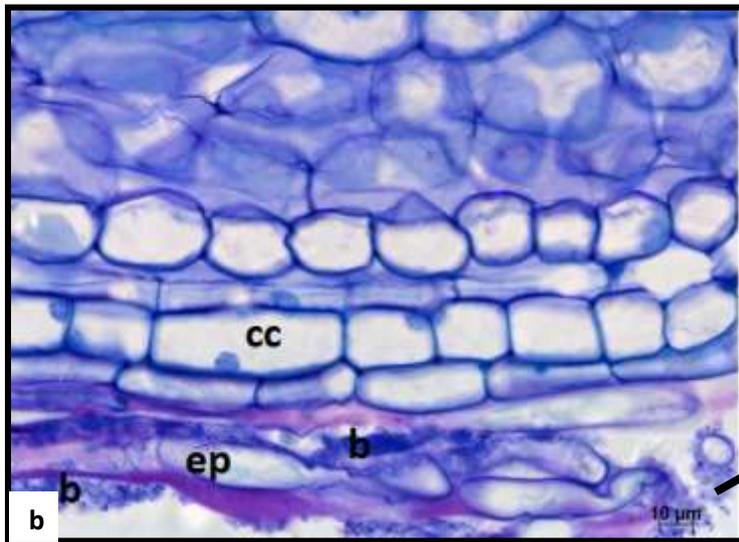
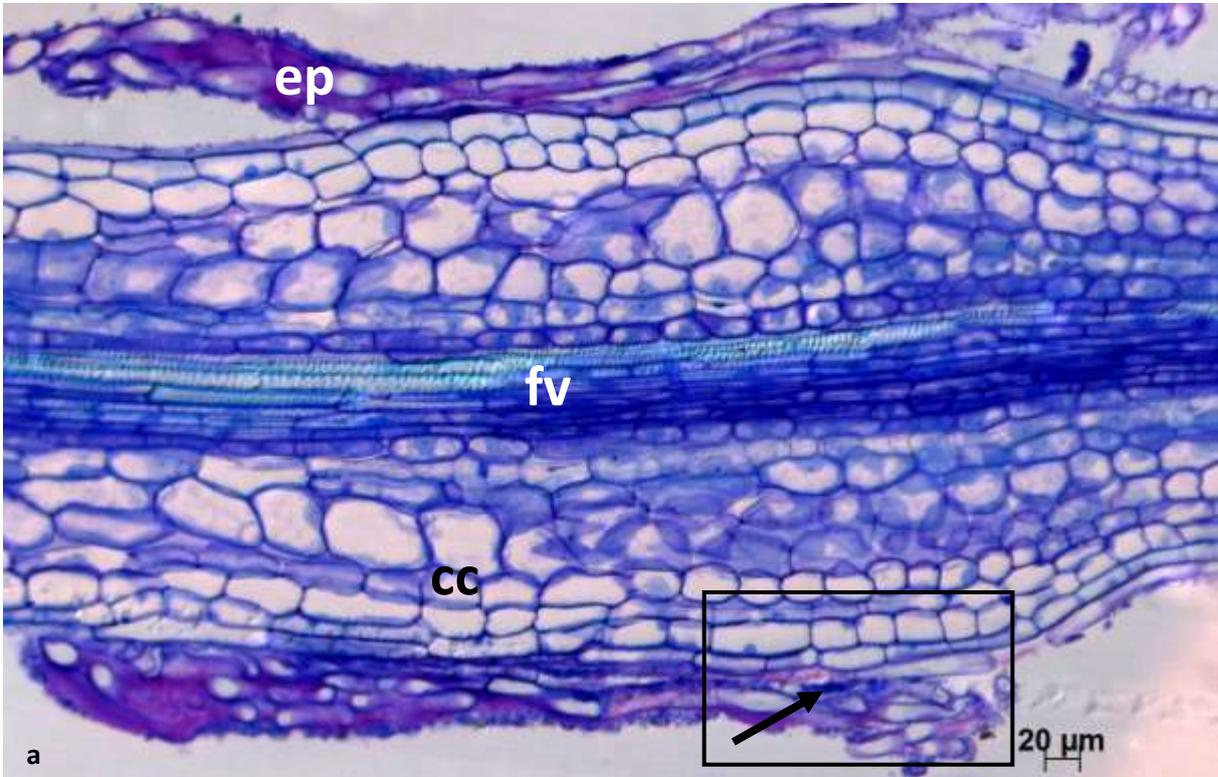


Planche VII

Observation microscopique des sections semifines des racines de *R. monosperma* inoculées par *P. koreensis*

- a. Colonisation bactérienne intercellulaire (flèche noire). Barre, 20 μm ;
- b. Divisions cellulaires dans le cortex racinaire (flèche orange). Barre, 10 μm .

Abréviations,

ep : épiderme ou rhizoderme, fv : faisceaux vasculaire, ci, cortex interne, ce : cortex externe,
b : bactéries.

Planche VII

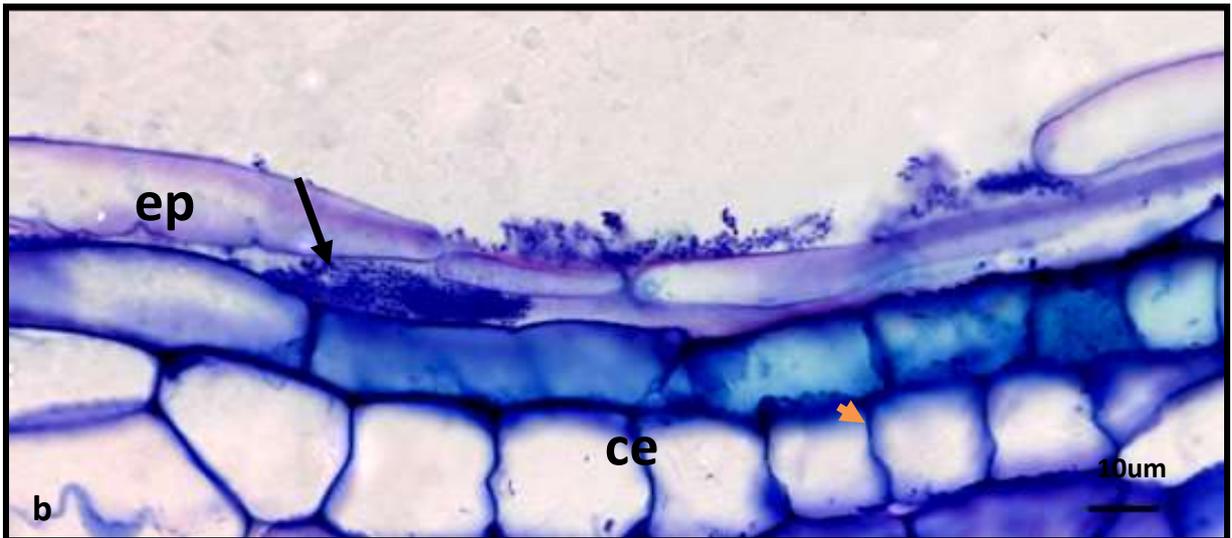
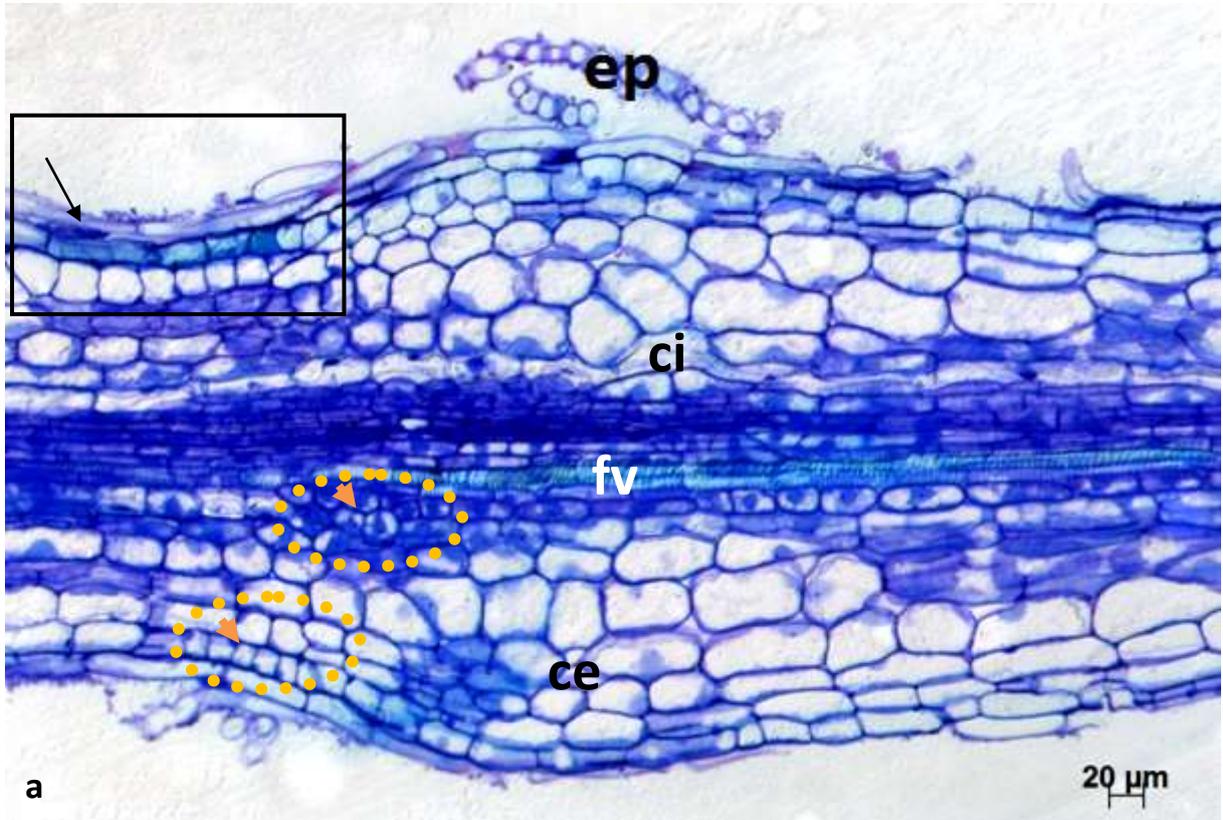


Planche VIII

Observation microscopique des sections transversales semifines et ultrafines des racines de *R. monosperma* inoculées par *Methylobacterium* sp

- a. Section semifine montrant la rupture de l'épiderme (ou rhizoderme) au niveau de sites d'infection et colonisation de la racine par *Methylobacterium* sp, 10 jours après inoculation. Barre : 20 μm ;
- b. Section ultrafine montrant le détail des sites d'infection après inoculation. Barre : 1 μm ;
- c. Détail montrant les bactéries colonisant la racine dans les sites d'infection. Barre : 1 μm ;
La flèche rouge indique les bactéries colonisatrices
- d. Section ultrafine montrant la pénétration des bactéries via les espaces intercellulaire de la racine. Barre : 2 μm .

Abréviations,

ep : épiderme ou rhizoderme, cc : cellules corticales, b : bactéries, p : paroi, sp : espace intercellulaire

Planche VIII

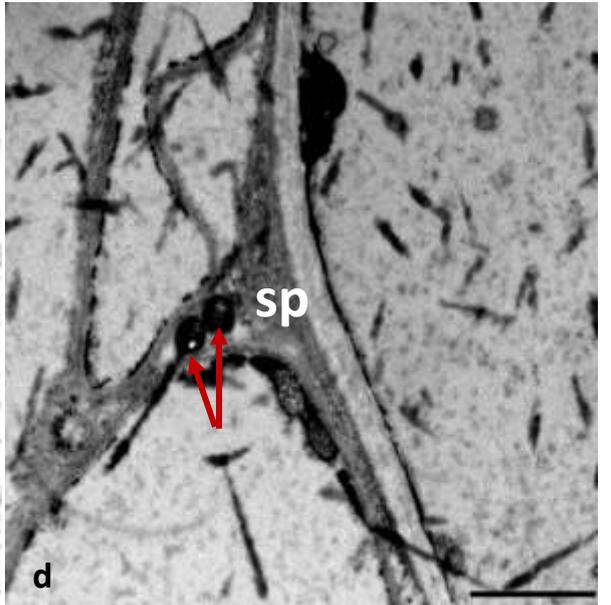
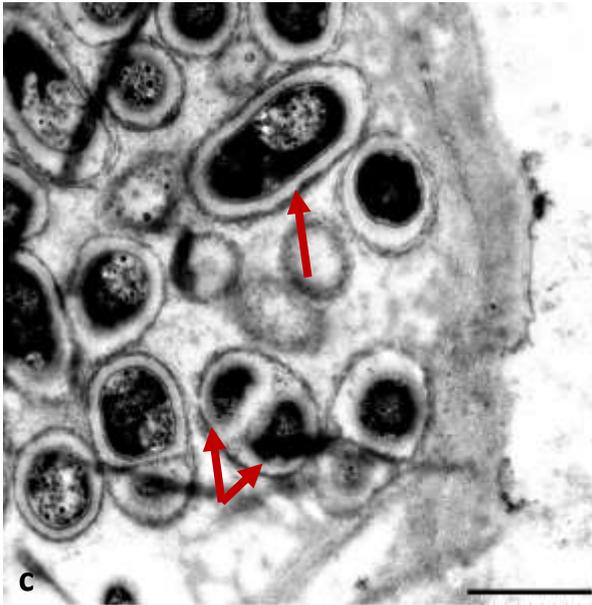
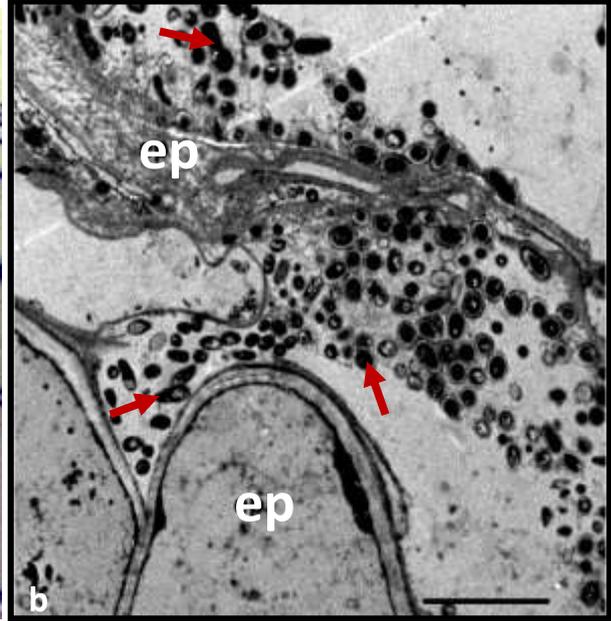
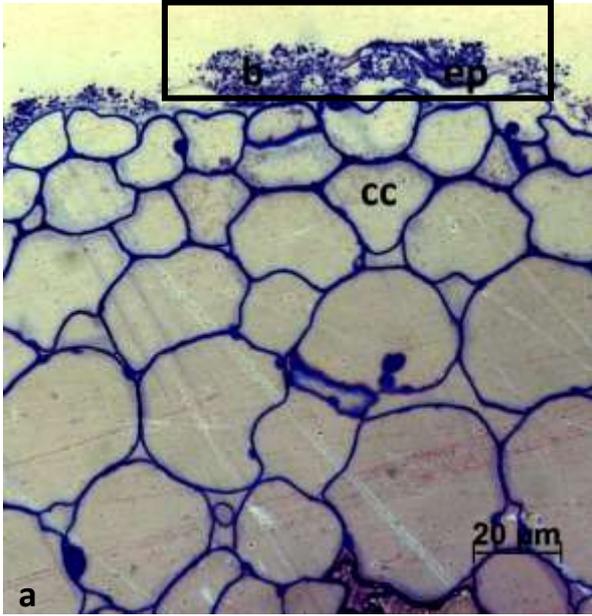


Planche X

Observation microscopique des sections ultrafines des racines de *R. monosperma* inoculées par *Methylobacterium* sp

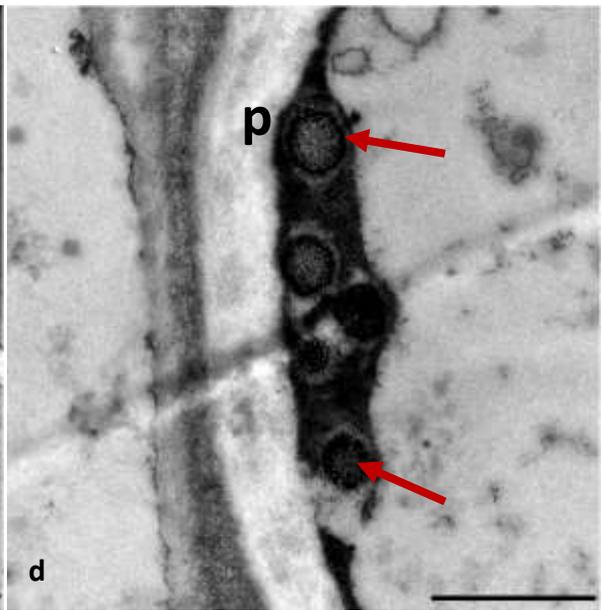
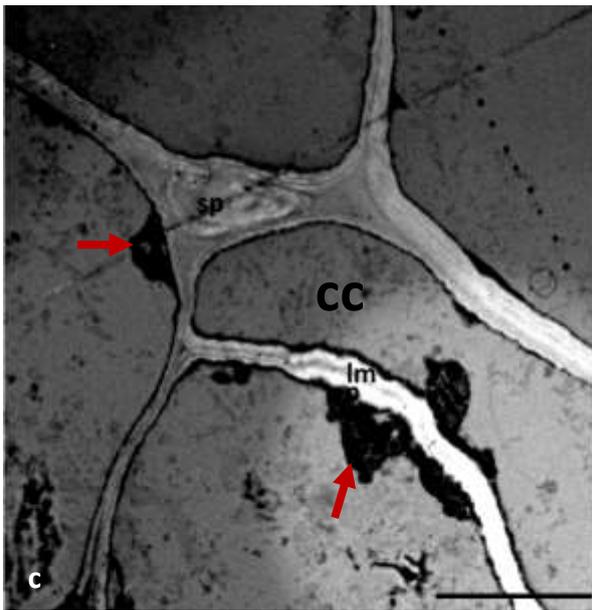
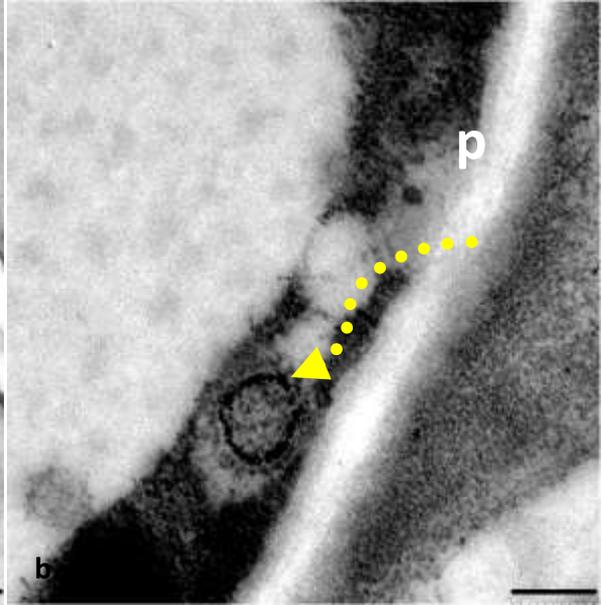
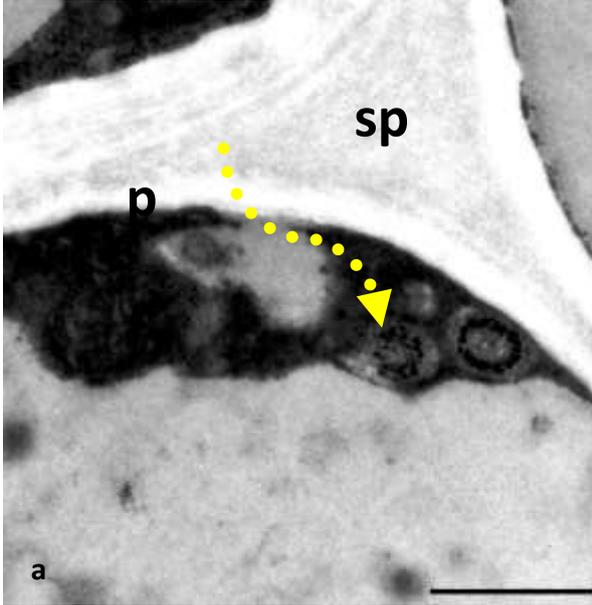
- a. b.** Section ultrafine montrant la colonisation intracellulaire de la racine par *Methylobacterium* sp, 10 jours après inoculation. Barre : a. 1 μm , b. 200nm ;
La flèche jaune indique les bactéries pénétrantes à travers la paroi cellulaire
- c.** Section ultrafine montrant une sous population bactérienne dans les cellules corticales de la racine. Barre : 5 μm .
- d.** Détail montrant les colonies des bactéries dans les cellules corticales de la racine.
Barre : 1 μm .

La flèche rouge indique les bactéries intracellulaires

Abréviations,

cc : cellules corticales, lm : lamelle moyenne, sp : espace intercellulaire, p : paroi

Planche X



**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Conclusion

Les travaux menés au cours de cette thèse sur l'étude de la symbiose entre une légumineuse du genre *Retama*, *R. monosperma*, et son microsymbionte, nous ont permis d'une part, d'aborder la compréhension de la mise en place de cette association, d'autre part, d'établir des hypothèses quant aux mécanismes intervenant dans cette interaction mutualiste.

Nous avons tout d'abord, identifié les bactéries qui colonisent les nodules de *R. monosperma* par analyse génétique basée sur les gènes ARNr16S, et les gènes de ménages *atpD*, *glnII* et *recA*. Les résultats indiquent que les micros-symbiotes présents dans nos nodules sont taxonomiquement identique à ceux récemment identifiés chez *R. sphaerocarpa* par Guerrouj *et al.* (2013).

Ensuite, l'étude anatomique des nodules de *R. monosperma* a permis de d'identifier ces nodules comme étant de type indéterminé, fixateur d'azote, présentant une compartimentation interne en 4 zones. On retrouve de la partie distale à la partie proximale:

- Une zone méristématique dédiée à la croissance du nodule, contenant deux parties distincts dont la plus distale et dépourvue de bactéroïdes à la quelle s'ajoute la deuxième partie aux cellules infectées;
- Une zone de différenciation, dans la partie la plus distale, les bactéroïdes se divisent activement, suivie par la partie proximale avec des cellules au cytoplasme dense, indicatif d'une activité métabolique importante, caractérisée par la présence d'amyloplastés intracellulaires compressés le long des parois des cellules infectées ;
- Une potentielle zone de fixation, dans la quelle 100% des cellules sont infectées qui laisse à envisager un envahissement avant divisions cellulaires plutôt qu'un envahissement par cordon d'infection. Dans cette zone, les bactéroïdes présentent une forme sphérique à légèrement elliptique inhabituellement rencontrées dans la majorité des nodules;
- Enfin, une zone de sénescence caractérisée par des bactéroïdes sénescents, et dans les quelles l'activité fixatrice d'azote est moindre puis éteinte.

Aucun cordon d'infection n'a été détecté dans les zones précitées formant le nodule de *R. monosperma*.

Aussi, d'importantes singularités sont à signaler notamment, (i) La mise en évidence d'un cas de symbiosome partagé par 4 bactéroïdes et la présence exceptionnelle de PHB (poly-hydroxy-butyrate) dans les bactéroïdes intracellulaires, (ii) l'absence de l'endoréduplication dans les nodules de *R. monosperma*, (iii) L'observation d'un endoderme de 2 à 3 couches de cellules lignifiées.

Par ailleurs, l'identification d'isolats à partir de nodules de *R. monosperma* via l'analyse du gène ARNr 16S révèle que ces bactéries appartiennent aux genres *Pseudomonas koreensis* et *Methylobacterium* sp.

La visualisation microscopique des sections semifines des sites d'infections au niveau des racines de *R. monosperma* après inoculation par *P. koreensis* et *Methylobacterium* sp, indique que ces bactéries colonisent la racine dans certaines parties de la zone d'élongation et dans la zone pilifère.

Les bactéries induisent d'une part, la stimulation de la division des cellules corticales racinaires et d'autre part la déstabilisent les cellules épidermiques.

P. koreensis et *Methylobacterium* envahissent le cortex racinaire à travers les fissures de l'épiderme et pénètrent dans les cellules corticales externes via les espaces intercellulaires. Ces résultats démontrent que ces bactéries qualifiées comme *PGPR* puissent établir avec *R. monosperma* une association étroite à caractère epi-endophytique.

Perspectives,

-La caractérisation des étapes précoces du processus symbiotique entre *R. monosperma* et *B. retamea*, apportera des connaissances complémentaires et originales pour comprendre mieux l'internalisation des bactéries sans cordon d'infection. Cette connaissance pourrait se révéler primordiale pour le transfert de la capacité de fixer d'azote des légumineuses à d'autres plantes cultivées d'intérêt économique.

-Bien que la présence du gène *nodA* chez *B. retamae* ait déjà été rapportée, aucun lien direct avec son rôle au sein du dialogue moléculaire n'ait encore été établi. Pour cela une étude détaillée de la perception de Facteurs Nod par la plante sera envisageable pour répondre à Plusieurs questions qui se posent : est-ce que la première phase de reconnaissance initiée par les facteurs Nod est contournée par ces bactéries? Quelle est la molécule signal impliquée dans l'initiation de l'organogenèse nodulaire chez les *Retam* ?

En agriculture, en particulier pour les pays du Sud, *R. monosperma* présente un potentiel, en exploitant à la fois ces propriétés symbiotique avec des Rhizobia pour la fixation d'azote et de constituer donc une alternative aux engrais azotés chimiques et les propriétés de dépollution en s'associant avec *Methylobacterium*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Akkal, S., Louaar S., Benahmed M., Laouer, H.,Duddeck, H. *Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells. UDC pp. 547-972.

Aimé, S., Penven, M.J. (1982). Le complexe dunaire du Cap Falcon (Oran). Etude morphodynamique appliquée et perspectives d'aménagement In: Méditerranée, Troisième série, Tome 45 p, 3-13.

Alguacil, M.M, Hernandez, J.A., Caravaca, F., Portillo, B., Roldan, A. (2003). Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizial shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. An International Journal for Plant Biology **118**, 562-570.

Arora, N. (1954). Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. Phytomorphology **4**, 211-216.

B

Baldani, J. I., and Baldani, V., L., D. (2005). History on the biological nitrogen fixation research graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Brass. Sci.* **77**: 549- 579.

Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Palm, C., Peck, M.C., Surzycki, R., Wells, D.H., Yeh, K.C., Davis, R.W., Federspiel, N.A., and Long, S.R. (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9883-9888.

Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri, Y., Fernandez de Mattos, S, Amzazi, S., Villalonga, P. (2014). Anti-inflammatory effects of *Retama monosperma* in acute ulcerative colitis in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **P**, 14-38.

Belmokhtar, Z ., Kaid Harche, M. (2014). In vitro antioxidant activity of *Retama monosperma* (L.) Boiss. *Natural Product Research* **28**, 2324-2329.

Ben Romdhane, S., Nasr, H., Samba-MBay, R., Neyra, M., Habib Ghorbal, M. (2005). Diversity of *Acacia tortilis* Rhizobia revealed by PCR/RFLP on crushed root nodules in Tunisia. *Annals of Microbiology* **55**, 249-258.

Bender, G., Nayder, M., Goydych, W., Rolfe, B. (1987). Early infection events in the nodulation of the non legume *Parasponia Andersonii* by *Bradyrhizobium*. *Plant Science* **51**, 285–293.

Benmiloud., M. R. (2013). Diversité Génétique et Cytogénomique de trois espèces du genre *Retama*. Thèse Université Mouhamed Boudiaf (Oran).

Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, F., Cassan, F., Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbial and Cell Physiology* **74**, 874-880.

Bonaldi, K., Gargani, D., Prin, Y., Fardoux, J., Gully, D., Nouwen, N., Goormachtig, S., and Giraud, E. (2011). Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by Photosynthetic *Bradyrhizobium* Sp. Strain ORS285: The Nod-Dependent Versus the Nod-Independent Symbiotic Interaction *The American Phytopathological Society* **24**,1359–1371.

- Bond, L.** (1948). Origin and developmental morphology of root nodules of *Pisum sativum*. *Journal of Botany* **109**, 411-434.
- Boulila, F., Depret, G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S., Laguerre, G.** (2009). *Retama* species growing in different ecologicalclimatic areas of north eastern Algeria have a narrow range of Rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst Appl Microbiol* **32**, 245–255.
- Brewbaker, J. L., Willers, K. B., and Macklin, W.** (1990). Reponse of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *R. meliloti* SU-47. *Gen Microbiol* **139**, 3157-3163.
- Brencic, A., and Winans, S.C.** (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 155-194.
- Brewin, N.J.** (2004). Plant cell remodelling in the Rhizobium-Legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant. Sci* **23**, 293-316.
- Brown, S. M., Walsh, K. B.** (1994). Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability. *Aust. journal of plant physiol* **21**, 49-68.
- Brundu, G.A.D., Camarda, I., Deiana, P.** (2004). A contribution to the study of the distribution of *Medicago- Sinorhizobium* symbiosis in Sardinia (Italy). *Journal of Agricoltura Mediterranea* **134**: 33-48.

C

- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., and Denarie, J.** (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**, 1647-1665
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Figueroa, D., Barea, J.M., Roldan, A.** (2003a). Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semi-arid Mediterranean area. *For Ecol Manage* **182**,49–58.
- Cermola, M., Fedorova, E., Tate, R., Riccio, A., Favre, R., and Patriarca, E.J.** (2000).Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol- Plant-Microbe- Interact* **13**, 733-74.
- Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Bâ, A., Gillis, M., de Lajudie, P., and Dreyfus, B.** (2000). Photosynthetic *Bradyrhizobium* are natural endophytes of the African wild rice, *Oriza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol* **66**, 5437- 5447.
- Chaintreuil, C., Boivin, C., Dreyfus, B., and Giraud, E.** (2001). Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. ORS285 reveals the presence of a new insertion sequence upstream of nodA. *FEMS. Microbiol. Lett* **194**, 83-86.
- Chandler, M.** (1978). Some Observations on Infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *Journal of Experimental Botany* **29**, 749-755.
- Chandler, M. R., Date, R. A., Roughley, R.J.** (1982). Infection and root nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot* **33**, 47-57.
- Chen, W.M., James, E.K., Prescott, A.R., Kierans, M., and Sprent, J.I.** (2003). Nodulation of Mimosa spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant. Microbe. Interact* **16**, 1051-1061.

- Chomczynski, P., Rymaszewski, M.** (2006). Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. *Biotechniques* **40**, 454-458.
- Chmelíková, L., Hejman, M.** (2012). Root system variability in common legumes in Central Europe *Biologia* **67/1**, 116-125.
- Colan, M.J.** (1963). Black nodules in *Dolichos*. *Australian Journal Sci* **26**, 121.
- Connell, J.H., Slatyer, R.O.**(1977). Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *The American Naturalist* **111**, 1119-1144.
- Conforti, F., Statti, G., Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Menichini, F., Houghton, P.J.** (2004). Antioxidant and cytotoxic activities of *Retama raetam* subsp. *Gussonei*. *Phytother Res* **18**,585–587.
- Compant, S., Clement C, Sessitsch A.** (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* **42**, 669-678.
- Corby, H.D.L.** (1988). Types of leguminous nodule and their distribution among the Leguminosae. *Kirkia* **13**, 53–123.
- Crespi, M., Galvez, S.** (2000). Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *Journal of plant Growth Regulation* **19**,155-166.
- Crutzen, P.J., Mosier, A.R., Smith, K.A., and Winiwarter, W.** (2007). N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys. Discuss* **7**, 11191-11205.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., Bono, J. J.** (2001). Perception of lipo chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci* **6**, 24-30.

D

- Dart, P.J.** (1977). Infection and development of leguminous nodules. in *A treatise on dinitrogen fixation*, Section III, Hady K.W.S (de) John Willey and Sons, New York, 367-472.
- Dobereiner, J.** (1965). Black nodules *Centrosolna pubescens* ; *Soil Biol. Intern. News Bul.* no2.
- Doyle, J.J.** (1998). Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends Plant Sci* **3**, 473-478.
- Downie, J.A., and Walker, S.A.** (1999). Plant responses to nodulation factors. *Current Opinion in Plant Biology.* **2**, 483-489.
- Downie, J.A.** (2007). Infectious Heresy. *Science* **316**, 1296-1297.
- Doyle, J.J.**(2011). Phylogenetic perspectives on the origin of nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 1289–1295.
- Dreyfus, B., Garcia, J.L., Gillis, M.** (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **38**, 89-98.

E

- El-Shazly, A., Ateya, A.M.,Witte, L.,Wink, M.** (1996). Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*, *R. sphaerocarpa* and *R.monosperma*. *Z. Naturforsch* **51c**,301–308.

F

- Faria, S.M., Hay, G. T., Sprent, J. I.** (1988). Entry of rhizobium into roots of *Mimosa scabrella* Bentham occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol* **134**, 229 1-2296.
- Faria, S.M, Lewis, G.P., Sprent, J., Sutherland, J.M.** (1989). Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytologist* **111**, 607-619.
- Fernandez-Lopez, M., Goormachtig, S., Gao, M., D'Haese, W., Van Montagu, M., and Holsters, M.** (1998). Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *sesbania rostrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12724-12728.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X.** (1997). Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. *Nature* **387**, 394-401.

G

- Gage, D.J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 280-300.
- Gaur,** (1990). Phosphate solubilisation microorganisms as biofertilizers. Omega Scientific Publisher, New Delhi p, 176.
- Gallego-Martin, F., Sandez Anta, M.A., Navarro Andrés, F.** (1988). Acerca de la cariólogía de algunas genisteas del centro-occidente español. *Lazaroa* **9**, 55–60.
- Gallego-Fernandez, J.B., Munoz Vallées, S., Dellafiore, C. M.** (2010). Expansion de un arbusto nativo-invasivo en dunas costeras: causas y consecuencias ecológicas. *Revista Chagual* **8**, 41-48.
- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C., and Batut, J.** (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672.
- Giraud, E., Fleischman, D.** (2004). Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynth. Res* **82**, 115-130.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C., Sadowsky, M.** (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**, 1307-1312.
- Golinowski, W., Kopcinska, J., Borucki, W.** (1987). The morphogenesis of lupine root nodules during infection by *Rhizobium lupini*. *Acta. Soc. Bot. Pol* **56**, 687–703.

- Graham, P.H., Vance, C.P.** (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant. Physiol* **131**, 872-877.
- Goormachtig, S., Capoen, W., and Holsters, M.** (2004a). Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends. Plant. Sci* **9**, 518-522.
- Goormachtig, S., Capoen, W., James, E.K., and Holsters, M.** (2004b). Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 6303-6308.
- González-Mauraza, H., Martín-Cordero, C., Alarcón-de-la-Lastra C., Rosillo, M. A., León-González, A.J., Sánchez-Hidalgo, M.** (2013). Anti-inflammatory effects of *Retama monosperma* in acute ulcerative colitis in rats. *Journa of Physiol Biochem* **70**, 163–172.
- Gonzalez, V., Santamaria, R.I., Bustos, P., Hernandez-Gonzalez, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S.C., Ramirez, M.A., Jimenez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., and Davila, G.** (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 3834-3839.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., and Frugier, F.** (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell.* **18**, 2680-2693.
- Gonzalez, V., Bustos, P., Ramirez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernandez-Gonzalez, I., Hernandez-Celis, J.C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodriguez, O., Flores, M., Cevallos, M.A., Collado-Vides, J., Romero, D., and Davila, G.** (2003). The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol* **4**, R36.
- Gottfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R., Hennecke, H.** (2001). Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol* **183**, 1405-1412.
- Graham, P.H., and Vance, C.P.** (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* **131**, 872-877.
- Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M.H., Abdelmoumen. H., Quinones, M.A., El Idrissi, M.M., Velázquez, E., Fernández-Pascual, M., Bedmar, E.J., Peix, A.** (2013). Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp.nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst. Appl. Microbiol* **36**, 218–223.
- Guinel, F.C.** (2009). Getting around the legume nodule, I. the structure of the peripheral zone in four nodule types. *Botany* **87**, 1117-1138.

H

- Haase, P., Pugnaire, F.I., Fernández, E.M., Puigdefábregas, J., Clark, S.C., Incoll, L.D.** (1996). Investigation of rooting depth in the semiarid shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. by labelling of ground water with a chemical tracer. *J Hydrol* **177**, 23–31.
- Hatimi, A., Achouri, M., Oihabi, A.** (1997). Endomycorhization de legumineuses fixatrices de dunes: croissance et nutrition phosphatée. *Sechresse* **8**, 99-102.
- Held, M., Hossain, M.S., Yokota, K., Bonfante, P., Stougaard, J., Szczyglowski, K.** (2010). Common and not so common symbiotic entry. *Trends Plant Sci* **15**, 540–545.

Hirsch, A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* **122**, 211-237.

Hirsch, AM, Lum, MR, Downie, JA. (2001). what makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology* **127**, 1484-1492.

Hopkins, W.G.(2003). Introduction to plant physiology. Second edition. Eds : De Boeck, De Boeck University, Belgique p, 68-101.

J

Jaftha, J.B., Strijdom, B.W., Steyn, P.L. (2002). Characterization of pigmented methylotrophic bacteria which nodulate *Lotononis bainesii*. *Syst. Appl. Microbiol* **25**, 440-449.

James, E.K., Minchin, F.R., Iannetta, P.P.M., Sprent, J.I. (1997). Temporal relationships between nitrogenase and intercellular glycoprotein in developing white lupin nodules. *Annals of Botany* **79**, 493–503.

K

Kalita, M., Stepkowski, T., Łotocka, B., Malek, W. (2006). Phylogeny and nodulation genes and symbiotic properties of *Genista tinctoria* bradyrhizobia. *Arch Microbiol* **186**, 87–97.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., and Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**, 331-338.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., and Tabata, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* **9**, 189-197.

Korotkova, N., Lidstrom, M. (2001). Connection between Poly hydroxybutyrate biosynthesis and growth on C1 and C2 compounds in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology* **183**, 1038-1046.

L

Lancelle, S. A., Torrey, J. G.(1984). Early development of *Rhizobium* induced root nodules of *Parasponia rigida*. II. Nodule morphogenesis and symbiotic development. *Can J Bot* **63**, 25-35.

Li, B., Xie G., Soad A., and Coosemans J. (2005). Suppression of *Meloidogyne javanica* by antagonistic and plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Zhejiang Univ. Sci* **6**, 496- 501.

Lodwig, E., Leonard, M., Marroqui, S., Wheeler, T., Findlay, K., Downie, J., Poole, P. (2005). Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. *Molecular Plant Microbe Interactions* **18**, 67-74.

Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**, 1885-1898.

Łotocka, B., Kopcinska, J., Gorecka, M., Golinowski, W. (2000). Formation and abortion of root nodule primordia in *Lupinus luteus* L. *Acta Biol Crac Ser Bot* **42**, 87–102.

Łotocka, B., Kopcinska, J., Golinowski, W. (1997). Morphogenesis of root nodules in white clover. I. Effective root nodules induced by the wild type of *Rhizobium leguminosarum* biovar. trifolii. *Acta Soc Bot Pol* **66**, 273–292.

Łotocka, B., Kopcinska, J., Skalniak, M. (2012). Review article: the meristem in indeterminate root nodules of Faboideae. *Symbiosis* **58**, 63–72.

Louaar, S., Akkal, S., Bousetla, A., Medjroubi, K., Djarri, L., Seguin, E. (2005). phytochemical study OF *Retama sphaerocarpa*. *Chemistry of Natural Compounds* p. 87.

M

Ma, F., Peterson, C. A. (2003). Current insights into the development, structure and chemistry of the endodermis and exodermis of root. *Canadian journal of botany* **81**, 405-421.

Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K., Stougaard, J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun*.

Maghrani, M., Lemhadri, A., Jouad, H., Michel, J.B., Eddouks, M. (2003). Effect of the desert plant *Retama raetam* on glycaemia in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **87**, 21–25.

Maghrani, M., Lemhadri, A., Zeggwagh, N.A., El Amraoui, A., Haloui, M., Jouad, H., Eddouks, M. (2004). Effect of *Retama raetam* on lipid metabolism in normal and recent-onset diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **90**, 323–329

Maire, R. (1552-1987). Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara). Volumes I à XVI. Lechevalier, Paris in Encyclopédie biologique.

Maire, R. (1987). Flore de l'Afrique du Nord. Edition Lechevalier. Paris, p.128

Martin-Cordero F., Lopez Lazaro M., Gil-Serrano A., Rodriguez Carvajal M. A., Gonzalez J. A. (1999). Novel flavonol glycoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry* **51**, 1129-1131.

McRae, D.G., Miller, R.W., Berndt, W.B., Joy, K. (1989). Transport of C₄-dicarboxylates and amino acids by *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact* **2**, 273–278.

Menna, P., Barcellos, F.G., Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **59**, 2934–2950.

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (2003). A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* **132**, 161–173.

Merghoub, N., Benbacer, L., Amzazi, S., Morjani, H., El mzibri, M. (2009). Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research* **12**, 1045-1050.

- Miklashevichs, E.H., Rohrig, J., Schmidt, S.J.** (2001). Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Crit- Rev- Plant- Sci* **20**, 373-394.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C.** (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**, 948-950.
- Moulin, L.** (2002). Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène *nod A* à l'identification de rhizobia au sein des bêta-protéobactéries. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-LyonI p, 289.
- Moreira, F., Cruz, L., Miana de Faria, S., Marsh, T., Martínez-Romero, E., de Oliveira Pedrosa, F., Maria Pitard, R., Peter W Young, J.** (2006). *Azorhizobium doebereinae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systemic and Applied Microbiology* **29**, 197-206.
- Muñoz Vallés, S., Gallego-Fernández, J.B., Dellafiore, C.** (2005). Spatial and Temporal Pattern of *Retama monosperma* Spread in the Spit of El Rompido (Gulf of Cadiz, SW Spain). In: Abstract Book of the European IALE Congress, Landscape Ecology in the Mediterranean, Inside and Outside Approaches, Faro, Portugal p, 101.
- Muñoz Vallés, S., Gallego-Fernández, J.B., Dellafiore, C., Cambrollé, J.** (2011a). Effects on soil, microclimate and vegetation of the native-invasive *Retama monosperma* (L.) in coastal dunes. *Plant Ecology* **212**, 169-179.

N

- Ndoye, I., de Billy, F., Vasse, J., Dreyfus, B., and Truchet, G.** (1994). Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J Bacteriol* **176**, 1060-1068.
- Nuti, M. P.** (1989). Advanced in the utilisation of rhizobia in arid environments. *Arid Soil Res. Rehabilitation* **3**, 243-258.
- Nutman, P.S.** (1956). The influence of the legume in root-nodule symbiosis. *Biol Rev* **31**, 109-151.

O

- Oldroyd, G.E.D.** (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Rev* **11**, 252–263.
- Oke, V., Long, S. R.** (1999). Bacteroid formation in the Rhizobium–legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol* **2**, 641-646.
- Olson, J.O.** (1958). Rates of succession and soil changes on southern Lake Michigan sand dunes. *Botanical Gazette* **119** (3), 125-170.

P

- Paau, A., Cowles, J., Raveed, D.** (1978). Development of bacteroids in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules. *Plant Physiology* **62**, 526-530.
- Patriarca, E.J., Tatè, R., Iaccarino, M.** (2002). Key Role of Bacterial NH₄⁺ Metabolism in Rhizobium-Plant Symbiosis. *Microbiology and molecular biology reviews* p, 203–222.
- Pawlowski K, Bisseling T.** (1996). Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features? *Plant Cell* **8**, 1899-1913.
- Pingret, J.L., Journet, E.P., and Barker, D.G.** (1998). Rhizobium nod factor signaling. Evidence for a gprotein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell* **10**, 659-672.

Popp, C., Ott, T. (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 458–467.

Pueppke, S.G., Broughton, W.J. (1999). *Rhizobium* sp. strain *NGR234* and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 293-318.

Pugnaire, F.L., Haase, P., Puigdefábregas, J. (1996). Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecology* **77**, 1420–1426.

Pugnaire, F. I., Haase, P., Puigdefabregas, J., Cueto, M., Clark, S.C., Incoll, L.D. (1996). Facilitation and succession under the canopy of a leguminous shrub, *Retama sphaerocarpa*, in a semi-arid environment in south-east Spain **76**, 455-464.

Q

Quezel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome 1 et 2). Edition du C.R.N.S. France, p.1170.

R

Rana, D., Krishnan, H.B. (1995). A new root-nodulating symbiont of the tropical legume *Sesbania*, *Rhizobium* sp. SIN-1 is closely related to *R. galegae*, a species that nodulates temperate legumes. *FEMS. Microbiology Letters* **134**, 19–25.

RANGA MO, V. (1977). Effect of root temperature on the infection process of *Lotus* and *Stylosanthes*. *J. Exp. Bot* **28**, 241-259.

Reese, G. (1957). Über die polyploidiespektren in der nordsaharischen Wüstenpflanzen. *Flora* **146**(3), 478–487.

Rejili, M., Ferchichi, A., Mahdhi, M. & Mars, M. (2007). Natural nodulation of some wild legumes in the south area of Tunisia. *Agric. J* **2**,405–411.

Renier, A., De Faria, S.M., Jourand, P., Giraud, E., Dreyfus, B., Rapior, S., Prin, Y. (2011). Nodulation of *Crotalaria podocarpa* DC. By *Methylobacterium nodulans* displays very unusual features. *J. Exp. Bot* **62**, 3693-3697.

Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biology* **17**:208–212

Rivas, R., Velazquez, E., Willems, A., Vizcaino, N., Subba-Rao, N.S., Mateos, P.F., Gillis, M., Dazzo, F.B., and Martinez-Molina, E. (2002). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5217-5222.

Rodriguez-Echeverria, S., Perez-Fernandez, M.A. (2003). Soil fertility and herb facilitation mediated by *Retama sphaerocarpa*. *J Veg Sci* **14**, 807–814.

Rodriguez-Echeverria, S., Moreno, S., Bedmar, E. J. (2014). Genetic diversity of root nodulating bacteria associated with *Retama sphaerocarpa* in sites with different soil and environmental conditions *Systematic and Applied Microbiology* **37**, 305–310.

Rosenblueth, M., Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact* **19**,827-837.

Ruiz-Diez, B., Fajardo, S., Puertas-Mejia, M.A., De Felipe, M.R., Fernandez-Pascual, M. (2009). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch. Microbiol* **19**, 35–46.

Ruiz-Diez, B., Quinones, M.A., Fajardo, S., López, M.A., Higuera, P., Fernandez-Pascual, M. (2012). Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **96**, 543–554.

S

Sajnaga, E., Malek, W., Lotocka, B., Stepkowski, T., Legocki, A. (2001). The root-nodule symbiosis between *Sarothamnus scoparius* L. and its microsymbionts. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**, 385–391.

Sawada, H., Kuykendall, L.D., and Young, J.M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* **49**, 155–179.

Schubert, K.R. (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol* **37**, 539–574.

Sen, D., Weaver, R. W. (1984). A basis for different rates of N₂-fixation by the same strains of *Rhizobium* in peanut and cowpea root nodules. *Plant. Sci. Lett* **34**, 239–246.

Selker, J.M.L., Newcomb, E.H. (1985). Spatial relationships between uninfected and infected cells in root nodules of soybean. *Planta* **165**, 446–454.

Soltis, D.E., Soltis, P.S., Morgan, D.R., Swensen, S.M., Mullin, B.C., Dowd, J.M., Martin, P.G. (1995). Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 2647–2651.

Sprent, J., Raven, P.H. (1992). Evolution of nitrogen-fixing symbiosis. in *Biological nitrogen fixation*. London: Chapman and Hall.

Sprent, J. (1993). Evolution since Knoxville: were nitrogen-fixing organisms wise to inhabit land plants? In *New horizons in nitrogen fixation*, R. Palacios, Mora, J., and Newton, W.E., Editors. Kluwer: Dordrecht.

Sprent, J.I. (2001). *Nodulation in Legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Sprent, J.I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol* **174**, 11–25.

Sprent, J.I., Ardley J.K., James E.K. (2013). From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany* **89**, 31–41.

Spurr, A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **26**, 31–42.

Shalaby, A. F., Monayeri, M. O., Etman, M. N., El Habibi, A. M., Youcef, N. M., (1972). Germination of some desert medicinal plant under different condition. *Desert. Inst. Bull., A. R. E.*, **22**(2): 433–444.

Shiraishi, A., Matsushita, N., Hougetsu, T. (2010). Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. And the Betaproteobacteria *Bolteria* sp. *Journal of Systematic and Applied Microbiology* **33**, 269–274.

Suessenguth, k., Von beyerle, R. (1936). Über bakterien-sknollschen am spross von *Aeschynomene paniculata* Willd. *Hedwigia* **5**, 234–237.

Sturtevant, D.B., Teller, B.J. (1989). Cytokinin Production by *Bradyrhizobium japonicum*. *American Society of Plant Biologists* **89**, 1247–1252.

Sutton, W.D. (1983). Nodule development and senescence. In: Broughton WJ (ed) Nitrogen fixation. Vol 3. Legumes. Clarendon Press, Oxford, pp 144–212.

Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby, R.J., De Bruijn, F.J., and Ronson, C.W. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* **184**, 3086-3095.

Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., and Dreyfus, B. (2001). Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* **183**, 214-220.

T

Terefework, Z., Lortet, G., Suominen, L., Lindstrom, K. (2000). Molecular evolution of interactions between rhizobia and their legume hosts. Dans. Prokaryotic nitrogen fixation, a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E. W. (Eds.) Horizon Scientific, Wymondham Norfolk, England.

Timmers, A.C.J., Auriac, M.C., and Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**, 3617-3628.

Timmers, A.C.J., Soupène, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant-Microbe. Interact* **13**,1204–1213.

Truchet, G., Barker, D.G., Camut, S., DeBilly, F., Vasse, F., Huguet, T. (1989). Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Journal of Mol. Gen. Genet* **219**, 65-68.

V

Van de velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaitre, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K-I., Abe M. Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E., Mergaert, P. (2010). Plant Peptide Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis. *Journal of Science* **327**, 1122-1126.

Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**, 4295-306.

Vasse, J., de Billy, F., and Truchet, G. (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti* alfalfa symbiotic interaction is accomanied by a hypersensitive reaction. *Plant J* **4**, 555-566.

Vega-Hernández, M.C., Pérez-Galdona, R., Dazzo, F.B., Jarabo-Lorenzo, A., Alfayate, M.C., León-Barrios, M. (2001). Novel infection process in the indeterminate root nodule symbiosis between *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste) and *Bradyrhizobium* sp. *New Phytol* **150**,707–721.

Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., Martínez-Romero, E. (2005) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and

recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation. *Mol- Phylogenet -Evol* **34**, 29–54

W

Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetsa, R.V., Cook, D., Gough, C., Denarie, J., and Long, S.R. (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13407-13412.

Walker, S.A., Viprey, V., and Downie, J.A. (2000). Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13413-13418.

Weir, B. S. (2006). Systematics, specificity and Ecology of new zeland Rhizobia. PH D thesis. School of Biological Sciences, the university of Auckland. New Zealand.

Witty, J. F., Minchin, F. R., Scot, L. , Sheeky, J. E. (1986). Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford Surveys plant. Mol. Cell. Bio* **3**, 276-314

Y

Yatazawa, M., Yoshida, S., Maeda, E. (1984). Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L. *Soil Sci. Plant Nutr* **30**, 405-416.

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2003). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* : A reply to Farrand et al. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **169**, 198-204.

Young, N.D., Cannon, S.B., Sato, S., Kim, D., Cook, D.R., Town, C.D., Roe, B.A., and Tabata, S. (2005). Sequencing the gene spaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **137**, 1174-1181.

Young, J.P., Crossman, L.C., Johnston, A.W., Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H., Wexler, M., Curson, A.R., Todd, J.D., Poole, P.S., Mauchline, T.H., East, A.K., Quail, M.A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S., and Parkhill, J. (2006). The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**, R34.

Z

Zohary, M. (1959). A revision of the genus *Retama* (Boiss). *Bull. Res. Counc. Isr* **7(D)**, 1–2.

Zohary, M.(1962). Plant life of Plestine and Jordan **163**:3515-523.

Website

www. Rhizobia. Co. Nz/taxonomy/Rhizobia. Html

www.toulouse.inra.fr/centre/lipm/fr/interactions_symbiotiques/cm_equipe

¹<http://www.vertdeterre.com/nature/vegetal>

²<http://www.mooseycountrygarden.com/perennial-plants/blue-lupin>

³http://www.missouriplants.com/Bluealt/Medicago_sativa_page.html

⁴http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aeschynomene_indica_2.JPG

⁵<https://www.google.fr/search?hl=fr&biw=1280&bih=697&noj>

⁶http://fr.wikipedia.org/wiki/Vesce_commu

ANNEXE

Milieux de culture

Milieu YMA (Vincent, 1970) Utilisé pour la culture courante des souches de BNL, et pour l'obtention de cellules en vue d'une préparation d'ADN. Par litre: mannitol: 10 g ; glutamate de sodium: 0,5 g ; K₂HPO₄ :0,5 g ; MgSO₄.7H₂O : 0,2 g ; NaCl : 0,05 g ; CaCl₂ : 0,04 g ; FeCl₃ : 0,004 g; extrait de levure: 1 g ; agar : 20 g. Le pH du milieu est ajusté à 6,8. Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120°C.

Milieu Jensen (Vincent, 1970) :Par litre: 10 mL de solution P (K₂HPO₄ à 20 g / L ; MgSO₄.7H₂O à 20 g / L) ; 10 mL de solution Q (NaCl 20 g /L) ; 20 mL de solution R (CaHPO₄ à 50 g /L) ; 10 mL de solution D(FeCl₃.6H₂O à 4 g /L) ; 1 mL d'oligo-éléments de Jensen* ; agar : 20 g /L.* 1 Litre de solution d'oligo-éléments de Jensen contient H₃B₃O₃: 2,86 g ; MnSO₄.4H₂O : 2,03g; ZnSO₄.7H₂O: 0,22 g; CuSO₄.5H₂O : 0,08 g; Na₂MoO₄.H₂O : 0,09 g. Le pH du milieu est ajusté à 6,7. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

Alkaline PEG reagent preparation:

1. Combine 60 g PEG 200 (Sigma-Aldrich or equivalent) with 0.93 mL 2 M KOH and 39 mL water. If desired, NaOH can substitute for KOH in the reagent. Note that PEG 200 is measured by mass rather than volume because of the viscosity of the liquid.
2. Confirm that the pH is 13.3–13.5. Due to storage, some batches of PEG 200 have an acidic, rather than neutral, pH. In this case, add an additional amount of alkali to reach the target pH range.

Blast Alignments with *Bradyrhizobium retamae* strain R7Q2 sequences

16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KC247083.2|Length: 1415Number of Matches: 1

Score

Expect

Identities

Gaps

Strand

2543 bits (1377)

0.0

1380/1381(99%)

1/1381(0%)

Plus/Plus

Query 1 TGC-
AGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGG
GAAC 59

|||||

Sbjct 14
TGCAAGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGAAC 73

Query 60
GTACCTTTTGGTTCGGAACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGGATAAGC
CCTTACG 119

|||||

Sbjct 74
GTACCTTTTGGTTCGGAACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCGGATAAGC
CCTTACG 133

Query 120
GGGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAATG 179

|||||

Sbjct 134

GGGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAATG 193

Query 180

GCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGA 239

|||||

Sbjct 194

GCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
GGGACTGA 253

Query 240

GACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG
GCGCAAGC 299

|||||

Sbjct 254

GACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG
GCGCAAGC 313

Query 300

CTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTT
TTGTGCG 359

|||||

Sbjct 314

CTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTT
TTGTGCG 373

Query 360

GGAAGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGC
AGCCGCGG 419

|||||

Sbjct 374

GGAAGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGC
AGCCGCGG 433

Query 420
TAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGT
AGGCGGGT 479

|||||

Sbjct 434
TAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGT
AGGCGGGT 493

Query 480
CTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCTTTGATAC
TGAAGAT 539

|||||

Sbjct 494
CTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCTTTGATAC
TGAAGAT 553

Query 540
CTTGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAAGTGCAGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTA
GATATTCG 599

|||||

Sbjct 554
CTTGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAAGTGCAGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTA
GATATTCG 613

Query 600
CAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCCCGATACTGACGCTGAGGC
ACGAAAGC 659

|||||

Sbjct 614
CAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCCCGATACTGACGCTGAGGC
ACGAAAGC 673

Query 660
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
ATGCCAGC 719

|||||

Sbjct 674
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
ATGCCAGC 733

Query 720
CGTTAGTGGGTTTACTCACTAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATTCCGCCT
GGGGAGT 779

|||||

Sbjct 734
CGTTAGTGGGTTTACTCACTAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATTCCGCCT
GGGGAGT 793

Query 780
ACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGCATG 839

|||||

Sbjct 794
ACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGCATG 853

Query 840
TGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTC
GCGGGCC 899

|||||

Sbjct 854
TGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTC
GCGGGCC 913

Query 900
CCAGAGATGGGGTCCTTCAGTTCGGCTGGACCGGAGACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCA 959

|||||

Sbjct 914
CCAGAGATGGGGTCCTTCAGTTCGGCTGGACCGGAGACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCA 973

Query 960
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCCGTCC
TTAGTTG 1019

|||||

Sbjct 974
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCCGTCC
TTAGTTG 1033

Query 1020
CTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGA
AGGTGGGG 1079

|||||

Sbjct 1034
CTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGA
AGGTGGGG 1093

Query 1080
ATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGGTG 1139

|||||

Sbjct 1094
ATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGGTG 1153

Query 1140
ACAATGGGATGCTAAGGGGTGACCCTTCGCAAATCTCAAAAAGCCGTCTCAG
TTCGGATT 1199

|||||

Sbjct 1154
ACAATGGGATGCTAAGGGGTGACCCTTCGCAAATCTCAAAAAGCCGTCTCAG
TTCGGATT 1213

Query 1200
GGGCTCTGCAACTCGAGCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG
CACGCCA 1259

|||||

Sbjct 1214
GGGCTCTGCAACTCGAGCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG
CACGCCA 1273

Query 1260
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTT
GGTTTTA 1319

|||||

Sbjct 1274
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTT
GGTTTTA 1333

Query 1320
CCTGAAGACGGTGCGCTAACCGAAAGGGGGCAGCCGGCCACGGTAGGGTCAG
CGACTGGG 1379

|||||

Sbjct 1334
CCTGAAGACGGTGCGCTAACCGAAAGGGGGCAGCCGGCCACGGTAGGGTCAG
CGACTGGG 1393

Query 1380 G 1380

Sbjct 1394 G 1394

Sequences from 16S rRNA, *atpD*, *glnII* and *RecA* obtained from *Retama monosperma* nodules in FASTA format

16S rRNA

TGCAGTCGAGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCG
TGGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAACAACCCAGGGAAACTTGGGCTAATACCG
GATAAGCCCTTACGGGGAAAGATTATCGCCGAAAGATCGGCCCGCGTCTGAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTG
AGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCG
CGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAAT
GACGGTACCGCAAGATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA

TACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGG
CGGGTCTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCTGGAGCTCAATCCAGAACTGCCTTTG
ATACTGAAGATCTTGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAAGTGCAGGTGTAGAGG
TGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGC
CCGATACGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGCCGTTAGTGGGTTTACTCAC
TAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATTGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAT
TAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTGCGGGC
CCCAGAGATGGGGTCCTTCAGTTCGGCTGGACCGGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCCCGTCCTTAGTTGCTACATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTG
ATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGG
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGATGCAAGGGGTGAC
CCTTCGCAAATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGGGCTCTGCAACTCGA
GCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCACGCCACGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACC
TGAAGACGGTGCGCTAACCGAAAGGGGGCAGCCGGCCACGGTAGGGTCAGCG
ACTGGGG

atpD

TGCTGGGCCGCATCATGAACGTCATCGGCGAACCGATCGACGAAGCCGGTCC
AATCAAGTCCGAAGGCAAGCGCGCCATCCATCAGGAAGCGCCGACCTACT
GACCAATCCACTGAGGCCGAAATCTTGTGACCGGCATCAAGGTCGTCGACCTG
CTCGCTCCCTACGCCAAGGGCGGCAAGATCGGCCTGTTTCGGCGGGCGCCGGCGT
CGGCAAGACCGTGCTGATTCAGGAGCTGATCAACAACGTCGCCAGGCCACG
GCGGTTATTCGGTGTTTCGCCGGCGTCGGCGAGCGTACCCGCGAAGGCAACGA
CCTCTATCACGAGTTCATCGAGTCCAAGGTCAACGCCGATCCGCGCAATCCCG
ATCCGAGCGTGAAGCAAAATGCGCGCTGGTGTTCGGCCAGATGAACGAACCG
CCTGGCGCCCCGCGCCCGCGTCGGCCTCACAGGTCTGACGGTTGCTGAGCACTT
CCGCGACCAGGGCCAGGACGTGCTGTTCTTCGTGCAAACATCTTCCGCTTAC
GCAGGCCGGTTCTGAAGTGTCGGC

glnII

CTCGAGTACATTTGGCTCGACGGCTATACGCCGACGCCGAGTCTGCGCGGCAA
AACGCAGATCAAGGAATTCGACAAGTTCCCGACGCTCGAACAGCTTCCGCTGT
GGGGCTTCGACGGCTCGTCCACATGCAGGCCGAAGGCCACAGCTCCGATTGC
GTGCTGAAGCCGGTCGCCGTCTATCCGGATGCAGCGCGGGAAAACGGCGCGC
TGGTGATGTGCGAAGTCATGATGCCCGACGGCAAGACCCCGCACCCCTCGAAC
AAGCGCGCAACCATCCTCGACGATGAAGGCGCCTGGTTCGGCTTCGAGCAGG
AATATTTCTTCTACAAGGACGGCCGTCCGCTCGGCTTTCCTCGGACGGTTATC
CGGGTCCGCAGGGCCGTAACACCGGCGTTGGCTACAAGAACGTTGGCGAT
GTCGCCC GCAAGATCGTGGAAGAGCATCTCAACCTCTGCCTAGCCGCCGGCAT
CAACCACGAAGGCATCAACGCCGAAGTGGCGAAGGCCAGTGGGAATTCCAGA
TCTTCGGCAAGGGCTCCAAGACCGCTGCCGACCAGATGTGGATGGCTCGCTAC
CTGATGCTGCGCCTGACCGAGAGCTACGGCATCGACATCGAATTCCACTGCAA
GCCNTCGGCGATAACCGACTGGAACGGCTCCGGCATGCAA

recA

TTTCGGCAAGGGATCGGTGATGAAGCTGGGCAAGAACGACCGTTCGATGGAT
GTCGAGACGGTGTCTCGGGCTCGCTCGGGCTCGACATTGCGCTCGGTGTCCG
CGGGCTGCCGAAGGGGCGGGTGTGGAAATCTACGGGCCGGAATCGTCGGGCA
AGACCACGCTGGCGTTGCACACGGTGGCGGAAGGACAGAAGAAGGGCGGCA
TCTGCGCCTTCATCGA
CGCCGAACACGCGCTCGATCCGGTCTATGCGCGCAAGCTCGGCGTCAACATCG
ACGAGCTCCTGATCTCGCAACCCGACACCGGGCGAGCAGGCGCTGGAAATCTG
CGACACACTGGTGCCTCCGGCCGATCGACGTGCTGGTGGTTCGATTCGGTGGC
GGCTCTGGTGCCGAAGGCCGAACCTCGAGGGCGAGATGGGCGATGCGCTGCCG
GGGTTGCAGGCGCGGCTGATGAGCCAGGCGCTGCGCAAGCTCACGCCTCGAT
CAACAAGTCGAACACCATGGTGATCTTCATCAACCAGATCCGCATGAAGATC
GGCGTCATGT

