

Université SAAD DAHLAB DE BLIDA
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biotechnologie

THÈSE DE DOCTORAT

en sciences agronomiques

Spécialité : Amélioration des productions végétales

INTERACTION DES RHIZOBACTERIES
SYMBIOTIQUES ET NON SYMBIOTIQUES ET EFFETS
SUR LA PHYTOSTIMULATION ET LA NODULATION : CAS DES
***PSEUDOMONAS* SPP. FLUORESCENTS ET RHIZOBIUMS.**

Par

Samira OUSERIR

devant le jury composé de :

H. BELKAHLA	Professeur, USD. Blida-1	Présidente
Y. KACI	Professeur, U.S.T.H.B., Alger	Examineur
L. KHELIFI	Professeur, ENSA, El Harrach	Examineur
M. MEFTI	M.C.A, ENSA, El Harrach	Examineur
F. AMMAD	M.C.A, USD.Blida-1	Examinatrice
M. BENCHABANE	Professeur, USD. Blida-1	Directeur de thèse

Blida, octobre 2019

RÉSUMÉ

De nombreux travaux, en microbiologie du sol, ont mis en évidence des potentialités effectives chez des rhizobactéries, en phytostimulation de la croissance des plantes, l'induction systémique de leur résistance et le biocontrôle de leurs agents phytopathogènes. Les interactions phytobénéfiques sont, principalement, de deux types: symbiotiques et non symbiotiques. Notre étude s'intéresse à la présence simultanée des deux types (coinoculation) dans la rhizosphère de la fève, en conditions semi-contrôlées sous serre en verre et en conditions naturelles de plein champ. Le premier représenté par deux souches (R1 et R2) de *Rhizobium fabae*, alors que le second est représenté par trois souches (S20, CHAO et P64) de *Pseudomonas fluorescens*.

Pour tester la compétence rhizosphérique des souches de *Pseudomonas*, nous avons effectué des essais en microcosmes, avec trois espèces végétales : blé dur (*Triticum durum* var. waha), la tomate (*Lycopersicum esculentum* var. Heinz 1370) et la fève (*Vicia faba* L. var. Hista). La bactérisation des plantules dans les différents microcosmes, a montré que les souches de *Pseudomonas fluorescens* appliquées se caractérisent par des compétences rhizosphériques appréciables, avec des seuils de colonisation atteignant 10^{11} CFU / g de sol, montrant ainsi, le potentiel rhizosphérique des souches sélectionnées. En dépit de l'origine végétale initiale, nous avons constaté des seuils de colonisation élevés au niveau des rhizosphères des différentes plantes étudiées. La phytostimulation a été perceptible sur les plants de fève étudiés. Ceci dénote, globalement la non spécificité des effets bénéfiques par rapport aux origines des souches bactériennes, de leur origine végétale et aussi par rapport aux différents génotypes végétaux quant au niveau de perception des effets phytostimulateurs. Nous avons noté des gains dépassant parfois le taux de 90 % dans quelques interactions.

La bactérisation, inoculation simultanée, a induit une phytostimulation et l'amélioration de la nodulation sur les plants de fève. Selon les combinaisons des cinq souches appliquées, les meilleures performances ont été enregistrées avec les coinoculations (P64-R1 et P64-R2), où les effets bénéfiques sont plus perceptibles en plein champs par rapport à la serre, en induisant des gains plus élevés en nombre de nodules (plus de 128 %), en azote total (plus de 80 %), et en matières sèches et fraîches allant de 55,17 % à 92,29 %.

Les coinoculations *Rhizobium fabae* R1 et R2 avec *Pseudomonas fluorescens* P64 semblent les plus performantes en plein champ, ceci peut expliquer que ces souches ont eu un effet plus stimulant sur la croissance des plantes, notamment en conditions défavorables. La bactérisation combinée entre ces deux groupes de rhizobactéries, grâce à la diversité de leurs mécanismes d'action, peut induire des effets phytobénéfiques meilleurs par rapport à des actions séparées.

La phylogénie moléculaire (*in silico*) de souches de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* sur l'ADNr 16S et les gènes de ménages, a apporté un complément d'informations sur la taxonomie des souches étudiées. Les gènes *nifH* et *nodC* chez *Rhizobium* ont montré une forte homologie entre *R. fabae*, *R. leguminosarum* et *R. pisi*. La souche CHAO de *Pseudomonas protegens* présente beaucoup de similarité avec *Pseudomonas fluorescens* pour les séquences protéiques d'HCN et de TonB. Ces deux genres bactériens ont présenté des topologies différentes pour les séquences d'ARNr 16S. La compréhension d'une telle interaction (association, coopération, synergie...etc), ne peut être élucidée qu'avec l'investigation des aspects moléculaires, modulant les métabolismes bactériens en interaction avec la plante.

Mots-clés : *Pseudomonas fluorescens*; *Rhizobium fabae* ; coinoculation ; nodulation ; *Vicia fabae* ; phytostimulation; phylogénie.

ABSTRACT

Numerous soil microbiology studies have demonstrated effective rhizobacteria potentials in phytostimulation of plant growth, systemic induction of their resistance and biocontrol of their phytopathogenic agents. Phytobeneficial interactions are mainly of two types: symbiotic and non-symbiotic. Our study investigates the simultaneous presence of both types (coinoculation) in the rhizosphere of the bean, under semi-controlled conditions under glass greenhouse and in natural field conditions. The first represented by two strains (R1 and R2) of *Rhizobium fabae*, while the second is represented by three strains (S20, CHAO and P64) of *Pseudomonas fluorescens*.

To experiment the rhizosphere competence of *Pseudomonas* strains, we carried out microcosms trials with three plant species: durum wheat (*Triticum durum* var waha), tomato (*Lycopersicum esculentum* var Heinz 1370) and bean (*Vicia faba* L Hista). The bacterization of the seedlings in the different microcosms showed that the strains of *Pseudomonas fluorescens* applied are characterized by appreciable rhizospheric competency, with thresholds of colonization reaching 10^{11} UFC/g of soil, thus showing the rhizospheric potential of the selected strains. Despite the initial plant origin, we found high colonization thresholds in the rhizosphere of the various plants studied. Phytostimulation was noticeable on the studied bean plants. This denotes, globally, the non-specificity of the beneficial effects with respect to the origins of the bacterial strains, their plant origin and also with respect to the different plant genotypes as to the level of perception of the phytostimulatory effects. We have noted gains exceeding the 90 % rate in some interactions.

The bacterization, simultaneous inoculation, induced a phytostimulation and the improvement of the nodulation on the seedlings of bean. According to the combinations of the five strains applied, the best performances were recorded with the coinoculations (P64-R1 and P64-R2), where the beneficial effects are more perceptible in fields compared to the greenhouse, inducing higher gains in number of nodules (more than 128%), in total nitrogen (more than 80%), and in dry and fresh matter ranging from 55,17% to 92,29%).

Coinoculation *Rhizobium fabae* R1 and R2 with *Pseudomonas fluorescens* P64 seem to be the most efficient in the field, this may explain why these strains had a more stimulating effect on plant growth, especially under unfavourable conditions. The combined bacterization between these two groups of rhizobacteria, due to the diversity of their mechanisms of action, can induce better phytobeneficial effects compared to separate actions.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*; *Rhizobium fabae*; coinoculation; nodulation; *Vicia fabae*; phytostimulation; phylogeny.

ملخص

أظهرت دراسات عديدة في علم الأحياء المجهرية في التربة إمكانات فعالة لدي تفاعلات الريزوبكتيريا (*Rhizobium*)، في تنشيط النمو النباتي، وتحفيز النظام المقاومتي النباتي والسيطرة البيولوجية. التفاعلات هي أساسا من نوعين: غير التعايشية و التعايشية. تبحت دراستنا في التواجد المتزامن لكلا النوعين في منطقة الجذور، تحت ظروف شبه متحكم بها تحت بيت زراعي زجاجي وفي ظروف الحقل الطبيعي. الأول يمثل سلالتين (R1 و R2) من *Rhizobium fabae*، في حين يمثل الثاني بثلاث سلالات (S20، CHAO و P64) من *Pseudomonas fluorescens*.

لاختبار سلالات *Pseudomonas fluorescens*، أجرينا تجارب في نماذج تصميمية مصغرة مع ثلاثة أنواع من النبات: القمح الصلب، الطماطم والفاصوليا. وأظهرت كفاءة كبيرة في عتبات الاستيطان على الجذور تصل إلى 10^{11} خلية بكتيريا / غم تربة، مما يدل على إمكانية السلالات المختارة. على الرغم من أصل النبات الأولي، وجدنا عتبات استيطان عالية في منطقة الجذور من النباتات المختلفة التي تمت دراستها. وهذا يدل على الآثار المفيدة الشاملة غير المحددة فيما يتعلق بأصول السلالات البكتيرية، النباتية، وأيضا فيما يتعلق بالتراكيب الوراثية النباتية المختلفة لمستوى إدراك phytostimulateurs الآثار. لقد لاحظنا المكاسب التي تتجاوز في بعض الأحيان معدل 90 ٪ في بعض التفاعلات.

تسببت البكتيريا، مع التلقيح المتزامن للنوعين، في التحفيز النباتي وتحسن العقيدات. ووفقاً لتركيبات السلالات الخمس المطبقة، تم تسجيل أفضل النتائج مع (P64-R1 و P64-R2)، حيث تكون التأثيرات المفيدة أكثر وضوحاً في الحقول المفتوحة مقارنة بالبيوت المحمية، مما أدى إلى تحقيق مكاسب أعلى في عدد العقيدات (أكثر من 128 ٪)، في إجمالي النيتروجين (أكثر من 80 ٪)، وفي الأوزان الجافة والطازجة التي تتراوح من 17,55 ٪ إلى 29,92 ٪.

يبدو أن *Rhizobium fabae* R1 و R2 مع *Pseudomonas fluorescens* P64 هما الأكثر فعالية في هذا المجال، وهذا قد يفسر سبب تأثير هذه السلالات على نمو النباتات، خاصة في ظل الظروف غير المواتية. يمكن مقارنة البكتيريا المشتركة بين هاتين المجموعتين، وذلك بسبب تنوع آليات عملها، إلى إجراءات وميزات أخرى.

قدمت الدراسة الجزيئية (*in silico*) لسلالات *Rhizobium* و *Pseudomonas* على الـ S rDNA16 وجينات التدبير مزيداً من المعلومات حول تصنيف السلالات التي تمت دراستها. أظهرت جينات nodC و nifH في *Rhizobium* تماثل قوي بين *R. fabae* و *R. leguminosarum* و *R. pisi*. تظهر بروتينات من سلالة CHAO *Pseudomonas* تشابهاً كبيراً مع *Pseudomonas fluorescens* لتسلسل البروتين من HCN و TonB. قدم هذان النوعان البكتيريان طوبولوجيا مختلفة لتتابعات S rRNA16. لا يمكن توضيح فهم مثل هذا التفاعل (الارتباط، التعاون، التآزر ... إلخ)، إلا مع التحقيق في الجوانب الجزيئية، والتحويلات الأيضية البكتيرية في التفاعل مع النبات.

كلمات البحث: *Pseudomonas fluorescens*; *Rhizobium fabae*; coinoculation; nodulation; *Vicia fabae*, phytostimulation; phylogeny.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie ALLAH, le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté, la santé, et la patience nécessaire pour réaliser ce travail.

Les mots ne seront certainement pas assez forts pour exprimer ma plus profonde reconnaissance et mon entière gratitude envers mon directeur de thèse ; Monsieur le Professeur **BENCHABANE Messaoud**, sans vous monsieur, ce travail n'aurait jamais vu le jour. C'est pour moi un immense plaisir de vous avoir comme Directeur de thèse. Votre disponibilité et tout le temps que vous avez bien voulu m'accorder, m'ont été très précieux. Je vous remercie pour m'avoir fait profiter de vos connaissances et pour votre soutien précieux lors de la rédaction de ce travail, je vous remercie de m'avoir enseigné la pratique des sciences et la rigueur de la démarche expérimentale, de m'avoir transmise la capacité d'enthousiasme et de la force, je vous remercie de m'avoir offert cette grande liberté de travail et de m'avoir accordée votre confiance. Je suis très reconnaissante pour vos qualités rares tant au niveau humain que scientifique. J'ai énormément appris de vous Monsieur et je garderai longtemps le souvenir de votre enseignement et de votre humanité. J'espère sincèrement pouvoir rendre honneur à la qualité de votre formation et enseignement en transmettant une partie de votre passion et de votre savoir à mes futures étudiants.

Je voudrais remercier également les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à M^{me} le Professeur **BELKAHLA H** (Université de Blida-1), pour me faire l'honneur de bien vouloir assurer la présidence de ce jury de thèse, je vous remercie d'avoir toujours répondu positivement et pour votre disponibilité. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement M. le professeur **KHELIFI L** (ENSA d'EL Harrach), pour l'honneur qu'il m'a fait et qu'il me fait toujours, en acceptant d'examiner et de juger ce travail malgré ses occupations. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse également mes sincères remerciements à M. le Professeur **KACI. Y** (USTHB d'Alger), de m'avoir honoré par sa présence en acceptant d'examiner et de juger ce travail, profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également à M. le Docteur **MEFTI. M** (Maitre de conférences à l'ENSA d'EL Harrach), qui a bien voulu consacrer une partie de son temps précieux pour examiner ce travail, profonde reconnaissance.

Je voudrais également remercier M^{me} Docteur **AMMAD. F** (Maitre de conférences à l'université de Blida- 1), de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce

travail. Je la remercie pour son soutien en toute circonstance, pour ses encouragements, sa patience et ses aides sans limite.

J'adresse mes remerciements les plus profonds à M^{me} **BENCHABANE Dalila**, pour ses conseils et ses encouragements. Qu'elle trouve ici le témoignage de mon estime et l'expression de ma profonde gratitude.

Je souhaite remercier également, **Rafik, Delel, Djamila et Assia** pour leurs disponibilité et aides.

Mes plus sincères remerciements vont à **mes parents**, les deux personnes les plus chères dans ma vie, source inépuisable de tendresse, de patience, de sacrifice, d'inspiration, de force et de courage. Sans leur amour et leur soutien, je ne serais jamais arrivée là. Je leur dois beaucoup. Un grand merci à **mes frères et sœurs et à ma belle-famille** pour tout le soutien qu'ils m'ont accordé

Un merci tout spécial à mon mari, **Hamza**, qui m'a accompagné avec tant d'amour et de tendresse, pour son soutien quotidien, sa compréhension, sa patience, ses aides, et ses encouragements interminables qui m'ont apporté tout au long de ce travail.

Enfin, que toutes les personnes, qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude et de ma sympathie.

Je dédie ce travail à toute ma famille et à mes chandelles : **MOHAMED, AYA ET YASMINE**

***A la mémoire de mon frère
IBRAHIM***

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES.....	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	12
 1. SYNTHÈSES BIBLIOGRAPHIQUE.....	 16
1.1.Généralités sur les rhizobactéries bénéfiques.....	16
1.1.1. Définitions et diversité.....	16
1.1.2. Les PGPRs symbiotiques.....	17
1.1.3. Les PGPRs non symbiotiques.....	18
1.1.4. Mécanismes d'action des PGPRs.....	19
1.1.5. Facteurs influençant la diversité des PGPRs.....	20
1.2. Les rhizobia.....	22
1.2.1. Diversité taxonomique.....	22
1.3. La symbiose <i>Rhizobium</i> – légumineuse.....	24
1.3.1.Intérêt de la symbiose fixatrice d'azote.....	25
1.3.2. Diversité des légumineuses.....	26
1.3.3. Spécificité de la symbiose.....	27
1.3.4. Effets des facteurs biotiques et abiotiques sur la symbiose.....	31
1.4. Processus de nodulation.....	33
1.4.1. Bases biochimiques et moléculaires.....	33
1.4.2. Mécanismes de nodulation.....	38
1.4.3. Nitrogénase et gènes de fixation d'azote.....	43
1.5. Les <i>Pseudomonas</i> fluorescents phytobénéfiques.....	45
1.5.1. Mécanismes responsables des effets bénéfiques.....	45
1.5.2. Communication et interaction bactériennes.....	52
1.6 colonisation rhizosphérique.....	52
1.6.1.Etablissement de la colonisation rhizosphérique.....	53
1.6.2.Sites de colonisation rhizosphérique.....	54
1.6.3.Facteurs influençant la colonisation rhizosphérique.....	57
 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	 59

2.1. Le sol.....	59
2.2. Matériel biologique.....	59
2.2.1. Souches bactériennes.....	59
2.2.2. Matériel végétal.....	62
2.3. Compétence rhizosphérique.....	62
2.3.1. Inoculation des microcosmes.....	62
2.3.2. Dénombrement bactérien.....	63
2.4. Essais de nodulation et de phytostimulation.....	64
2.4.1. Expérimentation sous serre.....	64
2.4.2. Expérimentation en plein champ.....	68
2.4.3. Evaluation de la phytostimulation	70
2.4.4. Analyse statistique.....	71
2.5. Analyse <i>in silico</i>	71
2.5.1. Espèces de <i>Rhizobium</i> et de <i>Pseudomonas</i> et gènes concernés..	72
2.5.2. Alignement multiple (ClustalW).....	73
2.5.3. Construction des arbres phylogénétiques.....	73
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	74
3.1. Compétence rhizosphérique.....	74
3.1.1 Dénombrements bactériens.....	74
3.1.2 Discussion.....	76
3.2. Nodulation et phytostimulation.....	80
3.2.1. Essais sous serre.....	80
3.2.2. Essais en plein champs.....	89
3.2.3. Comparaison de la phytostimulation sous serre et en plein champ..	95
3.2.4 Discussion.....	102
3.3. Recherche <i>in silico</i>	109
3.3.1. Phylogénie des espèces de <i>Rhizobium</i>	109
3.3.2. Phylogénie des espèces de <i>Pseudomonas</i>	120
3.3.3. ARNr 16S des espèces de <i>Pseudomonas</i> et de <i>Rhizobium</i>	125
3.3.4. Discussion.....	127
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	133
CONCLUSION.....	137
APPENDICES.....	140
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	147

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1.1 :	Interaction bénéfique plante-rhizobactéries.....	17
Figure 1.2 :	Principales activités phytobénéfiques des PGPRs.....	19
Figure 1.3 :	Impact des PGPRs phytostimulatrices sur l'architecture de système racinaire, l'acquisition de nutriments et le fonctionnement des racines.....	21
Figure 1.4:	Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' α , β et γ -protéobactéries.....	24
Figure 1.5 :	Le dialogue moléculaire <i>Rhizobium</i> -Légumineuse.....	34
Figure 1.6 :	Structure des facteurs Nod.....	37
Figure 1.7 :	Etapes précoces du développement d'un nodule racinaire.....	39
Figure 1.8:	Déformation des poils absorbants.....	39
Figure 1.9:	formation de microcolonie.	39
Figure 1.10 :	La différenciation des bactéroïdes.	41
Figure 1.11 :	Stades du développement indéterminé et déterminé de nodules de légumineuse.....	42
Figure 1.12 :	Schémas de régulation des gènes <i>fix</i> et <i>nif</i>	44
Figure 1.13 :	Arbre phylogénétique des bactéries du genre <i>Pseudomonas</i>	46
Figure 1.14 :	A : Micrographie électronique à balayage d'une microcolonie de <i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS365 sur la racine de la tomate (Chin-A-Woeng et al., 1997 ; 2000). B : Analyse microscopie confocale à balayage de la colonisation des racines de tomate par <i>P. fluorescens</i> WCS365.....	46
Figure 1.15 :	Images MEB de racines fraîches obtenues à partir de plants de chanvre inoculés avec un consortium de PGPR.....	55
Figure 1.16 :	Sites de colonisation de plantes par des bactéries endophytes.....	56
Figure 1.17 :	Colonisation endophyte d'une bactérie favorisant la croissance des plantes (<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN).....	57
Figure 2.1 :	les différents constituants du microcosme.....	63
Figure 2.2 :	Semences de fève enrobées avec la pâte de tourbe.....	65
Figure 2.3 :	Dispositif expérimental de l'essai sous serre.....	66
Figure 2.4 :	Dispositif expérimental de l'essai en plein champs.....	69
Figure 3.1 :	Evolution des populations bactériennes (P64 CHAO S20) en fonction du temps dans les microcosmes des trois plantes.....	74
Figure 3.2 :	Evolution des populations bactériennes de <i>P. fluorescens</i> P64.....	75

Figure 3.3:	Evolution des populations bactériennes de <i>P. fluorescens</i> CHAO.....	76
Figure 3.4 :	Evolution des populations bactériennes de <i>P. fluorescens</i> S20.....	76
Figure 3.5:	Nodules racinaires de plants de fève cultivés sous serre bactérisés par la combinaison P64-R2.....	81
Figure 3.6 :	Développement racinaire des plants de fève bactérisés par la combinaison P64-R1.....	82
Figure 3.7:	Gains obtenus en nombre de nodules (A) et en matière azotée totale (B) des interactions entre les souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (S20 CHAO et P64) et les souches de <i>Rhizobium fabea</i> (R1 et R2).....	85
Figure 3.8:	Gains en hauteur des tiges (HT) et en longueur racinaire (LR) des plants de fève inoculés avec <i>Rhizobium fabea</i> (R1 ou R2), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (S20 CHAO ou P64), ou avec leur combinaison.....	86
Figure 3.9:	Gains obtenus en poids frais des pousses (PFP), en poids frais des racines (PFR), en poids sec des pousses (PSP), et en poids sec des racines (PSPR) des plants de fève inoculés avec <i>Rhizobium fabea</i> (R1 ou R2), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (S20 CHAO ou P64), ou avec leur combinaison....	87
Figure 3.10 :	Fragments des racines de fève bactérisés par <i>Pseudomonas fluorescens</i> après 72 heures d'incubation.....	88
Figure 3.11:	Evolution des populations bactériennes dans la rhizosphère de la fève.....	89
Figure 3.12 :	Nodules racinaires des plants de fève cultivés en plein champ bactérisés par la combinaison P64-R1.....	90
Figure 3.13:	Gains obtenus en nombre de nodules (A) et en matière azotée totale (B) des interactions entre les souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (S20 CHAO et P64) et les souches de <i>Rhizobium fabea</i> (R1 et R2).....	95
Figure 3.14:	Gains obtenus en longueur racinaire (LR), en poids frais des pousses (PFP), en poids frais des racines (PFR), en poids sec des pousses (PSP) et en poids sec des racines (PSPR) des plants de fève inoculés avec <i>Rhizobium fabea</i> (R1 ou R2), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (S20 CHAO ou P64), ou avec leur combinaison.....	96
Figure 3.15 :	Nodules racinaires des plants de fève bactérisés par la combinaison P64-R1.	97
Figure 3.16 :	Gains obtenus en matière azotée des interactions entre <i>Pseudomonas fluorescens</i> (S20, CHAO ou P64) et <i>Rhizobium fabea</i> (R1 ou R2).....	99
Figure 3.17 :	Développement racinaire des plants de fève bactérisés par la combinaison P64-R2.....	100
Figure 3.18 :	Modèle du processus d'autorégulation (AON).....	107

Figure 3.19 :	Phylogramme construit par la méthode NJ, du gène ADNr 16S de différentes espèces du genre <i>Rhizobium</i>	110
Figure 3.20 :	Phylogramme construit par la méthode NJ, du gène <i>rpoB</i> chez différentes espèces de <i>Rhizobium</i>	112
Figure 3.21 :	Phylogramme du gène <i>gyrB</i> , construit par la méthode NJ chez différentes espèces de <i>Rhizobium</i>	113
Figure 3.22 :	Phylogramme du gène <i>nodC</i> , construit par la méthode NJ chez différentes espèces de <i>Rhizobium</i>	114
Figure 3.23 :	Phylogramme du gène <i>nifH</i> , construit par la méthode NJ chez différentes espèces de <i>Rhizobium</i>	115
Figure 3.24 :	Carte structurale des régions symbiotiques de Rhizobias.....	117
Figure 3.25 :	Structure de la nitrogénase.....	118
Figure 3.26 :	Phylogramme de la nitrogénase, construit par la méthode NJ chez différentes espèces de <i>Rhizobium</i>	119
Figure 3.27 :	Phylogramme construit par la méthode NJ, de gène ARNr 16S chez <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. putida</i> et <i>P. protegens</i>	120
Figure 3.28 :	Phylogramme de gène <i>rpoD</i> , construit par la méthode NJ chez <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. putida</i> et <i>P. protegens</i>	121
Figure 3.29 :	(1) : La protéine ANR (Anaerobic regulatory protein) est représentée sous forme de bandes (A) . Le ligand Fe ₄ S ₄ est montré sous forme de bâton (B) . Il est démontré que le ligand était attaché au dimère ANR (A) . (2) : les interactions ADN Promoteur-ANR dimère (A) les résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison à ADN (B)	122
Figure 3.30 :	Phylogramme de la protéine HCN, construit par la méthode NJ chez des espèces du groupe <i>Pseudomonas fluorescents</i>	123
Figure 3.31 :	Structures RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) de TonB-96 (96 résidus C-terminaux de TonB).....	124
Figure 3.32 :	Phylogramme de la protéine TonB, construit par la méthode NJ chez les principales espèces du groupe <i>Pseudomonas fluorescents</i> : <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> et <i>P. protegens</i>	125
Figure 3.33 :	Phylogramme, construit par la méthode NJ, du gène ADNr 16S des souches de <i>Rhizobium</i> et de <i>Pseudomonas</i>	126

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 :	Souches rhizobactériennes.....	61
Tableau 3.1 :	Nombre de nodules	80
Tableau 3.2 :	Teneur en matière azotée totale (MAT %).	80
Tableau 3.3 :	Hauteur des tiges (cm), poids frais et poids sec (g) des pousses.....	83
Tableau 3.4 :	Longueur des racines (cm), poids frais et poids sec (g) de la partie racinaire.....	84
Tableau 3.5 :	Nombre de nodules.....	90
Tableau 3.6 :	Teneur en matière azotée totale (MAT %).	91
Tableau 3.7 :	Poids frais et poids sec (g) des pousses.....	93
Tableau 3.8 :	Longueur des racines (cm), poids frais et poids sec (g) de la partie racinaire.....	94
Tableau 3.9 :	Gains (%) en nodulation des plants sous serre et en plein champ.....	98
Tableau 3.10 :	Gains (%) en croissance des plants sous serre et en plein champ.....	101

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Pour satisfaire les besoins d'une population mondiale en croissance continue, l'objectif principal de l'agriculture, durant les décennies qui ont suivi la seconde guerre mondiale, était d'augmenter les rendements en produits agricoles, en adoptant des pratiques orientées vers la mécanisation et l'usage des intrants chimiques «agriculture intensive». Ces pratiques ont engendré, en l'espace de quelques décennies, des dommages parfois irréversibles persistants et difficiles à surmonter ou corriger; nous citons particulièrement les pollutions chimiques (sol, eau) [1, 2], la dégradation de la fertilité des terres suite aux déséquilibres des flores microbiennes, en plus de l'accumulation des résidus chimiques dans les produits agricoles. A ces défaillances s'ajoutent maintenant les changements climatiques en cours, qui constituent un nouveau défi pour l'agriculture, car il faudra conserver des rendements élevés dans des conditions environnementales où les cultures seront plus exposées aux stress abiotiques et biotiques [3]. Dans ce contexte, de nouvelles pratiques agricoles et de nouvelles écotechnologies sont nécessaires pour permettre une nouvelle révolution, cette fois-ci reposant sur des stratégies durables avec une gestion plus responsable des ressources agricoles et fossiles [4]. Les communautés microbiennes associées aux plantes, telles que les bactéries phytobénéfiques et les champignons mycorhiziens, constituent une alternative fortement proposée et souhaitable pour améliorer la durabilité et la stabilité de l'environnement agricole, tout en limitant l'utilisation d'intrants chimiques [5, 6].

De multiples interactions biologiques sont échangées par la plante avec les microorganismes dans la rhizosphère; qui peuvent lui être néfastes lorsqu'elles concernent des microorganismes phytopathogènes. D'autres en revanche peuvent favoriser la croissance et le développement du végétal, sous différents types de stress biotiques et abiotiques. Ces interactions bénéfiques font intervenir un vaste groupe de microorganismes comprenant des bactéries, généralement appelée PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) [7, 8], des champignons, désignées par PGPF (Plant Growth-Promoting Fungi) [9], ainsi que divers actinomycètes, protozoaires et algues.

Au niveau du microbiote rhizosphérique, les interactions plantes-bactéries présentent un intérêt plus que particulier, de par la diversité des partenaires microbiens présents et leurs impacts directs sur la santé et le développement du végétal. Cette interaction à bénéfices réciproques, fait intervenir notamment des bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes, appelées aussi *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR) [10]. Les PGPR possèdent des fonctions phytostimulatrices, qui améliorent la croissance et la nutrition des plantes par des mécanismes hormonaux ou en augmentant la disponibilité des éléments nutritifs minéraux. De plus, ces rhizobactéries se caractérisent par des fonctions phytoprotectrices grâce à des mécanismes d'antagonisme, de compétition ou d'induction de résistance chez les plantes [11].

Il est reconnu que ces rhizobactéries sont de deux types : Les PGPRs symbiotiques, englobant les rhizobiums, responsables de la fixation de l'azote atmosphérique au profit des plantes « légumineuses » grâce à la formation de nodosités [12, 13]. Cette fixation biologique présente un grand intérêt agronomique et environnemental, on estime que la moitié de la fixation d'azote se réalise par cette symbiose (10 à 300 kg d'azote fixé/hectare/an) [14]. En moyenne, selon les espèces végétales cultivées, les apports en engrais azotés dépassent 85 millions de tonnes [15], dont seulement 30 à 50 % au profit des plantes, alors que le reste se perd par lessivage en polluant d'autres compartiments écosystémiques [16], ou en déséquilibrant et dégradant la flore microbienne [17].

Les PGPR non symbiotiques (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*...etc.) qui sont capables d'établir avec leurs plantes hôtes une interaction facultative à bénéfices réciproques, ne conduisant pas à la formation de structure particulière. Parmi ces rhizobactéries, les *Pseudomonas* spp. fluorescents, largement étudiées et expérimentées surtout par rapport à leurs performances dans la phytostimulation de diverses plantes [10, 18, 19, 20], engendrant l'amélioration de leur nutrition [5, 21, 22], en modifiant l'architecture racinaire [11]; en favorisant la biodisponibilité de nutriments essentiels à la plante, particulièrement le fer, le phosphore, l'azote et autres carbohydrates [23].

Plusieurs études ont rapporté que l'utilisation simultanée de ces deux types de PGPRs (symbiotiques et non symbiotiques) procure des effets plus stimulants

de la croissance des plantes, de la nodulation, de la fixation d'azote, de l'activité nitrogénase et de l'assimilation de l'azote et du phosphore [5, 24]. Les effets phytobénéfiques recherchés affectent certaines fonctions physiologiques, telles que la réduction du taux d'éthylène [25], la survie des bactéries rhizobiennes dans le sol, l'élargissement du système racinaire suite à la production d'hormones de croissance et donc l'augmentation de sites potentiels à la nodulation [26].

La sélection de PGPRs performantes ne doit pas se limiter à leurs activités spécifiques responsables des effets bénéfiques, en fait l'efficacité de la bactérisation est fortement associée à la bonne colonisation rhizosphérique, à la compétition et à la survie des bactéries même en présence de la microflore indigène [27]. Une colonisation avec des effectifs suffisamment élevés est un prérequis pour l'expression des effets phytobénéfiques [28]. En effet, l'utilisation de souches de *Pseudomonas* spp fluorescents aptes à se maintenir et à se développer sur le système racinaire, s'accompagne d'effets bénéfiques significatifs chez les plantes inoculées [29], notamment, en association avec des rhizobias qui se sont révélés être des bactéries rhizosphériques compétentes, pouvant survivre longtemps dans le sol même en l'absence de légumineuses hôtes [30].

De nombreux travaux ont mis en évidence le potentiel phytostimulateur de plusieurs souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans des conditions expérimentales contrôlées [10, 31, 32, 20, 33, 34, 35, 36]. Malgré l'abondance des résultats expérimentaux, les exemples d'application pratique à grande échelle de ces rhizobactéries utiles restent limités. En effet, la mise en œuvre de ces microorganismes nécessite des études finalisées dans des conditions naturelles de plein champ. L'objectif de notre travail est d'étudier le potentiel de phytostimulation et de nodulation chez la fève (*Vicia faba* L. var. Hista), en appliquant des bactérisation avec les deux types de PGPRs (*Pseudomonas fluorescens* et *Rhizobium fabae*).

En premier lieu, notre étude s'intéressera à examiner la compétence rhizosphérique des rhizobactéries testées en interaction avec trois espèces végétales : le blé dur (*Triticum durum* var. waha), la tomate (*Lycopersicum esculentum* var. Heinz 1370) et la fève (*Vicia faba* L. var. Hista). L'objectif étant

d'évaluer les aptitudes d'adaptation et de colonisation rhizosphérique de trois souches de *Pseudomonas fluorescens* (S20, CHAO et P64).

Dans le but de montrer les effets stimulateurs de ces PGPRs sur la croissance et la nodulation de la fève, des essais ont été réalisés en coinoculation de ces rhizobactéries avec *Rhizobium fabae*. Considérant que les conditions de champs sont moins contrôlées, plus stressantes et défavorables, une étude comparative a été expérimentée en plein champ par rapport aux conditions contrôlées sous serre.

En raison de la complexité et de la diversité des mécanismes d'action des PGPRs symbiotiques (*Rhizobium*) et non symbiotiques (*Pseudomonas*) dans la rhizosphère et sur la phytostimulation de la plante hôte, nous nous sommes intéressés également à une recherche bioinformatique, particulièrement à une phylogénie moléculaire, afin de visualiser, éventuellement, des similarités (homologies) ou des hétérogénéités entre les deux espèces, en se basant sur l'ADNr 16S, des gènes de ménage, des gènes de nodulation (*nodC*) et de fixation d'azote (*nifH*), en plus d'autres gènes fonctionnels, en se référant aux données de la banque nucléaire *GenBank* - NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

CHAPITRE 1

SYNTHÈSES BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Généralités sur les rhizobactéries phyto-bénéfiques

Les interactions entre les plantes et les communautés microbiennes telluriques dépendent des relations trophiques, soumises à des compromis entre les coûts métaboliques fournis par la plante (composés carbonés permettant la croissance microbienne), et les services rendus par les microorganismes (métabolites microbiens contribuant à la croissance et la santé des plantes) [37] (Figure 1.1). La niche rhizosphérique représente un foyer propice à la colonisation microbienne, où de multiples interactions se produisent entre les microorganismes et la plante. C'est la résultante de l'interaction entre ces deux compartiments qui est à l'origine des services agroécosystémiques [38, 39]. Ces interactions, en fonction de leurs conséquences, peuvent être bénéfiques, nuisibles, ou neutres pour la plante [40]. Certains microorganismes, naturellement présents dans la rhizosphère, sont nécessaires à la nutrition et la santé de nombreuses espèces végétales [41].

Les associations bénéfiques avec la plante comprennent plusieurs communautés microbiennes rhizosphériques, dont lesquelles les bactéries sont les plus abondants. Parmi ces rhizobactéries, 2 à 5% ont la capacité de stimuler la croissance des plantes [42]. Ces interactions avec les plantes sont impliquées dans l'amélioration des processus physiologiques des plantes et leur résistance pour améliorer la physiologie et la résistance à divers agents phytopathogènes [43], par le biais de divers mécanismes encore non connus [11]. En raison de leur capacité à favoriser la croissance des plantes, ces rhizobactéries, ont été ainsi nommées Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

1.1.1. Définitions et diversité

Les PGPRs (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – bactéries stimulatrices de la croissance des plantes ou phytostimulatrices) sont des bactéries qui interagissent avec les plantes grâce à une étroite collaboration [44,

26, 45, 46]. Les associations plantes/rhizobactéries ont été observées dès 1904 par Lorenz Hiltner [47], et qui sont mutuellement bénéfiques.

Les PGPRs sont ainsi divisés en deux groupes caractérisés par le degré d'interdépendance avec la plante: (i) les PGPRs symbiotiques situés à l'intérieur ou à la surface des racines, qui dépendent entièrement de la plante pour leur survie [48] ; (ii) les PGPRs libres ou non symbiotiques qui sont présents au niveau du sol rhizosphérique, dont leur association structurelle avec la plante n'est pas nécessaire.

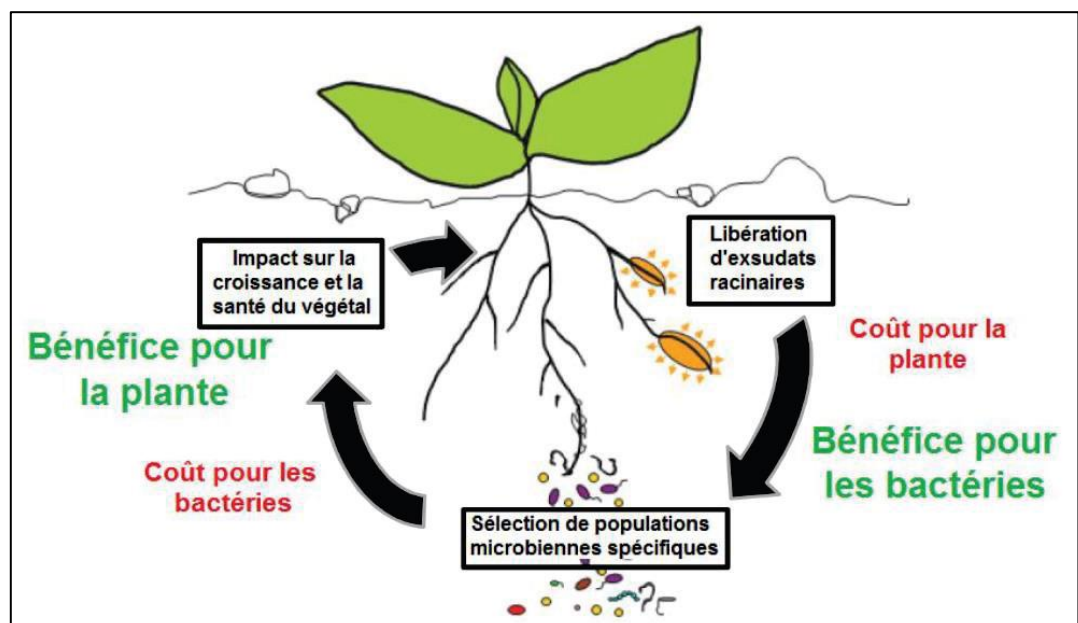


Figure 1.1 : Interaction bénéfique plante-rhizobactéries. La libération des exsudats représente un coût métabolique pour la plante qui va être investi dans la sélection de populations microbiennes particulières. En retour, certaines populations sélectionnées ont un impact positif sur la croissance et la santé de la plante en exprimant des fonctions bénéfiques [49].

1.1.2. Les PGPRs symbiotiques

L'interaction de la plante avec ces PGPRs implique la mise en place de systèmes d'identification, entre les deux partenaires, qui doit être régulée pour le succès de l'association; conduisant à une spécificité associative. Les symbiotes ont mis en place des mécanismes de reconnaissance pour identifier la plante hôte appropriée, ce qui leur fournira en réciprocité les nutriments nécessaires à leur croissance. Ainsi, il y aura des changements physiologiques chez la plante hôte, à travers leur activité spécifique avec cette plante, puis leur propre physiologie sera ajustée pour assurer leur métabolisme. Par conséquent, l'interaction dépendra

d'un échange de signaux hautement coordonné entre la plante et les bactéries, conduisant à des ajustements physiologiques graduels permettant l'établissement de la symbiose [50].

Les PGPRs symbiotiques sont dits mutualistes lorsqu'ils ont un effet bénéfique sur la nutrition et/ou la santé des plantes avec lesquelles ils interagissent. Ces PGPRs fournissent à la plante des éléments limitant pour sa croissance et qu'elle en absorbe en quantité insuffisante par rapport à ses besoins, ou qu'elle n'aurait pas pu acquérir seule. C'est le cas, par exemple, de la symbiose légumineuse-*Rhizobium* conduisant à la formation de nodules racinaires dans lesquels s'établissent les rhizobia afin de fixer l'azote atmosphérique [51]. Bien que la fixation de l'azote soit plus efficace, la formation de nodules n'est possible que pour quelques familles de plantes (Fabaceae, Casuarinaceae et Betulaceae) et ne concerne que très peu de genres bactériens (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* et *Frankia*) [12].

1.1.3. Les PGPRs non symbiotiques

Les PGPRs non symbiotiques établissent des interactions non obligatoires qui apparaissent inutiles [52]. La plupart des espèces végétales sont impliquées et les genres bactériens concernés appartiennent principalement aux Firmicutes et Proteobactéries (*Agrobacterium*, *Athrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Serratia*) [53]. Dans cette relation, les PGPRs bénéficient des photosynthétats libérés par les racines pour leur croissance, assurant ainsi la disponibilité et la répartition des nutriments pour la plante [37]. Les PGPRs non symbiotiques ont une spécificité d'être présentes à la fois à l'intérieur des tissus racinaires pour se développer dans le cortex en tant qu'endophytes, mais peuvent également se limiter à la colonisation de la surface racinaire (rhizoplan) où la compétition est importante avec d'autres microorganismes rhizosphériques pour des exsudats riches en énergie [52].

Considérés comme PGPRs non symbiotiques, les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant la rhizosphère ; ces rhizobactéries possèdent de nombreuses propriétés intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes comme biofertilisants et des agents de lutte biologique [53].

1.1.4. Mécanismes d'action des PGPRs

Les bactéries PGPR peuvent avoir un effet positif sur les plantes de manière directe et/ou indirecte (Figure 1.2). Les PGPRs peuvent améliorer la nutrition des plantes par la fixation biologique de l'azote grâce à des interactions symbiotiques ou non symbiotiques, ainsi que par sa transformation en ammonium soluble dans l'eau et absorbable par les plantes [54], par la solubilisation du phosphate inorganique [55] ou par la production de sidérophores [56], qui avec leur affinité avec les ions Fe^{3+} , vont donc permettre de les solubiliser. Ce mécanisme augmente la capacité de la plante à absorber le fer nécessaire à sa croissance [57]. Certaines souches renforcent la nodulation des légumineuses et la fixation d'azote et/ou influencent positivement la symbiose mycorhizienne, en augmentant de ce fait la solubilisation et la minéralisation du phosphore du sol.

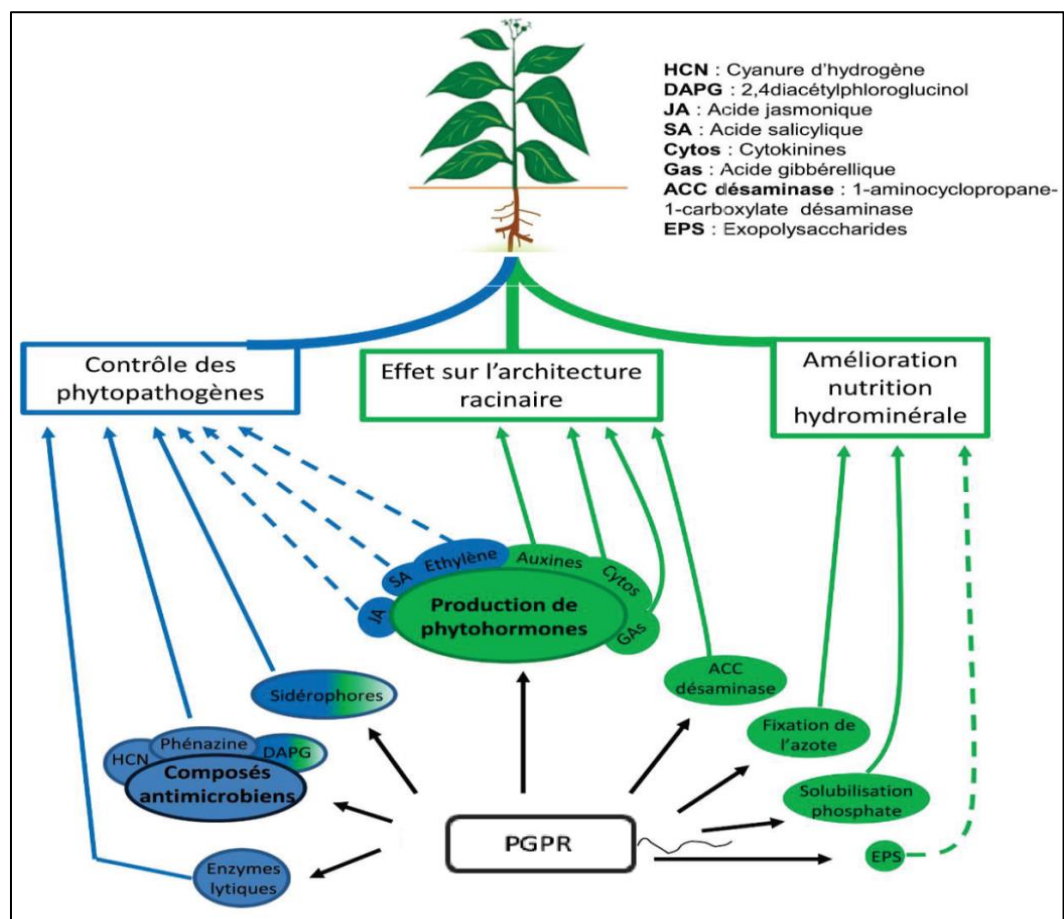


Figure 1.2 : Principales activités phytobénéfiques des PGPRs. La couleur bleue correspond aux activités phytoprotectrices et la couleur verte aux activités phytostimulatrices. Les traits pleins indiquent un effet direct et les traits en pointillés caractérisent un effet indirect [58].

Parmi toutes les caractéristiques phytobénéfiques des PGPRs, la modification de l'équilibre hormonale des plantes a les effets les plus apparentes sur la croissance et la nutrition de ces dernières [59]. Les PGPRs ont la capacité de synthétiser et de sécréter de nombreuses molécules, similaires aux hormones végétales, impliquées dans la structuration du système racinaire : auxines, cytokinines, gibbérellines et acide abscissique (ABA), elles sont également capables de détruire le précurseur biosynthétique de l'éthylène, l'acide 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique (ACC) [60].

Ainsi, un plus grand nombre de racines latérales permettra à la plante d'explorer un volume de sol plus large. Ceci est directement lié à la nutrition minérale de la plante et donc à sa croissance. Le système racinaire peut changer rapidement d'architecture pour s'adapter aux différences locales ou temporelles des statuts hydrique, nutritif ou structurel du sol qui l'entoure [61]. La grande adaptabilité des PGPRs permet ainsi aux plantes de mieux s'adapter et de surmonter le grand nombre de stress rencontrés au cours de leur vie [62]. Dans ce sens, la capacité des PGPRs à influencer l'architecture du système racinaire modifiera leur capacité à s'adapter à leur environnement, à en tirer le meilleur parti (Figure 1.3).

D'autres PGPRs peuvent protéger la plante en inhibant les phytoparasites, en se basant sur des mécanismes d'antagonisme ou de compétition, et/ou en induisant des défenses de la plante, telles que la résistance systémique induite (ISR) [9]. Certains PGPRs peuvent également aider les plantes à résister aux stress abiotiques, notamment à la contamination par des métaux lourds ou d'autres polluants [63]; certains augmentent même la capacité des plantes à séquestrer certains métaux lourds [64].

1.1.5. Facteurs influençant la diversité des PGPRs

Les PGPRs sont soumis à plusieurs facteurs biotiques et abiotiques qui affectent la diversité, l'abondance et l'activité des espèces qui les composent [65]. Ainsi, la structure des rhizobactéries dépend de (1) l'interaction entre la plante et la bactérie; (2) l'effet du génotype végétal sur la sélection taxonomique des PGPRs [66]; (3) des composés exsudés (rhizodéposition) [67], tels que les acides organiques émis par les racines. Ces composés proviennent de métabolites excrétés par la plante et de résidus végétaux ou mucilage

correspondant à des cellules émises, lors du développement racinaire dans le sol [68], des flavonoïdes et des isoflavonoïdes [69] ; (4) de la composition physique et chimique du sol et des communautés fonctionnelles de la rhizosphère [70] ; (5) et de la diversité et du fonctionnement des rhizobactéries [68]. De même, la structure génétique des bactéries au niveau de la rhizosphère dépend du stade de la croissance de la plante et les conditions environnementales auxquelles elles sont exposées [71].

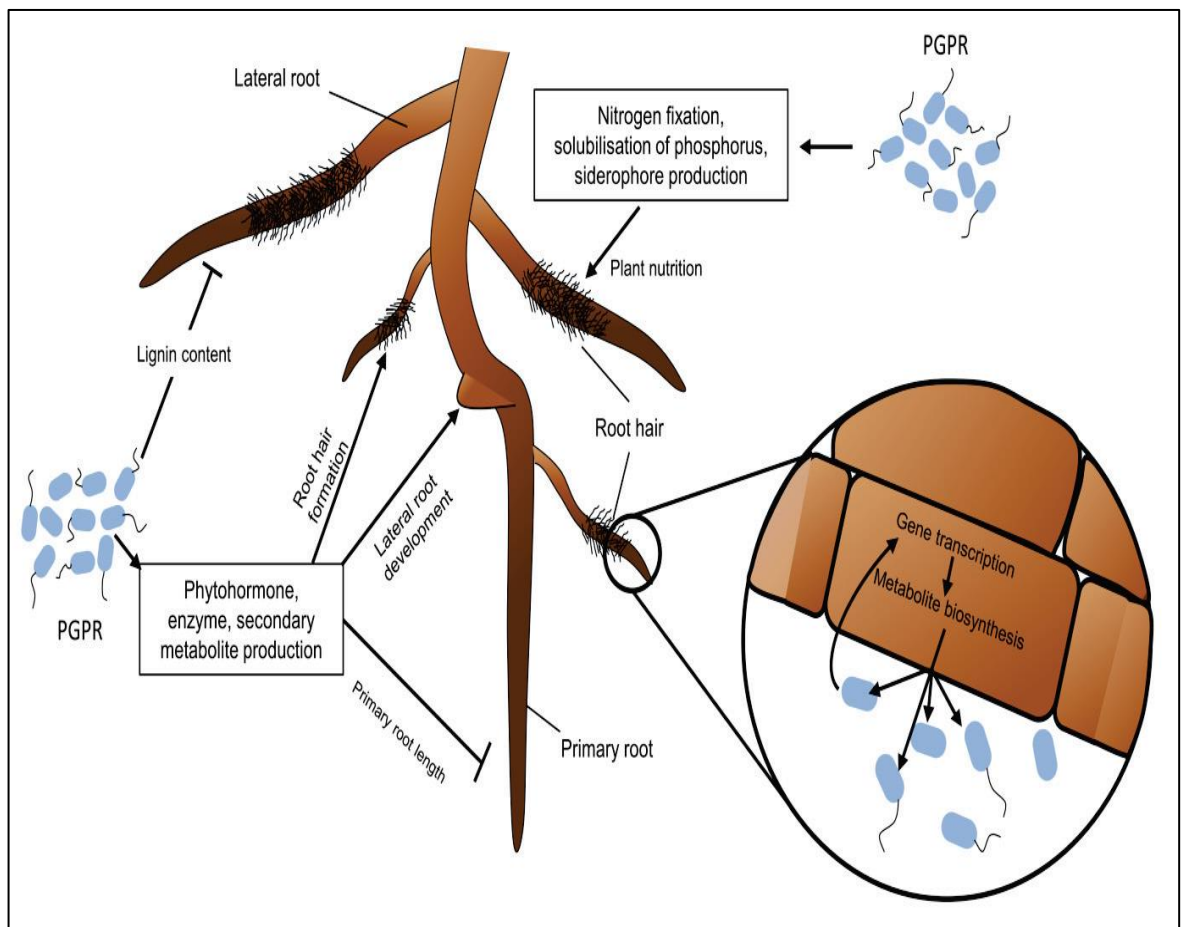


Figure 1.3 : Impact des PGPRs phytostimulatrices sur l'architecture de système racinaire, l'acquisition de nutriments et le fonctionnement des racines. La PGPR peut moduler le développement et la croissance des racines par la production de phytohormones, de métabolites secondaires et d'enzymes. Les effets les plus fréquemment observés sont une réduction du taux de croissance de la racine primaire et une augmentation du nombre et de la longueur des racines latérales et des poils racinaires. Les PGPR influencent également la nutrition des plantes via la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphore ou la production de sidérophores, et modifient la physiologie des racines en modifiant la transcription des gènes et la biosynthèse des métabolites dans les cellules végétales [72].

1.2. Les rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries du sol et de la rhizosphère capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec des légumineuses, ce qui favorise leur croissance dans des sols pauvres en azote [73]. Ces rhizobactéries sont capables de former des nodules sur les racines, où l'azote atmosphérique est fixé ou réduit en ammoniacque afin d'être assimilé par les plantes [74]. Ainsi, les rhizobia sont utilisés comme engrais biologiques et en tant qu'inoculats en agriculture depuis plus d'un siècle [75].

Les rhizobia sont des bactéries aérobies non sporulantes, Gram négatif, de 1,2 à 3µm de longueur et de 0,5 à 0,9 de largeur, chimio-organotrophes, neutrophiles (pH entre 6 et 7) et mésophiles (température optimale de croissance est comprise entre 25 et 30°C), mobiles par un flagelle polaire ou subpolaire ou par deux à six flagelles péritriches [76].

En fonction du temps de génération, les rhizobia sont classées en deux principaux groupes :

- **Les rhizobia à croissance rapide;** qui infectent généralement les légumineuses des zones tempérées et chaudes. Elles sont capables d'utiliser une large gamme d'hydrates de carbone, conduisant souvent à une production d'acides. Les rhizobia de ce groupe présentent un temps de génération de 2 à 4 heures, elles développent une turbidité remarquable dans un milieu de culture liquide après 2 à 3 jours [77].
- **Les rhizobia à croissance lente;** avec un temps de génération de 6 à 7 heures, elles exigent 3 à 5 jours pour produire une turbidité modérée dans un milieu liquide. Ce groupe se développe sur une gamme moins large de sources de carbones et entraîne une production d'alcalis [77].

1.2.1. Diversité taxonomique

Rhizobium se réfère généralement à des bactéries fixatrices d'azote, symbiotes des légumineuses, alors que “ *Rhizobium* ” est un genre bactérien. La première bactérie nodulante une légumineuse a été isolée en 1888 par Beijerinck, qui l'appelait initialement *Bacillus radicicola*, puis renommée *Rhizobium leguminosarum* [78]. Plus tard, la classification des rhizobiums a été fortement influencée par la plante hôte nodulée [79]. La taxonomie initiale des bactéries

[80] a été basée sur les tests de l'inoculation croisée entre les rhizobia et leurs plantes hôte ainsi que sur d'autres critères morphologiques et culturales [81]. Par la suite, deux groupes de rhizobiums ont été distingués, selon le critère de leur taux de croissance [82] : le genre *Rhizobium* à croissance rapide, et le genre *Bradyrhizobium* à croissance lente.

L'isolement des rhizobia associés à des légumineuses, non étudiées auparavant, a souvent bouleversé de leur taxonomie. Ces modifications persistantes dans la taxonomie ont conduit à la recherche de critères déterminatifs dans la description de nouvelles espèces [81]. Ainsi, les bactériologistes ont proposé l'utilisation de la taxonomie polyphasique prenant en compte une large gamme d'informations phénotypiques (Caractères morphologiques, physiologiques) et génotypique (analyse des plasmides, hybridation ADN/ADN, analyse du taux GC) [83].

L'introduction de la taxonomie numérique et l'analyse moléculaire de séquences multiloci (MLSA) de gènes, tels que : ADNr 16S, *atpD* (ATP synthase F1, sous-unité β), *recA* (recombinase A), *rpoB* (RNAPolymerase, sous-unité β), *glnI/glnA* (glutamine synthetase I), *glnII* (glutamine synthetase II), *thrC* (threonine synthase) ont permis de distinguer de nouveaux genres et de décrire de nouvelles espèces rhizobiennes, et de réviser la phylogénie des *Rhizobiaceae* [84]. Plus de 20 genres et 200 espèces sont déterminés, sur la base de séquençage de l'ADNr 16S, répartis dans les classes α , β et γ -*Proteobacteria* (Figure 1.4) [81, 83].

Il convient de noter qu'un même genre, ou même espèce, peuvent grouper des souches rhizobiennes et non-rhizobiennes, comme avec le genre *Methylobacterium* qui contient une espèce de rhizobia, *M. nodulans*, en plus des bactéries saprophytes. Ainsi, la taxonomie basée sur l'ADNr 16S ne reflète pas les propriétés symbiotiques, dans leur diversité, chez des rhizobia appartenant à la même espèce, notamment en ce qui concerne leur gamme de plantes hôtes. En conséquence, les études de taxonomie ont progressivement pris en compte la diversité des gènes nécessaires à la nodulation et à la fixation de l'azote (*nod* et *nif*) [85, 83].

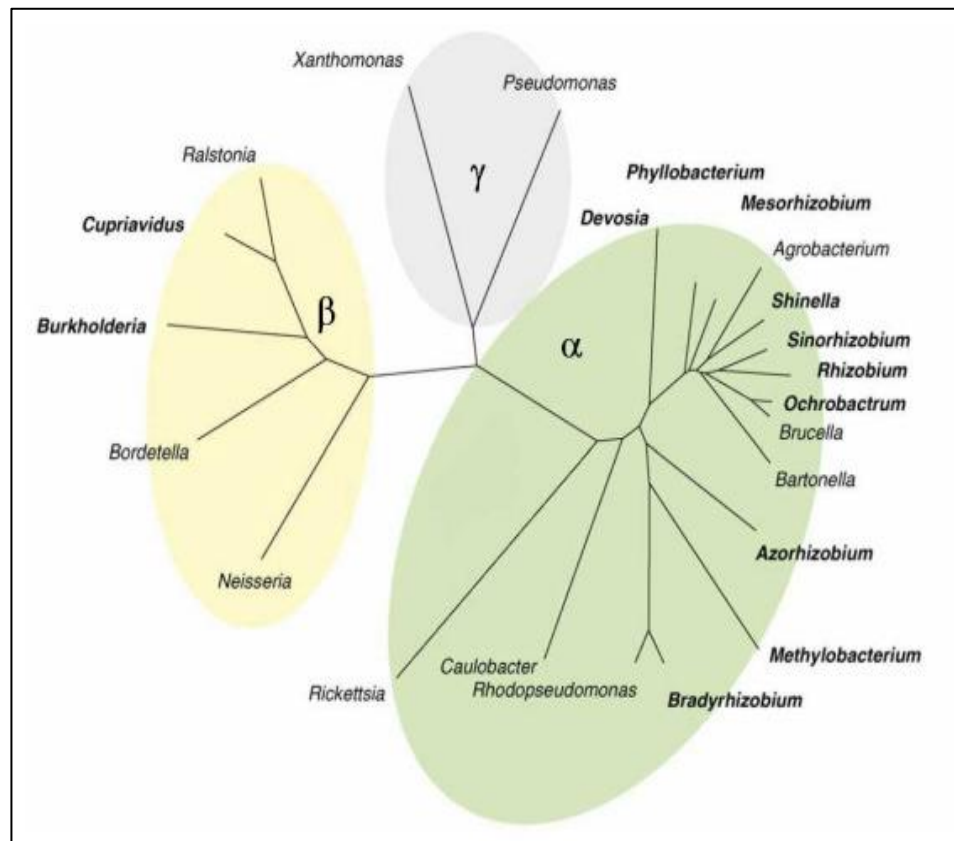


Figure 1.4: Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S d' α , β et γ -protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums [86].

1.3. La symbiose *Rhizobium* - légumineuse

Une des symbioses mutualistes la plus commune est la symbiose *Rhizobium*-légumineuse. Elle permet une association durable entre une α -protéobactérie de l'ordre des *Rhizobiales* et une plante dicotylédone de la famille des *Fabaceae*. Cette interaction est préférentiellement établie au niveau des racines et permet la formation d'organes spéciaux appelés nodules où les bactéroïdes réalisent la fixation atmosphérique de l'azote [87].

Les symbioses font partie des interactions utiles, par rapport aux des associations avec les PGPRs non symbiotiques, ce sont des interactions intimes entre les plantes et leurs partenaires, nécessitant la mise en place par les plantes de structures spécifiques pour accueillir leurs symbiotes. La symbiose se définit comme un processus dans lequel deux ou plusieurs organismes interagissent pour obtenir un bénéfice réciproque. Ce processus a largement contribué à l'adaptation des plantes dans différents environnements [88].

Plus généralement, ce type d'interaction est à l'origine d'organites et donc de fonctions eucaryotes importantes, telles que la respiration et la photosynthèse [89]. Comme pour l'association avec les PGPRs, les symbioses peuvent apporter aux plantes des éléments essentiels à leur croissance et à leur survie, tels que l'azote et le phosphore. En échange les plantes fournissent un espace écologique préférentiel pour les symbiotes et souvent, du carbone organique fixé grâce à la photosynthèse [90].

1.3.1. Intérêt de la symbiose fixatrice d'azote

Bien que l'azote représente environ 80 % d'azote atmosphérique, il ne peut être absorbé directement par les plantes. Ainsi, de nombreuses cultures ont besoin d'apport de fertilisants azotés, organiques ou synthétique, pour obtenir des rendements satisfaisants. L'azote (N) est l'un des éléments essentiels indispensables à la croissance et à la productivité des plantes [91]. Une carence en N est caractérisée par une chlorose foliaire et une croissance réduite des tiges et des racines. Cet élément est impliqué dans la synthèse des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines, des lipides membranaires et d'autres composants azotés. C'est le composant principal de la chlorophylle, pigment majeur impliqué dans la photosynthèse [92]. Il est généralement absorbé par les racines sous forme de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+).

Les besoins en azote dans l'agriculture sous forme d'engrais industriels représentent plus de 120 millions de tonnes par an [93]. L'utilisation accrue des engrais azotés augmente la formation d'azote réactif négatif pour l'environnement, sous forme de nitrates, dans les sols non explorés par les racines ou les eaux de drainage et par émissions de gaz à effets de serre, d'ammoniac ou d'oxydes d'azote dans l'air [94].

Les légumineuses peuvent utiliser l'azote de l'atmosphère comme source majeur d'azote, grâce à une symbiose avec des bactéries du sol, appelés collectivement «rhizobia». Ces bactéries présentes naturellement dans le sol transforment l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par la plante; il s'agit de la fixation symbiotique de l'azote (en anglais, BNF, Biological Nitrogen Fixation) [95]. Cette fixation biologique permet de réduire les apports d'azote dans le sol sous forme d'engrais chimique, assurant ainsi un niveau de fertilité en azote suffisant pour une productivité sans compromettre les caractéristiques

agroécologiques [96]. De ce fait, la valorisation de la fixation symbiotique de l'azote est un élément essentiel de la conception d'une gestion agricole durable respectant l'environnement.

1.3.2. Diversité des légumineuses

Les légumineuses ont de nombreuses utilisations, allant de la production de ressources riches en protéines, lipides, éléments minéraux et vitamines à l'amélioration de la qualité du sol (teneurs en azote et en matière organique, structure du sol). Cela permet d'améliorer durablement la productivité avec la rentabilité financière [97].

Les légumineuses appartiennent à la famille des *Fabaceae* (ou *Leguminosae*), à l'ordre des *Fabales*, à la classe des *Dicotyledonae* et à la sous-classe des *Rosidaeae*. Elles sont divisées en six sous-familles [98], représentées par 770 genres et près de 20 000 espèces [99]. Les *Papilionoideae* sont des herbacées et plus rarement des arbres et des arbustes, spécialement adaptées aux conditions méditerranéennes. Elles représentent la sous-famille la plus diverse, comprenant 478 genres et environ 14 000 espèces tropicales et tempérées. Les espèces tropicales incluent les genres : *Cajanus* (pois cajan), *Glycine* (soja), *Phaseolus* et *Vigna* (haricot). Les espèces tempérées comprennent principalement les genres : *Lens* (lentille), *Vicia* (vesce), *Pisum* (pois) ; *Medicago* (luzerne), *Melilotus* (mélilot), *Trifolium* (trèfle) ; *Cicer* (pois chiche) et *Lotus* (lotier) [87]. Les *Mimosoideae* contenant 77 genres et 3 000 espèces et les *Caesalpinioideae* avec 171 genres et 3 000 espèces consistent principalement en arbres et arbustes tropicaux subtropicaux [98].

Toutes les plantes appartenant à la superfamille des *Fabaceae* sont capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote, à l'exception du genre *Parasponia* de la famille des *Ulmaceae*. La symbiose est réalisée par des bactéries de type rhizobium présentes dans le sol, ce qui conduit à la formation de nodules au niveau racinaire et exceptionnellement au niveau de la tige. A partir de ces nodules que le rhizobium, différencié en bactéroïdes, trouve les conditions physiologiques nécessaires à la fixation d'azote atmosphérique.

La nodulation chez les légumineuses est un phénomène très commun. En effet, parmi les 20 % de légumineuses étudiées, 97 % des espèces de la sous-famille des *Papilionoideae* (pois, haricot, fève, lentille ... etc.), 90% de la sous-

famille des *Mimosoideae* (robinier, glycine, acacia... etc.) et 30% de la sous-famille des *Caesalpinioideae* (flamboyant, barbade, séné d'Alexandrie...etc.) sont capables d'être nodulées par des rhizobia spécifiques [100].

1.3.3. Spécificité de la symbiose

La spécificité de l'hôte est l'une des caractéristiques principales de la symbiose rhizobium-légumineuse, qui peut être définie par la diversité taxonomique des partenaires auxquels le symbiote rhizobien peut s'associer [101]. En général, chaque type de légumineuse ne peut être infecté que par une ou plusieurs espèces de rhizobiums (spectre d'hôtes de la légumineuse) et au contraire, chaque souche de rhizobiums ne peut infecter qu'un nombre limité d'espèces de légumineuses (spectre d'hôtes bactérien). Il existe quelques exceptions, certains rhizobia à large spectre d'hôtes sont capables de s'associer avec un très grand nombre de légumineuses, comme la souche d'*Ensifer* sp. NGR 234 isolée de *Lablab purpureus*, capable de noduler environ 120 genres de légumineuses et au genre *Parasponia* [102]. Au contraire, le spectre d'hôte est étroit chez le partenaire bactérien *Azorhizobium caulinodans* qui n'est capable de noduler qu'un seul hôte végétal, *Sesbania rostrata* [103]. Certaines légumineuses ne forment des nodules qu'avec un nombre limité de microsymbiotes, comme le genre *Galega*, associe uniquement à *Rhizobium galegae* [104], tandis que le siratro (*Macroptilium atropurpureum*) est couramment utilisé pour faire du piégeage à grand échelle, car son spectre d'hôte chez les espèces de rhizobia est très large.

Par conséquent, la diversité des associations symbiotiques ne semble pas dépendre ni de la classification bactérienne, ni de celle des légumineuses, ni de la situation géographique ou des habitats écologique des légumineuses. Le concept de symbiovar (sv) a été introduit pour distinguer les bactéries d'une même espèce, mais avec une gamme d'hôtes différente. L'espèce *R. leguminosarum* est l'un des meilleurs exemples décrits dans la littérature. Les symbiovars *phaseoli*, *trifolii* et *viciae* nodulent réciproquement les espèces des genres *Phaseolus*, *Trifolium* et *Vicia/Pisum*. Cette distinction dans les biovars est basée sur le spectre d'hôtes, qui est lui-même lié au type de gènes symbiotiques hébergés par la souche [105]. Selon Ramirez-Bahena et al. [106], les symbiovars peuvent être distingués

génétiqnement par la phylogénie des gènes de nodulation (*nodA* et *nodC*) et les gènes de la fixation de l'azote (*nifH*).

1.3.3.1. Phylogénie et recherche bioinformatique

Selon Claverie et *al.* [107], la bioinformatique est un domaine d'analyse de l'information biologique, principalement sous forme de séquences génétiques et de structures de protéines; c'est donc une branche théorique de la Biologie. Son objectif, est d'effectuer la synthèse des données disponibles, à l'aide de modèles et de théories, d'énoncer des hypothèses généralisatrices sur les structures protéiques, sur l'évolution des espèces et de formuler des prédictions sur les localisations de gènes et de leurs fonctions.

Selon Laurent [108], la bioinformatique ne se limite évidemment pas à l'analyse des séquences génomiques et protéomiques, mais également à des données concernant les marqueurs moléculaires (biomarqueurs), les données phénotypiques, etc... . Il s'agit d'une approche *in silico* (recherche utilisant des algorithmes basée sur des calculs complexes informatisés ou de modèles informatiques) qui vient compléter les approches classiques *in situ*, *in vivo* et *in vitro* [109].

La bioinformatique est un domaine multidisciplinaire qui utilise des méthodes informatiques, mathématiques, statistiques et /ou combinatoires pour résoudre un problème biologique [110]. La bioinformatique est stockée, organisée et diffusée dans des bases ou des banques de données pouvant être généralistes ; offrant un ensemble plutôt hétérogène d'informations, ou bien spécialisées qui correspondent à des données plus homogènes [108]. **GenBank (Genetic Sequence Databank)** est la banque nucléique la plus sollicitée, dont les données stockées sont issues de séquençage d'ADN et d'ARN. Elle créée en 1982 par la société IntelliGenetics et diffusée par le **NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)**.

La phylogénie est une approche de la bioinformatique qui catégorise les espèces en fonction de leurs ressemblances phénotypiques (phylogénie phénétique), ou de leurs séquences géniques (phylogénie moléculaire), dont le but est d'arriver à une représentation statistique permettant de bien visualiser les relations entre les différents taxons analysés. Les relations de parenté sont généralement représentées sous forme d'un arbre phylogénétique ou

dendrogramme, celui-ci est appliqué à tous les types graphiques arborés (cladogrammes, phénogrammes, phylogrammes, arbres ultramétriques, chronogrammes...) [111]. La phylogénie moléculaire, basée sur le séquençage d'ADN et d'ARN, introduit deux concepts permettant de distinguer deux gènes très apparents (homologues) du point de vue de leurs séquences primaires [112] :

- Les gènes dérivant d'un gène ancestral par spéciation sont appelés *orthologues* et présentent un grand potentiel pour des fonctions similaires.
- Les gènes résultant de la duplication à l'intérieur du génome d'une même espèce sont appelés *paralogues* et évoluent vers une divergence fonctionnelle, puisque la copie à travers le processus de l'évolution semble avoir adopté une nouvelle fonction.

La construction de la phylogénie moléculaire est basée sur les séquences d'ADN et de protéines, notamment de l'ADNr 16S, des cytochromes C, de la ribulose 1,5-biphosphate carboxylase et du facteur d'élongation alpha (*tuf*) [113].

L'ARNr 16S, présent dans tous les organismes vivants, a été établi comme la macromolécule de choix pour les analyses phylogénétiques, monogéniques et l'identification des espèces [114]. Aux fins de la phylogénie, le gène d'ARNr 16S s'est avéré extrêmement utile, en raison des régions de ses séquences hautement conservées chez les bactéries et même chez des espèces bactériennes très éloignées. Ainsi, ce gène est facile à amplifier et à séquencer à l'aide de gènes universels [115]. Phylogénétiquement, il est reconnu que des séquences partageant une similarité inférieure à 97 % correspondent à différentes espèces. Le pouvoir résolutif de l'ARNr 16S est suffisant pour séparer les différentes espèces; par contre il ne permet pas de regrouper des espèces identiques. Même si le pourcentage d'identité des ARNr 16S de deux souches est supérieur ou égal à 97 %, leur similarité doit être basée sur les résultats des hybridations ADN/ADN [116].

Le gène de l'ARNr 16S représente en moyenne 0,05 % du génome du procaryote [117]. Le nombre de copies de ce gène par génome bactérien varie entre 1 et 15 [118]. De plus, ce gène peut subir un transfert occasionnel ou une recombinaison [119]. Enfin, les séquences géniques de l'ARNr 16S peuvent ne

pas être suffisantes pour analyser les relations évolutives entre des espèces étroitement apparentées, car son gène est hautement préservé [120].

Les gènes de ménage (housekeeping genes) ou d'entretien, appelés MLST (Multi Locus Sequence Typing), sont considérés comme un outil de choix dans les expériences de typage moléculaire pour permettre la différenciation d'espèces étroitement apparentées. Ces gènes de référence sont toujours exprimés car ils codent pour la synthèse des protéines dont l'activité et la fonction sont indispensables à la vie cellulaire. Ainsi Ils sont toujours présents dans toutes les conditions [121]. Parmi ces gènes:

- le gène **rpoA** codant pour la sous-unité α de l'ARN polymérase dépendante de l'ADN, c'est l'enzyme responsable de l'initiation de la transcription.
- Le gène **rpoB**, codant la sous-unité β de l'ARN polymérase, fourni une résolution phylogénétique comparable, notamment dans l'analyse d'isolats étroitement liés au gène d'*ARNr 16* [122].
- Le gène **gyrB** qui code la sous-unité β de l'ADN gyrase (ou la topoisomérase II), qui est essentielle à la survie des cellules bactériennes. Le transfert horizontal de ce gène est rare, ce qui explique son utilisation dans la classification taxonomique des bactéries [122].
- le gène **recA** qui code pour la protéine Recombinase A (*recA*) qui joue un rôle clé dans la réparation et la maintenance de l'ADN. La protéine *recA* est particulièrement importante pour la phylogénie moléculaire, en raison de ses propriétés stables [123].

En pratique, la reconstruction phylogénétique nécessite l'alignement multiple, afin de comparer de nombreux gènes ou séquences de protéines, dans le but de fournir une matrice de distance qui constitue la base de la construction du dendrogramme [124]. Cependant, l'alignement de certaines régions peut être difficile à cause d'un trop grand nombre de mutations, de substitution et/ou d'insertion-délétion (*indel*). L'alignement multiple permet de produire un alignement optimal, dans le but de correspondre les positions homologues de diverses séquences et aussi l'ordre des séquences, facteur déterminant de la qualité de l'alignement final [113].

En général, les constructions phylogénétique se basent sur:

- **Méthodes de distance** : basées sur le calcul de la distance entre chaque paire de séquence, la matrice de distance est utilisée pour construire des arbres. Il existe deux méthodes [125] :
 - i) **Neighbor-joining** (jointure voisine), c'est une méthode de construction d'un arbre phylogénétique sans racine, à partir d'un indice d'écart (distance ou dissimilarité entre séquences). Elle est basée sur la recherche d'une paire d'UTOs (unités taxonomiques opérationnelles) qui réduisent la longueur totale des branches de l'arbre à chaque stade de regroupement [126].
 - ii) **UPGMA** (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean), méthode des groupes de paires non pondérées avec moyenne arithmétique, où les arbres résultants sont enracinés. Elle suppose un taux de substitution constant dans le temps et des lignées phylogénétiques (connu sous le nom d'hypothèse de l'horloge moléculaire) [127].
- **Méthode de parcimonie** : Contrairement aux méthodes de distance, la parcimonie considère chaque site individuellement pour l'ensemble des séquences. Elle est basée sur la théorie de *rasoir d'Occam*, qui détermine que la meilleure hypothèse pour expliquer un processus est l'utilisation du plus petit nombre d'événements (calculer le nombre minimal de substitutions) [113].
- **Méthode du maximum de vraisemblance** : C'est la méthode d'estimation la moins affectée par l'erreur d'échantillonnage [128], elle donne de meilleurs résultats que les méthodes de distances et de parcimonie, ce qui facilite la comparaison des hypothèses. La contrepartie étant bien sûr un temps de calcul beaucoup plus long que ces deux méthodes [129].

1.3.4. Effets des facteurs biotiques et abiotiques sur la symbiose

1.3.4.1. Facteurs biotiques

L'optimisation de la symbiose rhizobium-légumineuse nécessite la présence de souches bactériennes rhizosphériques compatibles et compétitives. Ces souches devraient être en nombre suffisant pour augmenter le nombre de nodules

et améliorer la fixation d'azote. A chaque espèce de légumineuses est attribuée une espèce de *Rhizobium* qui lui est inféodée. Les génotypes bactérien et végétal affectent le niveau d'efficacité de la fixation symbiotique [130].

Dans la rhizosphère, la plupart des légumineuses cultivées trouvent des souches rhizobiennes indigènes adaptées, telles que le pois et la féverole, associées préférentiellement à des souches de *Rhizobium leguminosarum*. Cependant, dans certains cas de pH basiques chez le lupin blanc, associé à *B. lupini*, ou de pH acides chez la luzerne, associée à *S. meliloti*, une inoculation par des espèces rhizobiennes adaptées est nécessaire. Des conditions environnementales défavorables (température élevée, pH faible), peuvent limiter la durée de survie des bactéries introduites dans le sol.

1.3.4.2. Facteurs abiotiques

La température, le pH du sol, la salinité, et le stress osmotique affectent significativement les processus de la croissance, de la survie des rhizobia de la symbiose rhizobium-légumineuse [131]. Le réchauffement climatique et les pratiques agricoles entraînent une augmentation des sols acides et ont un impact négatif sur la productivité des légumineuses. La température a un effet sur la survie des rhizobia dans le sol ainsi que sur la nodulation et tous les processus physiologiques, y compris le fonctionnement de la nitrogénase [90]. La température optimale au fonctionnement de la fixation symbiotique est comprise entre 15 et 25°C pour les légumineuses tempérées. Chez les légumineuses tropicales, ce seuil varie de 25 à 40°C, selon l'espèce végétale [73].

Le pH du sol (à pH < 5) affecte tous les aspects de la symbiose, depuis la survie des souches dans le sol jusqu'aux processus d'infection, de nodulation et de fixation d'azote. En fait, l'acidité perturbe l'adhésion des bactéries à la surface des poils racinaires, au cours du stade infectieux [132]. La plupart des terres agricoles sont alcalines, avec des pH compris entre 7 et 8.5, ce qui réduit la disponibilité des éléments nutritifs assimilables par les plantes. Le stress alcalin peut provoquer un retard de croissance chez certains rhizobia, ainsi que la viabilité symbiotique avec la légumineuse associée. L'alcalinité des sols inhibe significativement la nodulation et la fixation d'azote chez *Vicia faba* inoculée avec *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Cependant, l'inoculation de cette souche avec des champignons arbusculaires améliore la nodulation et la fixation d'azote, chez *V.*

faba, sous stress alcalin [133]. Il est donc important d'isoler des rhizobia résistants à des pH alcalins et capables de noduler des légumineuses [134].

La disponibilité des éléments nutritifs dans le sol et plus particulièrement celle de l'azote (N) et du phosphore (P), influe fortement sur la symbiose rhizobium-légumineuse. Bien qu'il existe un lien négatif entre la fertilisation en N et la fixation biologique d'azote, une tendance inverse a été signalée dans le cas d'une fertilisation en P. Voisin et *al.* [135] rapportent qu'une fertilisation en N, en particulier l'apport en nitrates, entraînerait une diminution du taux de fixation biologique d'azote chez les légumineuses.

1.4. Processus de nodulation

1.4.1. Bases biochimiques et moléculaires

La mise en place de la nodulation implique une reconnaissance et un dialogue moléculaire indispensable entre les partenaires symbiotiques. La coordination de l'expression de nombreux gènes chez les deux partenaires, qui se régule par échange de signaux moléculaires, est également nécessaire pour induire les importantes modifications racinaires relatives à la nodulation [136, 137].

En condition de carence en azote, l'interaction entre la plante et la bactérie commence au niveau de la rhizosphère, où les rhizobia sont attirés par chimiotactisme vers les racines des plantes hôtes, grâce aux différentes molécules exsudées ou excrétées par celles-ci [138]. Les flavonoïdes libérés par les racines constituent le premier signal moléculaire; ils sont reconnus particulièrement par des protéines régulatrices bactériennes, les protéines NodD [139]. L'activation de ces protéines conduit à l'expression coordonnée des gènes nodulaires (gènes *nod*, *noe* et *nol* collectivement appelés gènes *nod*) via les boîtes régulatrices (*nodbox*) situées en amont des gènes *nod*. Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochito-oligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod [140], qui sont ensuite identifiés par des récepteurs spécifiques de la plante hôte [141]. Ces facteurs Nod sont responsables de la courbure des poils absorbants racinaires, en constituant le deuxième signal moléculaire requis pour l'initiation nodulaire (Figure 1.5). Par la suite, l'activation de nombreux gènes permet l'établissement et le suivi de l'infection et de la différenciation nodulaire [136]. La reconnaissance entre les protéines NodD d'une

espèce de rhizobia et leur flavonoïde activateur est l'un des premiers mécanismes de spécificité dans la symbiose rhizobium-légumineuse [142].

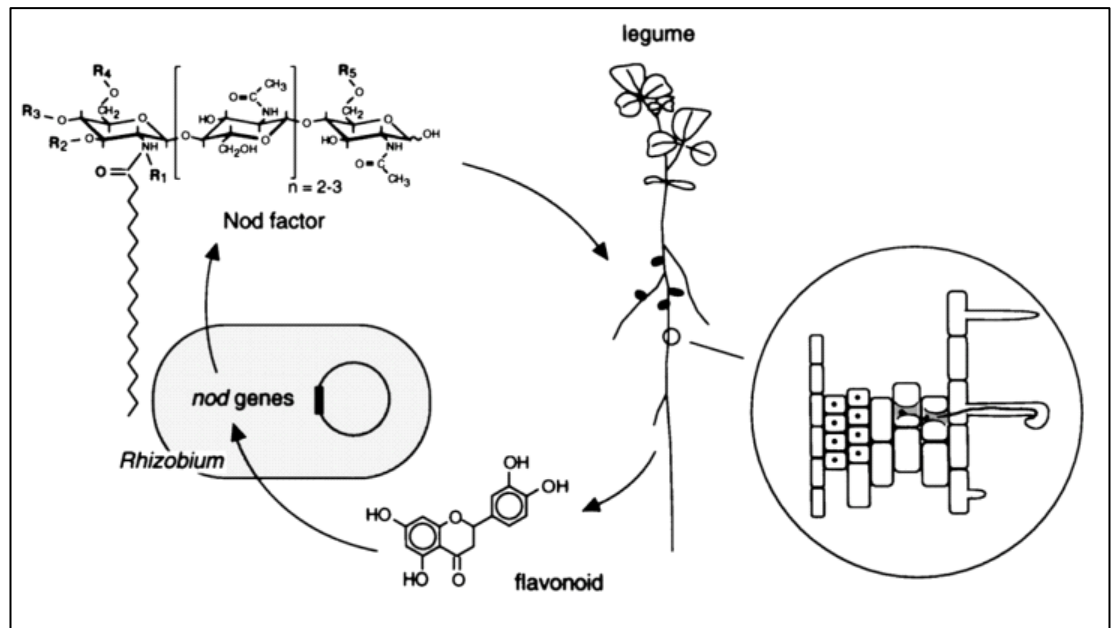


Figure 1.5 : Le dialogue moléculaire *Rhizobium*-Légumineuse. Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire [14].

1.4.1.1. Les flavonoïdes : signaux inducteurs des gènes *nod*

La plante hôte utilise toutes les fonctions nécessaires pour construire l'organe spécifique à la symbiose [143]. Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de nature aromatiques émis par les racines de la plante dans la rhizosphère. Ce sont les principaux signaux exsudés par la plante hôte et perçus par les rhizobiums dans le sol [144]. Les flavonoïdes jouent un rôle clé dans le déclenchement de la symbiose en tant qu'inducteurs spécifiques des gènes bactériens de nodulation (gènes *nod*), impliqués dans la synthèse des lipochito-oligosaccharides (LCOs) appelés les facteurs Nod, et qui sont essentiels pour l'infection initiale des racines et la formation des nodules [145].

Les flavonoïdes sont des dérivés du 2-phényl-1,4-benzopyrone, ayant une structure définie par deux anneaux aromatiques et un cycle propane ou pyrane. Selon les modifications apportées à cette structure, plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés chez les plantes, notamment les isoflavonoïdes qui sont spécifiques des légumineuses [146].

1.4.1.2. Les gènes de nodulation et leur localisation

La plupart de ces gènes sont localisés sur un plasmide [95]. Ces gènes sont impliqués dans le dialogue moléculaire ; ils permettent d'identifier les signaux de la plante, généralement des flavonoïdes, qui activent le programme symbiotique précoce de la bactérie, et déterminent ainsi à leur tour la synthèse et la sécrétion des signaux bactériens, les facteurs Nod [147]. La capacité des rhizobia à former des nodules dépend de la présence dans leur génome d'un groupe de gènes de nodulation indispensables à la symbiose [148].

Ces gènes peuvent être classés en trois groupes : les gènes *nod* régulateurs, les gènes *nod* communs et les gènes *nod* spécifiques [149].

- **Les gènes *nod* régulateurs** : y compris notamment le gène *nodD* (parfois en plusieurs copies dans le génome des rhizobiums), ils codent pour des protéines appartenant à la famille de régulateurs transcriptionnels du type LysR qui, en présence de signaux sécrétés par la plante (flavonoïdes), activent l'expression des autres gènes *nod* dits gènes *nod* communs. Les gènes *nodD* codant pour des récepteurs spécifiques de signaux de la plante constituent le premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte et du processus de l'infection [150].
- **Les gènes communs *nodABC*** : les gènes communs (gènes de structures) *nodA*, *nodB* et *nodC* sont les principaux gènes de la nodulation, qui codent pour les enzymes impliquées dans la synthèse du lipochitooligosaccharide. Ils sont responsables de la synthèse du squelette commun des facteurs Nod [151]. Ces gènes sont conservés chez presque tous les rhizobiums, ils sont fonctionnellement équivalents entre les espèces rhizobial [152]. Le gène *nodC* codant pour une N-acetylglucosamyl-transferase permet l'élongation de la chaîne, puis le gène *nodB* codant pour une N-déacétylase entraîne la suppression du résidu N-acétyl de l'extrémité de la chaîne permettant ainsi au produit du gène *nodA*, une N-acyl-transferase d'y ajouter une chaîne d'acides gras [153]. Ces gènes déterminent la synthèse de la structure de base commune à tous les facteurs Nod. Les gènes *nodABC* jouent un rôle absolument essentiel dans la formation des nodosités, la mutation dans l'un d'entre eux conduisant à l'incapacité à noduler toute plante [136].

- **Les gènes *nod* spécifiques** (ou *hsn* pour « host specific nodulation ») : sont les principaux déterminants de la spécificité de l'hôte. Chaque espèce de rhizobia est caractérisée par un certains ensemble de gènes *nod*, qui codent pour des enzymes impliquées dans le griffage du squelette lipochito-oligosaccharidique du facteur Nod avec les substitutions qui confèrent la spécificité de l'hôte [151]. Des mutations dans ces gènes codant altèrent la nodulation chez l'espèce hôte [136].

1.4.1.3. Les facteurs de nodulation : Structure, biosynthèse et sécrétion

En réponse à la libération des inducteurs appropriés aux plantes hôtes, les rhizobia conduisent à la synthèse et la sécrétion des lipochito-oligosaccharides (LCOs), appelés facteurs Nod, qui sont les principaux signaux pour le développement de la symbiose [145].

Les facteurs Nod sont des lipochito-oligosaccharides (LCO) constitués d'un squelette de chitine, ce qui signifie des unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons β -1,4 (Figure 1.6). Une chaîne d'acide gras polyinsaturée est greffée par N-acylation sur l'atome d'azote du résidu glucosamine situé à l'extrémité non réductrice du squelette de chitine. Le nombre d'unités de N-acétyl-D-glucosamine qui compose le facteur Nod est généralement compris entre 3 et 5 [140]. Les facteurs Nod peuvent encore être décorés à l'aide de substitutions chimiques particulières, qui leurs donnent leur spécificité (figure 1.6) [136].

La première étape consistait à collecter les facteurs Nod est établie par N-acétyl-glucosamyl transférase codée par *nod C* [154]. L'élongation de la chaîne est effectuée par *nod C* au niveau de la région terminale non-réduite [155]. La déacétylase NodB élimine ensuite la moitié de la N-acétyl de la région terminale de la N-acétylglucosamine (oligosaccharides) [150]. En fin, une acétyl transférase codée par *nod A* lie la chaîne acyle au carbone C2 libre de la région finale non-réduite de l'oligosaccharide. Cependant, des études ont montré que *nod A* et *nod C* sont également des éléments très importants, en particulier dans la spécificité de la plante hôte pour la nodulation [156].

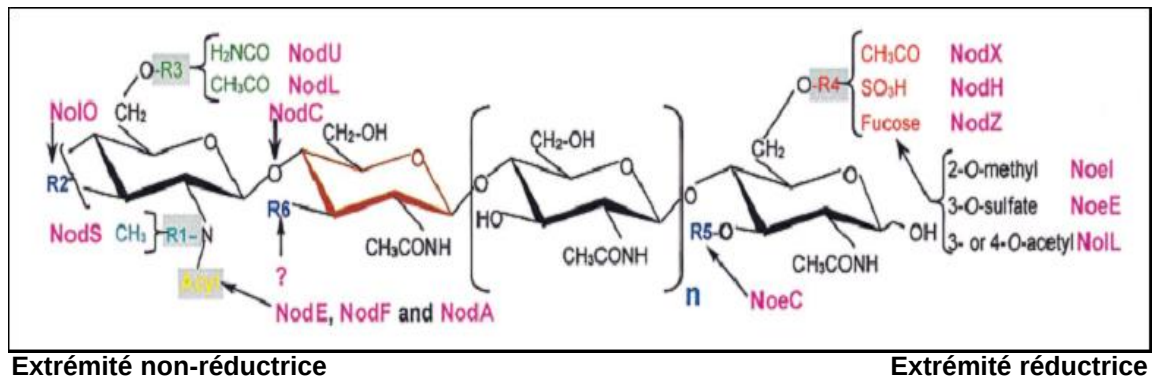


Figure 1.6 : Structure des facteurs Nod. Sont indiqués en rose les gènes impliqués (commun ou spécifiques) et les sites de décoration (R1 à R6) [136].

1.4.1.4. Les polysaccharides de surface

Bien que la production et la reconnaissance des facteurs Nod soient des déterminants majeurs de la spécificité de l'hôte, certains composés apparaissent également intervenir à des niveaux différents, notamment les polysaccharides de surface de la bactérie [136]. Trois principaux types de polysaccharides de surface sont synthétisés : les exopolysaccharides (EPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les polysaccharides de capsule (CPS), ces composés sont très importants pour l'infection plante-bactérie [157].

- Les EPS semblent jouer un rôle clé dans les différentes étapes de l'établissement de la symbiose lors de processus complexes de la nodulation, contribuant à la colonisation racinaire, à l'identification de la plante hôte, à l'initiation et l'extension des cordons d'infection, à la spécificité de la plante hôte et à l'invasion de nodule par l'hydrophobicité de la membrane bactérienne [158]. Les EPS peuvent également faciliter la différenciation des bactéroïdes, en conférant plus de plasticité à leur membrane [150].
- Les LPS sont des polysaccharides associés à la membrane bactérienne externe, par un groupement lipidique avec la partie saccharidique orientée vers l'extérieur. Ces LPS sont essentiels à la survie des bactéries.
- Les CPS sont des polysaccharides entourant la bactérie et lui conférant une matrice protectrice hydratée contre les bactériophages et les conditions sèches, souvent rencontrées dans la rhizosphère [157].

1.4.2 Mécanismes de nodulation

Le succès de l'interaction rhizobia - légumineuses est conditionné par un dialogue moléculaire entre les deux organismes. Ce dialogue est initié par la plante qui diffuse dans la rhizosphère, en condition de carence azotée, des flavonoïdes reconnus par les bactéries présentes dans l'environnement racinaire proche [159]. Ces composés activent chez la bactérie la synthèse des facteurs Nod (FN) [145]. Les FN sont perçus par la plante hôte en induisant les premières réponses cytologiques et moléculaires au niveau de la racine [160]. Des facteurs de surface comme la protéine rhicadhésine, les polysaccharides capsulaires (CPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) chez la bactérie et la lectine et autres adhésines chez la plante sont inclus dans l'identification et l'attachement des bactéries à la plante [161].

Les premières réponses cytologiques, se caractérisent par une déformation des poils racinaires (Figures 1.7 et 1.8), résultat de la réorientation de la croissance apicale du poil absorbant après leur contact avec les FN [162]. L'infection rhizobienne entraîne la pénétration des bactéries dans les cellules de la plante, induisant la dédifférenciation et la division des cellules du cortex qui sont les premières à recevoir les bactéries. Les cellules du cortex moyen s'activent et se divisent et les quelques cellules non infectées forment le méristème nodulaire [163].

Suite à l'attachement des rhizobia à la surface de l'épiderme racinaire, certaines bactéries se retrouvent piégées par les déformations des poils absorbants dans une structure appelée "crosse de berger" [164]. Les bactéries continuent ensuite à se diviser pour former une micro-colonie (Figure 1.9), où une dégradation locale de la paroi du poil absorbant est observée [165]. Les bactéries stimulent ensuite la formation d'un cordon d'infection intracellulaire par invagination de la paroi végétale, cordon dans lequel les bactéries se multiplient. Le cordon progresse vers le site définitif de libération des bactéries (Figure 1.9) : le primordium nodulaire (cellules issues du cortex moyen) qui devient par la suite le lobe nodulaire [95].

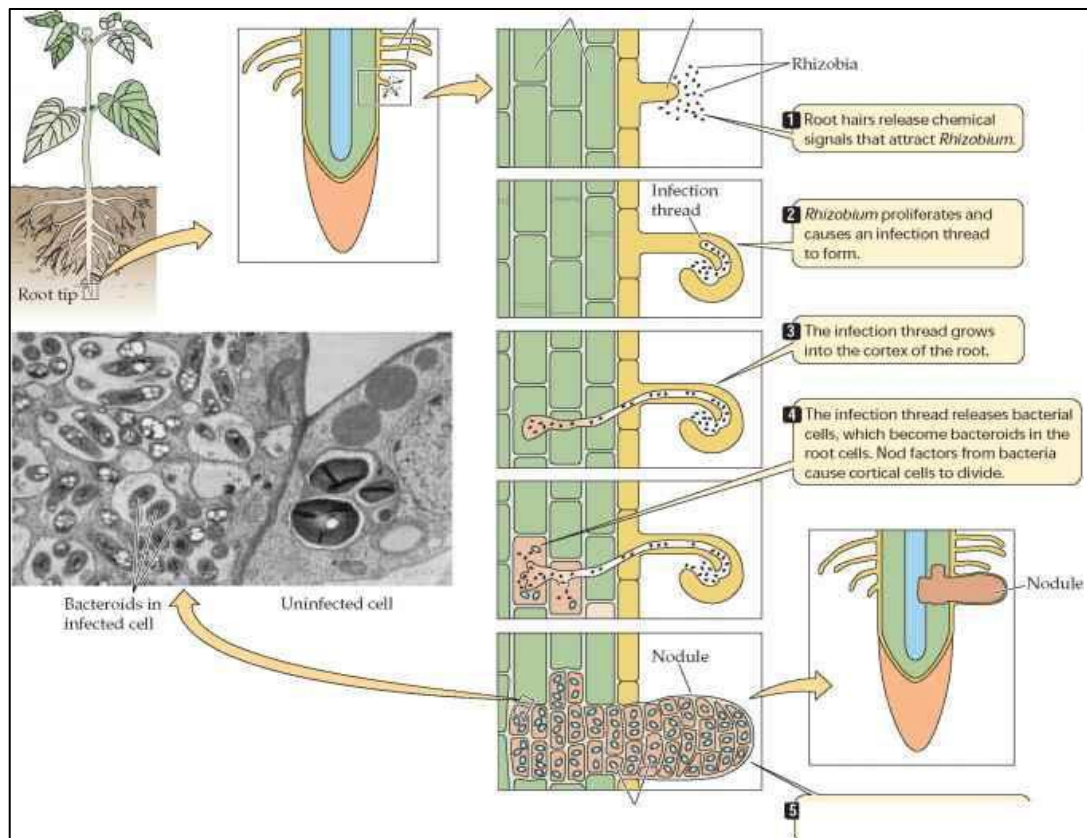


Figure 1.7 : Etapes précoces du développement d'un nodule racinaire. La fixation d'azote s'appuie sur l'invasion racinaire de la légumineuse par *Rhizobium* et la formation de nodules. Les schémas montrent les divers stades de développement nodulaire, ainsi que des bactéroïdes de *Rhizobium japonicum*, dans des vésicules racinaires de soja. Une cellule de racine non infectée se trouve à droite. (<https://www.78stepshealth.us>).

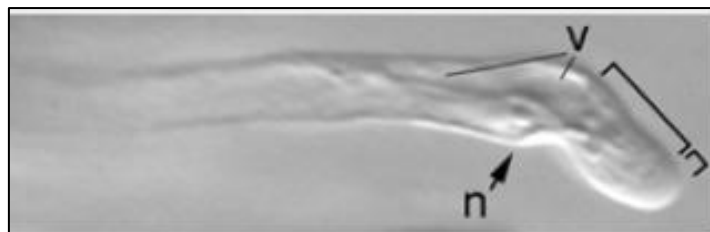


Figure 1.8: Déformation des poils absorbants, 120 minutes après un traitement FN à 10^{-9} M le poil absorbant présente une déformation typique caractérisée par un gonflement et une réorientation de la croissance apicale [162].



Figure 1.9: formation de microcolonie. Visualisation des microtubules endoplasmiques et corticales dans un poil absorbant replié en forme de crosse de berger autour d'une microcolonie bactérienne [165].

Parallèlement à la progression de l'infection, l'organogenèse nodulaire est mise en place. Le primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, se différencie en nodule mature [166]. Les bactéries sont libérées du cordon dans le cytoplasme des cellules végétales par un processus d'endocytose par lequel elles sont internalisées dans un compartiment formant le symbiosome entouré d'une membrane péribactéroïdienne d'origine végétale [163]. Cette membrane sépare les bactéries de la cellule hôte et contrôle l'échange de signaux et de nutriments entre les deux partenaires [167]. Une fois dans le symbiosome, les cellules bactériennes subissent de profonds changements physiologiques et morphologiques, se différenciant en bactéroïdes (Figure 1.10), formes fixatrices d'azote adaptées aux nouvelles conditions environnementales présentes dans le nodule [168].

Chez les légumineuses, deux types de nodules peuvent être distingués : déterminés et indéterminés (Figure 1.11), en fonction du site d'initiation des divisions cellulaires du cortex et la persistance ou non du méristème nodulaire [169].

- Dans le cas de nodules à croissance déterminée, l'activité mitotique du cortex externe est éphémère, ce qui entraîne la formation d'un organe sphérique sans zonation distincte (cas du haricot, soja, lotier..). La zone centrale comprend généralement une zone de fixation d'azote, plus ou moins infectées et d'une zone de sénescence [170]. Dans ce type d'organe, la différenciation des bactéries et des cellules de l'hôte est partielle [171].
- Le nodule de type indéterminé est formé à partir du cortex interne, il possède un méristème apical qui dirige sa croissance pendant toute sa vie, en lui donnant une forme allongée. Pour ce type de nodule, la différenciation se fait à la fois dans l'espace et dans le temps et conduit à la formation de cellules végétales et bactériennes entièrement dédiées à la fixation de l'azote. Ces nodules ont une structure plus complexe que celle de type déterminé [172].

En fonction de l'âge du nodule, nous retrouvons quatre à cinq zones définies par le type de cellule et par le stade de différenciation (Figure 1.11) :

- La zone méristématique : située à l'apex, composée de petites cellules en division active. Cette zone est dépourvue de bactéries [173].

- La zone d'infection : c'est la zone où la différenciation débute. Dans ces cellules, les bactéries sont libérées des cordons d'infections dans une structure appelée symbiosomes. Les cellules végétales commencent le processus d'endoréduplication et de modifications morphologiques pour devenir pratiquement sphériques [174].
- L'interzone : consiste en une à trois assises cellulaires riches en amyloplaste. Associée au cortex nodulaire, cette zone constitue une barrière limitant l'entrée de l'oxygène dans la zone de fixation [175].

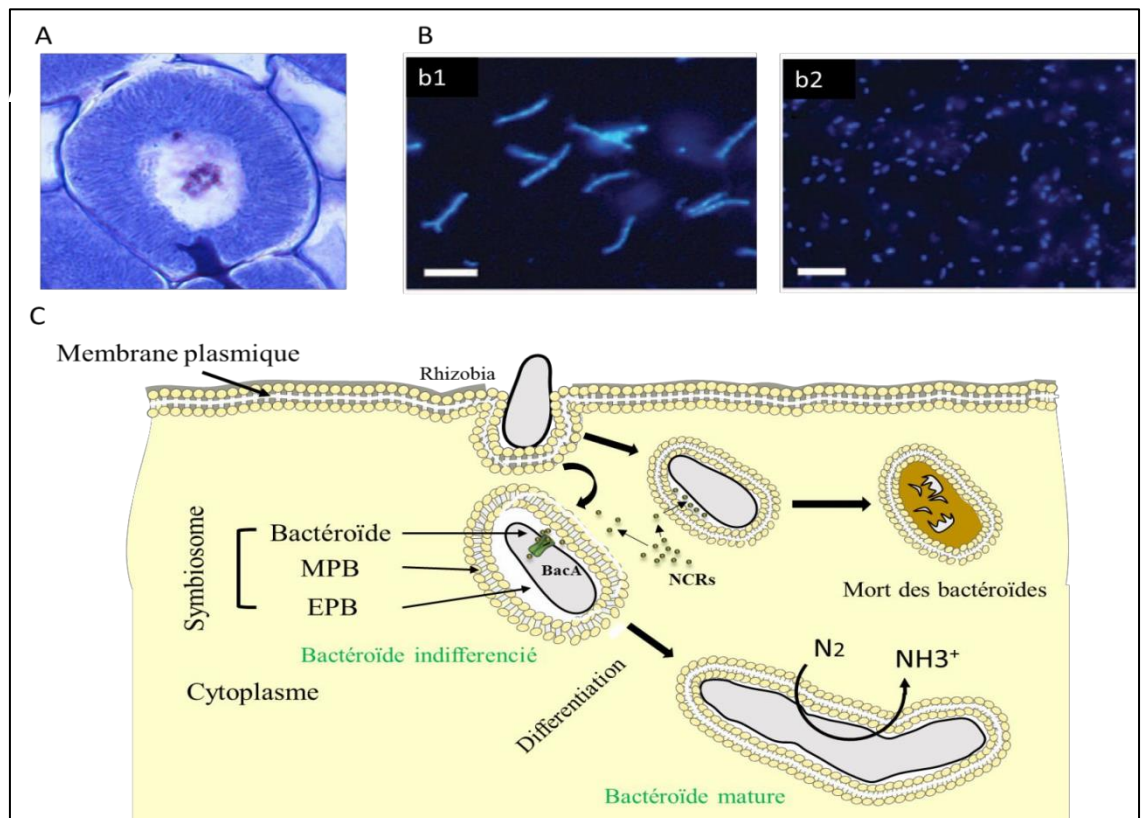


Figure 1.10 : La différenciation des bactéroïdes. Cellule symbiotique de *M. truncatula* infectée par des bactéroïdes différenciés. **B)** La différenciation induit une augmentation de la taille des bactéroïdes chez *Medicago* (b1) et non chez le soja (b2). **C)** Modèle de contrôle de la différenciation : les rhizobia infectent la cellule de l'hôte et se retrouvent dans le cytoplasme sous forme de symbiosome. Des peptides antimicrobiens (NCRs) sont sécrétés par la cellule de l'hôte et atteignent les symbiosomes. A forte concentration les NCRs ont un effet antimicrobien, mais internalisés par le transporteur bactérien BacA, leur toxicité diminue et ils induisent la différenciation. Les bactéroïdes différenciés fixent l'azote. MPB : membrane péri-bactéroïdienne, EPB : espace péri-bactéroïdien, Images **B** [176], Figure **C** [177].

- La zone de fixation : dans cette zone, les bactéries et les cellules végétales ont atteint un stade final de différenciation. Les cellules végétales sont hypertrophiées, polyploïdes et possèdent une grande vacuole centrale. Les

bactéries sont différenciées en bactéroïde : elles sont allongée et elles ont subi une endoréduplication. Les bactéroïdes enfermés dans les symbiosomes sont disposés perpendiculairement à la membrane plasmique [178].

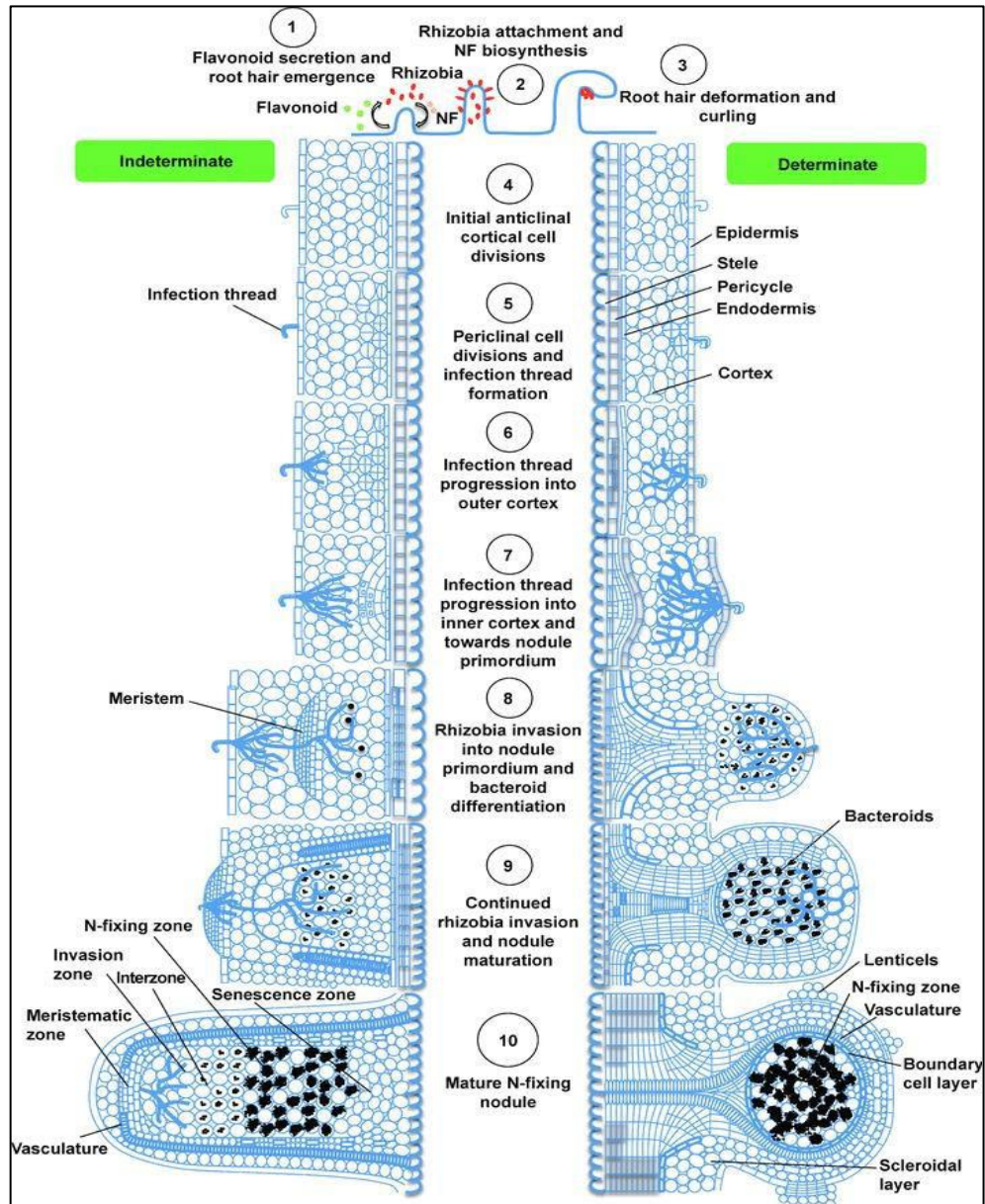


Figure 1.11 : Stades du développement indéterminé et déterminé de nodules de légumineuse. La figure illustre le développement d'un nodule de pois (indéterminé, à gauche) et de soja (déterminé, à droite). Les divisions cellulaires des nodules indéterminés ont lieu dans le cortex interne, alors qu'elles sont sous-épidermiques chez les nodules déterminés. Le méristème situé à la pointe du primordium des nodules indéterminés est en constant développement, alors qu'il est non persistant chez les nodules déterminés. Les différents stades de développement, types de tissus et zones de nodulation, sont identifiées [170].

La grande taille des cellules qui composent cette zone leur permet de contenir des milliers de bactéroïdes et leur forte activité métabolique assure

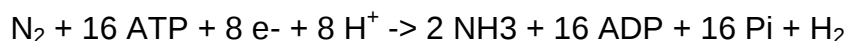
la production d'énergie nécessaire à la fixation de l'azote et sa transformation en ammonium. Associée à cette zone, nous observons une coloration rosée des nodules due à la leghémoglobine, une protéine permettant de contrôler la teneur en oxygène libre dans les nodules [179].

- La zone de sénescence : qui apparaît plus tardivement, se caractérise par une couleur verte due à l'oxydation de la leghémoglobine. Dans cette zone, les cellules végétales et les bactéries qu'elles contiennent dégénèrent [178].

1.4.3. Nitrogénase et gènes de fixation d'azote

Le complexe enzymatique de la nitrogénase, responsable de la réduction d'azote moléculaire en ammoniac, est constitué de deux métalloprotéines. La Protéine I est un hétérotétramère, composé de quatre sous-unités (Fe_4S_4) et un cofacteur comprenant du fer et du molybdène (FeMo-Co), site catalytique de la réaction de réduction de N_2 . La protéine II est un homodimère avec un simple groupe Fe_4S_4 qui est réduit par un donneur d'électron, le plus souvent la ferrédoxine [180].

La nitrogénase consomme une grande quantité d'énergie pour produire de l'ammoniac selon la formule suivante :



Deux types de gènes portés par les bactéroïdes sont nécessaires à cette réaction; ce sont les gènes *nif* et *fix* qui sont impliqués dans l'activité nitrogénase et la fixation d'azote. Les gènes *nif* codent pour la biosynthèse de la nitrogénase. Les gènes *fix* sont quant à eux impliqués dans la régulation et le métabolisme de l'oxygène (Figure 1.12). Plus de vingt gènes *nif* organisés en opérons sont impliqués dans la synthèse et le fonctionnement du complexe nitrogénase [6], y compris les gènes *nifHDK* représentant des gènes de structurels. Les gènes *nifDK* codent les séquences $\alpha\beta$ de la protéine I, à cofacteur FeMo de la nitrogénase, responsable de la réduction de N_2 en NH_3 . Le gène *nifH* code pour la protéine II, ou réductase, qui assure le transfert d'électrons nécessaires pour réduire le N_2 . L'activation symbiotique des gènes *nif* chez les rhizobia dépend de la concentration en oxygène ; elle-même régulée par une série de gènes *fix*.

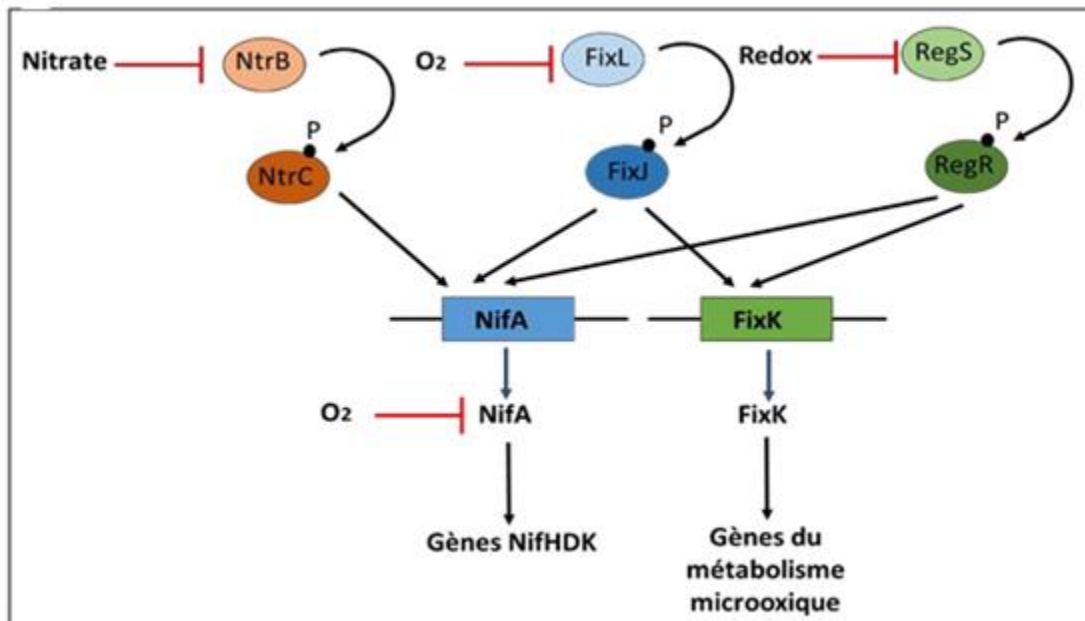


Figure 1.12 : Schémas de régulation des gènes *fix* et *nif*. Les nitrates, l'oxygène et l'état redox sont perçus par les systèmes à deux composantes NtrB-NtrC, FixL-FixJ et RegS-RegR respectivement. Ces systèmes sont responsables de l'activation de l'expression de *nifA* et/ou de *fixK*. *nifA* et *fixK* codent pour des facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes de la fixation d'azote (*nif*) et de la respiration microaérobie (*fix*). De plus, l'oxygène peut inhiber directement NifA. Ce dernier est responsable du contrôle de l'expression des gènes *nifHDK*, alors que FixK contrôle les gènes de la respiration microaérobie [181].

La présence d'oxygène est nécessaire aux bactéroïdes pour leur respiration et la synthèse d'ATP, mais un excès d'oxygène perturbe d'une manière irréversible la nitrogénase. Le parenchyme nodulaire forme une barrière de diffusion qui limite l'entrée de l'oxygène dans les nodules ; la plante exerce un contrôle physiologique sur sa perméabilité en fonction des conditions environnementales (notamment la disponibilité en O₂ et en nitrate dans la rhizosphère) [182]. Les légumineuses développent ensuite des mécanismes pour contrôler la quantité d'oxygène libre autour des bactéroïdes. La leghémoglobine, une enzyme ayant une grande affinité pour l'oxygène, qui transporte et tamponne la concentration d'oxygène nécessaire à la respiration des bactéroïdes [183].

La nodosité est étroitement liée avec le système vasculaire de la plante hôte, permettant ainsi les échanges de nutriments et de signaux entre les deux partenaires. La plante fournit à la nodosité, à travers le phloème, l'énergie nécessaire tout d'abord à sa formation puis à son fonctionnement, principalement sous forme de photosynthétats et en particulier de saccharose [167]. Le saccharose se transforme, dans les cellules nodulaires, en acides dicarboxyliques C-4 (malate, fumarate, succinate) qui sont ensuite transportés dans les

bactéroïdes. En revanche, la majeure partie de l'ammonium produit se transmet passivement des bactéroïdes au cytoplasme des cellules infectées pour y être assimilé [184]. Ces composés azotés sont transportés par le xylème afin d'être utilisés par la plante pour la synthèse des molécules azotées nécessaires à son métabolisme (acides aminés, protéines et acides nucléiques).

1.5. Les *Pseudomonas* fluorescents phytobénéfiques

Parmi les rhizobactéries phytobénéfiques reconnues par leur coopération associative, non symbiotique, de nombreuses souches appartiennent aux *Pseudomonas* spp. fluorescents exercent des effets phytobénéfiques sur la croissance de différentes espèces végétales et fournissent des actions bioprotectrices contre de nombreux agents phytopathogènes [185, 186] (Figure 1.13).

Les *Pseudomonas* appartiennent au groupe des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, et à l'ordre des *Pseudomonales*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 µm. Le genre *Pseudomonas* a été décrit en 1894 [187], comprend des bactéries ubiquitaires très diversifiées, notamment des espèces saprophytes et parasites [188]. Ces bactéries sont mobiles avec un ou plusieurs flagelles polaires [189]; et elles peuvent utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. La plupart des *Pseudomonas* se cultivent à 30 °C et se caractérisent par une croissance lente à 4 °C [190].

Ces rhizobactéries se caractérisent par l'adaptabilité et la colonisation des espaces rhizosphériques, ainsi que les racines de nombreuses plantes [191, 192] (Figure 1.14). Les effets et les fonctions phytobénéfiques sont assurés à travers différents modes d'action, utilisant différents mécanismes [193, 194].

1.5.1. Mécanismes responsables des effets bénéfiques

La diversité métabolique des *Pseudomonas* spp. fluorescents confère à ces bactéries une grande souplesse d'adaptation aux différentes conditions environnementales dans les sols et les rhizosphères [195, 196], favorisant leur utilisation comme biofertilisants, phytostimulateurs et agents de lutte biologique [196].

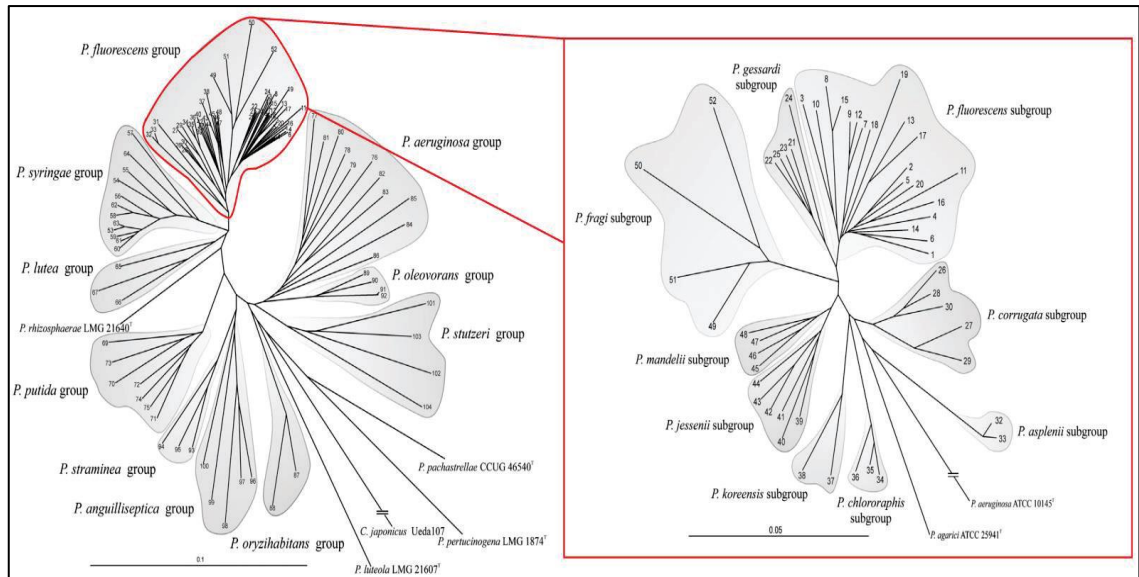


Figure 1.13 : Arbre phylogénétique des bactéries du genre *Pseudomonas*. Arbre phylogénétique réalisé à partir de la concaténation de 4 gènes de ménage *rrs*, *rpoD*, *gyrB* et *rpoB* [197].

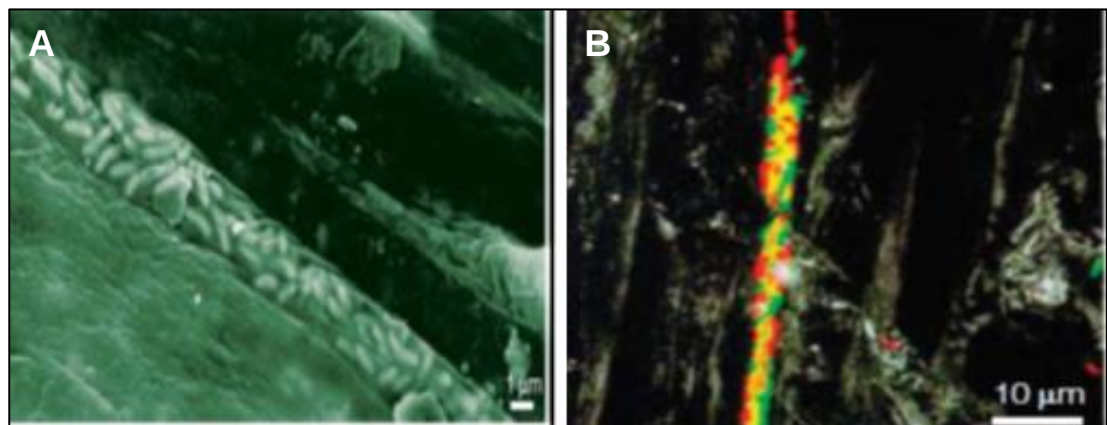


Figure 1.14 : **A** : Micrographie électronique à balayage d'une microcolonie de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 sur la racine de la tomate [198, 32]. **B** : Analyse microscopie confocale à balayage de la colonisation des racines de tomate par *P. fluorescens* WCS365, qui exprime des protéines autofluorescentes. Deux dérivées de WCS365 exprimant soit la protéine fluorescente bleu-vert (cellules rouges) ou la protéine fluorescente jaune (cellules vertes) ; le chevauchement des couleurs rouge et vert est indiqué en jaune [199].

1.5.1.1. Phytostimulation de la croissance

Certaines souches du genre *Pseudomonas* ont été décrites pour leurs effets directs positifs sur la croissance des plantes, entraînant une augmentation des rendements de diverses cultures herbacées, légumières, arboricoles et ornementales [200]. Ces souches peuvent stimuler la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes : la synthèse de métabolites similaires aux

phytohormones et l'excrétion de vitamines [201] ; la fixation non symbiotique de l'azote (N_2) et la solubilisation d'oligoéléments notamment le phosphate (P) [202].

1.5.1.1.1. Synthèse de phytohormones

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent agir directement sur la croissance et l'état physiologique et nutritionnel de la plante qu'elles colonisent, grâce à leur capacité à synthétiser et sécréter des hormones telles que: l'acide indole-acétique (AIA), les cytokinines, les gibbérellines et les inhibiteurs de la production d'éthylène [203, 204]. Ces substances de croissance sont absorbées et assimilées directement par les racines, elles sont utilisées par la plante non seulement dans des conditions normales, mais jouent également un rôle protecteur en conditions de stress [205].

Parmi les régulateur de croissance, l'AIA est la principale auxine naturelle produite par les *Pseudomonas* [206, 207], à des concentrations élevées, affectant la division, l'extension et la différenciation des cellules végétales, réduit la longueur des racines primaires, stimule la formation des racines latérales et favorise la formation des poils absorbants [208], conduisant ainsi à une absorption accrue de l'eau et des nutriments [209].

La cytokinine, d'origine bactérienne, peut affecter la division et le cycle cellulaire, la mobilisation des éléments nutritifs, la formation et l'activité des méristèmes apicaux, le développement floral, la levée de la dormance des bourgeons et de la germination [210].

De même, les gibbérellines, en combinaison avec d'autres phytohormones, régulent divers processus de croissance : la germination, l'élongation, la floraison, la croissance racinaire, et retardent le vieillissement de nombreux organes végétaux [211].

L'éthylène est une autre hormone végétale capable de lever la dormance des graines, qui peut également favoriser la maturation des fruits et déclenche l'abscission des feuilles [212]. Cependant, sa forte concentration ($> 25 \mu g/l$) en état de stress due aux métaux lourds [213], aux pathogènes [214], à la sécheresse, à la salinité [215] et aux polluants organiques [216] entraînent une inhibition de la formation des poils et l'élongation racinaire et par conséquent une réduction de la croissance végétale. La teneur élevée de l'éthylène peut être

réduit en dégradant son précurseur direct, l'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique (ACC), à l'aide de l'ACC-désaminase. Cette enzyme est exprimée chez plusieurs rhizobactéries appartenant au groupe de *Pseudomonas* spp. qui peuvent dégrader l'ACC en α - ketobutyrate et en ammonium [217].

1.5.1.1.2. Amélioration de la nutrition des plantes

La fixation non symbiotique d'azote est assurée par des diazotrophes libre dans la rhizosphère, capables de stimuler la croissance des plantes non-légumineuses telles que les radis et le riz. Ce processus est mis en œuvre par plusieurs PGPRs non symbiotiques dont les *Pseudomonas* ont été étudiés de manière approfondie [218]. Malgré la quantité limitée de l'azote fixé pour la plante hôte, ces rhizobactéries stimulent la croissance des plantes et activent leurs potentialités défensives [219].

Le phosphore est le deuxième élément le plus important dont les plantes besoin en quantité suffisante pour une croissance optimale. Il joue un rôle essentiel dans presque tous les processus métaboliques majeurs, notamment le transfert d'énergie, la transduction du signal, la respiration, la biosynthèse moléculaire et la photosynthèse [220]. Cependant, 95 à 99% du phosphore se présente sous des formes insolubles, immobilisées ou précipitées; il est donc difficile pour les plantes de l'absorber. Les plantes n'absorbent le phosphate que sous forme d'ions monobasiques (H_2PO_4^-) et dibasiques (HPO_4^{2-}). La solubilisation et la minéralisation des phosphates est une caractéristique très importante des *Pseudomonas* spp. [221]. Hussein et Joo [222] ont rapporté que sur 122 isolats microbiens, *P. fluorescence* présentait le potentiel le plus élevé de solubilisation des phosphates. La libération de phosphore d'une source insoluble par *Pseudomonas* est attribuée à la production d'acides organiques [223].

Le fer est également le micronutriment essentiel pour presque tous les organismes de la biosphère. Bien qu'il soit le quatrième élément le plus abondant sur Terre, dans les sols aérobies, le fer n'est pas facilement absorbé par les bactéries ou les plantes car l'ion ferrique ou Fe^{+3} , la forme prédominante dans la nature, n'est que légèrement soluble. Les PGPR, notamment les *Pseudomonas* spp. fluorescents [224] ont développé des mécanismes spécialisés pour l'assimilation du fer, notamment la production de composés chélateurs de fer de faible poids moléculaire, appelés sidérophores, qui transportent cet élément dans

leurs cellules en améliorant sa capacité d'absorption [56, 225]. Ainsi, cette chélation réduit la disponibilité des ions ferriques pour les agents pathogènes, ce qui inhibe également leur croissance [226]. La réduction de la maladie peut être le résultat d'une colonisation étendue des racines ou des sites de l'infection par ces rhizoactéries bénéfiques, réduisant ainsi l'espace requis pour la croissance de l'agent pathogène [227]. Ces propriétés expliquent leur capacité à s'installer en nombre et durablement sur et à proximité des racines [195].

1.5.1.2. Biocontrôle des agents phytopathogènes

Les micro-organismes phytopathogènes constituent une menace majeure et chronique pour l'agriculture durable et la stabilité des écosystèmes à travers le monde. Les *Pseudomonas* constituent une approche prometteuse, durable et écologique, pour la protection de la plante en agissant directement contre les agents pathogènes ou en stimulant les défenses végétales [228]. Le biocontrôle assuré par les souches de *Pseudomonas* spp. est une caractéristique importante qui joue un rôle dans les approches de la lutte biologique [229].

1.5.1.2.1. Antibiose

L'antibiose est le mécanisme le plus connu et le plus important utilisé par les *Pseudomonas* pour réduire l'invasion des agents pathogènes vers les tissus de la plante hôte [189]. Elle consiste en une inhibition directe de la croissance d'agent pathogène en produisant de métabolites dotés de propriétés antifongiques et/ou antibiotiques [230]. L'antibiose exercée par certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été mise, d'abord, en évidence *in vitro* [18]. De nombreux antibiotiques produits par ces bactéries ont été isolés: le 2,4-Diacéthylephloroglucinol (DAPG) [231], les phénazines (PHZ) [232], la Pyrrolnitrine (PRN), la Pyolutéorine (PLT), et le Cyanure d'hydrogène (HCN) [233]. Les *Pseudomonas* montrent non seulement une grande diversité des espèces mais également un grand nombre d'antibiotiques produits [234]. L'isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir de plusieurs régions géographiques a introduit plusieurs groupes différents de producteurs de DAPG, capables de supprimer un large éventail de phytopathogènes, notamment des bactéries, des champignons et des nématodes [235]. Nombreux facteurs abiotiques (l'oxygène, la température, des sources spécifiques de carbone et d'azote, et des micro-éléments), biotiques (la plante hôte, le pathogène, la microflore indigène, et la

densité de cellules de la souche productrice) et physiologiques, y compris le quorum sensing ont été identifiés pour influencer la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle [236].

1.5.1.2.2. Induction de la résistance systémique (ISR)

La reconnaissance de certaines PGPRs par la plante peut entraîner une réaction immunitaire lui permettant de se défendre contre toute attaque par un organisme pathogène [237]. Cette « immunisation » de la plante est appelée induction de la résistance systémique (ISR) [238, 239]. Ces PGPRs stimulent des modifications physiques ou chimiques dans les plantes en améliorant ainsi leur résistance [240]. L'induction de cette résistance par les PGPRs repose sur la reconnaissance spécifique entre des éliciteurs rhizobactériens et la plante [241]. Les mécanismes de l'ISR comprennent (1) la stimulation de la croissance, (2) la tolérance physiologique, (3) l'induction de l'amélioration de la paroi cellulaire et (4) l'augmentation de la production de phytoalexines, d'enzymes de défense, d'antioxydants et la modulation de phénols ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes [242]. En général, l'ISR n'offre pas une protection complète contre l'infection, et la durabilité de la résistance induite par les PGPRs varie d'une plante à l'autre, mais également selon de la souche bactérienne [243]. De nombreuses souches de *Pseudomonas* peuvent induire cette résistance systémique contre les champignons, les bactéries et les virus chez plusieurs plantes [244, 245, 246].

1.5.1.2.3. Compétition pour l'espace et les nutriments

Taqarort et *al.* [247], suggèrent que les rhizobactéries à croissance rapide, peuvent éliminer les champignons phytopathogènes par compétition pour les sources de carbone et d'énergie. La compétition spatiale contribue également à la réduction des infections racinaires, car certaines PGPRs, protègent les racines en occupant les sites d'infection des agents phytopathogènes [248].

Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pouvoir instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère [189]. Outre le taux de croissance intrinsèque, la mobilité (présence d'un flagelle), le chimiotactisme, les lipopolysaccharides (LPS), la capacité de synthétiser des vitamines et des macromolécules et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines sont d'autres caractéristiques

favorables à la colonisation racinaire [9]. Ces propriétés expliquent leur capacité à s'installer en nombre et durablement sur et à proximité des racines [195].

La colonisation des systèmes racinaires par *Pseudomonas* spp. fluorescents implique un chimiotactisme envers les exsudats racinaires, une adsorption sur les racines et enfin une compétition pour les nutriments [227]. La réduction de la maladie peut être le résultat d'une colonisation importante des racines ou des sites de l'infection par ces rhizoactéries bénéfiques, réduisant ainsi l'espace nécessaire à la croissance des agents pathogènes [226].

1.5.1.3. Tolérance aux stress abiotiques

Les PGPRs ont le potentiel de favoriser la croissance des plantes hôtes par des effets sur : la nutrition, la structure racinaire ou la santé de leur partenaire végétal [249]. Ils peuvent également conduire à l'expression des mécanismes de la tolérance systémique induite (TSI) vis-à-vis de divers facteurs de stress abiotiques, notamment en ce qui concerne la sécheresse, la salinité et les métaux lourds [250]. L'inoculation de la souche *Pseudomonas* AMK-P6, par exemple, induit une thermotolérance chez le sorgho (47-50°C); obtenue en améliorant la biomasse végétale ainsi que de la teneur en chlorophylle, en sucres, en acides aminés et en proline [251]. Malgré la présence de cadmium, la croissance du colza (*Brassica napus*) peut s'améliorer après l'inoculation des souches de *Pseudomonas* (*tolasii* ou *fluorescens*) résistantes au cadmium. La production de sidérophores, de l'AIA et l'expression de l'ACC-désaminase par ces dernières permet de réduire la toxicité de ce métal [252]. Certaines espèces de *Pseudomonas* possèdent le mécanisme enzymatique nécessaire pour supprimer l'inhibition de la croissance des plantes causée par une production élevée d'éthylène. Par exemple *Pseudomonas putida* qui possèdent l'ACC-désaminase confèrent une résistance efficace au blé et au colza, en réduisant la synthèse d'éthylène provoquée par un stress salin [253]. *Pseudomonas aeruginosa* R75 et *P. savastanoi* CB35 peuvent favoriser la croissance d'Elyme de Daourie (*Elymus dauricus*) par la dégradation des polluants organiques tels les chloro-benzoates [254]. Les exopolysaccharides (EPS) produits par *Pseudomonas putida* GAP-P45 jouent un rôle positif dans la régulation de la teneur en eau,

et la diffusion de la source de carbone aux plantes, en particulier dans des conditions de stress hydrique [255].

1.5.2. Communication et interaction bactériennes

Bien que les bactéries soient des organismes unicellulaires, elles présentent souvent le comportement de groupes ou de communautés fonctionnels [256]. Dans leurs actions phytostimulatrices et de biocontrôle, les *Pseudomonas* fluorescents forment des microcolonies qui forment un biofilm sur les sites préférés des exsudats racinaires [188]. Ces microcolonies communiquent les unes avec les autres, selon le processus biologique «quorum sensing (QS)» en travaillant de manière coordonnée [257]. Le QS est un mécanisme de communication intercellulaire, utilisé par de nombreuses bactéries pour réguler leur densité de populations et exprimer leurs gènes fonctionnels dans de telles situations [258].

Chez les bactéries à Gram négatif, le QS repose sur la synthèse et la détection de petites molécules signal appelées *N*-acyl-homosérine lactones (AHLs) [259], généralement associé à leur comportement pathogène ou symbiotique [260]. Les AHLs sont des molécules autoinductrices qui s'accumulent dans l'environnement extracellulaire, lorsque le nombre de ces molécules atteint un seuil de concentration critique (le quorum), la réponse est déclenchée en provoquant l'expression génique. La régulation par le QS joue un rôle majeur dans la physiologie et le développement des bactéries [260]. Ce phénomène contrôle plusieurs phénotypes dans l'interaction plantes-bactéries-pathogènes; il contrôle également les phénotypes liés aux PGPRs: la production de composés antimicrobiens, de sidérophores [262], et l'induction de la résistance systémique chez les plantes [261].

1.6 Colonisation rhizosphérique

La sélection de souches PGPR performantes ne doit pas se limiter à leurs activités spécifiques responsables des effets bénéfiques, mais elles devraient être capables à se maintenir et à coloniser le système racinaire de la plante hôte. En fait, la colonisation rhizosphérique peut être considérée comme un processus d'enrichissement en microorganismes qui s'adaptent mieux à une niche particulière [263]. La colonisation à des niveaux suffisamment élevés est une condition préalable à l'expression des effets phytobénéfiques des PGPR, qu'il

s'agisse d'activités phytostimulatrices ou phytoprotectrices [27, 28]. Toutes ces observations montrent que la plante pourrait sélectionner les populations microbiennes colonisant ses racines, leur permettant de se développer de manière sélective et préférentielle.

La compétence rhizosphérique des bactéries varie d'une souche à l'autre; elle conditionne leur capacité à se répartir le long des racines de la plante hôte, à se multiplier et à survivre pendant longtemps en présence de la microflore rhizosphérique indigène [264]. Les caractéristiques bactériennes qui déterminent la bonne compétence rhizosphérique sont relativement inconnus, mais en général, elles semblent liées à la capacité des souches à s'attacher aux racines, se déplacer vers et le long de la racine et entrer en compétition de façon efficace et compétitive avec la microflore résidente [18].

1.6.1 Etablissement de la colonisation rhizosphérique

Le processus de colonisation peut être divisé en plusieurs étapes identifiées comme déterminantes : migration vers la racine, adhésion, croissance et survie [18, 265]. La première étape majeure dépend de la capacité d'une bactérie à se déplacer vers la racine [266], résultant des interactions physicochimiques et biologiques entre les deux partenaires [18]. Ce rapprochement, plus au moins passif ou réversible, dépend des exsudats racinaires, en particulier des sucres et des acides aminés, qui attirent les bactéries par chimiotactisme à la surface racinaire. Ce processus de rhizodéposition stimule, en particulier, la mobilité flagellaire des bactéries, leur permettant de coloniser la rhizosphère [47]. La deuxième étape est la phase d'ancrage, qui semble correspondre à un attachement fort et irréversible aux racines. Cette étape fait intervenir des fibrilles extracellulaires qui emprisonnent les bactéries au sein d'un biofilm. La production de polysaccharides extracellulaires et de protéines membranaires (MOMP), pourrait jouer un rôle dans le processus d'adhésion [267]. En conséquence, l'adhésion aux racines des plantes permet aux bactéries d'avoir un meilleur accès aux sécrétions des racines. L'adhésion des *Pseudomonas* à la racine dépend plutôt de leur aptitude à s'agglutiner avec des glycoprotéines, appelées agglutinines produites par la plante [268]. Chez *P. fluorescens* WCS417 les chaînes lipopolysaccharides latérales, formant l'antigène O des LPS bactériens, jouent un rôle important dans la colonisation racinaire [269].

1.6.2 Sites de colonisation rhizosphérique

Dans des conditions naturelles ou après inoculation, des PGPRs ont été contrôlés pour leurs niches de colonisation, en utilisant des techniques microscopiques [270]. D'après Benizri *et al.* [271] ; il a été constaté que de nombreuses souches de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, et *Burkholderia* peuvent coloniser la rhizosphère, en se s'installant à la surface de cellules rhizodermiques ou sur le rhizoplan (surface de la racine) [272] avec des densités comprises entre 10^5 et 10^7 UFC/g poids frais [40]. Des bactéries ont été visualisées comme des cellules individuelles attachées à la surface des racines, puis multipliées sur le rhizoderme, pour former une chaîne de bactéries (Figure 1.15.B), comme il a été observé dans le cas *Pseudomonas fluorescens* DF57 sur les racines de l'orge [273]. De nombreuses bactéries rhizosphériques colonisent non seulement la rhizosphère et/ou le rhizoplan, mais elles peuvent également pénétrer et coloniser les tissus internes (Figure 1.15.C), générant ainsi des effets stimulants sur la croissance des plantes [274, 275, 276, 272].

Plusieurs études confirment que les plantes hébergent différentes communautés endophytes [277, 278, 279] et que les bactéries endophytes proviennent principalement de la rhizosphère [280]. Les endophytes représentent un sous-groupe des communautés rhizobactériennes qui peuvent pénétrer à l'intérieur des racines de leurs hôtes une fois qu'elles ont recolonisé le rhizoplan [281]. En général, il est admis que les endophytes sont plus susceptibles de montrer des effets améliorant la croissance des plantes que les bactéries colonisant exclusivement la rhizosphère [282].

Après la colonisation, de la rhizosphère et du rhizoplan, certains micro-organismes du sol peuvent pénétrer dans les racines et constituer des sous-populations présentant les caractéristiques spécifiques requises pour l'efficacité endophyte [274]. Le processus de pénétration ne signifie pas nécessairement des mécanismes actifs. On peut donc s'attendre à ce que toutes les bactéries de la rhizosphère soient endophytes à un stade de leur vie [280]. Une pénétration passive peut se produire dans des fissures telles que celles qui se produisent dans les sites d'émergence des racines, ou qui proviennent de micro-organismes nuisibles, ainsi que par les extrémités de racines (Figure 1.16) [283]. Pour certaines bactéries, des adaptations spécifiques se sont développées, par

exemple pour les bactéries nodulantes ou chez les microorganismes dotés de mécanismes spécifiques, assurant leur pénétration active des systèmes racinaires [280].

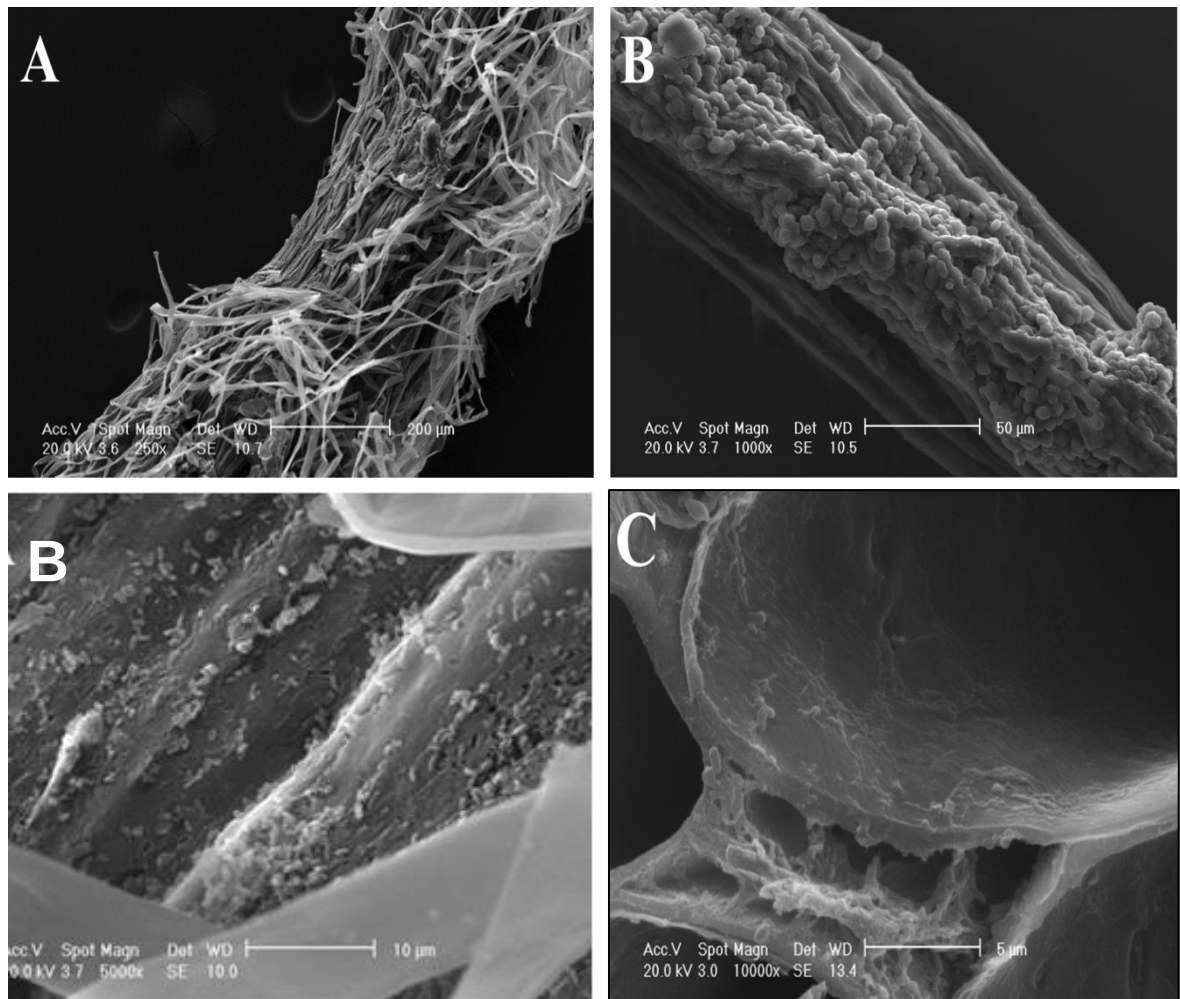


Figure 1.15 : Images MEB de racines fraîches obtenues à partir de plants de chanvre inoculés avec un consortium de PGPR. Les échantillons ont été prélevés après 8 jours de conditions de croissance aseptique in vitro. La figure montre une racine de semis de chanvre dans laquelle des racines poilues sont visibles **(A)**. Les PGPRs colonisent activement la plante à la surface des racines **(B)** et pénètrent à l'intérieur des tissus radiculaires **(C)** [272].

Il a été démontré que les lipopolysaccharides, les flagelles, les pili et la motilité en secousse [284] ont eu des effets sur la colonisation endophyte et la mobilité bactérienne. De plus, la sécrétion des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (CWDEs) est impliquée dans la pénétration bactérienne [285]. Cette dernière fonction a été confirmée par l'analyse du génome de l'endophyte non nodulant *Azoarcus* sp. BH72 [286] possédant des gènes codant pour des CWDEs, telles que les cellulases et les polygalactorunases. Dans le génome de

l'endophyte *Klebsiella pneumoniae* Kp342, qui colonise le maïs, la luzerne ainsi que de nombreuses autres cultures, il a été démontré que de nombreux autres gènes se sont avérés importants pour la colonisation [287].

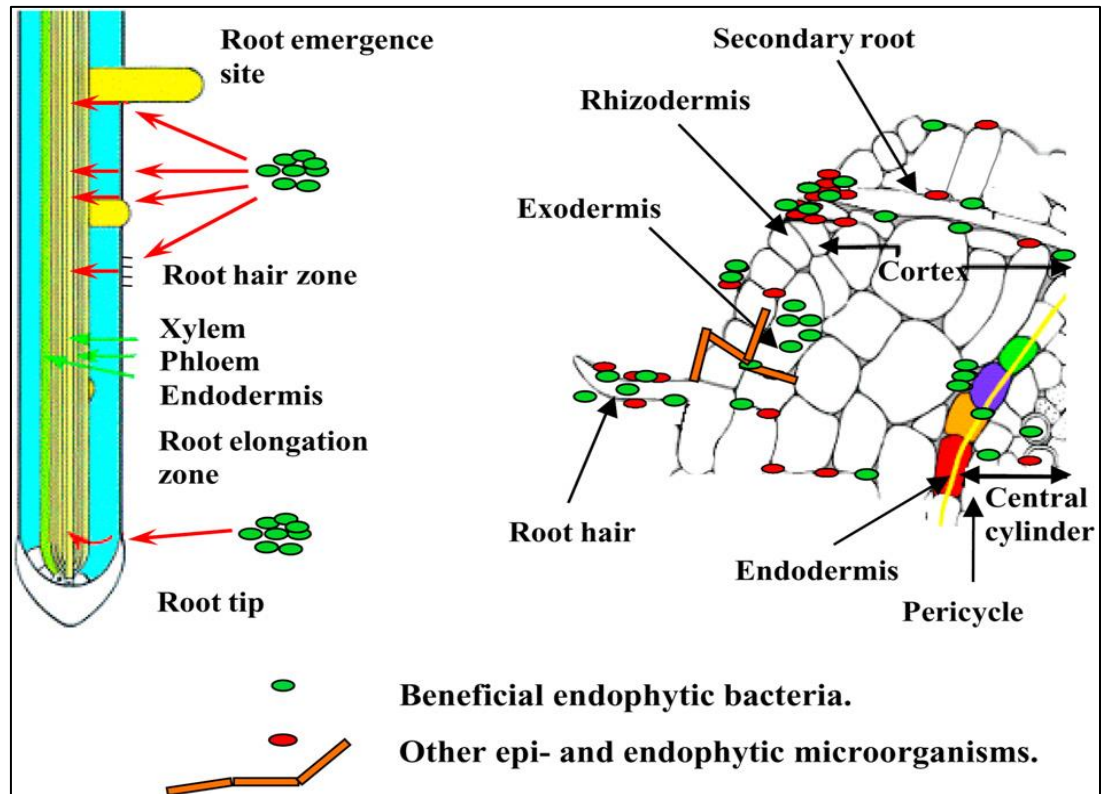


Figure 1.16 : Sites de colonisation de plantes par des bactéries endophytes [248].

Des mécanismes actifs ou passifs pour les processus de translocation des bactéries endophytes au sein de leurs plantes hôtes ont été rapportés, leur permettant de passer du rhizoplan au cortex du système racinaire. Une fois que les bactéries atteignent la zone corticale de la racine, une barrière, telle que l'endoderme, peut empêcher la colonisation, car peu de bactéries peuvent traverser l'endoderme [288]. Il est probable que les endophytes capables de traverser l'endoderme sont susceptibles de sécréter des CWDE leur permettant de poursuivre la colonisation à l'intérieur de la racine [289]. Dans des conditions naturelles, certaines bactéries délétères peuvent en outre perturber l'endoderme, permettant ainsi aux bactéries endophytes de pénétrer simultanément dans le cylindre central (Figure 1.16). Après avoir traversé cette barrière, les bactéries endophytes doivent pénétrer dans le péricycle pour atteindre les vaisseaux radiculaires de leurs hôtes (Figure 1.17). Ce constat a été observé chez

Herbaspirillum seropedicae Z67 avec le riz [289] et chez la souche PsJN de *B. phytofirmans* avec la vigne [275, 276], qui est le cas de nombreuses autres bactéries endophytes.

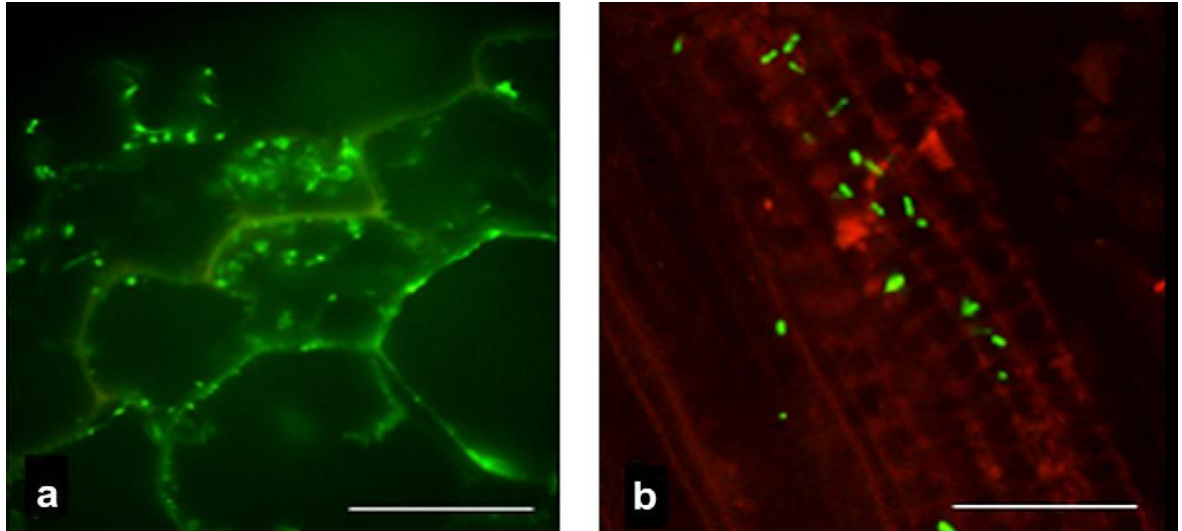


Figure 1.17 : Colonisation endophyte d'une bactérie favorisant la croissance des plantes (*Burkholderia phytofirmans* PsJN) observée par hybridation *in situ* en fluorescence (a) ou avec marquage *gfp* (b) montrant des cellules bactériennes sous forme de bâtonnets verts à l'intérieur du cortex (a) ou de vaisseaux du xylèmes (b) à fluorescence verte. Barres d'échelle: (a) 25 μm et (b) 10 μm [276].

1.6.3 Facteurs influençant la colonisation rhizosphérique

De nombreux paramètres biotiques et abiotiques sont impliqués pour modeler la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère, tant en termes de diversité que d'effectifs [290, 291]. Certains facteurs influent sur le processus d'exsudation racinaire et par conséquent, sur la compétence rhizosphérique des bactéries [209].

Plusieurs études indiquent que les caractéristiques du sol [292, 293, 294, 295], sont les facteurs les plus importants dans le modelage de la biomasse et la structure des rhizobactéries, telles que le pH du sol, la disponibilité en éléments nutritifs, la solubilité des métaux et le contenu en carbone [296] et en azote [297], l'humidité des sols, la salinité [298, 299] et les changements climatiques [300].

D'autre part, Les exsudats racinaires jouent un rôle clé dans le processus de colonisation rhizosphérique. Ces exsudats sont utilisés par les microorganismes endémiques comme signaux chimiques en plus d'être un

substrat nutritif disponible pour la croissance et le développement de ces microorganismes dans la rhizosphère [301, 302, 303]. Ainsi, de nombreuses études montrent l'effet génotype des plantes sur la rhizodéposition, un facteur majeur affectant les structures des communautés rhizosphériques [292, 304, 305]. Cet effet varie en fonction de l'espèce végétale ou les variétés et les écotypes considérés [306, 307], mais également en fonction du stade de croissance de la plante [308]. Ainsi, Les propriétés phénotypiques des racines telles que la structure du système racinaire, le profil d'exsudation et la capacité d'acquisition de nutriments et d'eau varient en fonction du génotype de la plante et affectent les interactions avec les populations microbiennes [292].

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expérimentations ont été réalisées au niveau du Laboratoire de Protection et de Valorisation de Ressources Agrobiologiques (LPVRAB, Faculté SNV, Université Blida-1) au laboratoire, sous serre et en plein champ. L'objectif étant de mettre en évidence et de tester l'efficacité de souches de rhizobactéries, via l'étude des processus de nodulation et de phytostimulation, dans le contexte de la continuité de travaux entamés précédemment [35, 36].

2.1. Le sol

Le sol, utilisé dans nos expérimentations, provient d'une parcelle nue, non cultivée depuis au moins deux décennies, située dans la station expérimentale du département de biotechnologie. Les caractéristiques physicochimiques du sol ont été étudiées au niveau du laboratoire de pédologie [309] (pH = 6.7, K 0.63%, Na 2.63%, capacité d'échange cationique 12.5 meq /100 g de sol, phosphore assimilable 189.33 ppm, teneur en matière organique 1.89 %). Le sol recueilli de la station expérimentale a été séché à l'air libre, tamisé (2 mm) afin d'éliminer les éléments grossiers et d'assurer une granulométrie homogène, puis désinfecté par autoclavage (trois autoclavages de 30 minutes à 120°C et à 24 heures d'intervalle) pour inhiber la microflore native.

2.2. Matériel biologique

2.2.1. Souches bactériennes

Les expérimentations ont été réalisées avec des souches sélectionnées de *Pseudomonas fluorescens* et de *Rhizobium fabae* (Tableau 2.1).

Trois souches de *Pseudomonas fluorescens* : S20, CHAO et P64. Les souches S20 et P64 ont été isolées, respectivement, de la rhizosphère du palmier dattier dans la région de Ghardaïa et de la rhizosphère de l'abricotier dans la région de Mitidja [310]. Ces souches ont fait l'objet de différents travaux antérieurs, ayant permis leur sélection sur la base de leurs potentialités

d'antagonisme et de phytostimulation [20, 35, 36]. La souche CHA0 est considérée comme souche type de référence, utilisée dans de nombreux travaux de recherche et d'expérimentation [311, 18, 312, 313, 189, 314]. Cette souche est connue par ses effets bénéfiques dans le biocontrôle et la promotion de la croissance végétale, elle se caractérise par la production de divers métabolites secondaires, notamment les pyoverdines, l'HCN et les phénazines [214, 315].

Deux autres souches rhizobiennes : *Rhizobium fabea* (R1 et R2) sont également expérimentées pour leurs potentialités symbiotiques. Ces souches ont été isolées à partir de nodules de la fève cultivée dans deux sites différents dans la région de Cherchell (Tipaza, Algérie) dans une étude précédente réalisée par Chennaoui [35]. Les procédures d'isolement, d'identification et de caractérisation ont été effectuées selon la méthode adoptée par Grainger [316]. Les racines de la fève présentant des nodules ont été découpées et rincées à l'eau courante. Une désinfection superficielle a été réalisée par le passage dans de l'eau javellisée (6°, 2 mn), suivi d'une désinfection à l'alcool (97°, 2 mn), et de trois rinçages consécutifs à l'eau distillée stérile de trois minutes chacun. Le nodule est pris avec une pince et un scalpel stérile et incisé avant de le déposer dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDAE (potato dextrose agar + extrait de levure) (Appendice 1). L'incubation a été effectuée pendant 4 jours à 27°C.

2.2.1.1. Identification des bactéries *Rhizobium*

En l'absence de critères biochimiques déterminatifs absolus, nous nous sommes basés sur les caractéristiques d'appartenance au genre *Rhizobium* additionnées au pouvoir nodulant (formation de nodosités) sur les racines de la légumineuse d'origine (la fève), après réinoculation, en environnement stérile. La présélection des souches assimilées à *Rhizobium* s'est basée, notamment sur les caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques [317]. Les caractéristiques recherchées sont, surtout, l'apparence et l'élasticité de la colonie bactérienne, ainsi que la forme, le diamètre, l'élévation et la couleur [318, 319]. En plus de ces caractères la coloration de Gram a été effectuée selon la technique décrite par Prescott [320] (Appendice 1).

2.2.1.2. Pouvoir nodulant

Afin d'étudier le pouvoir nodulant des souches isolées, des graines de fève (*Vicia faba*, var. *hista*) ont été semées dans du sol, désinfecté préalablement, et bactérisés avec une suspension préparée à partir des souches bactériennes à tester. Cet examen est réalisé en cinq répétitions pour chaque souche bactérienne, avec un témoin non bactérisé, pendant une période de 30 jours.

L'aspect macromorphologique observé chez les colonies isolées, montre des spécificités propres aux colonies des *Rhizobium* à savoir, des colonies circulaires, bombées, lisses, visqueuses de 2 à 4 millimètres de diamètres, avec une pigmentation similaire à celle de la couleur de l'agar. La reinoculation des souches de *Rhizobium*, nous a permis de sélectionner deux souches ayant provoqué la formation de nodules sur les racines des plants de fève : *Rhizobium fabae* R1 et *Rhizobium fabae* R2.

Tableau 2.1 : Souches rhizobactériennes

Souches bactériennes	Plante hôte	Origine	Référence
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	Tabac	Suisse	[314]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> S20 <i>Pseudomonas fluorescens</i> P64	Palmier dattier, Abricotier	Algérie	[321, 20]
<i>Rhizobium fabae</i> R1 et R2	Fève	Algérie	[35, 36]

2.2.1.3. Préparation des inoculats

La pureté des souches de *Pseudomonas* a été vérifiée sur le milieu King B [322] (Appendice 1) et celle des souches de *Rhizobium* sur le milieu PDAE, en réalisant plusieurs repiquages successifs. Les souches purifiées ont été conservées à 4°C. L'inoculum des souches de *Pseudomonas* a été obtenu après incubation de 24 à 36 heures à 25 °C sur milieu King B; celui des souches de *Rhizobium*, a été préparé à partir de cultures bactériennes de 4 jours à 25 °C sur milieu PDAE. Les suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau distillée stérile, pour obtenir des concentrations de 10^8 CFU/ml ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu), aux longueurs d'onde $\lambda = 580$ nm pour *Pseudomonas*, et 600 nm pour *Rhizobium*.

2.2.2. Matériel végétal

Nos expérimentations ont été réalisées par l'interaction des rhizobactéries avec trois espèces végétales : le blé dur (*Triticum durum* var. waha), la tomate (*Lycopersicum esculentum* var. Heinz 1370) et la fève (*Vicia faba* L. var. Histal). Les graines ont été désinfectées par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (10 %, 10 mn), lavées cinq fois consécutives avec de l'eau distillée stérile et laissées pour séchage sur papier absorbant. Ces graines ont été déposées dans des boîtes Pétri stériles, tapissées de papier filtre imbibé d'eau distillée stérile, pour prégermination (48h, 20°C).

2.3. Compétence rhizosphérique

L'étude de la rhizocompétence porte sur la mise en évidence de l'effet de la plante sur les aptitudes des souches de *Pseudomonas* à coloniser la rhizosphère. Cette interaction a été réalisée avec les trois espèces végétales, citées précédemment, bactérisées avec les trois souches bactériennes S20, CHA0 et P64.

L'essai a été conduit dans des microcosmes (Figure 2.1) conçus selon la description de Latour *et al.* [19]. Chaque microcosme est composé de :

- Un tube à essai (150 mm x 25 mm) contenant de l'eau distillée stérile à 1/3 de son volume, pour que la mèche absorbante assure par remontée capillaire un niveau d'humidité constant dans le sol.
- Une mèche de tissus absorbant (8 cm de long et 2 cm de large), dans l'extrémité haute a été introduite dans le sol et l'autre a été plongée dans le tube contenant de l'eau distillée stérile.
- Une seringue stérile de 5 ml contenant le sol, dont l'aiguille a été sélectionné et remplacé par un tube en plastique cylindrique (3 cm de long) assurant le passage de la mèche absorbante.

2.3.1. Inoculation des microcosmes

Les graines, de tomate, de blé dur ou de fève, préalablement désinfectées et prégermées ont été semés dans des tubes contenant 9 g de sol et recouvertes immédiatement par 1g de sol, pour avoir 10 g de sol dans chaque microcosme.

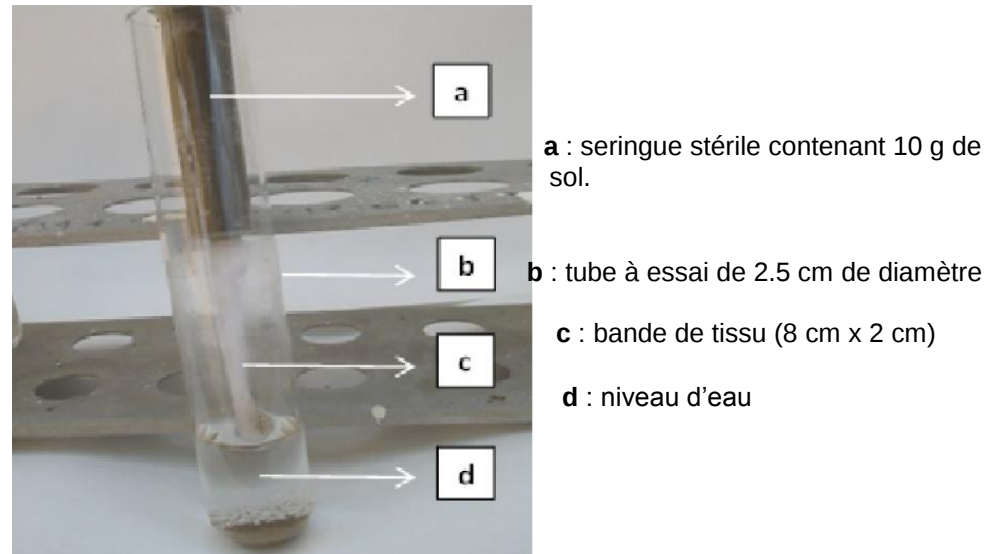


Figure 2.1 : les différents constituants du microcosme.

Les microcosmes sont bactérisés par les suspensions bactériennes à raison de 10^8 CFU/g de sol, selon les traitements étudiés, puis déposés en chambre de culture pendant 30 jours (25 °C, photopériode de 16 heures). L'essai a été mis en place selon un dispositif en randomisation totale de neuf traitements avec 12 répétitions:

- T1, T2, T3 : Plants de blé, de tomate ou de fève bactérisés par la souche P64.
- T4, T5, T6 : Plants de blé, de tomate ou de fève bactérisés par la souche CHA0.
- T7, T8, T9 : Plants de blé, de tomate ou de fève bactérisés par la souche S20.

2.3.2. Dénombrement bactérien

Le suivi de la dynamique des populations bactérienne a été effectué après 15 et 30 jours d'incubation. Pour chaque traitement cinq microcosmes ont été analysés à chaque date de prélèvement. Après avoir découpé les parties aériennes, au ras du sol, avec un scalpel désinfecté, le contenu de chaque seringue (sol + système racinaire), a été récupéré et homogénéisé dans 90 ml d'eau distillée stérile. La suspension obtenue a été mixée pendant 5 mn à l'aide d'un mixeur (Blender). 1 ml de la mixture a été versé dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile et nous avons préparé une série de dilutions de 10 en 10. Le dénombrement bactérien a été effectué sur milieu KB, ensemencé

avec 0.1 ml de chacune des dilutions suivantes: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} . Les opérations d'ensemencement sont réalisées par étalement, à l'aide de billes en verre, en effectuant trois répétitions par dilution. L'incubation s'est réalisée à 25°C pendant 24 à 48 heures.

Selon le protocole de dénombrement établi au laboratoire d'écologie microbienne et pathologie des sols (UMR-INRA-Dijon-France), seulement les boîtes présentant entre 30 et 600 colonies seront retenues. Le calcul de la concentration bactérienne de la solution mère se fait selon la formule suivante :

$$\text{Concentration de la solution mère} = \text{Nombre de colonies} / (\text{Volume} \times \text{dilutions})$$

2.4. Essais de nodulation et de phytostimulation

L'expérimentation a été réalisée afin d'évaluer les potentialités de la nodulation induites par la combinaison de souches de *R. fabae* (R1 et R2) avec les souches de *P. fluorescens* (S20, CHAO et P64) et ses conséquences sur la phytostimulation et la croissance de la fève. Dans le but d'établir une comparaison entre les différentes conditions d'expérimentation, cette étude s'est déroulée en conditions expérimentales semi-contrôlée (sous serre en verre) et en conditions naturelles de plein champ.

2.4.1. Expérimentation sous serre

L'expérimentation a été réalisée sous serre en verre, aérée par des fenêtres latérales et chauffée par des radiateurs. Le semis a été réalisé dans des pots en plastique d'une capacité de 2000 ml. Les pots ont été désinfectés par l'hypochlorite de sodium (1 %) et leur fond a été recouvert d'une couche de gravier de 1 cm d'épaisseur, pour assurer un bon drainage, et remplis par le substrat désinfecté (2/3 de sol + 1/3 de tourbe). Les graines de fève, préalablement désinfectées, ont subi une prégermination sur papier filtre stérile imbibé d'eau durant trois jours (26 à 27°C).

2.4.1.1. Inoculation bactérienne

Avant le semis, les graines de la fève préalablement désinfectées et mises à germer ont été bactérisées avec les différentes souches de *Pseudomonas*, selon les différents traitements. La tourbe stérile a été utilisée à titre de support

dans la préparation finale de l'inoculum à appliquer. A cet effet, un volume de 50 ml de la suspension bactérienne est mélangé avec 20 g de tourbe ($2,5 \times 10^8$ CFU /g), pour obtenir une pâte qui s'adhère facilement sur les graines. Dans le cas du témoin non bactérisé, les semences sont placées dans la tourbe imbibée avec de l'eau distillée stérile (Figure 2.2).

Les semences enrobées avec la pâte de tourbe ont été laissées pendant une heure pour assurer une bonne adhésion des bactéries. Le semis a été réalisé dans des pots préalablement arrosés pour assurer une humidité suffisante à l'installation des bactéries.

Afin d'assurer un niveau suffisant en populations bactériennes dans les pots, deux rappels de bactérisation, pour chaque souche, ont été réalisés après une et deux semaines suivant le semis, à l'aide d'une seringue contenant 10 ml de suspension bactérienne à la même concentration initiale.

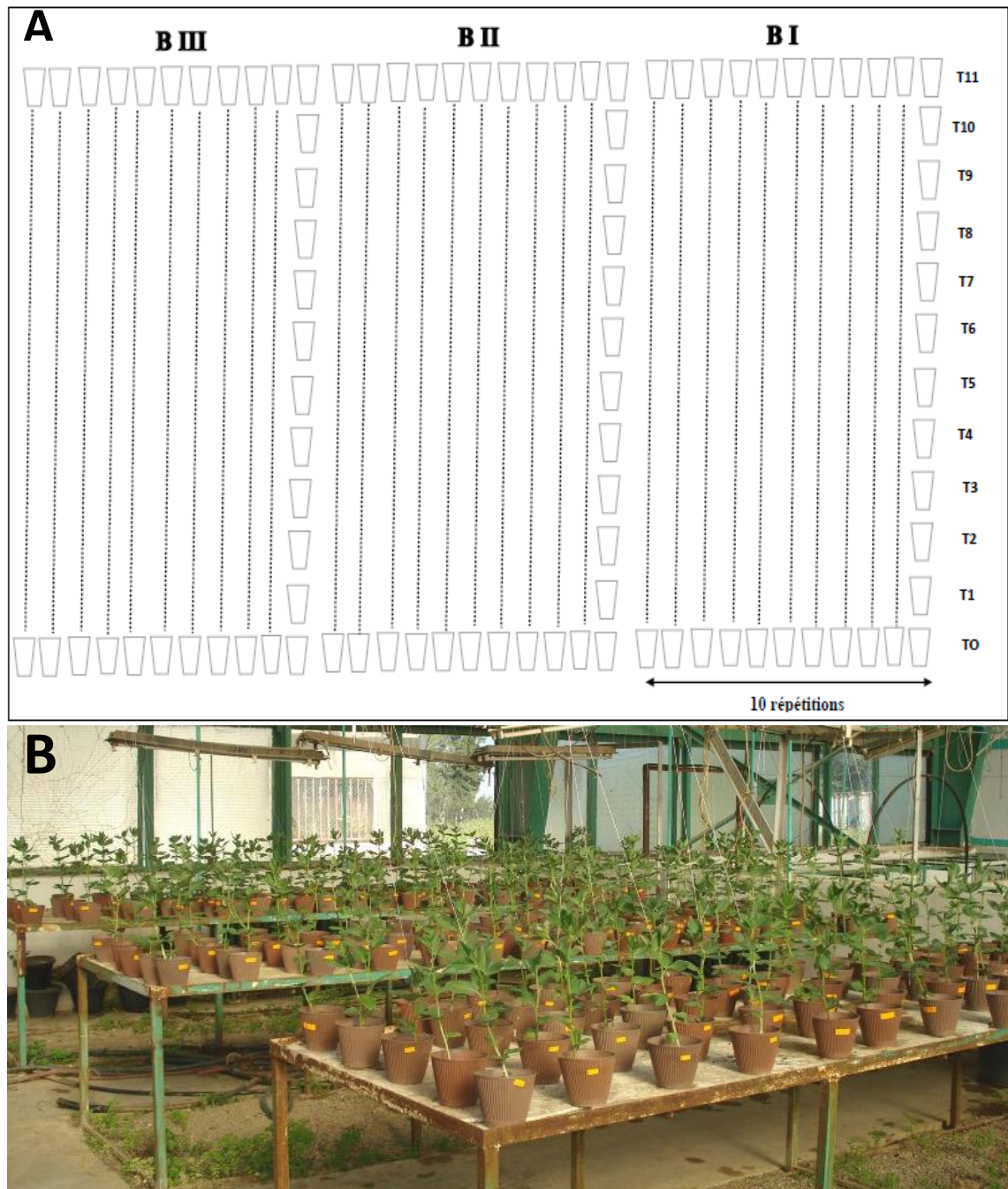


Figure 2.2 : Semences de fève enrobées avec la pâte de tourbe.

L'inoculation avec les souches de *Rhizobium* a été effectuée trois jours après le semis (après la formation des racines et des poils absorbants). Deux rappels de bactérisation ont été réalisés après 20 jours et après un mois du semis. Durant la croissance de la plante, l'arrosage des pots a été effectué de manière à satisfaire les besoins de la plante en eau.

2.4.1.2. Dispositif expérimental

L'essai a été mis en place suivant un dispositif en trois blocs aléatoires complets (blocs I, II et III). Dans chaque bloc figurent les 12 traitements étudiés où chaque traitement est représenté par dix plants par bloc, soit trente plants par traitement (Figure 2.3, A et B).



T0 (plants témoins non bactérisés) ; **T1, T2, T3, T4 et T5** (plants bactérisés respectivement par : R1, R2, S20, CHAO et P64) ; **T6, T7, T8, T9, T10 et T11** (plants bactérisés respectivement par les combinaisons : S20-R1, S20-R2, CHAO-R1, CHAO-R2, P64-R1 et P64-R2)

Figure 2.3, A et B : Dispositif expérimental de l'essai sous serre.

Les différents traitements étudiés sont :

- **T0** : Plants témoins non bactérisés.
- **T1, T2** : Plants bactérisés respectivement avec les souches R1 et R2.
- **T3, T4, T5** : Plants bactérisés respectivement avec les souches S20, CHAO et P64.
- **T6** : Plants bactérisés avec les souches S20 et R1 (R1 témoin)
- **T7** : Plants bactérisés avec les souches S20 et R2 (R2 témoin)
- **T8** : Plants bactérisés avec les souches CHAO et R1 (R1 témoin)
- **T9** : Plants bactérisés avec les souches CHAO et R2 (R2 témoin)
- **T10** : Plants bactérisés avec les souches P64 et R1 (R1 témoin)
- **T11** : Plants bactérisés avec les souches P64 et R2 (R2 témoin)

2.4.1.3. Vérification de la colonisation rhizosphérique

Dans le but d'évaluer le pouvoir colonisateur des souches de *Pseudomonas fluorescens*, une vérification de l'installation des bactéries au niveau de la rhizosphère a été effectuée. A cet effet, des fragments de racines sont prélevés des différents traitements, suivis de plusieurs rinçages avec de l'eau distillée stérile et séchés séparément sur papier filtre stérile. Chaque fragment a été déposé aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant le milieu King B. Les observations ont été effectuées 24 à 72 heures après incubation à 27 °C.

Pour l'étude de la dynamique des populations bactériennes, un dénombrement bactérien a été effectué pour les plantes cultivées sous serre.

A la fin du cycle de suivi de la culture (50 jours); les racines intactes des plantes échantillonnées sont découpées à partir de la partie aérienne et débarrassées de l'excès du sol adhérent. 1g de racine est pesé précisément et mis dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile (10^{-1}). Après homogénéisation, et à partir de cette dilution, une série de dilutions successives au $10^{\text{ème}}$ ont été réalisées avec de l'eau distillée stérile, jusqu'à la dilution 10^{-7} .

Des ensemencements ont été effectués avec les dilutions 10^{-3} , 10^{-5} et 10^{-7} . Un volume de 0.1 ml de chaque dilution est ensemencée sur la surface de la boîte de Pétri contenant le milieu King B, avec trois répétitions pour chaque dilution.

Après incubation de 24 à 48 heures à 27°C, le dénombrement des colonies a été effectué, les résultats sont exprimés en CFU/g, il s'agit de la moyenne de nombre de colonies comptées avec les trois dilutions.

2.4.2. Expérimentation en plein champ

L'essai en plein champs a été conduit dans une parcelle nue de la station expérimentale du département de biotechnologie, dont les caractéristiques physicochimiques du sol ont été décrites précédemment. Avant le semis, la parcelle d'essai a été labourée en sec à l'aide d'une charrue à disque et a subi un passage du cover crop, pour assurer un maximum d'homogénéité et de régularité du lit de semence.

2.4.2.1. Inoculation bactérienne

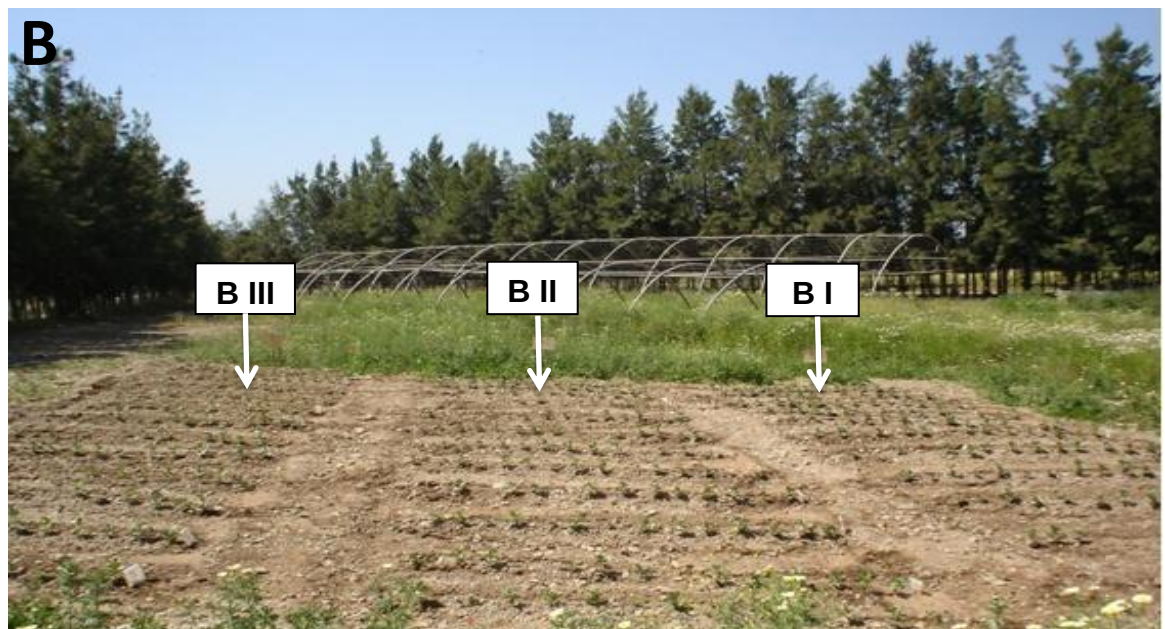
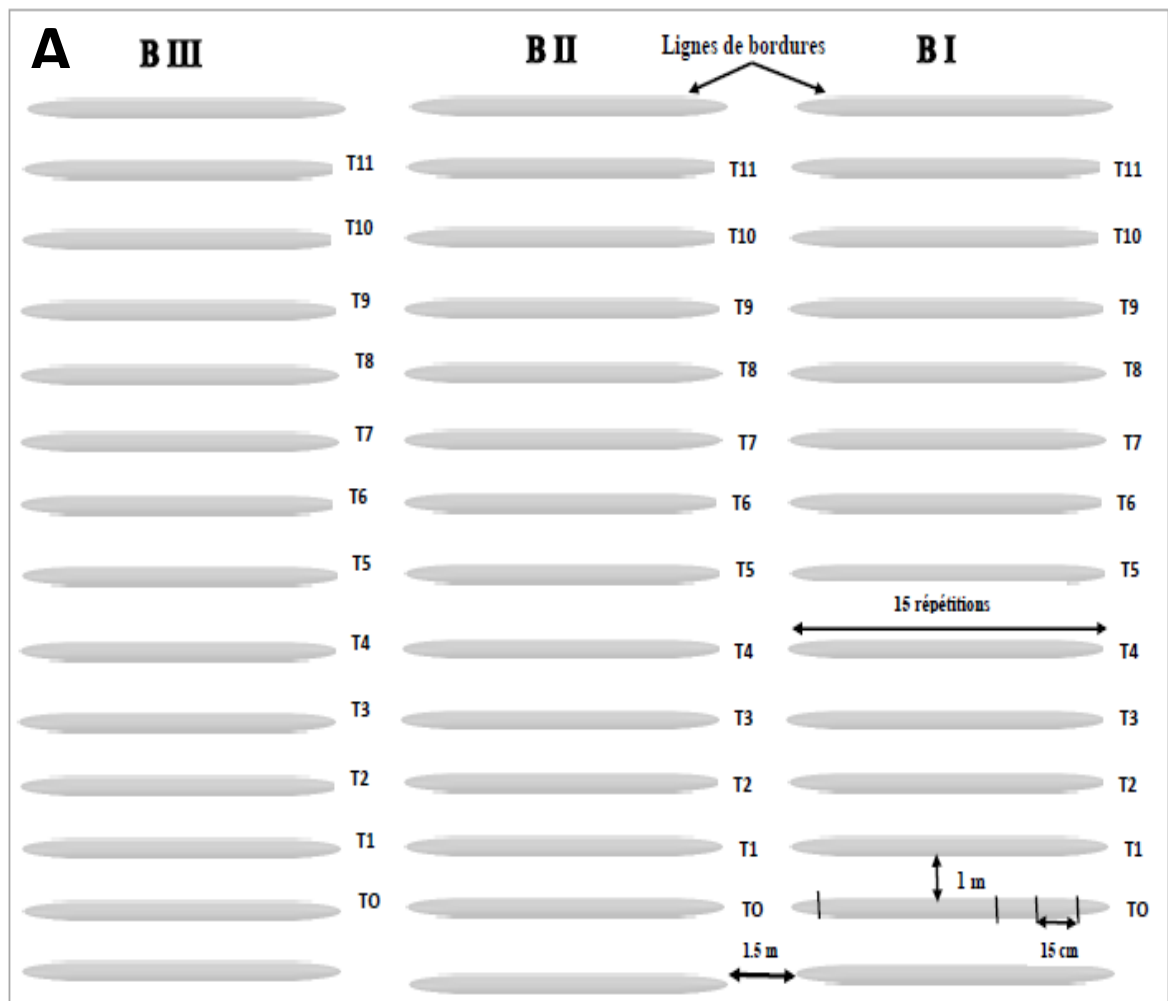
Après la désinfection et le trempage des semences de la fève, durant toute une nuit dans de l'eau distillée stérile, ces dernières ont été enrobées avec une patte de tourbe imbibée avec l'inoculum bactérien, selon la désignation des traitements concernant les souches de *Pseudomonas fluorescens*.

Les graines enrobées ont été semées en plein champs, selon le dispositif expérimental adopté et après un arrosage effectué la veille du semis. L'inoculation avec les deux souches de *Rhizobium* a été réalisée 10 jours après le semis. Deux rappels de bactérisation ont été effectués après 30 jours et après 45 jours du semis. L'irrigation a été assurée manuellement, à l'aide d'arrosoir, quotidiennement, et particulièrement en périodes sèches.

2.4.2.2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental adopté est en blocs aléatoires complets avec trois répétitions. Chaque bloc est composé de 12 lignes correspondant aux 12 traitements étudiés. La fève a été semé à 4 à 5 cm de profondeur et distant de 15 à 20 cm environ, en lignes espacées de 1 m pour éviter d'éventuelles contacts racinaires entre les plants des différents traitements. Chaque ligne comporte 15 répétitions (Figure 2.4, A et B).

Les mêmes traitements étudiés dans l'expérimentation sous serre, sont appliqués en plein champs, à savoir : **T0** (plants témoins non bactérisés) ; **T1, T2, T3, T4 et T5** (plants bactérisés respectivement par : R1, R2, S20, CHAO et P64) ; **T6, T7, T8, T9, T10 et T11** (plants bactérisés respectivement par les combinaisons : S20-R1, S20-R2, CHAO-R1, CHAO-R2, P64-R1 et P64-R2).



T0 (plants témoins non bactérisés) ; **T1, T2, T3, T4 et T5** (plants bactérisés respectivement par : R1, R2, S20, CHAO et P64) ; **T6, T7, T8, T9, T10 et T11** (plants bactérisés respectivement par les combinaisons : S20-R1, S20-R2, CHAO-R1, CHAO-R2, P64-R1 et P64-R2).

Figure 2.4, A et B : Dispositif expérimental de l'essai en plein champs.

2.4.3. Evaluation de la phytostimulation

Afin d'évaluer les effets bénéfiques de la bactérisation avec *Pseudomonas fluorescens* en combinaison avec *Rhizobium fabae*, sur la nodulation et la phytostimulation des plants de fève, cultivées sous serre ou en plein champs, nous nous sommes intéressés à la mesure de trois types de paramètres : les paramètres de croissance relatifs au développement des parties aériennes et racinaires, la nodulation et la teneur en matière azotée totale. Ces paramètres ont été évalués au prélèvement, après 50 jours du semis.

2.4.3.1. Hauteur des tiges et longueur des racines

Les de la longueur des deux parties, aérienne et racinaire, exprimées en centimètre (cm), sont effectuées au prélèvement, sur cinq plants au hasard, déterrées soigneusement et débarrassés des substrats.

2.4.3.2. Poids frais et sec de la biomasse aérienne et des racines

Dans chaque essai et de chaque traitement cinq plants récoltés, au hasard, sont préalablement débarrassés du sol adhérent ; les deux parties, aérienne et racinaire sont séparées et pesées immédiatement pour déterminer les poids frais, puis étiquetées et desséchées à l'étuve à 80°C pendant 72 heures jusqu'au poids sec constant. Les valeurs de ces paramètres sont exprimées en gramme (g).

2.4.3.3. Nombre de nodules

Le nombre de nodules par plant échantillonné, de chaque traitement, a été compté au prélèvement, où la partie racinaire de chaque plant est soigneusement débarrassée du substrat adhérent suivi par un rinçage approprié, afin de dénombrer les nodules développés sur ses racines.

2.4.3.4. Teneur en matière azotée totale

La teneur en azote totale de la partie aérienne, pour 100 g de matière sèche, exprimée en matière azotée totale (MAT), est mesurée selon la méthode de Kjeldahl [323].

2.4.3.4.1. Minéralisation

L'opération s'effectue sur un échantillon de 2g qu'on introduit dans un matras de 250 ml avec 2 g de catalyseur (Appendice 1) et 20 ml d'acide sulfurique pur ($d = 1.84$). Le matras est porté sur un support d'attaque et chauffé jusqu'à décoloration du liquide ou obtention d'une couleur verte stable. Après

refroidissement, on ajoute peu à peu, avec précaution 200 ml d'eau distillée en agitant et en refroidissant sous un courant d'eau.

2.4.3.4.2. Distillation

50 ml du contenu du matras sont transversés dans l'appareil distillateur (Büchi). Dans un bécher destiné à recueillir le distillat, on met 20 ml de l'indicateur (Appendice 1).

50 ml de solution de soude ($d = 1.33$) sont versés dans l'appareil distillateur. L'attaque doit se faire jusqu'à obtention d'au moins 100 ml de distillat, on titre en retour par de l'acide sulfurique (N/20) jusqu'à obtention de la couleur initiale de l'indicateur.

$$1 \text{ ml d'H}_2\text{SO}_4 (1\text{N}) \longrightarrow 0.014 \text{ g (d'N)}$$

$$1 \text{ ml d'H}_2\text{SO}_4 (\text{N}/20) \longrightarrow 0.0007 \text{ g (d'N)}$$

$$N (\text{g}) = X \times 0.0007 \times 100/Y \times 200/A.$$

X: descente de la burette (en ml).

Y : poids de l'échantillon de départ.

A : volume de la prise d'essai.

$$\text{MAT (MS)} = N (\text{g}) \times 6.25$$

2.4.4 Analyse statistique

Pour la phytostimulation de la croissance, les résultats des pourcentages ont été comparés par le test de Student ($\alpha=5\%$), test de comparaison des proportions. Les paramètres de phytostimulation et les résultats des dénombrements bactériens ont subi une analyse de la variance et de la comparaison des moyennes selon le test Newman-Keuls au seuil de risque d'erreur $\alpha = 5\%$ [324], en utilisant le logiciel STATISTICA.

2.5. Analyse *in silico*

Notre recherche bioinformatique a ciblé des gènes portés par *Rhizobium* et *Pseudomonas* dont les séquences nucléotidiques et protéiques sont soumises et archivées dans la banque de données Genbank, hébergée sur le portail NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.5.1. Espèces de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* et gènes concernés

En l'absence de travaux de séquençage sur les isolats rhizobiens (R1et R2) utilisés dans ce travail, nous avons ciblé dans la banque de données, les séquences biologiques d'espèces rhizobiennes, porteuses de gènes similaires et impliqués dans les processus de nodulation. En ce qui concerne, *Pseudomonas*, nous avons ciblé les séquences génomiques de la souche de référence CHA0, utilisé dans notre travail (Tableau 2.1), et à titre comparatif et illustratif, en plus d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* et une autre de *Pseudomonas putida*.

2.5.1.1. *Rhizobium*

- *Rhizobium fabae* [325]
- *Rhizobium leguminosarum* [326]
- *Rhizobium pisi* [326]
- *Rhizobium etli* [327]
- *Rhizobium gallicum* [328]
- *Rhizobium phaseoli* [326]
- *Rhizobium leucaenae* [329]
- *Rhizobium giardinii* [328]
- *Rhizobium tropici* [330] (Appendice D)

Les différentes séquences ciblées (gènes et protéines) pour les souches de *Rhizobium* (Appendice D) sont :

- Gène ARNr 16S,
- Gène *nodC*,
- Gène *nifH*,
- Protéine nitrogénase
- Gène de ménage :
 - sous-unité β de l'ADN polymérase (*rpoB*),
 - sous-unité β de l'ADN gyrase (*gyrB*).

2.5.1.2. *Pseudomonas*

- *Pseudomonas protegens* [331]
- *Pseudomonas fluorescens* [332]
- *Pseudomonas putida* [333] (Appendice D)

Les différents gènes et protéines concernés pour les souches de *Pseudomonas* (Appendice D) sont :

- ARNr 16S (rrs),
- Facteur sigma d'ARN polymérase (RpoD),
- Protéine HCN (hydrogene cyanide synthase),
- Protéine TonB.

2.5.2. Alignement multiple (ClustalW)

Les séquences de chaque gène, ou chaque protéine, sont soumises au programme ClustalW pour la réalisation d'alignement multiple. L'algorithme mesure les meilleures identités (score de l'alignement) à partir d'un ensemble de séquences (taxons). Il fait ressortir la meilleure paire de séquences ayant le meilleur score d'alignement, puis continue toutes les comparaisons pour finir avec la dernière séquence à inclure dans l'alignement multiple [334]. Ainsi, les séquences les plus identiques sont alignées en premier puis les plus distantes ou les plus divergentes. Le nombre d'alignements possibles entre n séquences est donné par la relation :

$$\frac{n \times (n - 1)}{2}$$

L'alignement multiple fait ressortir des zones de forte similarité et / ou des zones de faible similarité. Les premières indiquent une forte conservation des nucléotides (ou des acides aminées) entre les séquences. Au contraire, les zones de faible similarité retrouvées dans l'alignement multiple s'expliquent par des taux de mutations (substitutions ou insertions / délétions) très élevées entre les séquences alignées.

L'alignement multiple a concerné les séquences de chacun des gènes et des protéines retenus pour cette étude. Ces séquences ont été enregistrées sous le format FASTA pour pouvoir les utiliser dans leur traitement avec le logiciel MEGA.

2.5.3. Construction des arbres phylogénétiques

Le programme MEGA (version 6.0) a été utilisé pour construire les arbres phylogénétiques entre les différents taxons. Après avoir aligné les séquences nucléotidiques des différents gènes, les arbres phylogénétiques sont construits par le programme MEGA 6.0 en utilisant la méthode neighbor-joining (NJ).

CHAPITRE 3

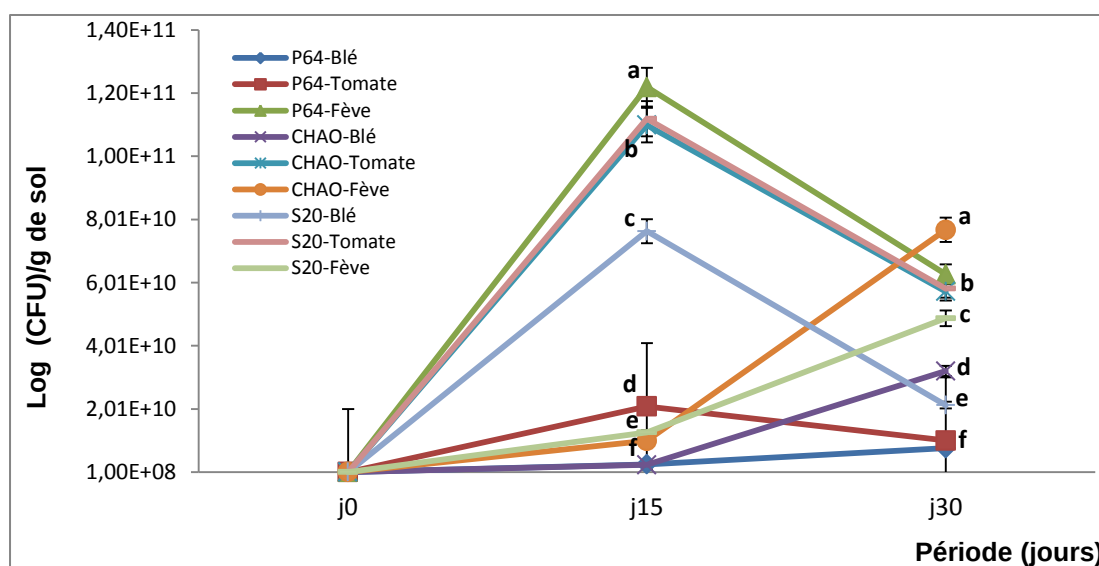
RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Compétence rhizosphérique

3.1.1 Dénombrements bactériens

Il est à rappeler que les dénombrements bactériens ont été réalisés à deux différentes périodes, après 15 et 30 jours du semi. Les résultats des différents microcosmes, les trois plantes confondues (blé, tomate et fève), montrent une évolution significative des populations des trois souches (P64, CHAO et S20) par rapport aux apports initiaux (10^8 CFU/ g de sol). En effet après 15 jours du semis, les densités sont de l'ordre de 10^9 à 10^{11} CFU/ g de sol (Figure 3.1).

Après 30 jours, nous avons noté une légère diminution pour la plupart des interactions étudiées, à l'exemple de P64-Fève et CHAO-Tomate, où les niveaux sont passés, respectivement, de $1,22 \cdot 10^{11}$ à $6,27 \cdot 10^{10}$ CFU/g de sol et de $1,10 \cdot 10^{11}$ à $5,73 \cdot 10^{10}$ CFU/g de sol, toutefois, ces densités restent plus élevées comparativement aux apports initiaux (10^8 CFU/ g de sol) (Figure 3.1).



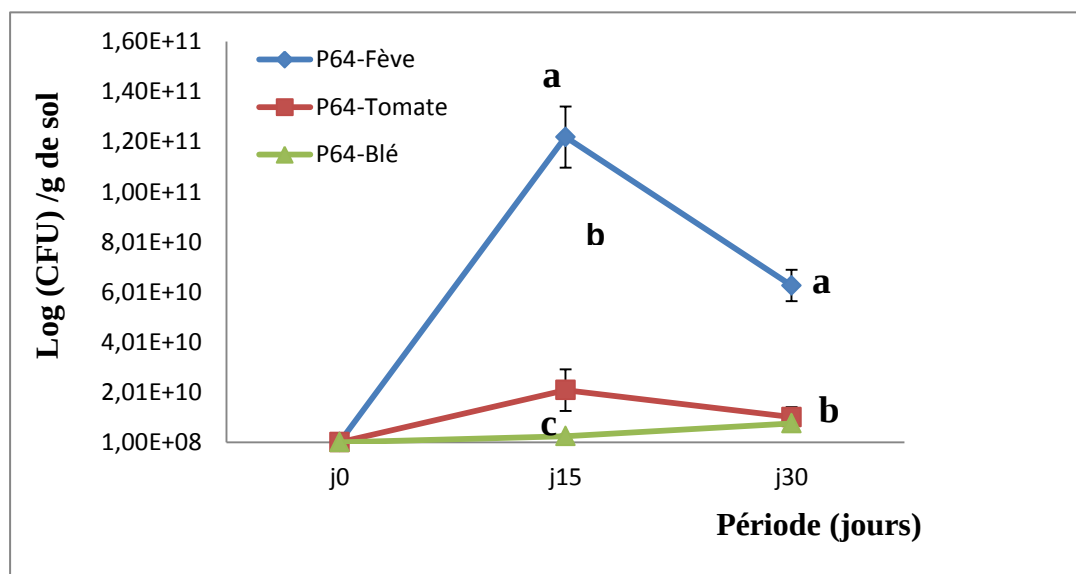
Les valeurs mentionnées avec différentes lettres sont significativement différentes selon le test de classement des moyennes (Newman-Keuls $\alpha = 5 \%$)

Figure 3.1 : Evolution des populations bactériennes (P64 CHAO S20) en fonction du temps dans les microcosmes des trois plantes.

En analysant les niveaux de colonisation de chaque souche bactérienne, après 15 jours de la bactérisation, nous constatons une nette évolution de leurs densités respectives (Figures 3.2, 3.3 et 3.4).

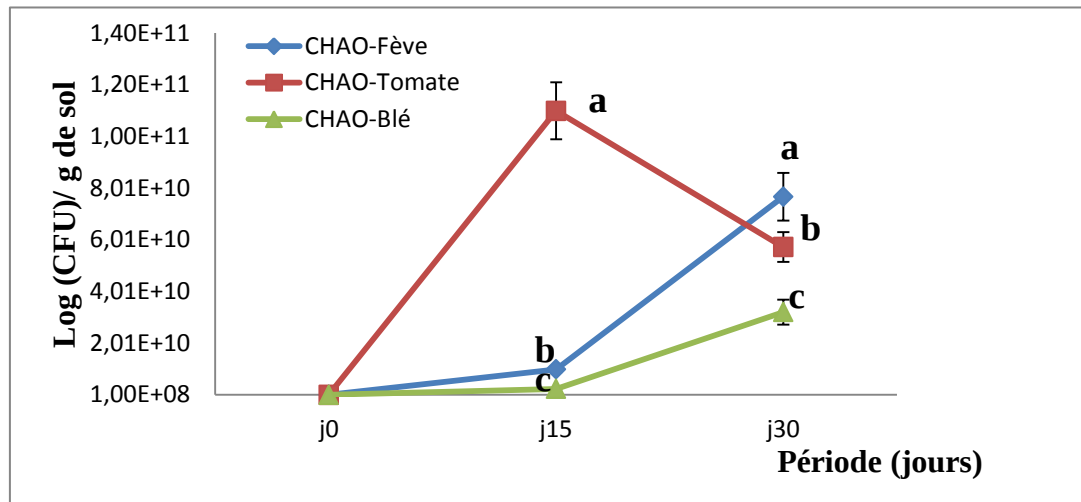
Les densités bactériennes des interactions P64-fève, S20-tomate et CHAO-tomate, formant le groupe (a), sont les plus élevées et se situent à plus de 10^{11} CFU/ g de sol. Les interactionnistes P64-tomate, CHAO-fève et S20-blé, classées dans le groupe homogène (b), présentent des densités avoisinant 10^9 à 10^{10} CFU/ g de sol. Le dernier groupe homogène (c), avec une concentration proche de 10^9 CFU / g de sol, regroupe les interactions P64-blé, CHAO-blé et S20-fève.

Le calcul des dénombrements, après 30 jours de la bactérisation, révèle une légère diminution au niveau de la plupart des microcosmes, toutefois les densités de colonisation exprimées gardent une compétence rhizosphérique appréciable (Figures 3.2, 3.3 et 3.4).



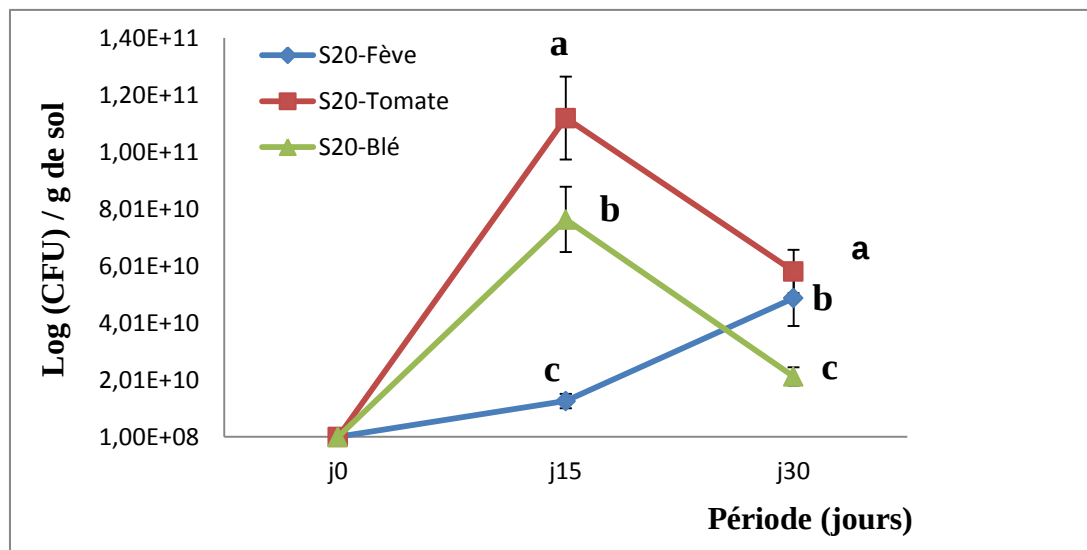
Les valeurs mentionnées avec différentes lettres sont significativement différentes selon le test de classement des moyennes (Newman-Keuls $\alpha = 5 \%$)

Figure 3.2 : Evolution des populations bactériennes de *P. fluorescens* P64.



Les valeurs mentionnées avec différentes lettres sont significativement différentes selon le test de classement des moyennes (Newman-Keuls $\alpha = 5\%$).

Figure 3.3: Evolution des populations bactériennes de *P. fluorescens* CHAO.



Les valeurs mentionnées avec différentes lettres sont significativement différentes selon le test de classement des moyennes (Newman-Keuls $\alpha = 5\%$).

Figure 3.4 : Evolution des populations bactériennes de *P. fluorescens* S20.

3.1.2 Discussion

Dans les conditions de microcosmes, les dénombrements effectués révèlent une bonne colonisation des systèmes racinaires, se traduisant par une compétence rhizosphérique appréciable chez les trois souches bactériennes étudiées. D'une manière générale, en comparant les dénombrements enregistrés après 15 et 30 jours, on peut conclure que les souches bactériennes sont plus

actives entre J0 et J15, où les densités bactériennes maximales ont été atteintes, montrant ainsi une adaptation rhizosphérique relative.

Le ralentissement, et parfois la régression des populations introduites, observés entre J15 et J30 peut indiquer une occupation spatiale maximale, bien que les densités bactériennes à ce stade, restent élevées comparativement aux densités initiales (10^8 CFU/ml). La prolifération et la survie bactérienne sont régies et régulés par l'espace rhizosphérique et la quantité et la qualité des éléments nutritifs disponibles. Cette survie est d'autant meilleur que la biomasse microbienne est limitée, et que la richesse du milieu en nutriments est importante [31].

Les niveaux de colonisation racinaire obtenus, avec les plants de blé dur, de tomate ou de fève, expriment une compétence rhizosphérique notable chez les souches de *Pseudomonas fluorescens* inoculées (P64, CHAO et S20), traduite par une intense activité dans ces micro-habitats, malgré que leurs origines rhizosphériques initiales d'isolement soient autres que ces plantes, qui sont respectivement l'abricotier, le tabac et le palmier dattier. Scher *et al.* [335] ont rapporté que le seuil de 5.10^3 CFU / g de sol constitue un bon indice de colonisation racinaire, ainsi, avec 10^{11} CFU/ g de sol, nos souches sont très efficaces.

A l'issu de ces résultats, nous pouvons constater l'aptitude compétitrice des trois souches bactériennes (P64, CHAO et S20) dans les rhizosphères de fève et de tomate, donc ces plantules exercent un effet rhizosphérique remarquable par rapport à la rhizosphère de blé. Les densités maximales en populations bactériennes dénombrées au niveau des masses unitaires racinaires, sont définies comme un potentiel de colonisation et d'adaptation [336].

La spécificité de la colonisation racinaire peut être expliquée par des variations dans le panel de composés impliqués dans le chimiotactisme chez *Pseudomonas*, ce qui peut refléter l'adaptation des bactéries aux conditions nutritives établies par chaque plante-hôte.

Il est bien connus que la colonisation racinaire est une étape cruciale est critique pour exprimer les effets phytobénéfiques des rhizobactéries [28]. Une meilleure compréhension du processus de colonisation racinaire est nécessaire

pour identifier les souches efficaces adaptées aux différentes conditions environnementales.

La connaissance des mécanismes responsables des effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents permettrait d'identifier les conditions favorables à leurs expression ; ces conditions sont liées aux caractéristiques intrinsèques des souches et à l'environnement [18].

Les fluctuations des densités des populations observées entre les diverses interactions étudiées peuvent être liées à la capacité d'accueil de la rhizosphère ; du sol et de la plante qui affectent la diversité des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents [337, 338].

Cette grande rhizocompétence peut provenir de leur taux de croissance élevé et leur capacité à métaboliser efficacement de nombreux composés des exsudats racinaires [32].

Les rhizodépôts représentent la principale source de carbone dans la rhizosphère, elle jouerait donc un rôle important dans l'établissement et l'efficacité de la promotion de la croissance des rhizobactéries [339].

La nature qualitative et quantitative de la matière organique exsudée varie en selon les espèces végétales étudiées et dépend en partie des racines (durée de vie, anatomie, morphologie, composition chimique) [340, 341].

De plus, les rhizobactéries présentent intrinsèquement des capacités concurrentes variables [18], ce qui a été démontré au sein de la population des *Pseudomonas fluorescens* [342]. En effet, l'utilisation de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents capables de se maintenir et de se développer sur le système racinaire, s'accompagne d'effets bénéfiques significatifs chez les plantes inoculées [29].

La colonisation des plantes par les *Pseudomonas* est un processus complexe et étroitement contrôlé commençant par le chimiotactisme dans la rhizosphère le long d'un gradient d'exsudats racinaires, suivie par une migration sur le rhizoplan [343], puis par la formation d'un biofilm bactérien [198].

Les phases précoces de la colonisation sont facilités par la mobilité bactérienne (flagelles pili), ainsi que par la production de biosurfactants, qui, ensemble, permettent un mouvement d'essaimage coordonnée [343].

Les étapes suivantes sont caractérisées par la formation de microcolonies à la surface de la plante, suivie par l'établissement d'un biofilm mature. L'adsorption des bactéries à la racine est causée par des interactions physico-chimiques et biologiques entre les bactéries et la racine [18]. Cette seule colonisation peut conduire à l'occupation de sites suffisants pour assurer leurs effets phytobénéfiques [344].

Outre les cellules bactériennes, il existe une matrice protectrice constituée d'adhésines protéiques [345], de lipopolysaccharide [346] et de nombreuses molécules d'exopolysaccharide [347]. En effet, chez *P. fluorescens* WCS417 les chaînes lipopolysaccharides latérales constituant l'antigène O des LPS bactériens jouent un rôle important dans la colonisation racinaire [269].

Pour réussir à coloniser la rhizosphère des plantes, de nombreuses espèces de *Pseudomonas* spp. produisent des enzymes leur permettant de favoriser la croissance des plantes et de perturber les réponses au stress. Par exemple, des enzymes synthétisant et catabolisant des auxines [194] ainsi que des substances volatiles permettant la croissance des plantes, telles que le 2-3-buta-nediol et l'acétoïne, ont été identifiées dans plusieurs génomes de *Pseudomonas* [348].

L'établissement de mécanismes de communication cellulaires tels que le quorum sensing, régule ainsi la colonisation racinaire et l'expression de certains gènes phytobénéfiques [349]. Ce mécanisme de communication et de signalisation cellulaire est très répandu chez les rhizobactéries [188]. Certaines bactéries rhizosphériques sont capables de métaboliser les molécules signal telles que des homosérines lactones du processus du quorum sensing [257]. Ainsi tous les mécanismes de régulation et de communication peuvent donc favoriser la compatibilité au sein de la communauté fonctionnelle des microorganismes phytobénéfiques qui colonisent une même plante-hôte.

Bien que la capacité de survie, la dynamique de croissance et le pouvoir de colonisation de nos souches semblent prometteurs ; il est difficile d'extrapoler nos résultats obtenus dans des conditions expérimentale (microcosmes) aux conditions naturelles, car elles ne reflètent pas nécessairement la véritable complexité de la rhizosphère.

3.2. Nodulation et phytostimulation

3.2.1. Essais sous serre

3.2.1.1. Nombre de nodules

Le processus de nodulation, estimé chez les plants des différents traitements bactérisés, montre des fluctuations par rapport aux témoins respectifs (R1 et R2). Le nombre de nodules est significativement élevé chez les plants de fève inoculés par la souche R2 (91,67 nodules /plant) et avec la combinaison des souches P64-R2 (90,80 nodules /plant). Ainsi, la combinaison P64-R1 a induit une meilleure nodulation (82,42 nodules/plant) par rapport à son témoin R1 (67,67 nodules /plant) (Figure 3.5, Tableau 3.1).

3.2.1.2. Teneur en matière azotée totale (MAT %)

Le dosage de la matière azotée totale chez les plants de fève bactérisés révèle une certaine supériorité dans la teneur en azote (Appendice 2). Les plants inoculés avec la combinaison P64-R2 ont la teneur la plus élevée en azote avec 21,29 %, comparativement à son témoin R2 qui n'a enregistré que 16,26%. Les autres interactions ne montrent pas de différences significatives par rapport à leurs témoins R1 ou R2 (Tableau 3.2).

Tableau 3.1 : Nombre de nodules

	R1	R2	S20-R1	S20-R2	CHAO-R1	CHAO-R2	P64-R1	P64-R2
Nombre de nodules par plant	64,67 ± 5,35* c**	91,67 ± 4,39 a	67,09 ± 6,75 bc	83,02 ± 4,75 ab	62,59 ± 6,22 c	77,24 ± 6,78 abc	82,42 ± 4,90 ab	90,80 ± 3,33 a

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2),

* : Ecart types issus des quinze répétitions.

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls à $\alpha = 5\%$ (Analyse ANOVA).

Tableau 3.2 : Teneur en matière azotée totale (MAT %)

	R1	R2	S20-R1	S20-R2	CHAO-R1	CHAO-R2	P64-R1	P64-R2
Teneur en azote (%)	16,26 ± 0,95* b**	15,48 ± 1,02 bc	16,27 ± 1,39 b	14,79 ± 1,04 c	14,94 ± 0,56 c	15,92 ± 0,71 bc	17,90 ± 0,89 b	21,20 ± 0,90 a

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

* : Ecart types issus des quinze répétitions. ** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls à $\alpha = 5\%$ (Analyse ANOVA).

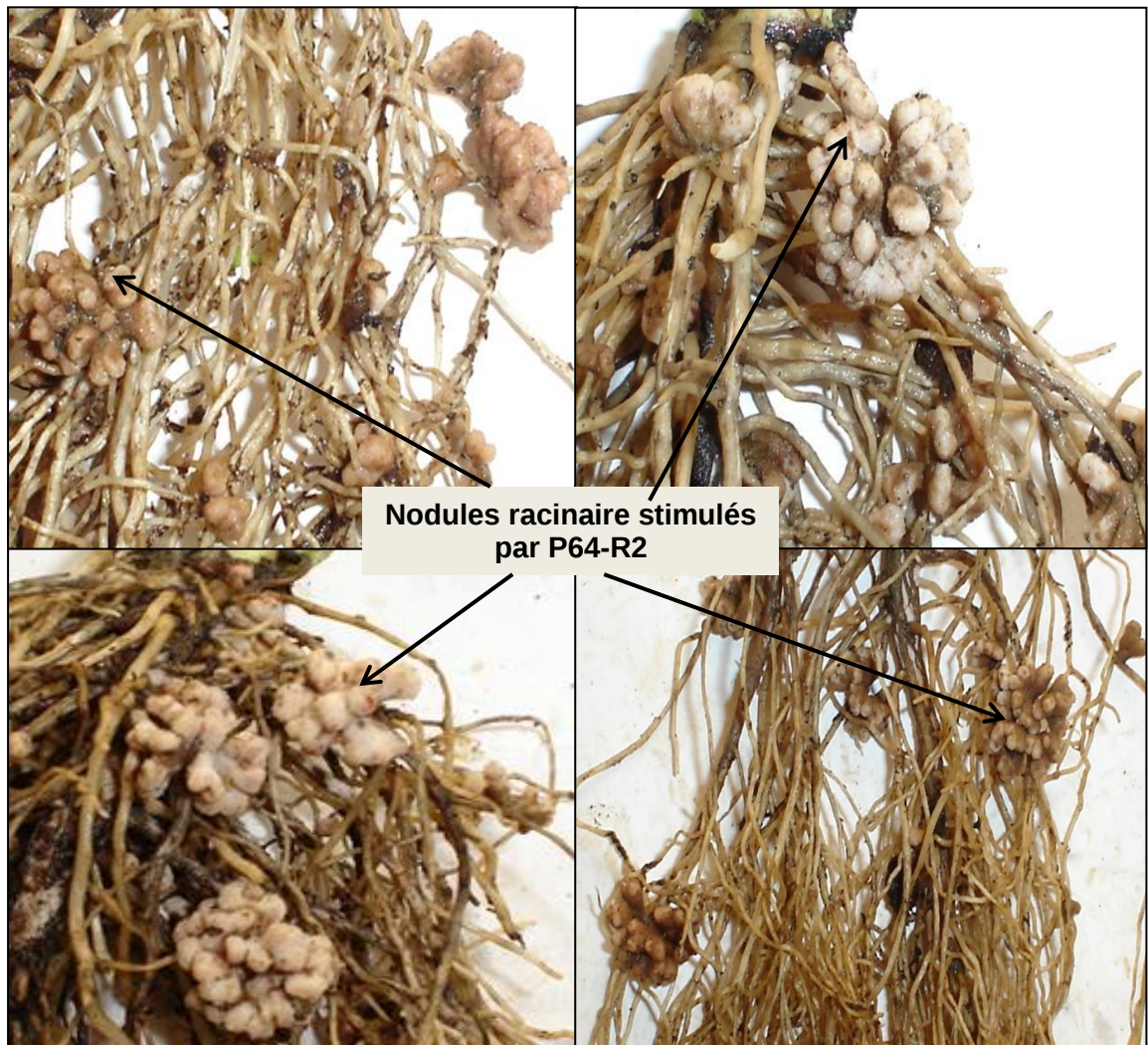


Figure 3.5: Nodules racinaires de plants de fève cultivés sous serre bactérisés par la combinaison P64-R2.

3.2.1.3. Paramètres de croissance

3.2.1.3.1. Hauteur des tiges et poids frais des pousses

L'analyse des résultats de la hauteur des tiges et du poids frais des pousses ne révèle pas de différences significatives, entre les différentes souches étudiées, ainsi que de leurs interactions par rapport à leurs témoins respectifs (plants non inoculés) (Appendice 2).

3.2.1.3.2. Poids sec des pousses

L'analyse de la variance pour le poids sec montre que les douze traitements étudiés se répartissent en quatre groupes significativement différents. Les meilleures performances ont été enregistrés chez les plants inoculés par la

combinaison des souches P64 et R2, avec un poids maximum de 4,23 g. Le témoin n'a enregistré que 2,93 g. Les autres interactions entre les souches S20 et CHAO avec les deux souches rhizobiennes R1 et R2 ont montré des poids légèrement supérieurs à celui du témoin (Tableau 3.3).

3.2.1.3.3 Longueur des racines

Les différentes mesures des longueurs racinaires révèlent une différence significative entre les plants bactérisés par la souche R1 (35,97 cm) par rapport au témoin (29,42 cm). Les longueurs racinaires enregistrées au niveau des autres traitements, que ce soit simples ou combinés, ne montrent pas une augmentation significative par rapport aux témoins respectifs (Tableau 3.4).

3.2.1.3.4. Poids frais et secs des racines

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté une augmentation des poids frais et secs de la partie racinaire chez les différentes interactions, par rapport aux traitements non inoculés. Le meilleur poids frais (11,66 g) a été obtenu chez les plants coinoculés avec l'interaction P64-R2, suivie de l'interaction S20-R2 avec un poids de 10,83 g, tandis que le témoin n'a présenté que 9,18 g. Comparativement au témoin, la combinaison P64-R1 présente le meilleur poids sec racinaire avec une valeur de 142 g. Une légère augmentation des valeurs en poids sec a été enregistrée chez les autres interactions (Figure 3.6 Tableau 3.4).



Figure 3.6 : Développement racinaire des plants de fève bactérisés par la combinaison P64-R1

Tableau 3.3 : Hauteur des tiges (cm), poids frais et poids sec (g) des pousses.

	Témoin	R1	R2	S20	CHAO	P64	S20-R1	S20-R2	CHAO-R1	CHAO-R2	P64-R1	P64-R2
Hauteur (cm)	58,73	68,33	61,68	60,34	59,57	59,14	59,33	59,12	61,70	60,45	62,13	66,13
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	4,66*	6,06	2,50	5,19	4,21	6,34	6,84	5,51	6,82	3,32	4,40	4,28
Poids frais (g)	33,53	35,17	35,22	35,64	34,09	34,66	36,61	33,10	35,55	33,15	34,82	38,39
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	3,52	7,92	4,21	4,61	3,17	3,55	2,02	2,52	5,81	2,34	3,50	1,25
Poids sec (g)	2,93	3,51	3,57	3,45	3,59	3,38	3,47	3,11	3,49	3,22	3,60	4,23
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,24 b**	0,74 ab	0,46 ab	0,37 ab	0,62 ab	0,40 ab	0,45 ab	0,31 b	0,67 ab	0,24 ab	0,14 abc	0,39 a

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls ($\alpha = 5\%$) (Analyse ANOVA).

* : écart- type entre les répétitions.

Tableau 3.4 : Longueur des racines (cm), poids frais et poids sec (g) de la partie racinaire.

	Témoin	R1	R2	S20	CHAO	P64	S20-R1	S20-R2	CHAO-R1	CHAO-R2	P64-R1	P64-R2
Longueur (cm)	29,42	35,97	30,80	30,46	27,14	31,53	31,22	31,30	28,82	26,98	29,38	30,68
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,93* b**	3,61 a	3,71 b	3,25 b	2,66 b	3,69 b	2,36 b	2,71 b	1,72 b	1,07 b	2,25 b	3,59 b
Poids frais (g)	9,18	8,86	8,84	8,19	7,54	9,02	8,09	10,83	8,21	7,68	9,04	11,66
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,56 abc	2,00 abc	1,19 abc	1,88 bc	1,09 bc	1,23 abc	1,36 bc	2,86 ab	1,45 bc	1,13 bc	1,02 abc	1,49 a
Poids sec (g)	0,38	1,25	1,26	0,55	0,71	0,86	0,89	0,63	0,98	0,96	1,42	1,31
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,10 d	0,36 ab	0,26 ab	0,30 cd	0,27 cd	0,34 bcd	0,20 bcd	0,26 cd	0,38 ab	0,28 abc	0,12 a	0,24 ab

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls ($\alpha = 5\%$) (Analyse ANOVA).

* : écart-type entre les répétitions.

3.2.1.4. Estimation des gains

3.2.1.4.1 Nombre de nodules

En comparaison avec les témoins inoculés par les souches de *Rhizobium* (R1 et R2), l'estimation des gains montre que l'effet de l'interaction est plus notable sur le nombre de nodules chez les plants associés aux *Pseudomonas* et *Rhizobium* à la fois. Ceci est nettement notable avec la souche P64 associée avec la souche R1 où nous avons obtenu un gain marquant de 27,44 %. Les autres combinaisons n'ont pas induit des améliorations significatives en nodulation par rapport à leurs témoins respectifs (Figure 3.7 A).

3.2.1.4.2 Teneur en matière azotée totale (MAT %)

L'effet de la souche P64 de *Pseudomonas fluorescens* a été également constaté sur la teneur azotée de la biomasse aérienne des plants de fève inoculés. Le dosage de la matière azotée montre que les meilleurs gains ont été obtenus dans la bactérisation associant les souches P64 et R2, en induisant un gain de l'ordre de 37,53 %. Le reste des autres interactions ne montre pas des gains significatifs (Figure 3.7 B).

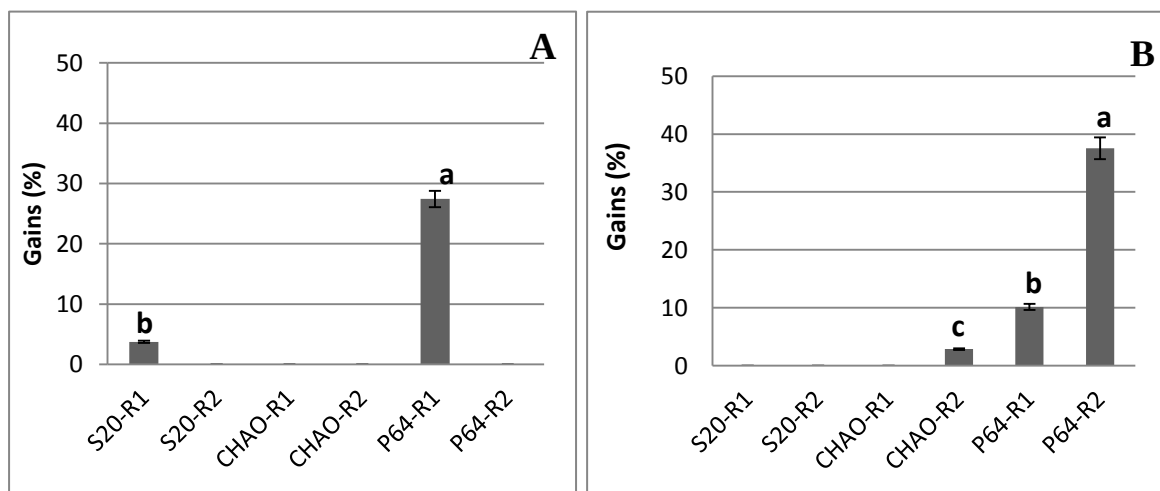


Figure 3.7: Gains obtenus en nombre de nodules **(A)** et en matière azotée totale **(B)** des interactions entre les souches de *Pseudomonas fluorescens* (S20 CHAO et P64) et les souches de *Rhizobium fabea* (R1 et R2). Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent les différences significatives ($P < 0.05$).

3.2.1.4.3 Paramètres de croissance

Les gains obtenus révèlent que l'interaction des souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *Rhizobium fabae* a influencé positivement la biostimulation de la croissance végétale. Des fluctuations relatives ont été enregistrées dans les différentes interactions appliquées. En effet, la souche P64 a induit des gains appréciables au niveau des différents paramètres étudiés, notamment en situation de coinoculation avec les souches R1 ou R2 de *Rhizobium*.

Les gains obtenus, en hauteur des tiges et en longueur racinaire ont montré que la coinoculation avec les souches de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* n'a pas induit un effet notable sur les plants de fève cultivés sous serre. En effet, les meilleurs gains en hauteur des tiges (16,34 %) et en longueur racinaire (22,26 %) ont été enregistrés chez les plants bactérisés par la souche R1 de *Rhizobium* par rapport aux témoins non inoculés (Figure 3.8).

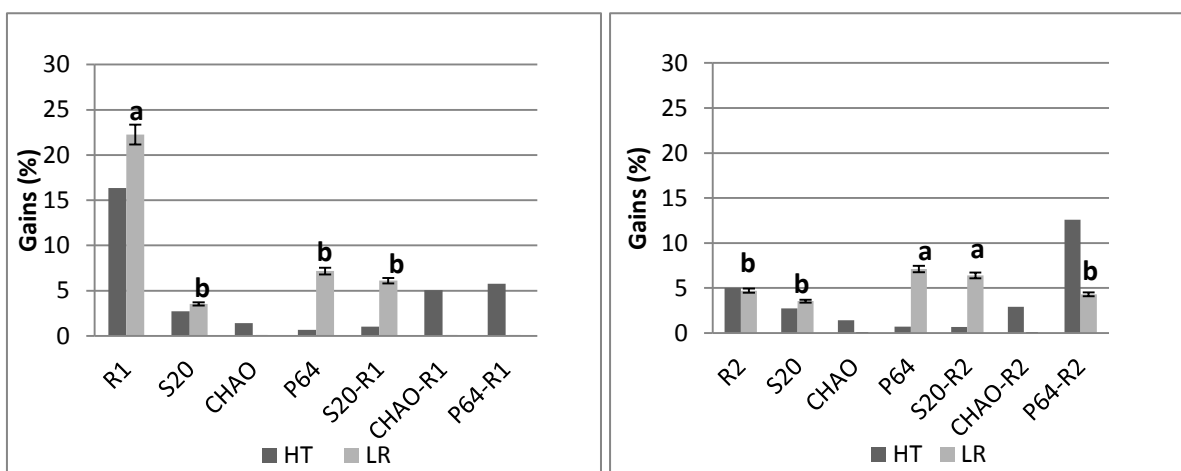


Figure 3.8: Gains en hauteur des tiges (HT) et en longueur racinaire (LR) des plants de fève inoculés avec *Rhizobium fabae* (R1 ou R2), *Pseudomonas fluorescens* (S20 CHAO ou P64), ou avec leur combinaison. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent les différences significatives ($P < 0.05$).

L'effet de la coinoculation a été plus marquant avec les autres paramètres de croissance étudiés. La souche P64 de *Pseudomonas fluorescens* a amélioré considérablement le poids sec des pousses et des racines de la fève, notamment lors de son interaction avec les souches de *Rhizobium*.

La combinaison P64-R2 a induit un gain de 44,7 % en poids sec des pousses, et un gain très hautement significatif de 246,36 % en poids sec des

racines. Le gain augmente jusqu'à 276,31% avec la coinoculation de P64 - R1. Concernant les autres paramètres étudiés (poids frais des pousses et des racines), globalement, tous les traitements ont montré des taux approximativement similaires et ne révèlent pas de différences significatives (Figure 3.9 A B).

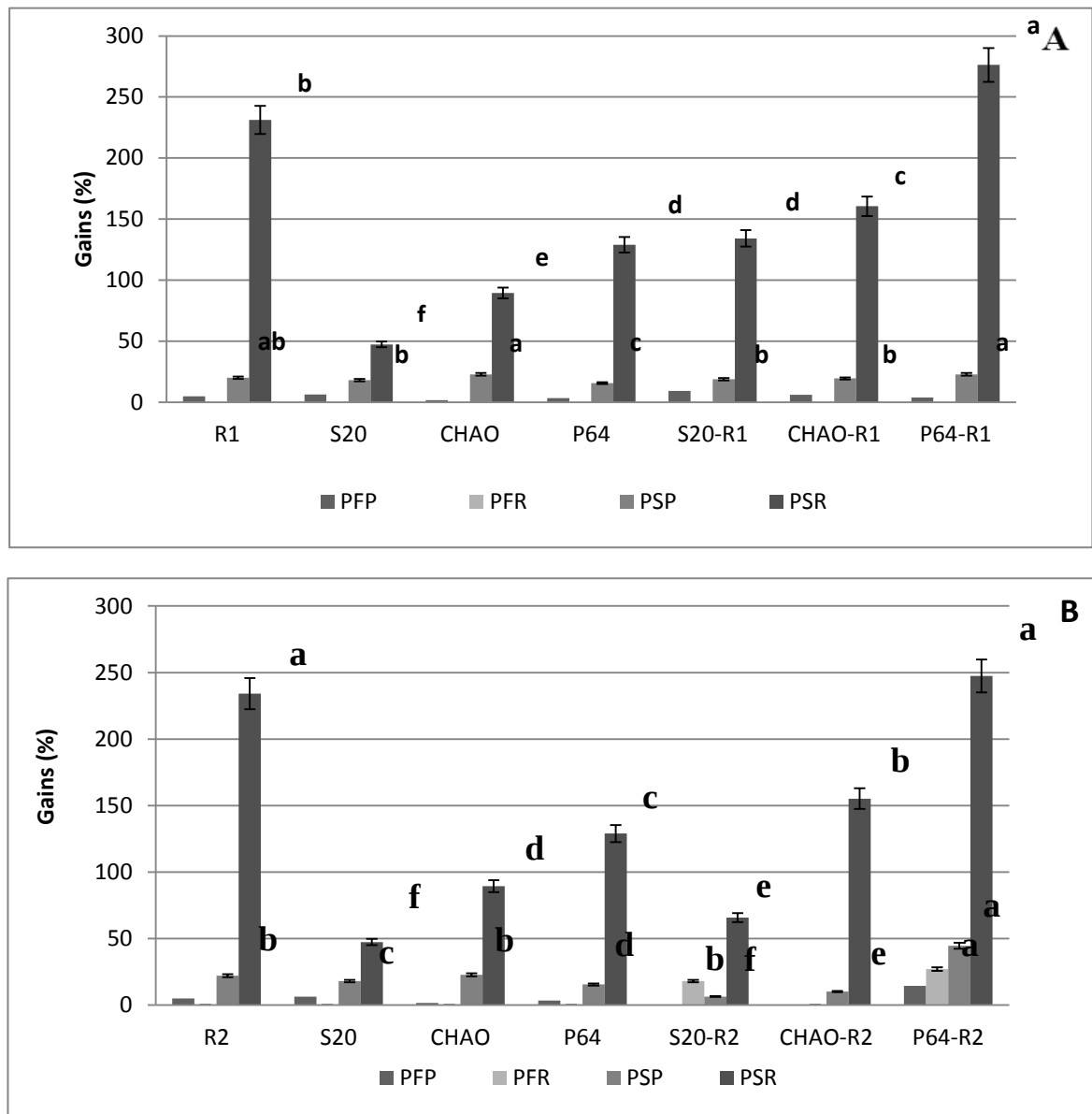


Figure 3.9: A et B : Gains obtenus en poids frais des pousses (PFP), en poids frais des racines (PFR), en poids sec des pousses (PSP), et en poids sec des racines (PSR) des plants de fève inoculés avec *Rhizobium fabae* (R1 ou R2), *Pseudomonas fluorescens* (S20 CHAO ou P64), ou avec leur combinaison. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent les différences significatives ($P < 0.05$).

3.2.1.5 Vérification de la colonisation rhizosphérique

Les observations effectuées sur les fragments racinaires après 72 heures d'incubation à 27°C, révèlent la présence de nombreuses colonies de *Pseudomonas fluorescens* autour de ces fragments après 50 jours d'inoculation, indiquant une bonne colonisation rhizosphérique (Figure 3.10).

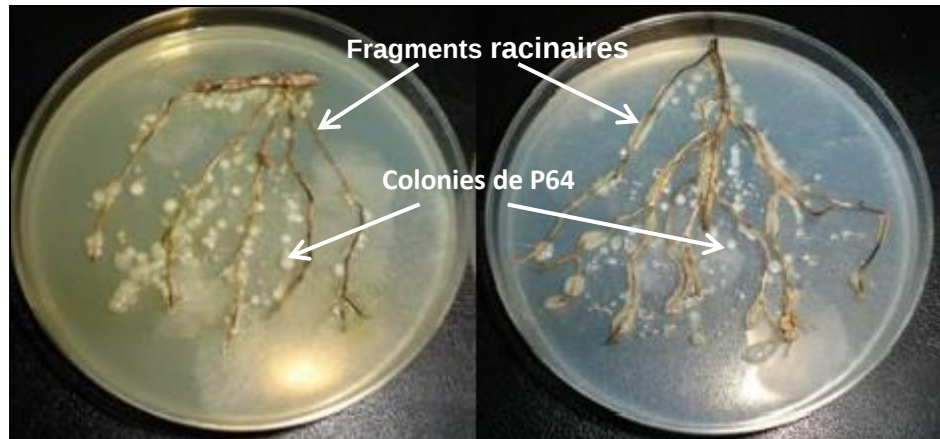
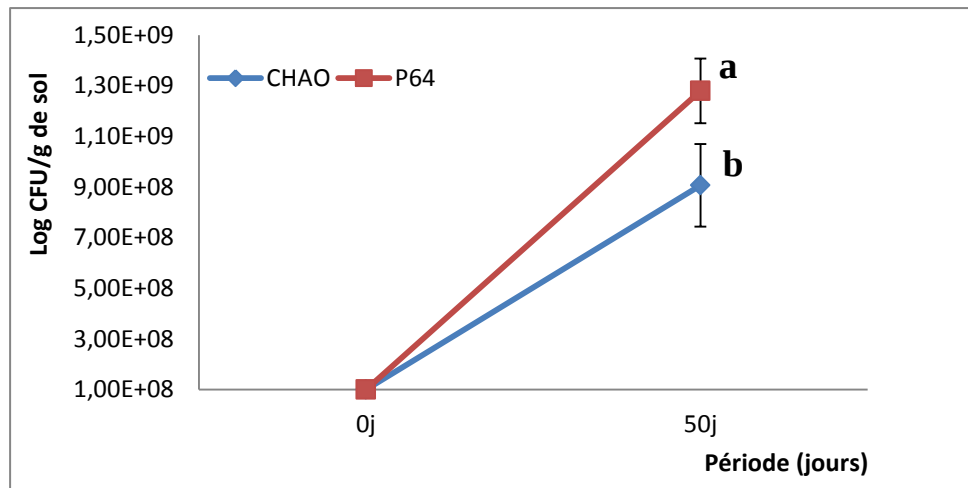


Figure 3.10 : Fragments des racines de fève bactérisés par *Pseudomonas fluorescens* après 72 heures d'incubation.

Sur la base des concentrations initiales apportées dans le sol, nous avons constaté pour les deux souches de *Pseudomonas fluorescens* (CHAO et P64), une nette évolution de leurs populations bactériennes avec des degrés de colonisation appréciables. En effet, nous avons noté des concentrations bactériennes élevées de l'ordre de 10^9 CFU/g de racine, par rapport à la concentration initialement introduite qui est de l'ordre de 10^8 CFU/g de sol. La plus forte progression avec $1,28 \cdot 10^9$ CFU/g de racine a été enregistrée avec la souche P64 (Figure 3.11).



Les valeurs mentionnées avec différentes lettres sont significativement différentes selon le test de classement des moyennes (Newman-Keuls $\alpha = 5\%$)

Figure 3.11: Evolution des populations bactériennes dans la rhizosphère de la fève.

3.2.2. Essais en plein champs

3.2.2.1 Nombre de nodules

Au terme de notre expérimentation, le nombre de nodules comptabilisé chez les différents traitements révèle une meilleure nodulation chez les plants de fève coinoculés par rapport aux témoins (R1 et R2). La bactérisation avec la souche P64 de *Pseudomonas fluorescens* en combinaison avec la souche R1 de *Rhizobium fabae* a induit le meilleur nombre de nodules (50,60 nodules/plant) par rapport au témoin qui n'est qu'à 22,13 nodules/plant. Les autres interactions ont enregistré des valeurs plus au moins supérieures à l'exception de la combinaison CHAO-R2 (Figure 3.12, Tableau 3.5).



Figure 3.12 : Nodules racinaires des plants de fève cultivés en plein champ bactérisés par la combinaison P64-R1.

Tableau 3.5 : Nombre de nodules

	R1	R2	S20-R1	S20-R2	CHAO-R1	CHAO-R2	P64-R1	P64-R2
Nombre de nodules par plant	22,13 ± 2,69*	35,80 ± 9,61	29,27 ± 4,54	40,13 ± 5,53	26,20 ± 4,24	32,20 ± 1,89	50,60 ± 4,62	43,80 ± 10,41
	de**	bcd	cde	abc	cde	bcd	a	ab

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

* : Ecart types issus des quinze répétitions.

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls avec $\alpha = 5\%$ (Analyse ANOVA).

3.2.2.2 Teneur en matière azotée totale (MAT %)

Les résultats obtenus, d'après le dosage de la matière azotée totale des plants de fève cultivés en plein champ, montrent une meilleure teneur en azote chez les plants bactérisés par la combinaison P64-R1 (34,83 %) comparativement au témoin (19,09 %) (Tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Teneur en matière azotée totale (MAT %)

	R1	R2	S20-R1	S20-R2	CHAO-R1	CHAO-R2	P64-R1	P64-R2
Teneur en azote (%)	19,09 ± 0,49* c**	20,29 ± 0,79 bc	21,28 ± 1,60 bc	21,85 ± 2,08 bc	19,72 ± 0,36 c	20,89 ± 0,17 bc	34,83 ± 0,44 a	23,19 ± 0,73 b

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

* : Ecart types issus des quinze répétitions.

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls avec $\alpha = 5\%$ (Analyse ANOVA).

3.2.2.3 Paramètres de croissance

L'analyse de la variance montre une différence significative entre les traitements étudiés pour le poids frais des pousses. L'interaction P64-R2 a enregistré le meilleur poids frais avec 31,96 g par rapport au témoin non inoculé (16,62 g), alors que les autres interactions ainsi que les traitements simples ont été classés dans le même groupe homogène (Tableau 3.7). Pour le poids sec des pousses, les résultats obtenus ne révèlent pas de différences significatives entre les différents traitements appliqués et le témoin.

La longueur racinaire des plants de fève cultivés au champ a été positivement influencée par la bactérisation avec les souches de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* à la fois. La combinaison P64-R2 a induit la meilleure longueur avec 13,93 cm (Tableau 3.8).

L'effet de la souche P64 a été également constaté sur le poids frais des racines, notamment lors de son coinoculation avec la souche R2 (4,49 g) et R1 (4,31 g). Tandis que les résultats obtenus pour le poids sec des pousses ne

révèlent pas de différences significatives entre les traitements étudiés (Tableau 3.8) (Appendice 2).

3.2.2.4 Estimation des gains

3.2.2.4.1 Nombre de nodules

L'interaction des souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *Rhizobium fabae* a influencé positivement la nodulation chez les plants de fève, cultivés en plein champ. En effet, nous avons obtenu d'importants gains en nombre de nodules chez les plants traités par la souche P64, avec 128,94 % en interaction avec la souche R1 de *Rhizobium* (Figure 3.13 A).

3.2.2.4.2 Teneur en matière azotée totale (MAT %)

La coinoculation bactérienne a également influencé la teneur des pousses en azote total. Les meilleurs teneurs ont été obtenus par les plants de fève bactérisés avec l'interaction des souches P64 - R1, dont le gain est de 82,47 % (Figure 3.13 B).

Tableau 3.7 : Poids frais et poids sec (g) des pousses.

	Témoin	R1	R2	S20	CHAO	P64	S20-R1	S20-R2	CHAO-R1	CHAO-R2	P64-R1	P64-R2
Poids frais (g)	16,62	22,51	21,13	18,42	20,45	23,23	19,46	22,50	26,09	27,26	25,20	31,96
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	7,32* b**	3,7 ab	1,75 ab	2,88 ab	1,09 ab	3,23 ab	3,83 ab	0,71 ab	5,61 ab	3,15 ab	0,53 ab	7,78 a
Poids sec (g)	3,31	3,40	4,46	3,68	4,90	4,73	3,72	5,01	5,06	4,36	3,97	5,07
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,67	0,41	0,92	0,40	0,27	0,34	1,12	1,56	1,64	0,16	1,00	0,89

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls à $\alpha = 5\%$ (Analyse ANOVA).

* : écart- type entre les répétitions.

Tableau 3.8 : Longueur des racines (cm), poids frais et poids sec (g) de la partie racinaire.

	Témoin	R1	R2	S20	CHAO	P64	S20-R1	S20-R2	CHAO-R1	CHAO-R2	P64-R1	P64-R2
Longueur (cm)	9,38	10,33	9,67	9,60	9,13	12,55	12,07	12,20	12,47	12,60	13,20	13,93
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,11* d**	3,61 bcd	1,14 cd	1,21 b	0,68 d	0,51 abc	0,93 abcd	0,61 abcd	0,92 abcd	0,88 abc	1,11 ab	0,31 a
Poids frais (g)	2,59	2,96	3,36	3,50	3,66	3,71	2,57	3,30	2,87	3,67	4,31	4,49
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,43 c	0,27 b	1,13 b	0,88 b	1,09 ab	1,23 ab	0,48 c	0,34 b	0,57 b	0,27 ab	0,86 a	0,68 a
Poids sec (g)	0,59	0,57	0,52	0,65	0,63	0,62	0,41	0,53	0,57	0,62	0,81	0,64
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,26	0,08	0,16	0,35	0,20	0,44	0,05	0,04	0,02	0,10	0,02	0,13

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls à $\alpha = 5\%$ (Analyse ANOVA).

* : écart- type entre les répétitions.

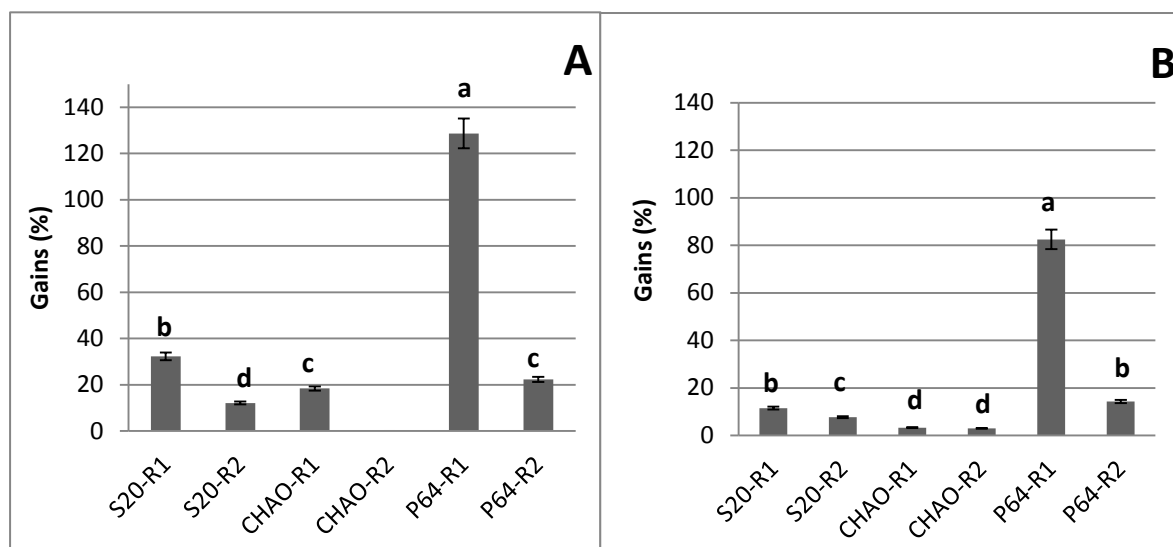


Figure 3.13: Gains obtenus en nombre de nodules **(A)** et en matière azotée totale **(B)** des interactions entre les souches de *Pseudomonas fluorescens* (S20 CHAO et P64) et les souches de *Rhizobium fabae* (R1 et R2). Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent les différences significatives ($P < 0.05$).

3.2.2.4.3. Paramètres de croissance

L'effet de l'interaction a été constaté également sur la phytostimulation de la croissance des plants de fève. La bactérisation des plants avec la souche P64 a révélé des taux plus ou moins appréciables au niveau des différents paramètres étudiés particulièrement en interaction avec la souche R2 de *Rhizobium*, où elle a induit des gains, en poids frais des pousses de 92,29 %, en longueur racinaire de 48,5 %, et en poids frais des racines de 73,35 % (Figures 3.14 A et B).

3.2.3. Comparaison de la phytostimulation sous serre et en plein champ

L'inoculation des plants de fève avec les souches de *Rhizobium fabae* (R1 et R2), et les souches de *Pseudomonas fluorescens* (S20 CHAO et P64), ainsi que la coinoculation avec l'interaction des différentes souches, ont influencé considérablement le nombre de nodules produit sur les racines, la teneur en matière azotée totale des pousses, ainsi que les paramètres de croissance végétale des plants cultivées sous serre ou en plein champ.

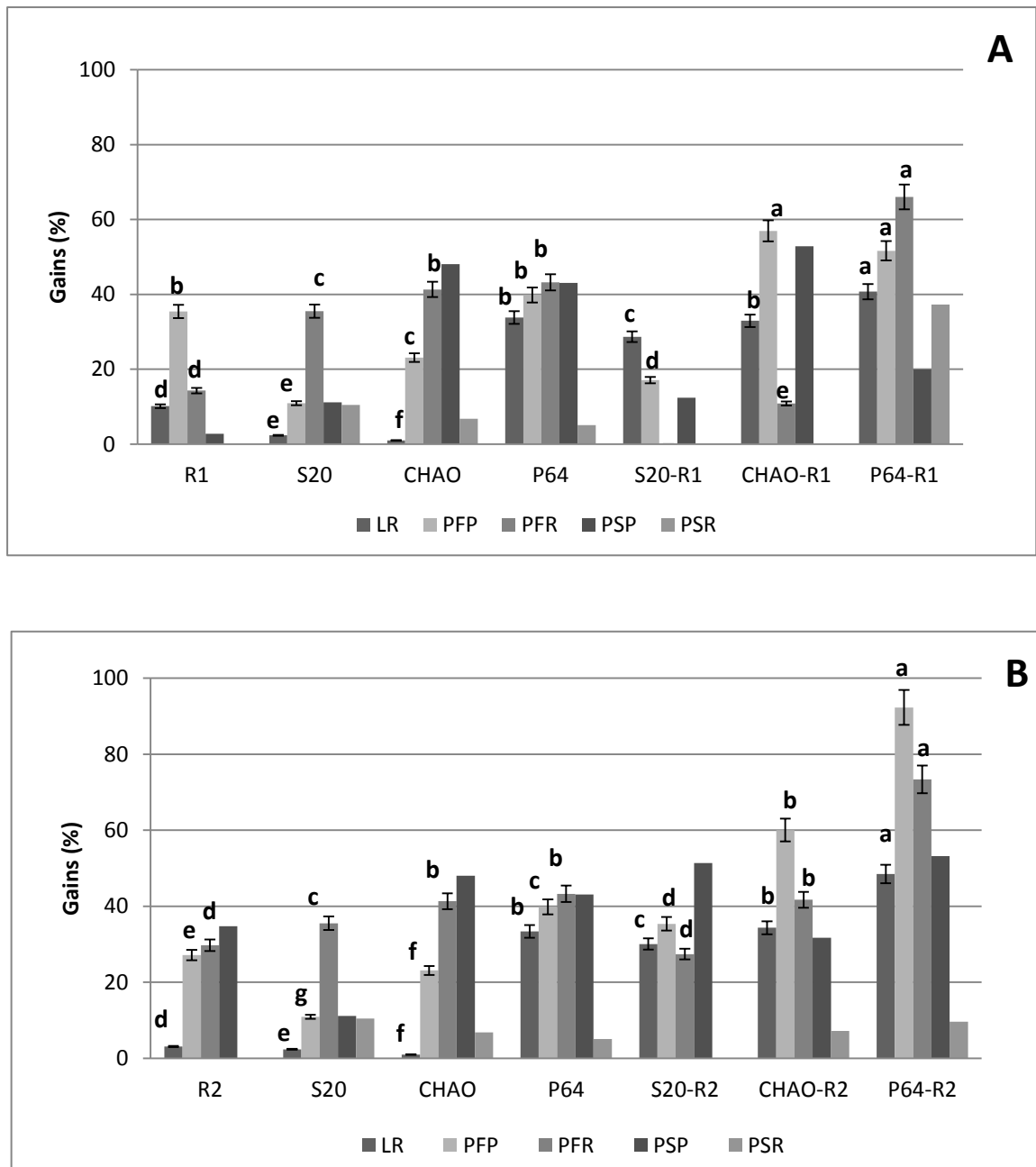


Figure 3.14: A et B : Gains obtenus en longueur racinaire (LR), en poids frais des pousses (PFP), en poids frais des racines (PFR), en poids sec des pousses (PSP) et en poids sec des racines (PSR) des plants de fève inoculés avec *Rhizobium fabae* (R1 ou R2), *Pseudomonas fluorescens* (S20 CHAO ou P64), ou avec leur combinaison. Les barres indiquent les erreurs standards et les différentes lettres indiquent les différences significatives ($P < 0.05$).

3.2.3.1 Nombre de nodules et teneur en matière azotée totale

Le nombre de nodules produit, sur les racines des plants de fève, par les traitements sous serre est supérieur, comparé à celui produit en plein champ et par rapport aux témoins (R1 et R2). Les coinoculations de la souche R1 de *Rhizobium fabae* avec les souches P64 et S20 de *Pseudomonas fluorescens* en plein champ, ont amélioré significativement la nodulation, comparée aux autres combinaisons et à l'inoculation uniquement avec R1 ou R2. Le gain en nombre de nodules le plus élevé, au champ, a été observé chez les plants de fève coinoculés avec l'interaction P64-R1 (128,94 %). Même si l'effet de cette combinaison (P64-R1) a procuré des gains chez les plans conduits sous serre (27,44%), néanmoins il y a une régression par rapport aux conditions de plein champ (Tableau 3.9 Figure 3.15).



Figure 3.15 : Nodules racinaires des plants de fève bactérisés par la combinaison P64-R1.

Tableau 3.9 : Gains (%) en nodulation des plants sous serre et en plein champ

	R1		R2		S20-R1		S20-R2		CHAO-R1		CHAO-R2		P64-R1		P64-R2	
	serre	Champ	serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ	Serre	Champ
Nombre de nodules par plant	64,67 ± 5,35* bc	22,13 ± 3,65 f	91,67 ± 4,39 a	35,80 ± 4,26 ef	67,09 ± 6,75 bc	29,27 ± 3,18 f	83,02 ± 4,75 ab	40,13 ± 2,90 e	62,59 ± 6,22 c	26,20 ± 3,15 f	77,24 ± 6,78 b	32,20 ± 4,85 ef	82,42 ± 4,90 ab	50,60 ± 3,60 d	90,80 ± 3,33 a	43,80 ± 3,15 e
Gain (%)					3,74 d ± 1,97 d	32,26 ± 8,45 b	- - -	12,09 ± 4,03 c	- - -	18,39 ± 4,68 bc	- - -	- - -	27,44 ± 7,14 b	128,64 ± 6,44 a	- - -	22,34 ± 5,11 bc

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

* : écart- type entre les répétitions.

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls à α= 5% (Analyse ANOVA).

(-) : pas de gain (sans effet sur la nodulation).

La teneur de la biomasse aérienne en matière azotée a été aussi induite par la souche P64 de *Pseudomonas*. La combinaison P64-R1 a montré une augmentation significative (82,47 %) en plein champ, alors que la teneur maximale en azote enregistrée sous serre est moins importante, et qui a été obtenue par l'application combinée P64-R2 (37,53 %), par rapport aux témoins respectifs R1 ou R2 (Figure 3.16).

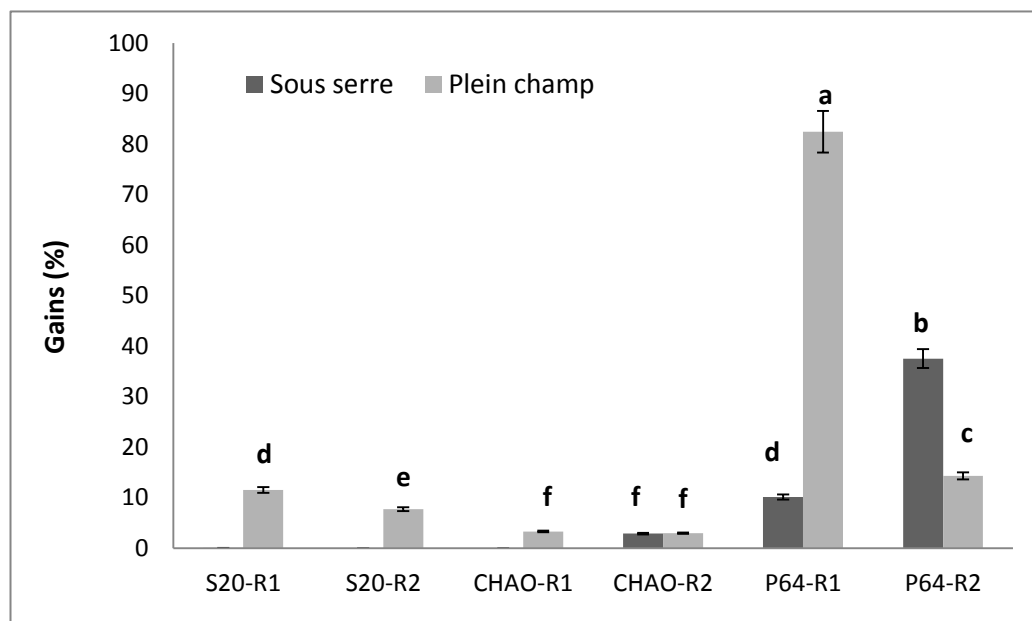


Figure 3.16 : Gains obtenus en matière azotée des interactions entre *Pseudomonas fluorescens* (S20, CHAO ou P64) et *Rhizobium fabae* (R1 ou R2).

3.2.3.2 Paramètres de phytostimulation

La comparaison des résultats nous a permis de constater que la coinoculation a engendré le gain en poids frais, le plus élevé, chez les pousses par rapport à l'inoculation séparée avec ces mêmes souches et au témoin non inoculé, selon la combinaison spécifique *Pseudomonas-Rhizobium*. En plein champ, l'interaction P64-R2 a engendré un gain significativement supérieur (92,29 %), comparé à R2 (27,13 %) et à P64 (39,83 %). De même, cette combinaison a induit le gain en poids frais le plus élevé sous serre (14,52 %), mais qui reste toujours inférieur aux gains obtenus en plein champ. Une tendance similaire pour le poids sec des pousses observé avec P64-R2 en plein champ (53,17 %) et sous serre (44,70 %) par rapport aux autres traitements (Tableau 3.10).

En ce qui concerne le poids frais des racines, les traitements sous serre n'ont pas enregistré des gains significatifs, où le maximum a été induit par l'interaction P64-R2 (27,12 %). Des gains plus importants ont été enregistrés en plein champ, suite à l'inoculation avec *Pseudomonas* (S20 CHAO et P64), par rapport aux souches de *Rhizobium*, R1 ou R2, seules, qui augmente significativement avec la coinoculation P64-R2 (73,35%) (Figure 3.17, Tableau 3.10). En termes de poids sec des racines, des taux très appréciables obtenus chez tous les plants inoculés sous serre, la valeur la plus élevée étant observée avec la combinaison P64-R1 (276,31%), comparativement aux traitements appliqués en plein champ, qui n'ont pas enregistré de gains significatifs par rapport aux témoins non inoculés (Tableau 3.10).



Figure 3.17 : Développement racinaire des plants de fève bactérisés par la combinaison P64-R2.

Tableau 3.10 : Gains (%) en croissance des plants sous serre et en plein champ.

Traitements		Pousses		Racines	
		Poids frais (%)	Poids sec (%)	Poids frais (%)	Poids sec (%)
R1	Sous serre	04,91 ± 0,24*m**	20,13 ± 1,00 e	-	231,17 ± 9,24 b
	Plein champs	35,43 ± 1,40 f	02,71 ± 0,13 j	14,28 ± 0,71 g	-
R2	Sous serre	05,07 ± 0,25 m	22,18 ± 1,10 e	-	234,21 ± 9,36 b
	Plein champs	27,13 ± 1,35 g	34,74 ± 1,73 d	29,72 ± 1,48 e	-
S20	Sous serre	06,32 ± 0,31 l	18,08 ± 0,90 f	-	47,36 ± 2,36 g
	Plein champs	10,89 ± 0,54 k	11,17 ± 0,75 h	35,52 ± 1,42 d	10,43±0,89 i
CHAO	Sous serre	01,69 ± 0,08 n	22,86 ± 1,11 e	-	89,47 ± 4,47 e
	Plein champs	23,10 ± 1,15 h	48,03 ± 1,92 b	41,31 ± 2,06 c	06,77 ± 0,33 j
P64	Sous serre	03,39 ± 0,16 m	15,69 ± 0,78 g	-	128,94 ± 5,15 d
	Plein champs	39,83 ± 1,99 e	43,08 ± 1,72 c	43,24 ± 2,16 c	05,08 ± 0,25 k
S20-R1	Sous serre	09,21 ± 0,46 k	18,77 ± 0,75 f	-	134,21 ± 5,36 d
	Plein champs	17,08 ± 0,85 i	12,38 ± 0,61 h	-	-
S20-R2	Sous serre	-	06,48 ± 0,25 i	18,08 ± 0,90 f	65,78 ± 3,28 f
	Plein champs	35,37 ± 1,41 f	51,35 ± 2,05 a	27,41 ± 1,09 e	-
CHAO-R1	Sous serre	06,05 ± 0,18 l	19,45 ± 1,97 e	-	160,52±6,42 c
	Plein champs	56,97 ± 1,13 c	52,87 ± 1,05 a	10,81 ± 0,54 h	-
CHAO-R2	Sous serre	-	10,23 ± 0,40 h	-	155,26 ± 6,21 c
	Plein champs	64,01 ± 3,20 b	31,72 ± 0,95 d	41,69 ± 1,66 c	7,21 ± 0,51 j
P64-R1	Sous serre	03,87 ± 0,19 m	22,86 ± 1,14 e	-	276,31 ± 11,05 a
	Plein champs	51,62 ± 2,58 d	19,93 ± 1,95 e	66,04 ± 3,30 b	37,28±1,86 h
P64-R2	Sous serre	14,52 ± 0,73 j	44,70 ± 2,23 c	27,12 ± 1,35 e	247,36 ± 9,89 b
	Plein champs	92,29 ± 4,61 a	53,17 ± 2,65 a	73,35 ± 3,66 a	9,63±0,92 i

Pseudomonas fluorescens (S20 CHAO et P64) et *Rhizobium fabae* (R1 et R2).

* : écart- type entre les répétitions.

** : Les valeurs suivies de la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le test de Newman-Keuls à α= 5% (Analyse ANOVA).

- : pas de gain (sans effet sur la phytostimulation).

3.2.4 Discussion

Certes, suite aux opérations de bactérisation avec les rhizobactéries, il a été constaté des effets phytobénéfiques, néanmoins nos expérimentations montrent à l'évidence des variabilités selon les conditions de leur application, en conditions semi contrôlées (sous serre) ou en plein champ ; ainsi que par rapport aux paramètres étudiés. L'interaction de souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *Rhizobium* a amélioré significativement le développement des biomasses aérienne et racinaire, le nombre de nodules et la teneur en matière azotée totale. Dans nos essais de coinoculation, la présence de souches de *Pseudomonas fluorescens* a induit une augmentation appréciable en nombre de nodules et en fixation d'azote, dans les deux essais (sous serre et plein champ), par rapport à l'activité des souches de *Rhizobium fabae* (R1 et R2). La souche P64 apparaît plus performante sur la plupart des paramètres de croissance en stimulant davantage ces processus chez la fève.

Dans des expériences en conditions contrôlées, la promotion des paramètres de croissance et de rendement de diverses plantes cultivées, en réponse à l'inoculation avec des PGPRs, ont été rapportés [350].

La bactérisation avec les souches de *Rhizobium fabae* (R1 et R2) a induit des effets bénéfiques considérables sur la promotion de la croissance, notamment sur la nodulation et la fixation symbiotique de l'azote. Ces rhizobactéries génèrent la formation de nodules [136], permettant de fixer l'azote atmosphérique (N_2) et le réduire en ammoniacque (NH_4OH) assimilable par la plante. De même, les *Rhizobiums* profitent de cette interaction par l'acquisition de molécules carbonées produites par la plante par voie de photosynthèse [351]. Plusieurs études suggèrent que la combinaison de souches de *Pseudomonas fluorescens* avec des *Rhizobiums* sp. sur des légumineuses pourrait être plus efficace que l'application de ces souches indépendamment [352, 353, 354]. Dans la plupart des cas, aucun effet négatif de l'interaction PGPR-*Rhizobium* symbiotique sur la croissance des plantes n'a été rapporté. L'excrétion des cellulases par les souches de *Pseudomonas* et leur action ultérieure sur les racines des légumineuses pourraient faciliter la pénétration rapide des *Rhizobiums*, entraînant une augmentation de la nodulation et de la fixation d'azote ; ce qui a été observé sur diverses légumineuses comme le haricot [355], le pois [356] et le soja [357].

D'après Bai et *al.* [358] et dans le but de la sélection de souches bactériennes favorisant la croissance des plantes, les évaluations finales doivent être faites sur le terrain. L'environnement naturel (de plein champ) est généralement beaucoup plus stressant, où les conditions sur le terrain sont plus complexes que celles d'un environnement contrôlé. Ainsi les résultats obtenus en expérience sous serre ne reflètent pas nécessairement le potentiel de promotion de croissance des plantes sur le terrain en condition pratiques et naturelles.

En plus de cette plante, plusieurs études ont montré que les PGPRs peuvent exercer des effets bénéfiques sur différentes cultures d'intérêt agronomique, telles que le pois chiche (*Cicer arietinum*) [359], le maïs (*Zea mays*) [360], le blé [361], la bettrave sucrière [362] et le haricot [363, 364]. D'après Esashi [365], l'inoculation des semences avec des *Pseudomonas fluorescens* a amélioré significativement la nodulation, la teneur en azote, la croissance et le rendement de plusieurs cultures. Le nombre de nodules racinaires est fortement corrélé avec le rendement de plusieurs espèces légumineuses [366]. Stajkovic et *al.* [367] ont montré que la coinoculation du haricot avec des souches de *Rhizobium* et de PGPRs a influencé positivement le nombre de nodules (76,67 à 106,67 nodules/plant), comparativement à l'inoculation avec *Rhizobium* seul (54 nodules/plant).

Dans nos expériences, les poids frais et secs des biomasses aérienne et racinaire sont nettement améliorés avec les coinoculations (P64-R1, P64-R2) par rapport aux témoins. Dans d'autres travaux, la coinoculation avec des espèces rhizobiennes et autres PGPRs a significativement amélioré le poids sec et frais des pousses et des racines du haricot [364], des plantules de soja et de pois chiche cultivés au champ et sous serre [368]. Ainsi, l'inoculation des graines de chou (*Brassica oleracea*) avec des PGPRs a augmenté le poids frais et sec des pousses, respectivement, de 6 à 51 % et de 13 à 10 %. De même, les poids frais et secs des racines ont été améliorés respectivement, de 27 à 12 % et de 12 à 37 % [369]. La coinoculation avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *Rhizobium* sp. a influencé positivement les paramètres de croissance des plantes, la nodulation, l'activité de nitrogénase, l'assimilation de l'azote et du phosphore, ainsi que la teneur du sol en phosphore assimilable.

La possibilité de produire un inoculant commun contenant un mélange d'un PGPR (*Pseudomonas* Kb-133), et des espèces de *Rhizobium* efficaces pour la nodulation et la productivité de l'haricot à graines noires, a été démontrée [370]. Ainsi, l'inoculation avec *Pseudomonas fluorescens* 2137 a augmenté la colonisation de *Bradyrhizobium japonicum* sur les racines de soja et le nombre de nodules produit, tandis que la coinoculation avec *Pseudomonas fluorescens* WCS365 avait des effets indésirables [371]. La même étude suggère également que la colonisation des racines par *Pseudomonas fluorescens* 2137 pourrait augmenter la nodulation par le dégagement des substances de croissance, qui stimulent l'infection par *Bradyrhizobium japonicum*.

Dans cette étude les gains en nodulation et en matière azotée obtenus, suite à la bactérisation avec la souche CHA0, sont moins importants comparés aux gains obtenus avec les souches P64 et S20. La souche CHA0, souche de référence, produit des métabolites certes bénéfiques comme les acides organiques et les hormones de croissance [372], mais elle est incapable d'utiliser le précurseur d'éthylène (ACC), donc dépourvue d'activité ACC désaminase [214].

Dans nos travaux précédents [35, 36], il a été enregistré des cas d'inhibition de la croissance de la fève par la souche CHA0, comparée aux souches P64 et S20. Par rapport aux souches isolées en Algérie, en l'occurrence P64 (Mitidja) et S20 (Ghardaïa), le problème de l'origine géographique peut être relaté, du moment que la souche CHA0 est une souche de référence isolée en Suisse. En effet, l'influence de l'origine écologique sur l'expression et la stabilité des effets bénéfiques des souches bactériennes a été signalée par plusieurs auteurs [365, 373], étant donné que les souches les plus performantes sont d'origine locale. Kumar *et al.* [374] ont montré par des études sur terrain que la coinoculation du pois avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *Rhizobium* a provoqué une réduction en nombre de pois infectés par *Fusarium oxysporum* cultivés dans des sols infestés, accompagnée d'une amélioration de la croissance des plantes en taille des pousses et en poids sec. Ainsi, la stimulation de la croissance et de la nodulation a été également rapportée chez le pois chiche, en utilisant des souches de *Pseudomonas* qui sont antagonistes aux champignons phytopathogènes (*Aspergillus* sp. *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidrematum* et *Rhizoctonia solani*) en coinoculation avec *Mesorhizobium*. Ceci a eu comme conséquence la

formation de 68 à 115 % de nodules supplémentaires, comparée à l'inoculation simple par *Mesorhizobium* [375]. Les résultats de nos expériences montrent que les effets bénéfiques de la coinoculation sont mieux perceptibles dans le champ par rapport à la serre. Les gains obtenus en nombre de nodules et en azote total, en poids frais et sec des pousses et en poids frais des racines sont plus importants en plein champ.

L'inoculation de plantes avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* a eu un effet plus stimulant sur leur croissance dans un sol non stérile. Abbass et Okon [376] ont émis l'hypothèse que l'AIA et d'autres phytohormones étaient responsables d'une augmentation de la croissance du canola, de la tomate et du blé (*Triticum turgidum*) dans un sol non stérile inoculé avec des souches PGPR. Les auxines produites par ces rhizobactéries peuvent affecter la croissance des plantes, notamment le développement racinaire qui favorise l'absorption d'éléments nutritifs, en augmentant ainsi la croissance végétale [377]. Généralement, les microorganismes isolés de la rhizosphère et du rhizoplan, de différentes cultures, ont montré plus d'aptitudes de production d'auxine que ceux provenant de sols sans racines [378]. Ceci peut expliquer que ces rhizobactéries ont eu une capacité plus compétitive de survivre et d'influencer la croissance des plantes inoculées, en présence d'une microflore indigène [379].

L'effet de la coinoculation avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* sur les performances symbiotiques des rhizobia nodulatrices est fortement influencé par les caractéristiques génétiques des associés symbiotiques, la spécificité et la compatibilité avec la plante hôte, ainsi que les conditions de culture [380]. En fait, un faible taux de nodulation et une réponse variable à l'inoculation sont principalement dus aux propriétés intrinsèques de la plante hôte, ainsi qu'à la sensibilité élevée à d'autres facteurs limitant la nodulation, tels que les taux élevés en engrais azotés utilisés dans l'agriculture intensive, les températures élevées et la sécheresse du sol [381]. La formation d'un nodule racinaire est un processus énergétique très coûteux; les légumineuses contrôlent le nombre et la taille des nodules afin d'avoir un apport optimal en azote au moindre coût en énergie (carbone). Jeudy et al., [382] ont démontré que la présence de sols riches en azote empêchait la formation de nodules chez les légumineuses. Ainsi, la fertilisation azotée entraîne la sénescence des nodosités

et réduit l'efficacité de la symbiose en faveur de l'acquisition directe d'éléments nutritifs dans le sol [176].

La régulation de la nodulation par la plante implique deux processus indépendants [383]. Le premier concerne l'éthylène, une hormone végétale qui régule négativement l'initiation des nodules en réduisant le nombre d'infections et en limitant la formation du primordium nodulaire [384]. Ce processus fonctionne en synergie avec le deuxième processus appelé AON (Autoregulation Of Nodulation) [383]. L'AON est une régulation systémique de la nodulation, qui comprend un signal foliaire et un signal racinaire [141]. Le gène *SUNN* code pour le récepteur de type LRR-RLK (Leucine Rich Repeat – Receptor Like Kinase) [385] ; l'orthologue HAR1 de ce gène peut se lier au peptide glycosylé CLERS2 (CLavata3/Embryo surrounding region) produit dans les racines, et qui agirait comme un signal à longue distance transporté via le xylème (Figure 3.18) [386]. Les peptides CLE sont sécrétés et impliqués dans de nombreux processus chez les plantes. Chez *M. truncatula*, les peptides *CLE12* et *CLE13* inhibent la nodulation de manière dépendante de *SUNN*. Ainsi, *CLE13* est exprimé dans les racines en réponse au facteur Nod et d'une manière dépendante de la voie de l'auxine, ce qui en fait un bon candidat pour être le signal systémique produit dans les racines et envoyé aux parties aériennes où se trouve *SUNN* [387, 388].

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connus pour être capables de sécréter des substances favorisant la croissance des plantes, comme l'acide indole-acétique et les cytokinines qui pourraient être responsables des effets bénéfiques des PGPRs [361]. La co-inoculation de *Mesorhizobium* sp. avec *Pseudomonas* produisant de l'AIA a augmenté le nombre de nodules chez le pois chiche ; le poids sec de la plante était significativement plus élevé en cas de co-inoculation par rapport au témoin [205]. Ainsi, l'inégalité de la nodulation peut être attribuée à la capacité des PGPRs à produire de l'AIA, car son rôle est de réguler la formation des nodules chez les légumineuses, en raison de la suppression des agents pathogènes ou de la mobilisation d'éléments nutritifs [389]. Le mécanisme de promotion de la croissance sur le pois a été étudié à l'aide de 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), produit par *Pseudomonas fluorescens* et son mutant négatif [390]. Des niveaux élevés en DAPG, dans la rhizosphère du pois,

suggèrent que cela peut agir comme une hormone provoquant des changements morphologiques sur la plante et qui peut conduire à l'infection et à la nodulation par *Rhizobium*.

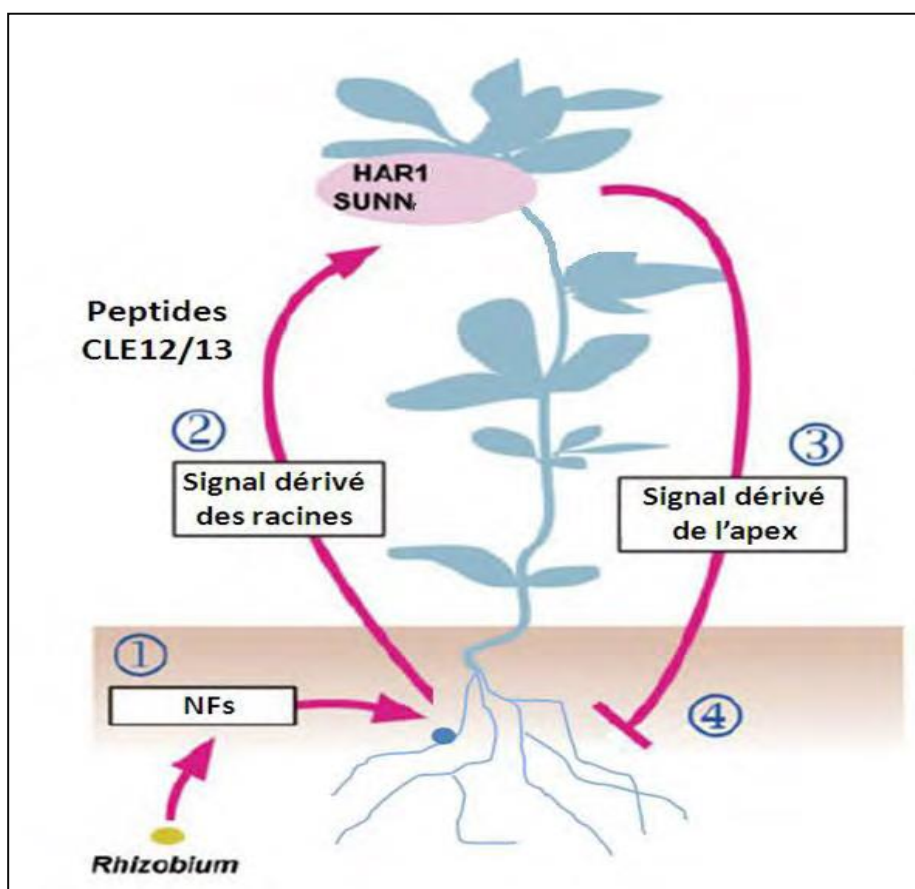


Figure 3.18 : Modèle du processus d'autorégulation (AON). Les facteurs Nod (NFs) induisent le processus de nodulation mais aussi l'expression des peptides CLE. (2) Ces peptides sont sécrétés et probablement glycosylés avant d'être transportés vers les parties aériennes via le xylème où ils sont perçus par SUNN / HAR1. (3) Cette perception induit la production d'un signal dans les feuilles qui a une action longue distance et négative sur la formation de nodules dans les racines (4) [391].

De nombreuses études ont observé l'inhibition du processus nodulaire ou de diminution du nombre de nodules par l'éthylène diverses légumineuses [392]. Les *Pseudomonas* spp., possédant l'enzyme ACC-désaminase pourraient être utile pour réduire la concentration d'éthylène pouvant nuire à la croissance des racines et au nombre de nodules produit dans un environnement stressant. Cette enzyme réduit l'association racine-ACC, tout en favorisant l'élongation racinaire [393]. Ahmad et al. [394] ont observé que l'inoculation combinée de *Pseudomonas*

et *Rhizobium phaseoli* améliorerait la croissance et la nodulation du haricot dans des conditions de salinité, due à la suppression de l'éthylène induit par le stress.

Chabot et al. [395] ont attribué cette croissance positive à la capacité des *Pseudomonas* à solubiliser les phosphates en augmentant la teneur en phosphore dans le sol, ainsi qu'en améliorant la nodulation et la fixation d'azote. D'après Bashir et al. [396], la disponibilité en phosphore augmente le nombre et la taille des nodules et la quantité d'azote absorbée par unité de poids des nodules ; augmentant ainsi la teneur en azote dans la partie récoltée de la légumineuse hôte, avec une amélioration de la densité des Rhizobia dans le sol entourant la racine.

Toro et al. [397] ont démontré que grâce à l'azote enrichi (N^{15}), le processus de nodulation et de fixation d'azote chez la luzerne augmente en parallèle avec l'augmentation du phosphate dans les tissus. Chez le maïs, l'inoculation de *Rhizobium* avec *Pseudomonas* induit une réaction de tolérance au sel, ce qui entraîne une production accrue de la proline, un maintien de la teneur en eau dans les feuilles et une absorption sélective des ions K^+ . Cela pourrait être dû à la plus grande accumulation du phosphore et à une plus grande stabilité de la membrane, ce qui réduit la fuite d'électrolyte [398]. Les pyoverdines produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents contribuent activement à l'acquisition du fer par les plantes dicotylédones, et permettent d'extraire le fer des structures minérales des sols. De plus, il a été démontré que les pyoverdines de certaines souches pouvaient être utilisées par la plante pour sa nutrition directe en fer [399]. Ces souches bactériennes possèdent également un système de sécrétion de type III (T3SS), un système connu pour permettre une interaction cellulaire directe entre la plante et la bactérie [400]. Il a été démontré ainsi, que la teneur en fer de l'environnement peut affecter l'effet des bactéries sur la croissance et la santé de la plante en ce qui concerne la synthèse de sidérophores.

La présence simultanée de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, dans les zones rhizosphériques où des *Rhizobiums* exercent leurs activités nodulantes sur des légumineuses, induit une phytostimulation et stimule plus le processus de nodulation. La coinoculation peut conduire à une nodulation

précoce, une augmentation du nombre de nodules et une amélioration générale de la croissance racinaire.

D'après nos résultats, la coinoculation en plein champ a augmenté considérablement la croissance des tiges et des racines, la nodulation, ainsi que la fixation d'azote. Ainsi les gains obtenus sont plus importants comparativement à ceux enregistrés sous serre. La réaction de la croissance était spécifique selon les interactions étudiées.

3.3. Recherche *in silico*

3.3.1. Phylogénie des espèces de *Rhizobium*

3.3.1.1. Gène ARNr 16S

Après comparaison *in silico* des séquences du gène ADNr 16S de différentes espèces du genre *Rhizobium*, l'arbre phylogénétique obtenu se présente en deux clades (Figure 3.19).

- **Le clade A**, comprend trois groupes de gènes différents :
 - i. Le premier groupe renferme les souches de *R. pisi*, *R. phaseoli*, *R. fabae*, *R. etli* et *R. leguminosarum*. Dans ce groupe nous notons la forte similarité entre les trois souches : *R. pisi*, *R. phaseoli* et *R. fabae*. La distance entre les séquences de *R. pisi* et *R. phaseoli* est de 0.0015 ($d = 0.0004 + 0.0011$). *R. fabae* présente la même distance de 0.0015 ($0.0007 + 0.0004 + 0.0004$) par rapport à *R. pisi* et une distance de 0.0022 ($0.0007 + 0.0004 + 0.0011$) par rapport à *R. phaseoli* (Figure III.19).
 - ii. Le deuxième groupe est constitué de la seule espèce de *R. gallicum* dont la distance avec le premier groupe est de 0.0101.
 - iii. Le troisième groupe renferme les souches de *R. leucaenae* et *R. tropici*, ce groupe de gènes présente une différence de 0.1% par rapport au premier groupe.
- **Le clade B**, renferme *R. giardinii* qui présente la séquence d'ADNr 16S la plus divergente de toutes les souches de *Rhizobium* ayant concernées cette recherche. Ce clade (B) est relativement éloigné du premier clade (A) (Figure 3.19).

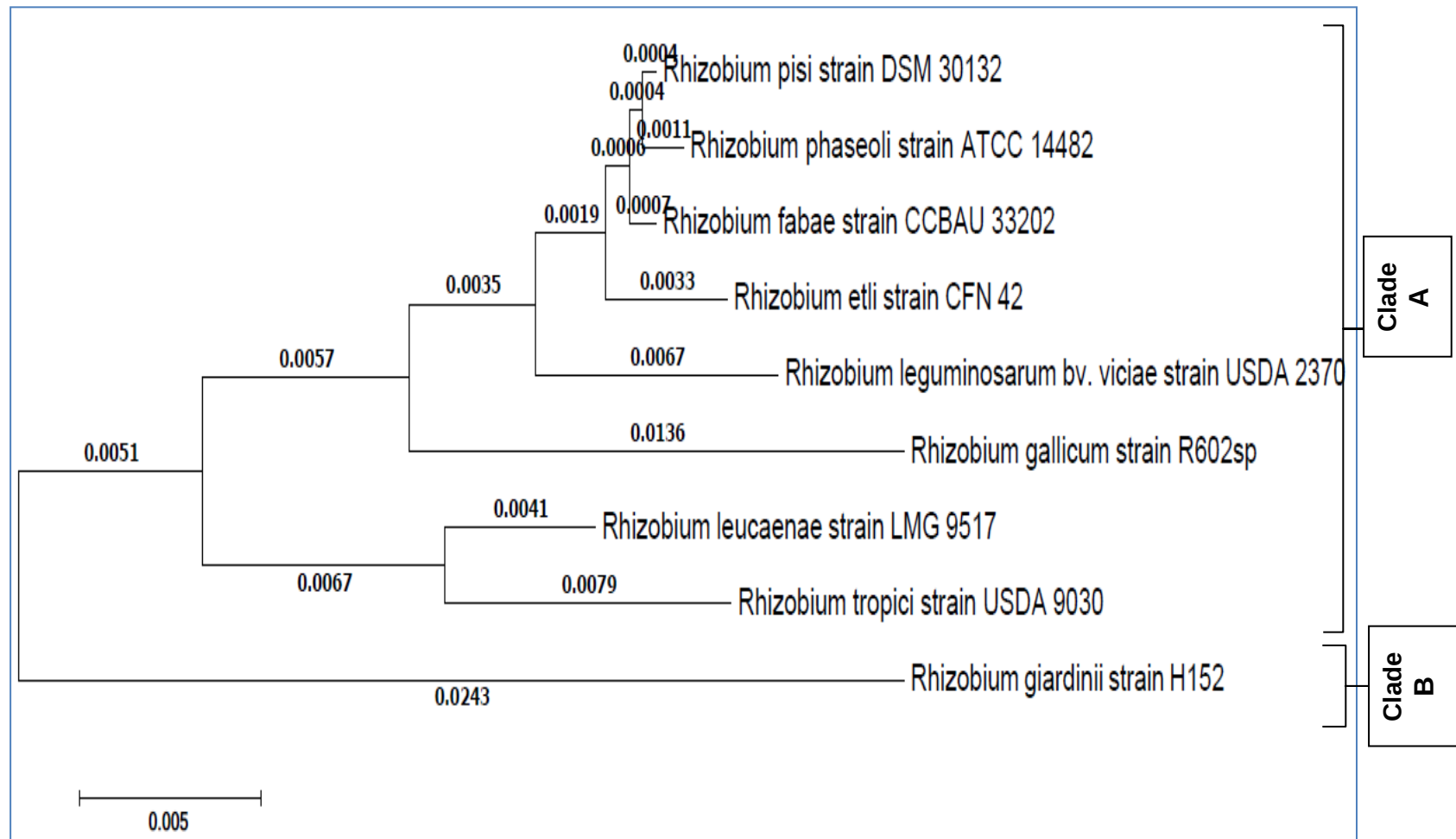


Figure 3.19 : Phylogramme construit par la méthode NJ, du gène ADNr 16S de différentes espèces du genre *Rhizobium*

3.3.1.2. Gènes *rpoB* et *gyrB*

Les arbres de séquences concaténées des gènes ménagers *rpoA* et *gyrB* (Annexe 3) sont illustrés respectivement dans les figures 3.20 et 3.21.

- Le gène *rpoA* est partagé en deux clades : Le clade (A) regroupe cinq espèces: *R. fabae* et *R. pisi* qui sont les plus analogues, *R. etli*, *R. leucaenae*, ainsi que *R. giardinii* qui est la plus éloignée des autres souches. Les souches *R. tropici*, *R. phaseoli*, *R. leguminosarum* et *R. gallicum* sont dans le même clade B. Ce dernier se distingue nettement (Figure 3.20).
- De même, l'arbre du gène *gyrB* se présente en deux clades A et B. La plupart des espèces de *Rhizobium* étudiées se retrouvent dans le clade A. Les espèces *R. leguminosarum*, *R. pisi* et *R. fabae* sont les plus analogues. Le clade B avec la seule espèce *R. giardinii* présente une différence de 10,71% par rapport à l'ensemble des autres espèces (clade A) (Figure 3.21).

3.3.1.3. Gène *nodC*

La figure 3.22 représente l'arbre phylogénétique de gène *nodC* divisé en deux clades (A et B), dont l'un (A) regroupe les souches de *R. fabae*, *R. leguminosarum* et *R. pisi*. Les autres six espèces constituent le deuxième groupe (B) distant du premier de 9,55%.

3.3.1.4. Gène *nifH*

Pour le gène *nifH*, l'arbre phylogénétique présente les espèces de *Rhizobium* en deux groupes distincts (A et B). Le clade (B) renferme, toujours, les trois espèces qui se rapprochent pour la plupart des gènes étudiés à savoir : *R. fabae*, *R. leguminosarum* et *R. pisi*. Les autres espèces de *Rhizobium* s'associent dans le clade (A), montrant ainsi une certaine distance entre les séquences des différentes souches, tandis que la distance entre les deux clades est de 5,26 % (Figure 3.23).

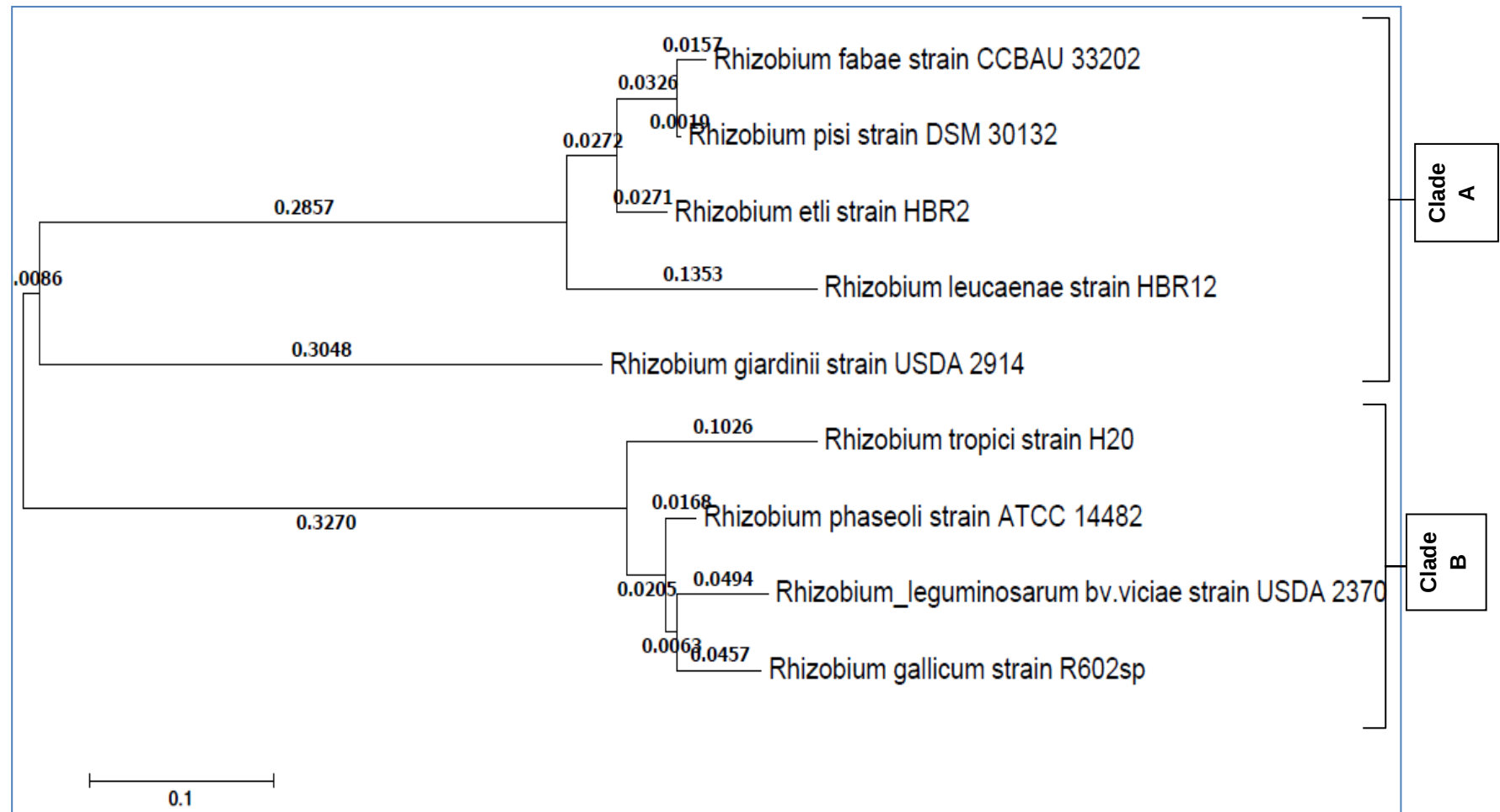


Figure 3.20 : Phylogramme construit par la méthode NJ, du gène *rpoB* chez différentes espèces de *Rhizobium*.

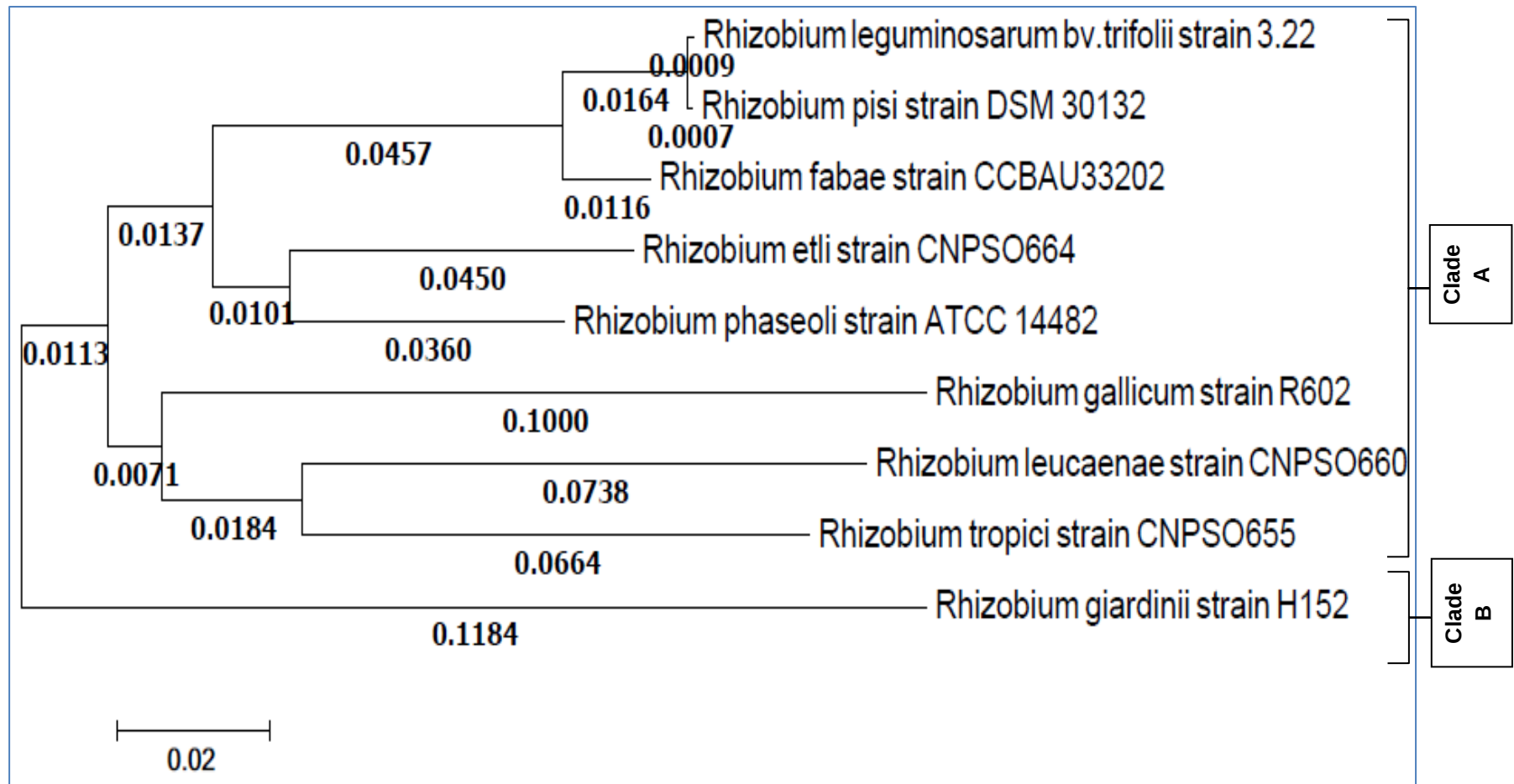


Figure 3.21 : Phylogramme du gène *gyrB*, construit par la méthode NJ chez différentes espèces de *Rhizobium*.

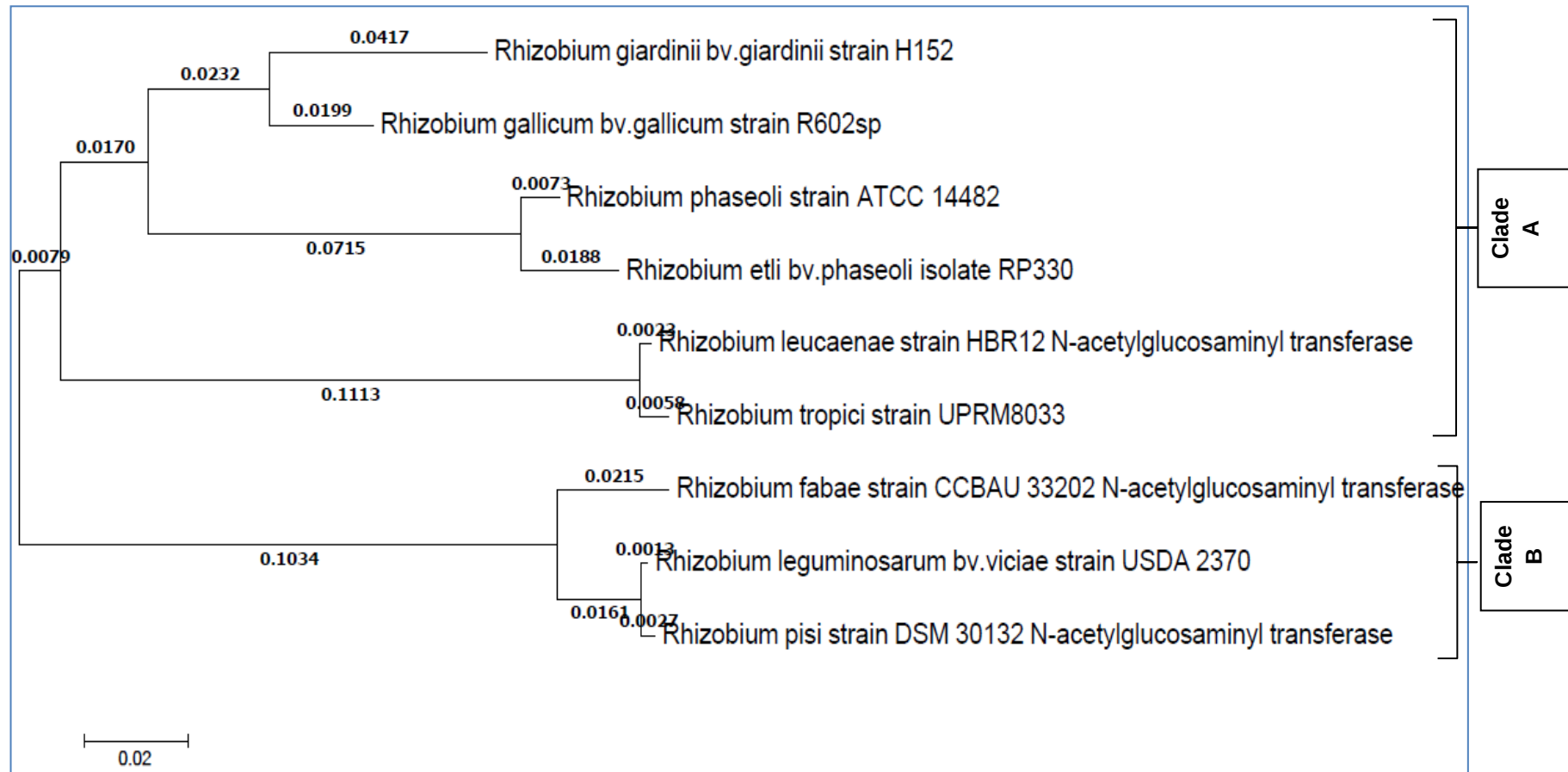


Figure 3.22 : Phylogramme du gène *nodC*, construit par la méthode NJ chez différentes espèces de *Rhizobium*.

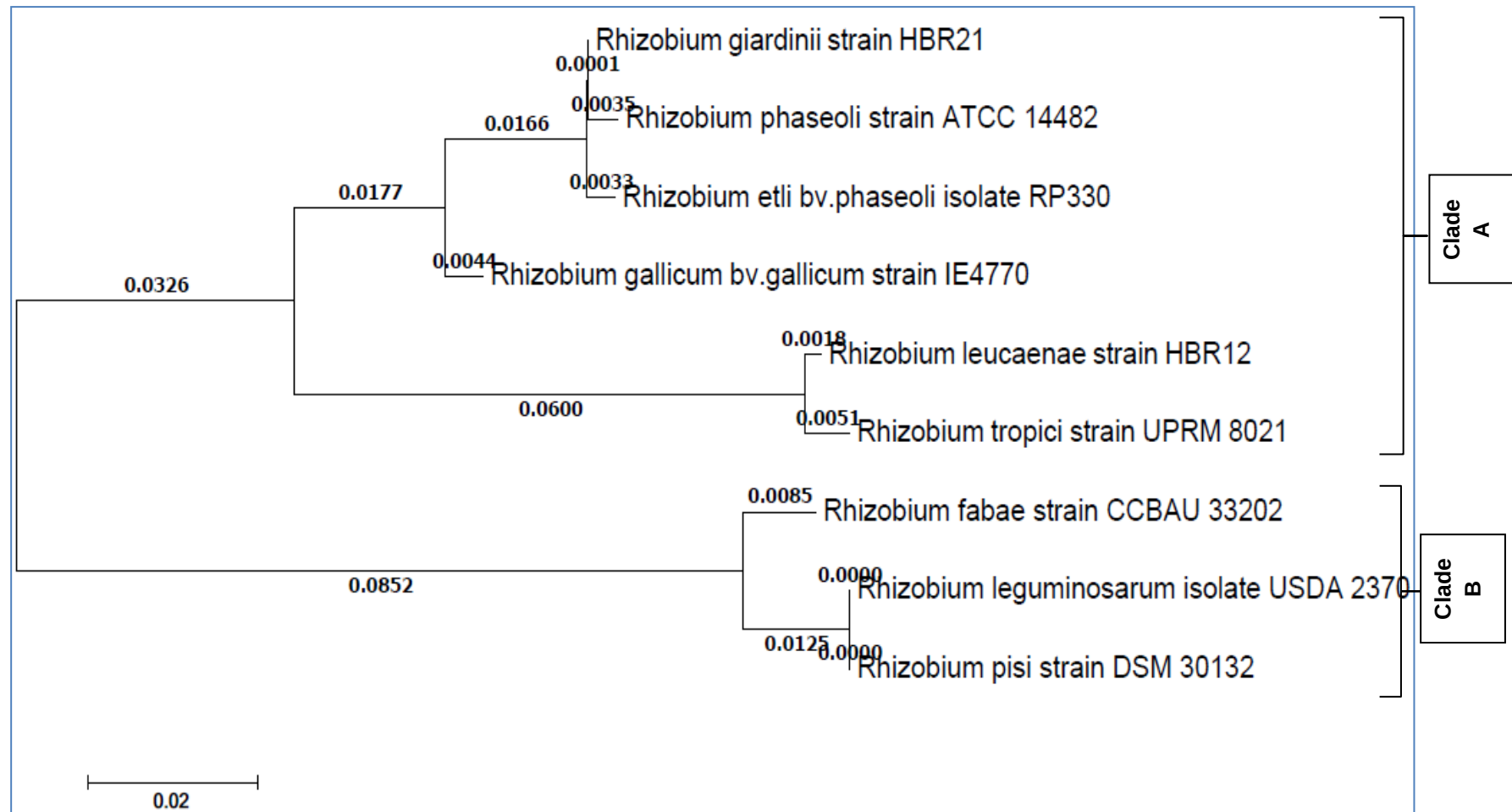


Figure 3.23 : Phylogramme du gène *nifH*, construit par la méthode NJ chez différentes espèces de *Rhizobium*.

3.3.1.5. Carte structurale des gènes symbiotiques

L'organisation des gènes symbiotiques (*nod*, *nif* et *fix*) a été déterminée chez différents rhizobia (Figure 3.24) ; chacun présentant des caractéristiques significatives.

- Beta-rhizobia présente 9 gènes de nodulation, en commun avec un arrangement de *nodUSAHJICBD*. En outre, *Cupriavidus* héberge de manière unique d'autres gènes *nod*, tel que *nodQ*, alors que seul *Burkholderia* contient *nodT* et *nodW*. À côté des gènes *nod*, le régulateur *nifA* a été étroitement combiné avec les gènes *nod* et séparé des autres gènes *nif* de *Cupriavidus* ; ce qui contraste avec *Burkholderia* où *nifA* est étroitement organisé avec *nifED (N) XQ nifN*, remplaçant *nifD* à *Cupriavidus*. Cela démontre que les deux genres de Beta-Rhizobium ont des mécanismes différents de fixation de l'azote.
- Chez Alpha-rhizobia, les gènes de nodulation ainsi que les gènes *nif* et *fix* sont plus diversifiés d'une espèce à l'autre, en termes d'arrangement et de nombre de gènes ; bien que ces espèces présentent des gènes en commun, tels que: *nodABC nifHDKE* et *fixNOQP*. L'organisation des gènes de symbiose entre Alpha et Beta-rhizobia est différente: les gènes de Beta-rhizobia ont moins de complexité dans leur structure de nodulation et de fixation de l'azote, suggérant la possibilité qu'ils aient évolué plus récemment que les Alpha-rhizobiums [401].

3.3.1.6. Nitrogénase

La nitrogénase est un complexe enzymatique composé de deux enzymes (Figure III.25): La nitrogénase réductase dimérique à cluster fer-soufre, cette sous unité fournit les électrons via un mécanisme ATP dépendant. La seconde enzyme est tétramérique à cluster fer-molybdate-cobalt, et est responsable de la réduction de l'azote moléculaire [402]. La construction de l'arbre phylogénétique de la protéine nitrogénase a fait ressortir deux clades distribuant les espèces de *Rhizobium* selon leur degré de similarité : Le clade A est subdivisé en groupes renfermant la majorité des espèces étudiées, où les souches de *R. pisi* et *R. fabae* appartiennent au même groupe. Le clade B ne regroupe que les souches de *R. leguminosarum* et *R. phaseoli* (Figure 3.26).

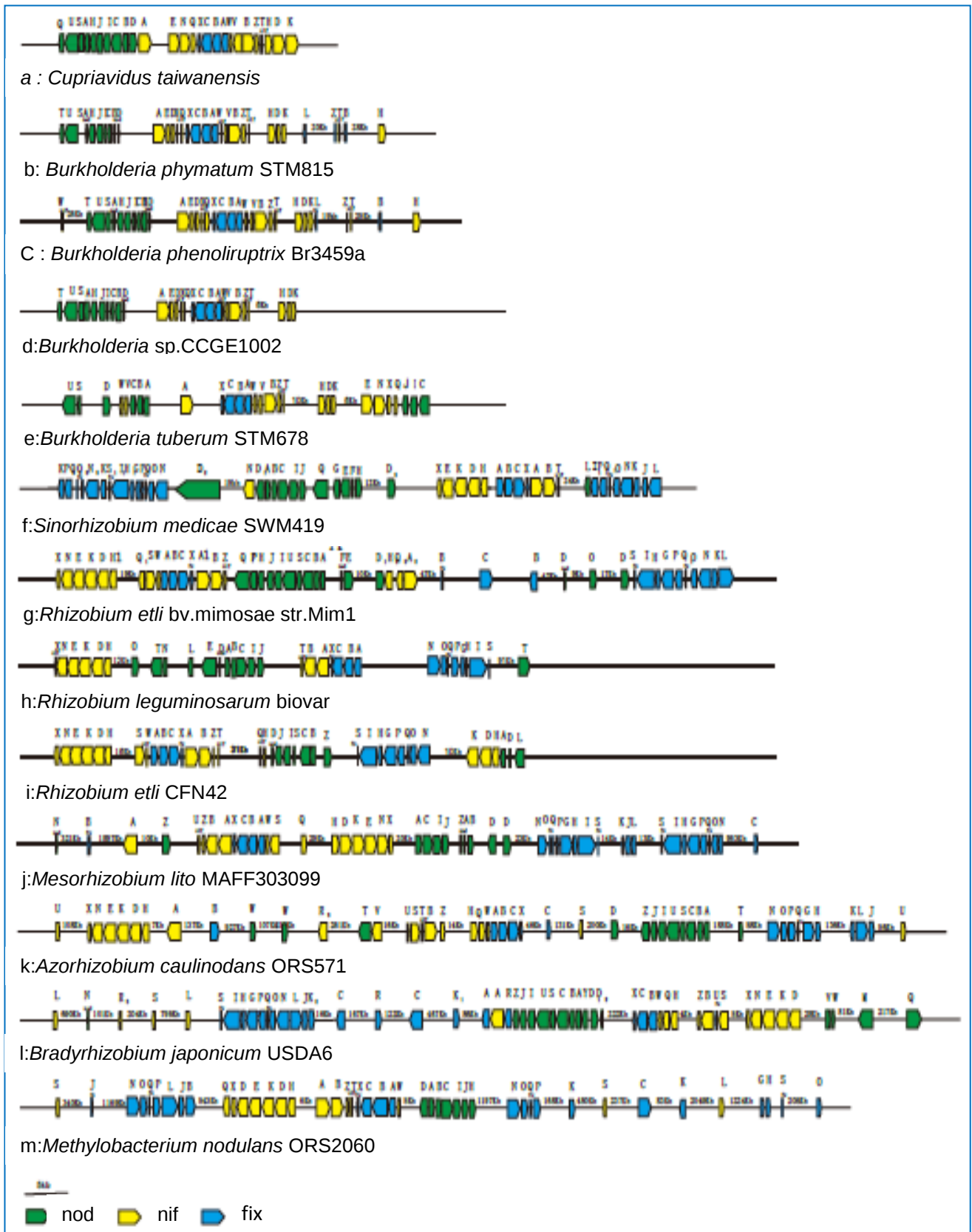


Figure 3.24 : Carte structurale des régions symbiotiques de Rhizobias. Les gènes sont colorés selon leur nom; Vert (gènes **nod**), jaune (gènes **nif**), bleu (gènes **fix**); Beta-rhizobia apparaît dans a, b, c, d et e; Alfa-rhizobia apparaît dans f, g, h, i, j, k, l et m. [401]. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

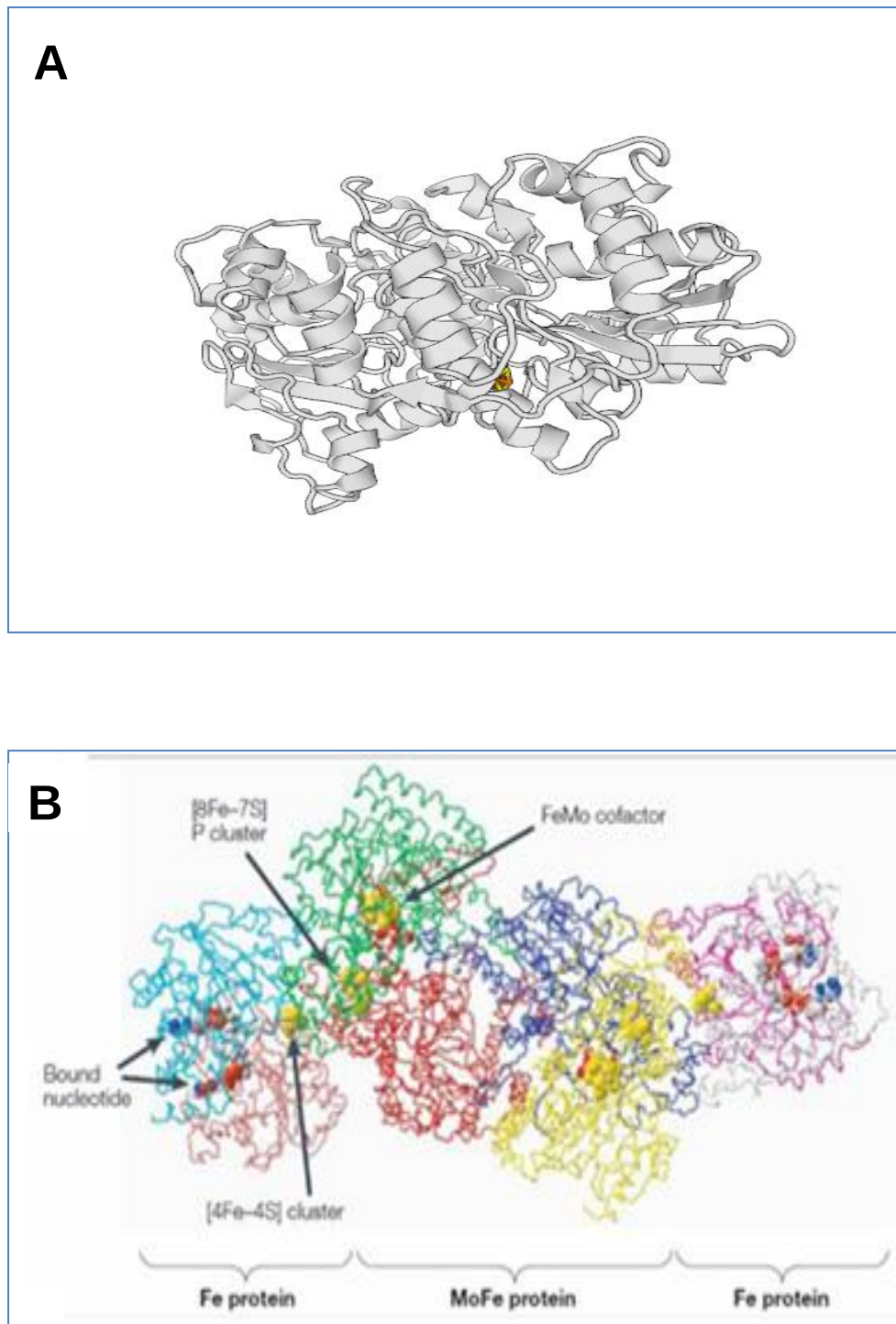


Figure 3.25 : Structure de la nitrogénase; (A) forme enroulée et sa composition (B) montrant un groupement fer-soufre. Elle libère des électrons utilisés pour réduire le diazote atmosphérique par la nitrogénase. Cette dernière utilise le FeMoCo comme co-facteur [403].

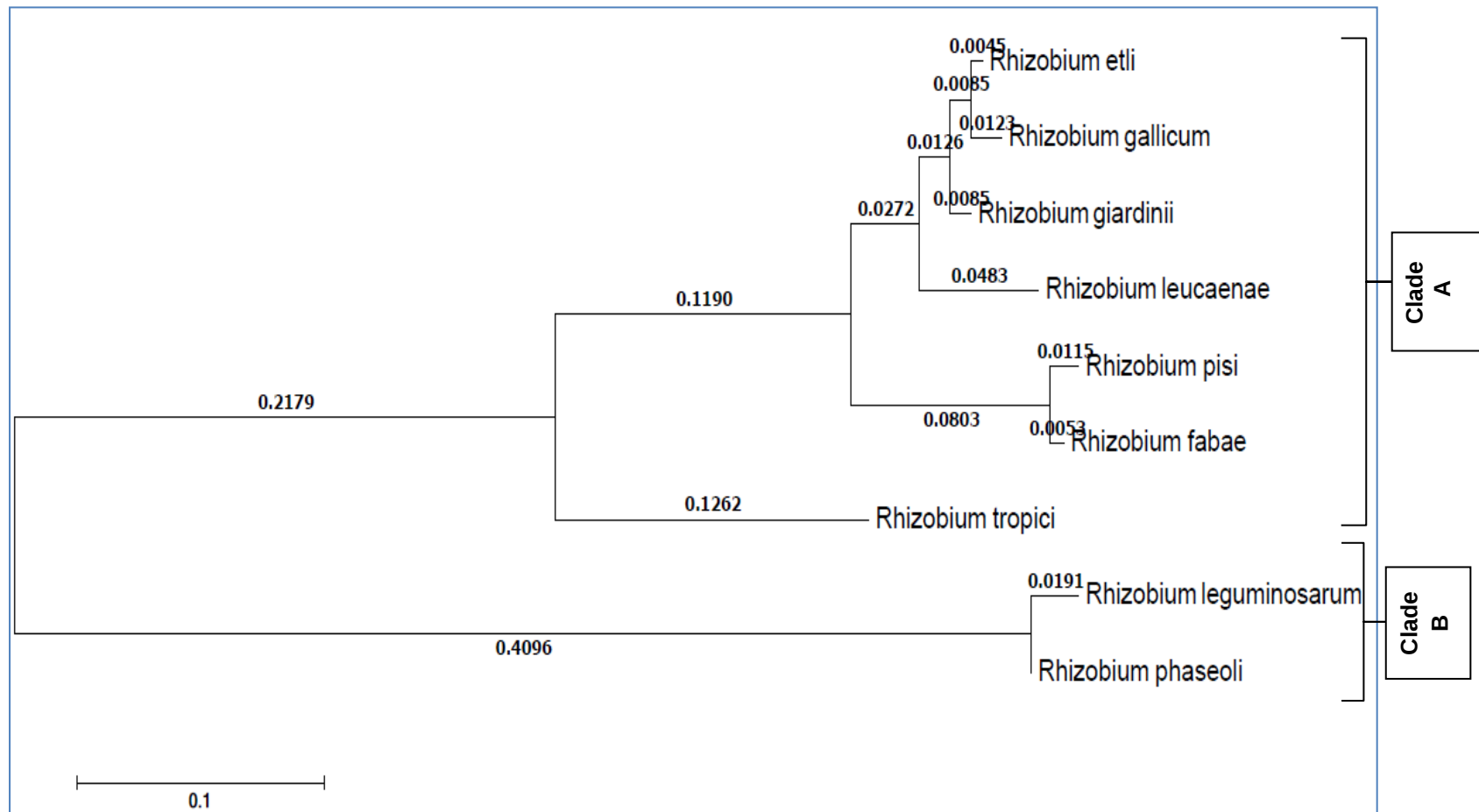


Figure 3.26 : Phylogramme de la nitrogénase, construit par la méthode NJ chez différentes espèces de *Rhizobium*.

3.3.2. Phylogénie des espèces de *Pseudomonas*

3.3.2.1 Gène ARNr 16S

La construction de l'arbre phylogénétique du gène ARNr 16S des trois espèces de *Pseudomonas* (Appendice 3), a fait ressortir deux clades A et B: Le premier regroupe les souches de *Pseudomonas protegens* et *P. fluorescens* où les souches CHA0 et WSM3457 présentent une forte similarité ($d = 0.08 \%$). Les deux souches de *Pseudomonas putida* se regroupent dans le même clade (B), éloigné du clade A (Figure 3.27).

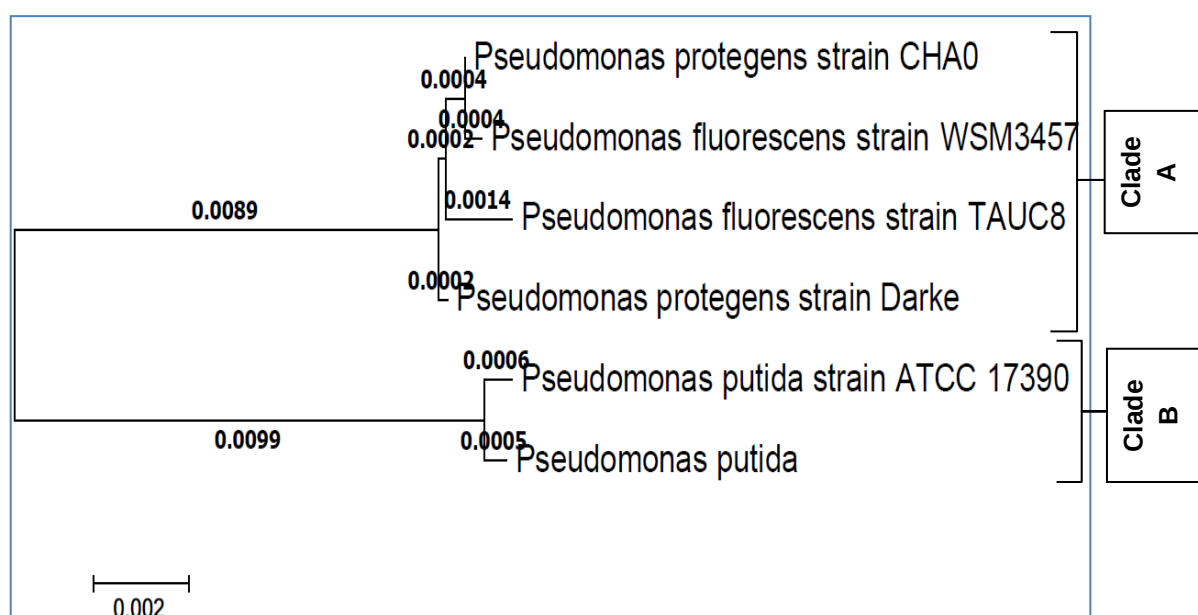


Figure 3.27 : Phylogramme construit par la méthode NJ, de gène ARNr 16S chez *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* et *P. protegens*.

3.3.2.2. Gène *rpoD*

Par rapport au gène *rpoD*, les souches de *Pseudomonas* sont réparties selon leurs séquences (Appendice 3) en deux clades A et B. dont les souches de *P. protegens* et une souche de *P. fluorescens* forment le clade A. Le groupe B renferme les souches de *P. putida* et une de *P. fluorescens*. La différence de séquences entre les deux groupes est de 10,19 % (Figure 3.28).

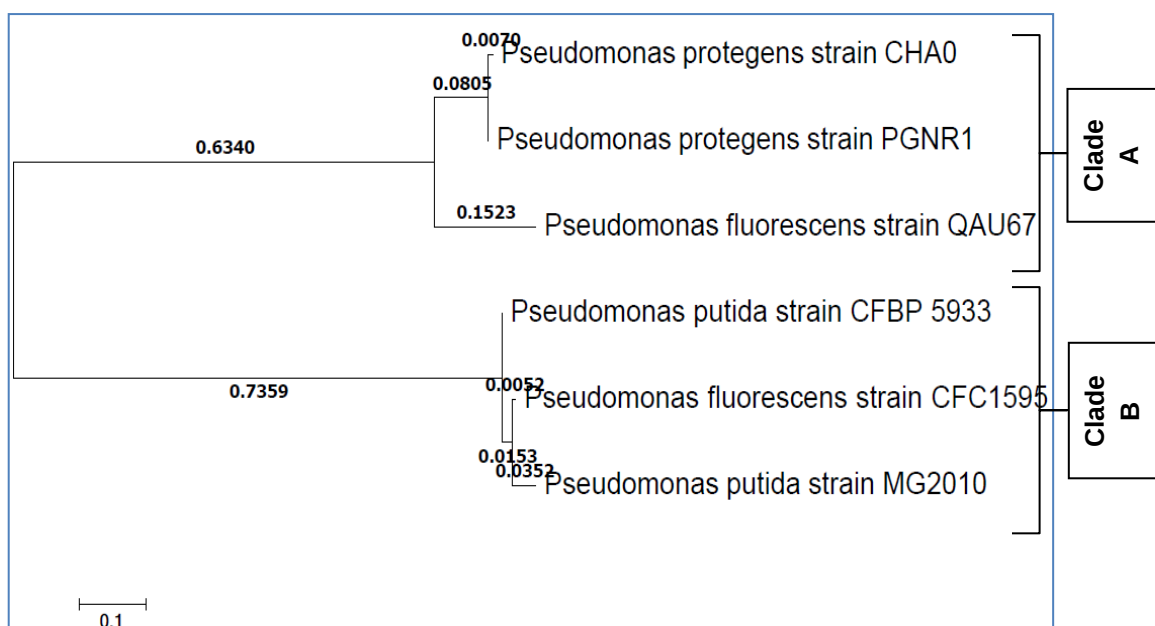


Figure 3.28 : Phylogramme de gène *rpoD*, construit par la méthode NJ chez *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* et *P. protegens*.

3.3.2.3. La protéine HCN

L'HCN ou l'acide cyanhydrique est synthétisé par l'enzyme HCN synthase, qui est codée par l'opéron *hcnABC*. Les expressions des gènes de cet opéron sont régulées par trois régulateurs de transcription, à savoir, LasR, ANR et RhIR. L'ANR (Anaerobic regulatory protein) est une protéine régulatrice appartenant à la famille des régulateurs de transcription de type FNR (Fumarate Nitrate Reductase) et qui agit en condition anaérobie. Elle régule la transcription de l'opéron *hcnABC* en reconnaissant et en liant une séquence promotrice conservée en amont de l'opéron *hcnABC*, appelée ANR box, sous forme de dimère. La dimérisation de cette protéine ANR est régulée par Fe_4S_4 cluster fer-soufre. Ce dimère d'ANR ($\text{ANR-Fe}_4\text{S}_4$ / $\text{ANR-Fe}_4\text{S}_4$) reconnaît et lie la séquence d'ADN promoteur et régule la transcription de cet opéron *hcnABC* (Figure 3.29 1 et 2) [404].

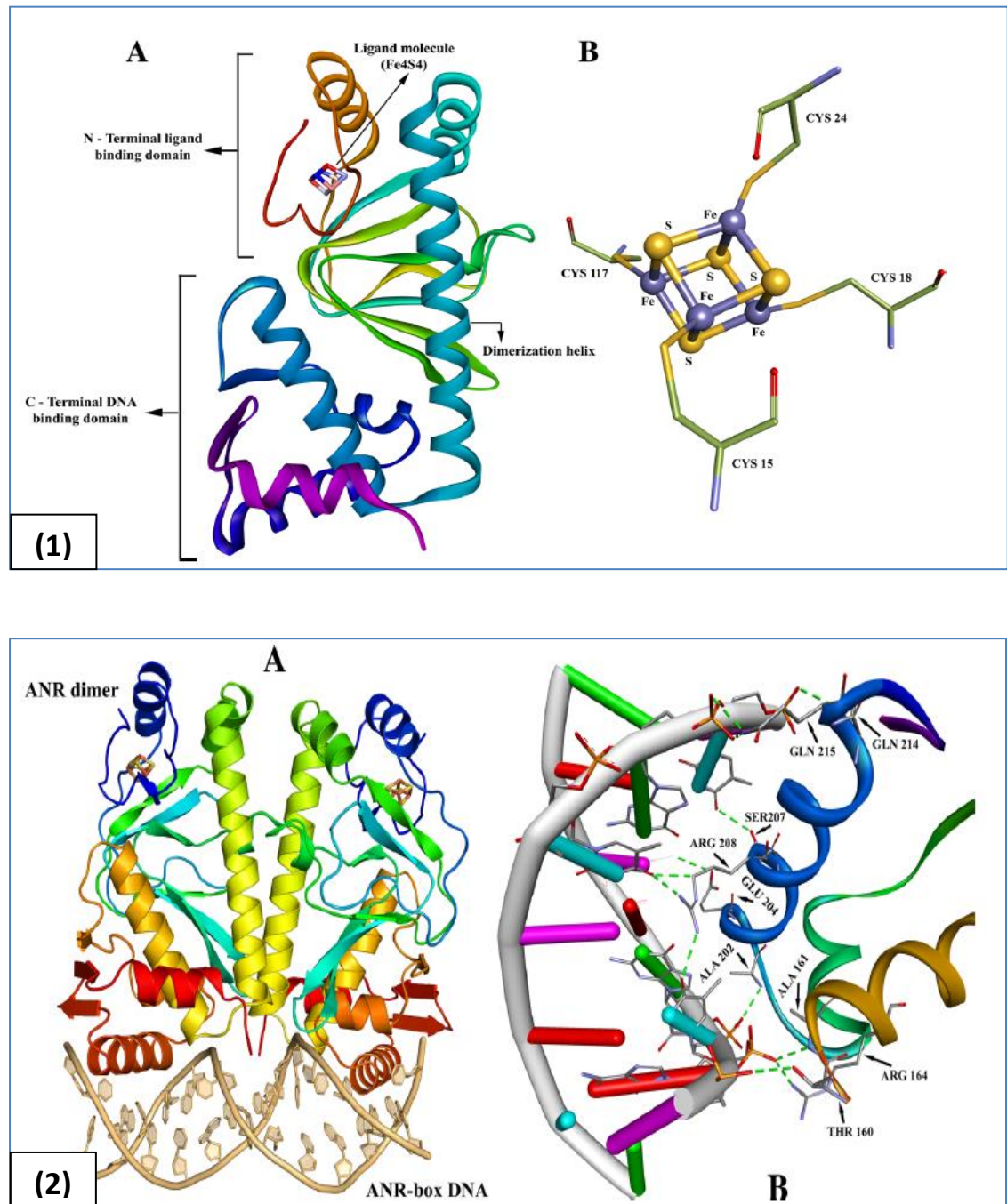


Figure 3.29 : (1) : La protéine ANR (Anaerobic regulatory protein) est représentée sous forme de bandes **(A)**. Le ligand Fe₄S₄ est montré sous forme de bâton **(B)**. Il est démontré que le ligand était attaché au dimère ANR **(A)**. **(2) :** les interactions ADN Promoteur-ANR dimère **(A)** les résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison à ADN **(B)** [404].

La figure 3.30 illustre la répartition des *Pseudomonas* selon leurs séquences protéiques d'HCN ; nous distinguons deux clades différents éloignés

de 4,9 % de différence, dont la souche CHA0 s'assemble avec la souche *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 dans le même groupe.

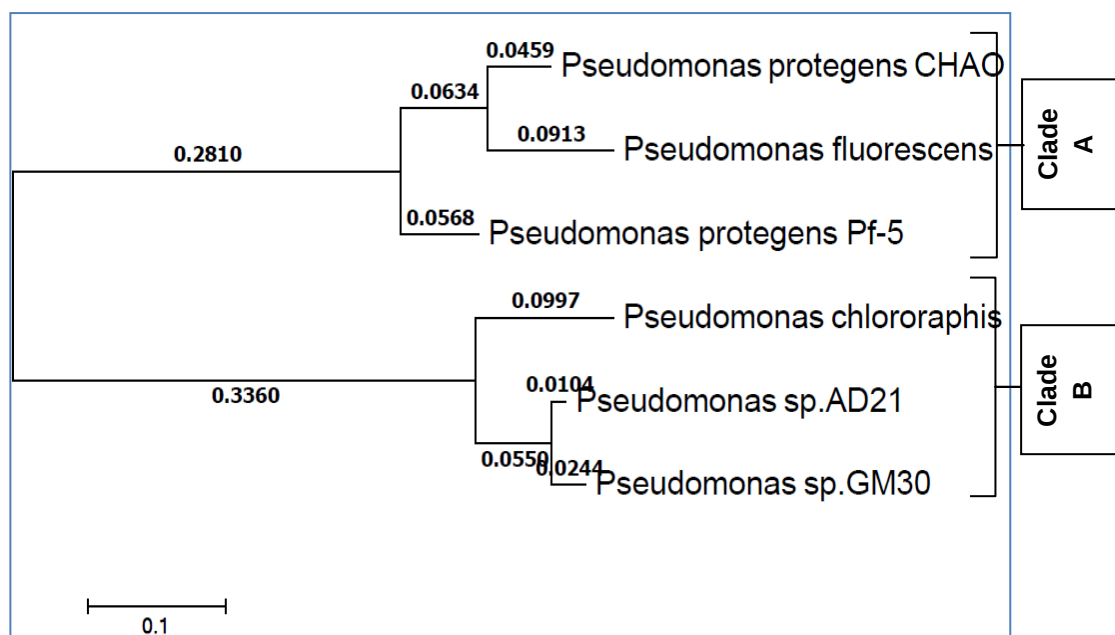


Figure 3.30 : Phylogramme de la protéine HCN, construit par la méthode NJ chez des espèces du groupe *Pseudomonas* fluorescents.

3.3.2.4 La Protéine TonB

La protéine TonB, qui comprend 239 acides aminés, est à la base de nombreux aspects physiologiques de l'enveloppe des cellules bactériennes à Gram négatif, y compris l'implication obligatoire dans le transport du fer. Les bactéries acquièrent généralement du fer par l'élaboration de sidérophores qui le complexent dans l'environnement. Le transport actif ultérieur de sidérophores ferriques, à travers les protéines du récepteur de la membrane externe, nécessite l'implication de la protéine TonB (Figure 3.31) [405].

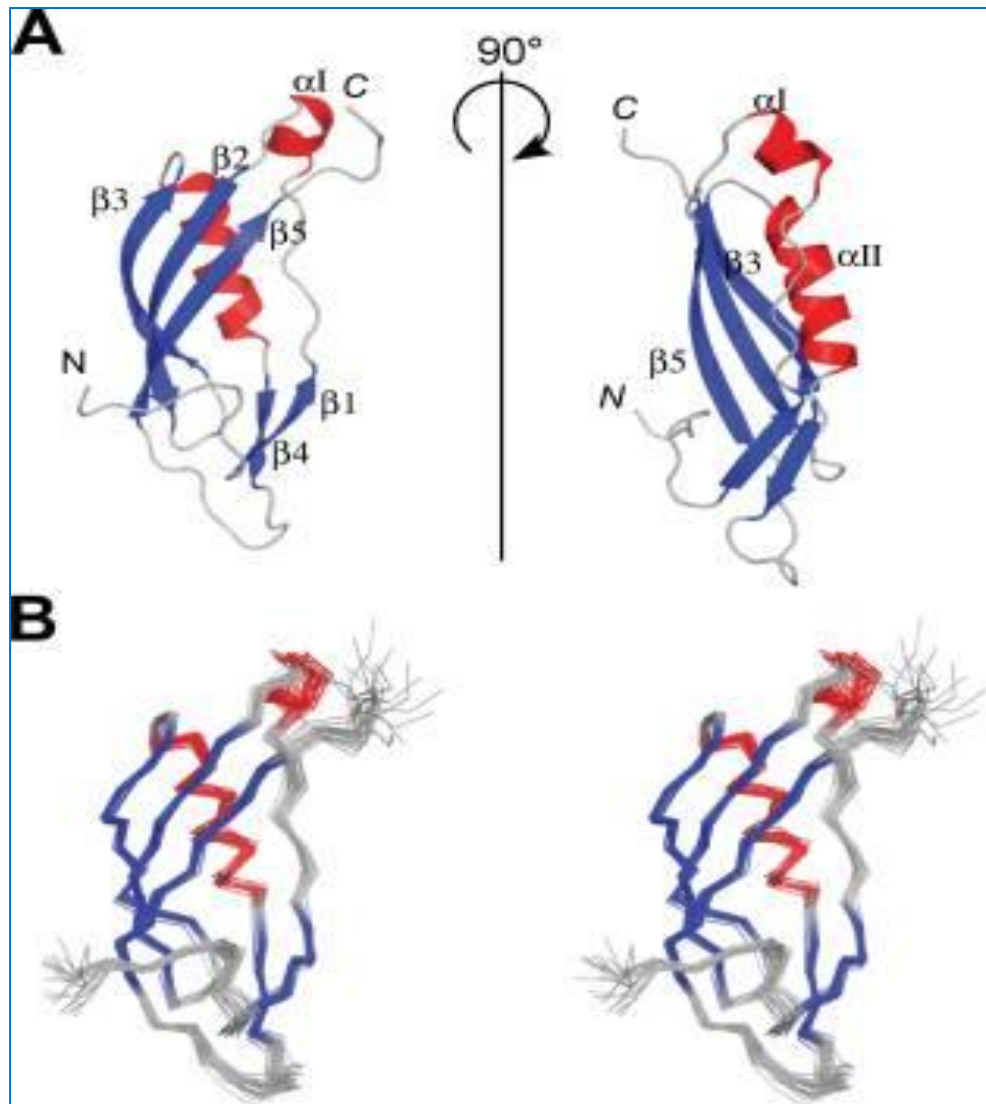


Figure 3.31 : Structures RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) de TonB-96 (96 résidus C-terminaux de TonB). **(A)** Dessins au ruban du conformère à la plus basse énergie des structures TonB-96 montrant les éléments de la structure secondaire. **(B)** Vue stéréoscopique d'un ensemble des 20 conformères de RMN ayant la plus basse énergie. Les couleurs rouge et bleue sont utilisées pour les hélices α et les feuilles β , respectivement. N et C indiquent N- ou C-terminaux, respectivement [406].

Pour la protéine TonB, l'arbre phylogénétique est divisé en deux clades (A) et (B), dont l'un regroupe les souches de *P. protegens* et l'autre les souches de *P. putida*. Les souches de *P. fluorescens* se répartissent dans les deux clades (A) et (B), présentant une distance dans leurs séquences de 9,57 % (Figure 3.32).

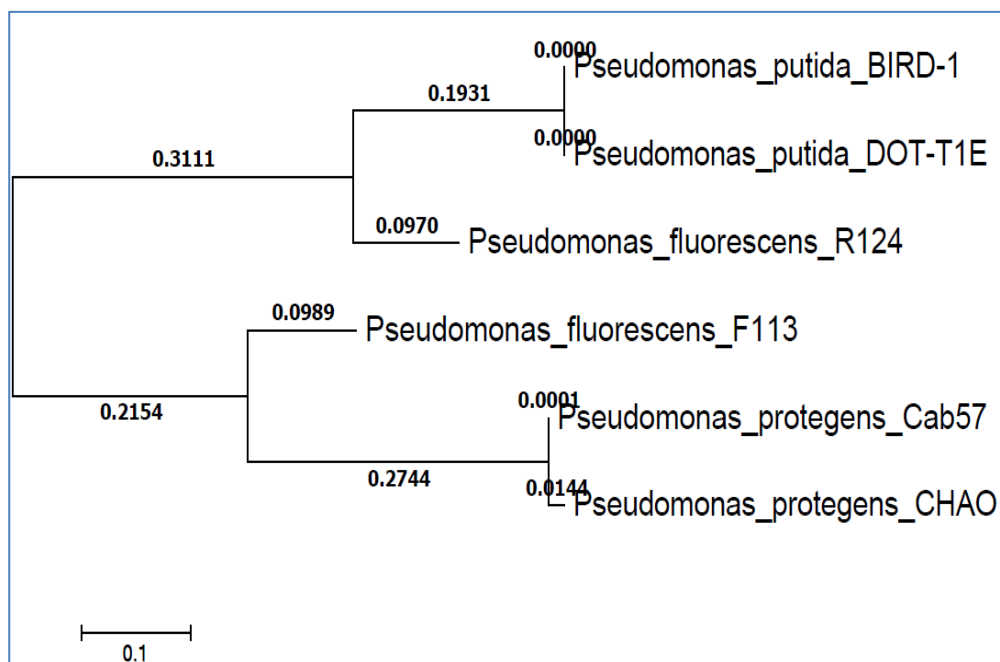


Figure 3.32 : Phylogramme de la protéine TonB, construit par la méthode NJ chez les principales espèces du groupe *Pseudomonas* fluorescents : *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. protegens*

3.3.3. ARNr 16S des espèces de *Pseudomonas* et de *Rhizobium*

La comparaison *in silico* de la séquence du gène ARNr 16S, de souches de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* (Annexe 3), a permis de les classer en deux clades (A et B) illustrant deux groupes phylogénétiquement différents (Figure 3.33).

Les résultats indiquent que la souche CHA0 de *Pseudomonas protegens* est apparentée phylogénétiquement aux souches de *Pseudomonas fluorescens* : TAUC8 (99,78 %), Clinton (99,99 %), WSM3457 (100 %) et Darke (100%) et avec la souche *Pseudomonas protegens* 1B1 (99,94 %).

Dans le clade B, la souche de *Rhizobium fabae* présente une forte similarité de séquences avec *R. etli*, *R. phaseoli* et *R. pisi* avec des similarités, respectivement, de 99,40 %, 99,82 % et de 99,93 %. Ainsi, les souches de *Rhizobium* (clade B) s'éloignent de plus de 5,86 % des souches de *Pseudomonas*.

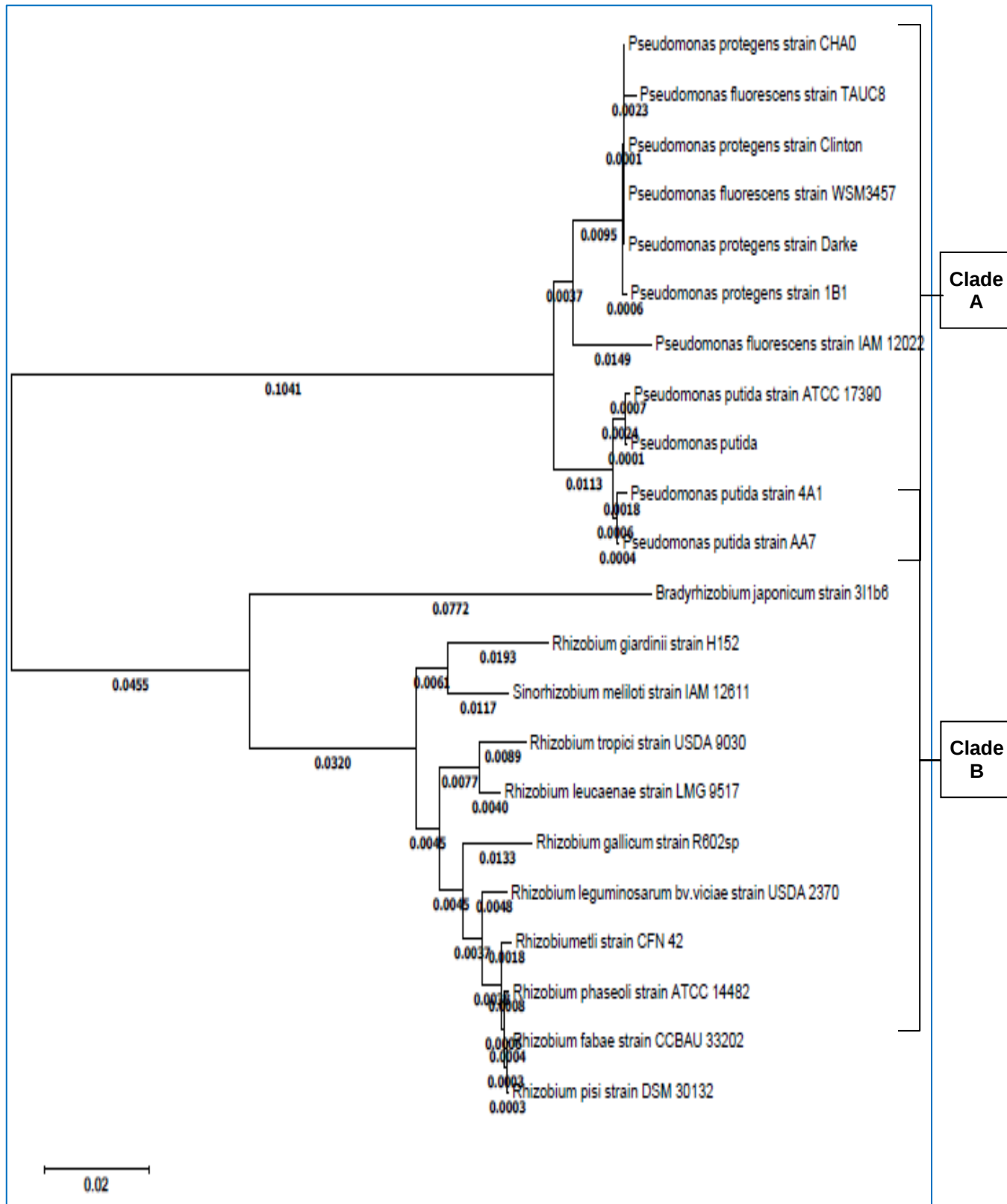


Figure 3.33 : Phylogramme, construit par la méthode NJ, du gène ADN_r 16S des souches de *Rhizobium* et de *Pseudomonas*.

3.3.4. Discussion

Parmi les objectifs visés de l'approche *in silico*, en explorant partiellement quelques aspects de la phylogénie moléculaire, est d'analyser les structures génomiques pouvant avoir un quelconque lien avec les potentialités phytobénéfiques (métabolites) ou avec les aptitudes écologiques. Pour les potentialités, ce qui est visé c'est surtout les gènes responsables de nodulation (*nod*) et de fixation (*nif*) de l'azote chez *Rhizobium* et ceux responsables de la compétence et de la colonisation rhizosphérique (*ton* et *hcn*) chez *Pseudomonas*.

Dans cette étude, nous avons constaté que les séquences nucléotidiques chez *Rhizobium* et *Pseudomonas* expriment des topologies différentes selon les familles de gènes considérées. La comparaison de l'arbre ARNr 16S avec celui des gènes de ménage fait ressortir deux clades principaux dans les deux cas. Les clades A et B de l'arbre ARNr 16S sont totalement disproportionnés avec huit souches contre une seule *R. giaeadinii* chez *Rhizobium*, et quatre souches contre deux chez *Pseudomonas*. Cependant les clades A et B de l'arbre des gènes de ménage sont plus équilibrés. Cette faible concordance entre les topologies des arbres obtenus n'est pas une différence absolue entre les taxons analysés. Elle exprime une divergence des différentes familles de gènes. Ainsi, si un groupe monophylétique de taxons est observé dans un clade d'un arbre donné (ARNr 16S), il peut être dissocié et partagé en différents clades dans un deuxième arbre (gènes de ménage).

La structuration obtenue va dans le sens utilisé communément, définissant ces deux genres bactériens dans les rhizoobactéries adaptées aux rhizosphères, mais avec des mécanismes nettement différents ; les uns sont symbiotiques (*Rhizobium*) alors que les autres sont non symbiotiques (*Pseudomonas*). Il est utile de rappeler que ces modes de vie sont déterminés justement par le type de relations avec les plantes hôtes, qui peut être endophyte, exophyte, obligatoire, coopératif ou facultatif...etc.

Les constructions phylogénétiques apportent un supplément d'informations dans la taxonomie du fait qu'elles s'intéressent à des données moléculaires et donc, plus spécifiques, grâce à elles, il est possible de retracer les principales étapes de l'évolution et ainsi de classer plus précisément les relations de parentés entre les individus; en se basant sur des séquences nucléiques, telles

que les ADNr 16S ou encore les gènes de certaines régions très conservées le long de l'évolution des microorganismes [407]. Ces gènes peuvent s'exprimer différemment d'un individu à un autre, non seulement à cause de leur rang systématique mais également à cause des influences que leur font subir leurs environnements respectifs.

Les deux arbres construits par les gènes *nifH* et *nodC* ont montré une ressemblance dans la disposition des souches *R. fabae*, *R. leguminosarum* et *R. pisi*, qui se situent dans les deux clades B des deux arbres, en présentant une forte analogie de séquences. La comparaison phylogénétique de la séquence d'ADNr 16S de souches de *Pseudomonas* et de *Rhizobium*, dans le même arbre, a exprimé le degré de divergence adaptative entre ces deux espèces, et la forte homologie entre les souches d'une même espèce, allant jusqu'à 100 % de similarité.

L'analyse de séquences d'ADN conservées (ADNr 16S) est largement utilisée en taxonomie microbienne [408], en raison de son universalité, son abondance et sa taille convenable aux analyses comparatives [409]. L'ADNr 16S contient par ailleurs des régions de séquences hautement conservées, très utiles pour la désignation des amorces [410], et d'autres régions de séquences suffisamment variables pour servir comme un excellent moyen taxonomique [411].

Les approches génomiques sont utilisées actuellement pour définir et comprendre les systèmes génétiques des symbiotes bactériens, impliqués dans l'interaction avec leurs hôtes respectifs.

Avec les progrès des technologies de séquençage, une encyclopédie génomique des bactéries nodulantes (GEBA-RNB : Genomic Encyclopedia of the Root Nodule Bacteria : <http://spotidoc.com/doc/760104/>) a été créée en tenant leur diversité phylogénétique et biogéographique [412]. Cependant malgré ces approches globales, le nombre de génomes rhizobiens complets reste faible. Compte tenu de la grande diversité génomique des rhizobia révélée par le grand projet GEBA-RNB [412], il s'agit d'une limitation aux études comparatives approfondies.

À ce jour, la majorité des souches de rhizobia isolées des nodules de plantes de *Vicia fabae*, cultivées dans plusieurs pays du monde, étaient

étroitement apparentées à l'espèce *Rhizobium leguminosarum* [413, 414]. Cela est dû au fait que la féverole est considérée comme un hôte sélectif et à l'interaction entre cette plante et *R. leguminosarum* bv. *viciae* (*R.l.* bv. *viciae*) était considéré comme l'un des plus spécifiques [130]. En fait cette collection a été révisée et comprend actuellement l'espèce *R. leguminosarum* bv. *Viciae*, *R. anhuiense* [415], *R. fabae* [325] et *R. laguerreae* [416].

Le génome des Rhizobiums diffère des autres gènes procaryotes, par sa taille (6 à 9 Mb) et la présence de plasmides dont la taille varie de 200 Kb à 15 Mb (mégaplasmides). Le séquençage complet des génomes ou plasmides de rhizobia montrent une localisation étendue des gènes de nodulation sur des régions symbiotiques (plasmidiques ou chromosomiques). L'emplacement des gènes *nod* varie d'une bactérie à l'autre. Chez *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. tropici*, *Sinorhizobium* sp. NGR 234 et *S. meliloti* les gènes *nod* sont localisés principalement sur des plasmides symbiotiques (pSym). La taille de ces plasmides varie de moins de 400 kb à plus de 15 Mb. Chez *B. japonicum*, *A. caulinodans*, *S. fredii* ou *M. loti*, les gènes *nod* sont chromosomiques situés sur des îlots symbiotiques de 610 kb chez *M. loti* et de 410 kb chez *B. japonicum*. Les gènes de nodulation font partie du « génome accessoire » [87], et sont généralement assemblés en opérons, précédés d'une *nod box* régulatrice stimulée par le complexe NodD-flavonoïdes. Les gènes *nodABC* présentent différentes organisations génétiques qui témoignent de phénomènes de recombinaisons importants. L'orientation et le nombre de copies d'un gène varient d'une espèce à l'autre.

Le nombre total de gènes nécessaire pour une nitrogénase fonctionnelle varie d'un organisme à l'autre, il est généralement estimé à environ 10 à 20 gènes [417]. Parmi ces gènes, *nifH* est la séquence la plus répandue et est devenu le marqueur de choix pour l'étude de l'écologie et de la diversité des organismes fixateurs d'azote. L'assemblage complet et le fonctionnement de la nitrogénase nécessite les produits de gènes *nif* impliqués dans la synthèse de FeMo-Co, tels que *nifH nifD nifK nifY nifB nifQ nifE nifN nifX nifU nifS nifV nifW nifZ* qui sont conservés chez tous les diazotrophes. Les gènes *nif* chez les micro-organismes fixateurs d'azote diffèrent au niveau de leur localisation : soit plasmidique ou chromosomique ; de leur organisation et de la régulation de leur expression.

Les conditions environnementales, biotiques et abiotiques peuvent affecter fortement la sélection des souches rhizobactériennes dans le sol. En outre, les pressions sélectives de l'hôte et le transfert latéral de gènes dans la rhizosphère sont les principaux mécanismes constitutifs de la structure génétique des microorganismes symbiotiques [418, 419], et ceux-ci confondent l'utilisation de la phylogénie de l'ADNr 16S pour décrire les relations bactériennes symbiotiques avec leurs hôtes et entre eux, ce qui rend difficile l'étude de l'histoire évolutive de la symbiose. D'autre part, les gènes *nif* et *nod* sont sélectivement perdus, dupliqués et transférés horizontalement à travers différentes souches chromosomiques [420].

La duplication de gènes *nif* dans de nombreux types rhizobiens, s'est révélée identiques dans de nombreux cas [421]. Ceci est également expliqué par Zheng et *al.* [401], qui supposaient que la région symbiotique de *B. japonicum* était localisée à l'origine sur un plasmide similaire aux plasmides *Sym* de *S. meliloti*, puis est devenu une partie du chromosome par intégration à un stade au cours de l'évolution. Alternativement, les plasmides symbiotiques de *S. meliloti* (et d'autres Rhizobia) peuvent avoir évolué par excision d'une région chromosomique.

L'analyse des séquences protéiques d'HCN et de TonB chez les *Pseudomonas* présente un certain équilibre dans le groupement des souches en deux clades A et B. La souche CHA0 de *P. protegens* a montré toujours des homologies avec *P. fluorescens*.

D'autre part, la souche CHA0 de *Pseudomonas protegens* possède des gènes du groupe 2 pour un opéron d'assimilation nitrite/nitrate, ce qui suggère qu'elle est plus efficace pour réduire la teneur en nitrates du sol. Des travaux effectués par Yu et *al.* [422], suggèrent qu'un mutant CHA0- Δ retS-Nif contenant un opéron intégré de fixation de l'azote, montre une activité fondamentale de la nitrogénase, indiquant que les protéines Nif ont été exprimées avec succès dans tous les transformants, bien que le degré de l'activité de la nitrogénase diffère entre eux. Cette différence peut être due au fait que l'îlot du gène *Nif* a été insérée de manière aléatoire dans le génome de souches de CHA0 mutantes, et que le positionnement de l'îlot du gène *Nif* sur différents sites génomiques affecterait l'expression des protéines Nif.

Il est important de noter que la croissance de *Arabis thaliana*, après l'application de la bactérie CHA0- $\Delta retS$ -Nif, était supérieure à celle des groupes témoins et même supérieure à celle des plantes sujette à la souche d'origine DSM4166 avec intégration de l'îlot du gène *Nif*. Ces résultats pourraient être expliqués par l'activité de biocontrôle de *P. protegens* CHA0 qui possède ses propres mécanismes de biocontrôle, son propre mode de vie, qui ont démontré leur capacité à favoriser la croissance des plantes. Par conséquent, la nouvelle souche de biocontrôle CHA0- $\Delta retS$ -Nif a divers effets sur la croissance des plantes après l'acquisition de la capacité de fixation de l'azote.

La capacité des *Pseudomonas* à coloniser la rhizosphère et être compétitives avec d'autres communautés microbiennes ; provient de leur capacité à absorber des éléments importants pour leur survie, tel que le fer, et à produire de nombreux antibiotiques tels que le cyanure d'hydrogène (HCN) et autres antibiotiques, ce qui leur confère un avantage concurrentiel dans la complexité rhizosphérique.

L'absorption de fer est particulièrement importante pour la croissance bactérienne et, par conséquent, la synthèse des transporteurs de fer à membrane externe (appelés transporteurs dépendants de TonB TBDT) est donc régulée de différentes manières. Ces transporteurs présentent une grande affinité et spécificité pour les chélates de métal (sidérophores) et nécessitent de l'énergie dérivée de la force proto-motrice à travers la membrane interne pour être transportés [423]. Pour exploiter cette source d'énergie, les TBDT doivent interagir avec un complexe protéique de la membrane interne constitué de TonB ExbB et ExbD [424]. Selon son rôle dans le transport du fer, tous les TBDT pour les sidérophores ferriques sont contrôlés par Fur et leur expression est donc supprimée lorsque le fer atteint un certain niveau.

Le transport des sidérophores ferriques à travers la membrane externe tire son énergie de la puissance proto-motrice de la membrane interne. Cela nécessite un complexe TonB qui convertit l'énergie dans la membrane interne constitué des protéines TonB, ExbB et ExbD. TonB interagit avec les transporteurs de membrane externes au niveau du motif TonB-box. Le transport des sidérophores ferriques à travers la membrane interne nécessite une protéine de liaison périplasmique et un transporteur ABC. Une fois que le sidérophore ferrique est

pénétre dans le cytoplasme, l'ion ferrique (Fe^{3+}) est réduit en ion ferreux (Fe^{2+}), destiné au stockage ou à l'incorporation à des enzymes. L'excès de Fe^{2+} (qui pourrait induire la formation de radicaux nocifs pour la cellule) se lie à la protéine répresseur Fur, qui à son tour se lie aux promoteurs cibles (P_{fur}) et empêche la transcription des gènes de transport des sidérophores. Tant le transport que l'induction nécessite une transduction d'énergie du complexe TonB-ExbB-ExbD dans la membrane interne [425].

Pseudomonas fluorescens Pf-5 produit deux sidérophores, une pyoverdine et une enantio-pyocheline, et son protéome comprend 45 protéines TonB-dépendante de la membrane externe, qui interviennent généralement dans l'absorption de sidérophores et d'autres substrats de l'environnement. 18 d'entre elles ont un domaine N-terminal de signalisation caractéristique des transducteurs de TonB-dépendant (TBDT), qui sont impliqués dans les systèmes de signalisation de surface cellulaire [425].

Les analyses phylogénétiques des 18 TBDT et des récepteurs dépendants de 27 TonB (TBDR), dépourvus du domaine de signalisation N-terminal, suggèrent une histoire évolutive complexe impliquant un transfert horizontal entre les différentes souches microbiennes. Des fonctions putatives ont été attribuées à certains TBDR et TBDT dans des clades comprenant des orthologues bien caractérisés d'autres *Pseudomonas* spp [426].

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un composé antimicrobien à large spectre, impliqué dans la lutte biologique contre les maladies des racines, synthétisé par de nombreux *Pseudomonas* spp. fluorescents associés aux plantes. La HCN-synthase est codée par trois gènes de biosynthèse (*hcnA*, *hcnB* et *hcnC*), mais on en sait peu sur la diversité de ces gènes chez *Pseudomonas* spp. Dans des travaux réalisés par Ramette et al. [427], la séquence partielle *hcnBC* a été déterminée pour une collection mondiale de *Pseudomonas* spp. Les phylogénies basées sur *hcnBC* et les séquences protéiques déduites ont révélé quatre groupes bactériens majeurs, mais des synergies topologiques ont été observées entre phylogénies *hcnBC* et à base d'ARNr 16S, suggérant un transfert latéral antérieur de *hcnBC* entre les *Pseudomonas* saprophytes colonisant les racines.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La rhizosphère est une niche préférentielle pour divers types de microorganismes, en particulier les PGPRs qui s'adaptent aux exsudats racinaires et interagissent de manière phytobénéfique, directement ou indirectement, pour la croissance des plantes. Ces rhizobactéries colonisent efficacement les racines végétales et peuvent améliorer leur croissance, en augmentant les rendements en produits agricoles et en biomasse végétale [428], grâce à leurs propriétés phytobénéfiques, notamment, la fixation de l'azote, la production de phytohormones, la mobilisation des éléments nutritifs ou leurs capacités de bioprotection. Outre ces actions bénéfiques sur les plantes, l'utilisation des PGPRs répond également à des objectifs agroécologiques souhaitables, notamment en ce qui concerne les nouvelles orientations, voire exigences, de la gestion durable des pratiques agricoles, de par son respect de l'équilibre biologique naturel ainsi que de l'environnement [429]. Dans ce contexte, de nombreuses études s'intéressent à la recherche de microorganismes PGPRs potentiels, par l'isolement, l'identification et leur application en tant que solution alternative aux intrants chimiques [8, 53].

Notre étude s'est intéressée à mettre en évidence les effets phytobénéfiques recherchés, selon deux types de mécanismes l'un est symbiotique (*Rhizobium*) et l'autre non symbiotique (*Pseudomonas*). De plus, à travers la variation de nos conditions expérimentales, sous serre et en plein champ, il nous a été possible de constater l'impact des potentialités rhizobactériennes et l'expression des effets positifs recherchés. En effet, la coinoculation avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *Rhizobium fabae* a influencé considérablement la croissance des plantes, le nombre de nodules produits et la fixation de l'azote atmosphérique, notamment en plein champ.

La croissance et l'activité métabolique des *Pseudomonas fluorescens* sont plus fortes et peuvent être maintenues plus longtemps dans la rhizosphère par rapport au sol environnant [430]. L'efficacité des effets bénéfiques des *Pseudomonas fluorescens* dans le champ, dépend d'une colonisation racinaire

réussie [431], nécessitant une bonne compréhension de la localisation, de l'organisation, de l'activité et de la viabilité des colonies bactériennes dans la rhizosphère le long de la racine [432]. Ainsi, des échecs dans des études précédentes, de promotion de la croissance végétale, ont été souvent associés à la faiblesse de leur rhizocompétence [433].

selon Shishido et Chamvay [434], l'évaluation de la colonisation des racines par les PGPRs a montré que les chutes de populations bactériennes n'étaient pas associés à la variabilité de la réaction de croissance au champ. Leurs résultats indiquent qu'une fois que la stimulation de la croissance a été induite en serre, le taux relatif de croissance des plantules peut augmenter de plus de 100% au champ.

Le type et la quantité d'exsudats racinaires sont influencés par l'espèce et l'âge de la plante [435], la zone d'excrétion [432], ainsi que les conditions environnementales [379]. La capacité de colonisation peut également être liée aux mécanismes impliqués dans le biocontrôle; l'antibiose nécessite une colonisation appropriée de la souche impliquée, contrairement au mécanisme de la résistance induite [232]. Ceci peut inhiber ou stimuler la croissance de certaines bactéries, affecter la structure bactérienne en espèce, ainsi que la proportion de cellules viables et mortes [436].

Les rhizobactéries bénéfiques sont également influencées par les composés d'origine microbienne impliqués dans le parasitisme, l'antagonisme ou la compétition. De plus, les signaux moléculaires, à savoir des composés de faible poids moléculaire, émis par un organisme est reconnu par d'autres qui induisent une réponse interactive à ce dernier sont également impliqués [40]. Ces signaux sont importants pour l'établissement d'interactions mutuelles et associatives entre microorganismes et racines de plantes [437].

L'identification des gènes impliqués dans les processus d'inoculation et de colonisation des racines donnera un aperçu plus détaillé des interactions plante-microorganismes et conduira à une application plus efficace des souches à inoculer. Plusieurs gènes de colonisation des racines chez *Pseudomonas fluorescens* ont été identifiés [438]. Rainey [439] a décrit une méthode permettant l'identification de gènes chez *Pseudomonas fluorescens*, en

montrant des niveaux élevés dans leur expression rhizosphérique. Cette méthode a identifié vingt (20) gènes induits dans la colonisation des niches rhizosphériques. Quatorze gènes ont montré une homologie significative, impliqués dans l'acquisition des nutriments et la réponse aux différents stress ; six gènes n'ont montré aucune homologie, et sept autres gènes de l'induction rhizosphérique (*rhi*) ont une homologie, permettant de reconnaître les gènes non-*Pseudomonas*.

Les modes de coinoculation des *Pseudomonas* et de *Rhizobium* peuvent avoir des effets variables sur la croissance des légumineuses ; cela est en fonction de la phase du processus modifié par les PGPRs : infection, nodulation ou fixation de l'azote. Ceci a été démontré par des résultats prouvant que les souches de PGPRs (*P. fluorescens*, *Chryseobacterium balusim* et *Serratia fonticola*) et *Sinorhizobium fredii* ont provoqué les augmentations les plus significatives sur la croissance et le rendement de plantes, lorsqu'elles étaient inoculées à différents temps (PGPR ou *S. fredii* d'abord), bien que leur inoculation au même temps n'ait eu aucun effet, ceci est probablement dû à la concurrence entre les souches inoculées [353].

Des études récentes indiquent que la coinoculation avec des rhizobiums et autres PGPRs peut affecter le métabolisme de la plante hôte. Cagide et *al.* [440] ont montré qu'un effet bénéfique de la coinoculation avec *Bradyrhizobium elkanii* et une souche PGPR sur la croissance du soja ; le taux de nodulation et le rendement en légumineuses ont été simultanément améliorés. En outre, sur la base d'une approche métabolique, ils ont démontré qu'un type différent de métabolites de plantes était se former à différents stades de développement. De nouvelles informations suggèrent que la coinoculation modifie le métabolisme primaire et secondaire de la plante, notamment les modifications du statut métabolique des nodules principaux et secondaires. Les travaux ont permis de découvrir un modèle différent de pigments photosynthétiques et photoprotecteurs, de flavonoïdes, d'acides organiques et de glucides.

L'inoculation microbienne peut modifier, au moins temporairement, la communauté bactérienne indigène du sol [441]. Celles-ci consistent en un mélange complexe de taxons endémiques et nouvellement introduits, avec un degré d'échange génétique entre les rhizobia et d'autres bactéries du sol

[442]. Lu et *al.* [443] ont montré que l'inoculation de *Rhizobium* a modifié les communautés bactériennes dans la rhizosphère et les nodules, quel que soit le statut du milieu de croissance. Les différences dans la physiologie des bactéries (y compris leur capacité à établir diverses interactions entre elles) affectent la composition des communautés microbiennes dans le sol, la rhizosphère et les nodules de légumineuses [444, 445]. Denton et *al.* [446] ont démontré que l'inoculation de plants de fève avec des densités suffisantes de *Rhizobium* peut augmenter la fixation de N₂ en présence de populations importantes, ce qui suggère que l'inoculant *Rhizobium* et les bactéries du sol pourraient former une association pour une nodulation efficace et une meilleure fixation d'azote.

De nombreux facteurs biotiques et abiotiques contribuent au processus de la colonisation chez les *Pseudomonas* dans la rhizosphère. Ces facteurs vont du type et de la quantité des exsudats racinaires produits par les plantes à la capacité des bactéries à utiliser ces sources pour leur mobilité et à des fins métaboliques [447]. Cependant, le pouvoir tampon du microbiote du sol et des plantes n'est pas bien compris. Par conséquent, comprendre la persistance des bactéries inoculées sur le terrain et leurs impacts sur les communautés microbiennes indigènes revêt une importance, théorique et pratique, en ce qui concerne l'utilisation des inoculats microbiens en agriculture.

Les méthodologies classiques appliquées en microbiologie du sol et dans les études de l'écologie microbienne, chez les communautés bactériennes telluriques ou rhizosphériques, même si elles permettent de mettre en évidence les effets phytobénéfiques, néanmoins l'évaluation quantitative et implicative moléculaire ne peut être que globale. La microbiologie de la rhizosphère dans sa grande complexité, qui s'ajoute à la spécificité interactive avec les plantes (architecture et exsudats racinaires) est en phase d'établir des protocoles qui devraient clarifier le type de telles interactions. Actuellement, on fait recours à des méthodologies de conception et de modélisation, à partir de systèmes bien définis, afin d'élucider au moins partiellement quelques aspects métaboliques et moléculaires.

CONCLUSION

Notre étude sur l'interaction de deux types bactériens; l'un est symbiotique *Rhizobium fabae* (R1 et R2), l'autre est non symbiotique *Pseudomonas fluorescens* (S20, CHAO et P64) avec la fève (*Vicia fabae*), a mis en évidence une stimulation dans le processus de nodulation, accompagnée de phytostimulation de la croissance végétale.

En premier lieu, à titre de prérequis, pour la réussite de cette association où la population bactérienne symbiotique endophyte s'attache de manière spécifique, il a été démontré que les souches de *Pseudomonas* se caractérisent par une compétence rhizosphérique. En effet, par rapport aux densités bactériennes introduites initialement (10^8 CFU/g de sol), les niveaux de colonisation, estimés en moyenne à 10^{11} CFU/g de sol, sont nettement supérieurs et traduisent une bonne adaptation à l'environnement racinaire des plantes testées. La colonisation est conditionnée par la quantité et la qualité des exsudats racinaires, en exerçant même un gradient de sélection au sein des communautés microbiennes rhizosphériques. Les souches de *Pseudomonas fluorescens* se caractérisent par leur capacité à utiliser une large gamme de composés organiques libérés par les plantes. Dans des travaux précédents [20], ces souches ont montré leur adaptation à différentes niches rhizosphériques, et ce malgré leurs origines végétales par rapport aux plantes testées. En plus elles ont induit des effets phytobénéfiques.

La phytostimulation induite par les souches de *Pseudomonas fluorescens* chez la fève, s'est traduite par une amélioration des phytomasses aériennes et racinaires, notamment en interaction avec la souche P64. L'impact de l'interaction des souches de *Pseudomonas fluorescens* et de *Rhizobium fabae* sur la stimulation de la nodulation, est plus notable avec les interactions P64-R1 et P64-R2. Des gains très appréciables, en nombre de nodules par plant dépassant le taux de 128 %, ainsi que des gains en matières azotées totales atteignant 82 %.

La comparaison des effets de la phytostimulation, entre les expérimentations conduites sous serre ou en plein champ, a révélé des niveaux appréciables de biostimulation de la croissance et de la nodulation. L'impact de

l'association des deux groupes rhizobactériens est mieux perceptible dans les conditions de plein champ par rapport aux essais sous serre. Ces résultats mettent en évidence que l'efficacité de ces interactions rhizobiennes est plus perceptible en conditions naturelles, considérées plus stressantes aux populations bactériennes. Il est souvent question que les interactions se mettent plus en activité en présence de facteurs stressants.

La phylogénie moléculaire des souches de *Rhizobium* et de *Pseudomonas*, ADNr-16S et les gènes de ménages, nous a apporté un complément d'informations sur la taxonomie des souches étudiées. Les gènes *nifH* et *nodC* chez *Rhizobium* ont montré une forte homologie entre *R. fabae*, *R. leguminosarum* et *R. pisi*. La souche CHA0 de *Pseudomonas protegens* présente beaucoup de similarité avec *Pseudomonas fluorescens* pour les séquences protéiques d'HCN et de TonB. Ces deux genres bactériens ont présenté des topologies différentes pour les séquences d'ARNr 16S.

Les PGPRs possèdent plusieurs avantages pour une utilisation à grande échelle, ils colonisent efficacement les racines de plantes génétiquement très éloignées, de plus, les nombreuses connaissances acquises sur leur production commerciale, leur physiologie et leur génétique s'ajoutent à ces avantages. La formulation des inoculats de bactéries sélectionnées, destinées aux applications pratiques comme biofertilisants, constitue une solution, économiquement rentable et écologiquement recherchée, afin de minimiser l'application des intrants chimiques.

Les mécanismes par lesquels les PGPRs induisent des bénéfices réciproques avec leurs plantes hôtes ne sont pas complètement élucidés. En plus, ces microorganismes doivent être compétents et pouvoir résister dans la rhizosphère influencée par plusieurs facteurs, notamment le type de sol, la plante hôte et les pratiques agricoles. Donc, il devient nécessaire de mieux comprendre les aspects communicatifs et de signalisation, notamment ceux ayant des déterminismes biochimiques et moléculaires entre les groupes de PGPRs (symbiotiques et non symbiotiques), qui sont impliquées dans les interactions plante hôte - rhizobactéries, ce qui constitue un indice fondamental sur la synergie observée dans la stimulation de la croissance des plantes. Cette situation synergétique, ou de complémentarité pour des rôles phytobénéfiques, peut être

valorisée notamment en conditions défavorables par la sélection de souches douées de potentialités stables, reproductibles et adaptées aux différentes conditions telluriques. Ainsi, l'investigation des phylogénies moléculaires et l'adoption de méthodologies et de techniques microbiologiques appropriées aux niches rhizosphériques, deviennent indispensables pour élucider et comprendre les interactions rhizobactériennes et plantes.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ADN	Acide deoxyribonucléique
AIA	Acid indol-acétique
AON	Autoregulation Of Nodulation
ARN	Acide ribonucléique
ADNr	Acide deoxyribonucléique ribosomique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine 5-triphosphate
CFU	Colony Forming Unit
cm	Centimètre
CPS	Polysaccharides de capsule
DAPG	Diacéthylephloroglucinol
EPS	Exopolysaccharides
FN	Facteurs Nod
g	Gramme
HCN	Cyanure d'hydrogène
hsn	Host specific nodulation (gènes de la spécificité de l'hôte)
ISR	Induced Systemic Resistance (Induction Systémique de Résistance)
Kb	Kilobase
MAT	Matière azotée totale
ml	Millilitre
mm	Milimètre
m	mètre
LCO	lipochitooligosaccharides
LPS	lipopolysaccharides
mn	minute
N ₂	Nitrogène
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDA	Potato Dextrose Agar
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
PGPF	Plant Growth Promoting Fungi
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PHZ	Phénazines
PLT	Pyolutéorine
PRN	Pyrrolnitrine
QS	Quorum sensing
SV	Symbiovar
TSI	Tolérance systémique induite

APPENDICE B

1- MILIEUX DE CULTURE

Milieu King B (King et *al.*, 1954).

- Peptone(Difco) 20 g
- Glycérol (prolabo) 15 ml
- K₂HPO₄ (sigma) 1,5 g
- MgSO₄ (sigma) 1,5 g
- Agar (sigma) 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH=7,2, autoclavage 20 minutes à 120 °C

Milieu PDA gélosé (Potato Dextrose Agar) (Jonsthorpe et Booth, 1983).

- Pomme de terre 200 g
- Dextrose 20 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH=7, autoclavage 20 minutes à 120 °C

2 – COLORATION DE Gram (Prescott ,2003):

1. Prélèvement du frottis bactérien sur une lame et le fixé.
2. Recouvrir la lame avec du violet de gentiane pendant 2 minutes, puis le rincer à l'eau distillée.
3. Recouvrir avec une solution de lugol pendant 2 minutes, rincer à l'alcool jusqu'à ce la disparition de la couleur
4. Recouvrir la lame avec de la fushine durant 2 minutes, puis rincer le colorant avec de l'eau distillée.

Observation sous microscope optique.

3 – DOSAGE DE L'AZOTE TOTALE (Kjeldahl, 1883) :

Composition du Catalyseur :

- 250 g de K₂SO₄
- 250 g de CuSO₄
- 5 g de Sélénium
- 20 ml d'acide sulfurique (d = 1,84).

Composition de l'indicateur (pour 1 litre de solution) :

- 20 g d'acide borique
- 200 ml d'éthanol absolu
- 10 ml d'indicateur contenant : ¼ de rouge de méthyle à 0,2% dans l'alcool à 95 °et de ¾ de vert de bromocresol à 0,1% dans l'alcool à 95°.

APPENDICE C

ANALYSE DE LA VARIANCE

Essai sous serre

Hauteur des tiges

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	12543.73	71	176.67				
VAR FACTEUR	562.65	11	51.15	1.42	0.1940		
VAR.BLOCS	741.84	2	370.92	10.33	0.0002		
VAR RESIDUEL	1651.32	46	35.90			5.99	9.7%

Longueur des racines

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	2096.43	71	29.53				
VAR FACTEUR	354.63	11	32.24	3.88	0.0006		
VAR.BLOCS	103.77	2	51.89	6.24	0.0041		
VAR RESIDUEL	382.40	46	8.31			2.88	9.6%

Poids frais des pousses

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	10813.08	71	152.30				
VAR FACTEUR	248.12	11	22.56	0.91	0.5375		
VAR.BLOCS	117.71	2	58.86	2.38	0.1019		
VAR RESIDUEL	1137.99	46	24.74			4.97	14.1%

Poids frais des racines

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	1935.86	71	27.27				
VAR FACTEUR	96.91	11	8.81	3.06	0.0038		
VAR.BLOCS	13.75	2	6.87	2.39	0.1013		
VAR RESIDUEL	132.51	46	2.88			1.70	19.0%

Poids sec des pousses

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	110.06	71	1.55				
VAR FACTEUR	6.78	11	0.62	2.05	0.0444		
VAR.BLOCS	4.74	2	2.37	7.90	0.0012		
VAR RESIDUEL	13.82	46	0.30			0.55	15.8%

Poids sec des racines

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	13.55	71	0.19				
VAR FACTEUR	7.27	11	0.66	7.18	0.0000		
VAR.BLOCS	0.16	2	0.08	0.89	0.4195		
VAR RESIDUEL	4.23	46	0.09			0.30	32.2%

Teneur en matière azotée totale (MAT %)

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	450.82	71	6.35				
VAR FACTEUR	305.38	11	27.76	22.31	0.0000		
VAR.BLOCS	0.59	2	0.29	0.24	0.7941		
VAR RESIDUEL	57.24	46	1.24			0.30	6.8%

Nombre de nodules

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	10729.67	35	306.56				
VAR FACTEUR	9505.71	11	864.16	18.28	0.0000		
VAR.BLOCS	183.79	2	91.89	1.94	0.1653		
VAR RESIDUEL	1040.16	22	47.28			6.88	9.8%

Essai plein champ

Longueur des racines

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	100.10	35	2.86				
VAR FACTEUR	66.25	11	6.02	4.94	0.0008		
VAR.BLOCS	7.02	2	3.51	2.88	0.0763		
VAR RESIDUEL	26.83	22	1.22			1.10	9.4%

Poids frais des racines

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	21.22	35	0.61				
VAR FACTEUR	21.27	11	1.12	3.00	0.0137		
VAR.BLOCS	0.78	2	0.39	1.04	0.3703		
VAR RESIDUEL	8.18	22	0.37			0.61	17.8%

Poids sec des pousses

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	58.57	35	1.67				
VAR FACTEUR	14.70	11	1.34	1.23	0.3253		
VAR.BLOCS	19.97	2	9.98	9.19	0.0013		
VAR RESIDUEL	23.90	22	1.09			1.04	24.2%

Poids sec des racines

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	0.95	35	0.03				
VAR FACTEUR	0.36	11	0.03	1.36	0.2600		
VAR.BLOCS	0.06	2	0.03	1.35	0.2807		
VAR RESIDUEL	0.53	22	0.03			0.15	27.2%

Nombre de nodules

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	3567.14	35	101.92				
VAR FACTEUR	2873	11	261.20	9.12	0.0000		
VAR.BLOCS	63.75	2	31.87	1.11	0.3475		
VAR RESIDUEL	630.17	22	28.64			5.35	16.3%

Teneur en matière azotée totale (MAT%)

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTAL	366.31	35	10.47				
VAR FACTEUR	335.51	11	30.50	23.54	0.0000		
VAR.BLOCS	2.30	2	1.15	0.89	0.4294		
VAR RESIDUEL	28.51	22	1.30			1.14	6.1%

APPENDICE D

1. Codes d'accèsion (GenBank) des différents gènes de *Rhizobium spp.*

Source: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>

Espèces	ARNr 16S	Espèces	<i>rpoB</i>	Espèces	<i>gyrB</i>
<i>R.fabae</i> strain CCBAU 33202	NR115872.1	<i>R.fabae</i> strain CCBAU 33202	FJ392877.1	<i>R.fabae</i> strain CCBAU33202	KC293523.1
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> strain USDA 2370	NR044774.1	<i>R.leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	EF202569.1	<i>R.leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> strain 3.22	JQ795182.1
<i>R. phaseoli</i> strain ATCC 14482	NR044112.1	<i>R.phaseoli</i> strain ATC C 14482	HQ670651.1	<i>R.phaseoli</i> strain ATCC 14482	KC293518.1
<i>R. etli</i> strain CFN 42	NR074499.2	<i>R.etli</i> strain HBR2	JN580720.1	<i>R. etli</i> strain CNPSO664	JN129333.1
<i>R. tropici</i> strain USDA 9030	NR026067.1	<i>R.tropici</i> strain H20	JF318217.1	<i>R.tropici</i> strain CNPSO655	JN129327.1
<i>R.gallicum</i> strain R602sp	NR036785.1	<i>R. gallicum</i> strain R602sp	EF027930.1	<i>R. gallicum</i> strain R602	HQ438235.1
<i>R.leucaenae</i> strain LMG 9517	NR118993.1	<i>R.leucaenae</i> strain HBR12	JN580728.1	<i>R.leucaenae</i> strain CNPSO660	JN129330.1
<i>R.giardinii</i> strain H152	NR026059.1	<i>R. giardinii</i> strain USDA 2914	MF350317.1	<i>R. giardinii</i> strain H152	HQ438240.1
<i>R.pisi</i> strain DSM 30132	NR115253.1	<i>R. pisi</i> strain DSM 30132	JQ795190.1	<i>R. pisi</i> strain DSM 30132	JQ795183.1
<i>S. meliloti</i> strain IAM 12611	NR043399.1	-	-	-	-

Espèces	<i>nodC</i>	Espèces	<i>nifH</i>	Espèces	Nitrogenase
<i>R. fabae</i> strain CCBAU 33202	JN580683.1	<i>R.fabae</i> strain CCBAU 33202	JN580789.1	<i>R. fabae</i>	AEZ05090.1
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> strain USDA 2370	FJ596038.1	<i>R. leguminosarum</i> isolate USDA 2370	DQ450935.1	<i>R. phaseoli</i>	RDJ04533.1
<i>R.phaseoli</i> strain ATCC 14482	HM441255.1	<i>R.phaseoli</i> strain ATCC 14482	JN580788.1	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	RFB83363.1
<i>R. etli</i> bv. <i>Phaseoli</i> isolate RP330	DQ413003.1	<i>R. etli</i> bv. <i>Phaseoli</i> isolate RP330	DQ413018.1	<i>R. etli</i>	WP020923547.1
<i>R.tropici</i> strain UPRM 8033	AY166842.1	<i>R.tropici</i> strain UPRM 8021	EU490519.1	<i>R. tropici</i>	BAU45301.1
<i>R. gallicum</i> bv. <i>gallicum</i> strain R602sp	AF217266.1	<i>R. gallicum</i> bv. <i>gallicum</i> strain IE4770	AY907475.1	<i>R. gallicum</i>	WP040114461.1
<i>R.leucaenae</i> strain HBR12	JN580662.1	<i>R.leucaenae</i> strain HBR12	JN580767.1	<i>R. leucaenae</i>	AEZ05068.1
<i>R. giardinii</i> bv. <i>giardinii</i> strain H152	AF217267.1	<i>R. giardinii</i> strain HBR21	JN580774.1	<i>R. giardinii</i>	AEZ05075.1
<i>R. pisi</i> strain DSM 30132	JN580682.1	<i>R.pisi</i> strain DSM 30132	JN580787.1	<i>R. pisi</i>	AEZ05088.1

2. Codes d'accèsion (GenBank) des différents gènes de *Pseudomonas* spp.

Espèces	ARNr 16S	Espèces	<i>rpoD</i>	Espèces	<i>HCN</i>	Espèce	<i>TonB</i>
<i>P. protegens</i> strain Darke	KT695848.1	<i>P. protegens</i> strain CHAO	DQ458677.1	<i>P. protegens</i> CHAO	WP053157943.1	<i>P. fluorescens</i> R124	EJZ60772.1
<i>P. protegens</i> strain CHAO	NR_114749.1	<i>P. protegens</i> strain PGNR1	DQ458686.1	<i>P. protegens</i> Pf-5	ANF06960.1	<i>P. fluorescens</i> F113	AEV61137.1
<i>P. fluorescens</i> strain WSM3457	JF423119.1	<i>P. putida</i> strain CFBP 5933	HF545859.1	<i>P. fluorescens</i>	WP014337865.1	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> DOT-T1E	AFO49835.1
<i>P. fluorescens</i> strain TAUC8	HQ914783.1	<i>P. putida</i> strain MG2010	KR559354.1	<i>P. chlororaphis</i>	WP114761760.1	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> BIRD-1	ADR62648.1
<i>P. putida</i>	KC189961.1	<i>P. fluorescens</i> strain QAU67	KM251441.1	<i>Pseudomonas</i> sp. AD21	WP102358434.1	<i>P. protegens</i> Cab57	BAO60539.1
<i>P. putida</i> strain ATCC 17390	AF094737.1	<i>P. fluorescens</i> strain CFC1595	KF701428.1	<i>Pseudomonas</i> sp. GM30	WP007965625.1	<i>P. protegens</i> CHAO	AQT07902.1
<i>P. fluorescens</i> strain IAM 12022	NR_043420.1	-	-	-	-	-	-
<i>P. protegens</i> strain Clinton	KT695847.1	-	-	-	-	-	-
<i>P. protegens</i> strain 1B1	KT695804.1	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> strain 4A1	MH379785.1	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> strain AA7	KX817279.1	-	-	-	-	-	-

Source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bundschuh, M., Goedkoop, W. and Kreuger, J., "Evaluation of pesticide monitoring strategies in agricultural streams based on the toxic-unit concept — Experiences from long-term measurements", *Sci. Total Environ.*, 484, (2014), 84-91.
2. Rasmussen, J.J., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., Cedergreen, N., McKnight, U.S., Kreuger, J., Jacobsen, D., Kristensen, E.A. and Friberg, N., "The legacy of pesticide pollution: An overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems", *Water Res.*, 84, (2015), 25-32.
3. Teixeira, L.C., Yergeau, E., Balieiro, .FC. et al., "Plant and bird presence strongly influences the microbial communities in soils of Admiralty Bay", *Maritime Antarctica*, PLoS One, 8 (6), (2013), e66109.
4. Herder, G.D., Van Isterdael, G., Beeckman, T. and De Smet, I., "The roots of a new green revolution", *Trends Plant Sci.*, 15, (2010), 600-607.
5. Vessey, J.K., "Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers", *Plant and Soil*, 255, (2003), 571-586.
6. Glick, B.R., "Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications". Hindawi Publishing Corporation, Scientifica., (2012).
7. Tahir, M., and Sarwar, M.A., "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production" *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 11 (1), (2013), 1-7.
8. Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K., "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28, (2012), 1327-1350.
9. Lugtenberg, B. and Kamilova, F., "Plant-growth-promoting rhizobacteria" *Annu. Rev. Microbiol.*, 63, (2009), 541-556.
10. Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., "Plant growthpromoting rhizobacteria on radishes", *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bact. Angers*, (1978), 879-882.
11. Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moënnelocoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F. and Prigent-Combaret, C., "Plant growth promoting rhizobacteria and root system functioning", *Frontiers in Plant Science*, 4, (2013), 356.
12. Martinez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D.E., Gajardo, G. and Mora, M.L., "Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria" *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10 (3), (2010), 293-319.

13. Ziaf, K., Latif, U., Amjad, M. *et al.*, "Combined use of microbial and synthetic amendments can improve radish (*Raphanus sativus*) yield", J. Environ. Agric. Sci., 6, (2016), 10-15.
14. Lindström, K., Murwira, M., Willems, A. and Altier, N., "The biodiversity of beneficial microbehost mutualism: the case of rhizobia", Res. Microbiol., 161, (2010), 453-463.
15. Herridge, D.F., Peoples, M.B. and Boddey, R.M., "Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems", Plant Soil, 311, (2008), 1-18.
16. Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. and Polasky, S., "Agricultural sustainability and intensive production practices", Nature, 418 (6898), (2002), 671-7.
17. Altieri, M.A., "The myth of coexistence: why transgenic crops are not compatible with agroecologically based systems of production", Bulletin of Science, Technology and Society, 25, (2005), 361-371.
18. Lemanceau, P., "Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: Exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents", Agronomie, 12, (1992), 413-437.
19. Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G. and Allard, F., "The composition of fluorescent *Pseudomonas* populations associated with roots is influenced by plant and soil type", Applied and environmental Microbiology, 62, (1996), 2449-2456.
20. Benchabane, M., "Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents", Thèse Doctorat d'état, FSB-UTHB, Alger, (2005), 235 p.
21. Dutta, S. and Podile, A.R., "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone", Critical Rev. Microbiol., 36 (3), (2010), 232-244.
22. Pij, Y., Penn, A., Terzano, R., Crecchio, C., Mimmo, T. and Cesco, S., "Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants", Plant Physiol. Biochem., 87, (2015), 45-52.
23. Reed, S.C., Cleveland, C.C. and Townsend, A.R., "Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective", Annu. Rev. Ecol. Environ. Syst., 42, (2011), 489-512.
25. Shaharoona, B., Arshad, M. and Zahir, Z.A., "Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.)", Lett. Appl. Microbiol., 42, (2006), 155-159.
26. Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R. and Azcon-Aguilar, C., "Microbial cooperation in the rhizosphere", Journal of Experimental Botany, 417 (56), (2005), 1761-1778.
27. Weller, D., "Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria", Annual Review of Phytopathology, 26, (1), (1998), 379-407.

28. Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P. and Bally, R., "Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination", *Can. J. Microbiol*, 45, (1999), 339-342.
29. Hernandez-Leon, R., Rojas-Solis, D., Contreras-Perez, Orozco-Mosqueda, M.del C., Macías-Rodríguez, L.I., la Cruz, H.R., Valencia-Cantero, E. and Santoy, G., "Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains", *Biological Control*, 81, (2015), 83-92.
30. Batista, J.S.S., Hungria, M., Barcellos, F.G., Ferreira, M.C. and Mendes, I.C., "Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil", *Microb. Ecol.*, 53(2007), 270-284.
31. Davet, P., "Vie microbienne du sol et production végétale", INRA, Paris, (1996), 384 p.
32. Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H., Dekkers, L.C. and Lugtenberg, B.J., "Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot", *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13, (2000), 1340-1345.
33. Mijajlovic, G., Deaker, D.R. and Kennedey, I.R., "Methods of the isolation and quantification of beneficial bacteria in the rhizosphere of crop plants", *International Conference, Rhizosphere*, 2 (5), (2007), 77-93.
34. Oswald, A., Calvo, P. and Zuniga, D., "Plant growth promoting rhizobacteria to improve productivity and plant health of potato based cropping systems in the Central Andean Highlands", *International Conference, Rhizosphere*, 1 (2), (2007), 1-12.
35. Chennaoui, N., "Actions des rhizobactéries bénéfiques sur l'amélioration de la stimulation de la croissance des plantes : Importance de la compétence rhizosphérique chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents", *Mémoire Magister, USD. Blida*, (2008), 161p.
36. Ouserir, S., "Etude des effets de la coinoculation des rhizobactéries (*Pseudomonas* spp. fluorescents et *Rhizobium* spp.) sur la phytostimulation et la nodulation chez la fève", *Mémoire Magister. Spécialité : Amélioration des productions végétales, USD Blida, Algérie*, (2009), 139 p.
37. van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. and van Straalen, N.M., "The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems", *Ecology Letters*, 11, (2008), 296-310.
38. Wu, C.H., Bernard, S.M., Andersen, G.L. and Chen, W., "Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration", *Microbial Biotechnology*, 2, (2009), 428-440.
39. Cortois, R. and De Deyn, G.B., "The curse of the black box", *Plant and Soil*, 350, (2012), 27-33.

40. Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M, "The role of root exudates", *In: Rhizosphere interactions with plants and other organisms*, Annu. Rev. Plant. Biol., 57, (2006), 233-266.
41. Bever, J.D., Platt, T.G. and Morton, E.R., "Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities", *Annual Review of Microbiology*, 66, (2012), 265-283.
42. Jha, C.K., Patel, D., Rajendran, N. and Saraf, M., "Combinatorial assessment on dominance and informative diversity of PGPR from rhizosphere of *Jatropha curcas* L.", *J. Basic Microbiol.*, 50, (2010), 211-217.
43. Garcia-Seco, D., Zhang, Y., Gutierrez-Manero, F.J., Martin, C. and Ramos-Solano, B., "Application of *Pseudomonas fluorescens* to blackberry under field conditions improves fruit quality by modifying flavonoid metabolism", *PLoS ONE*, 10, (2015), 1-23.
44. Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., "Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora", *Phytopathology*, 71, (1981), 1020-1024.
45. Raza, W., Ling, N., Yang, L., Huang, Q. and Shen, Q., "Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9", *Sci. Rep.*, 6, (2016a), 24856.
46. Raza, W., Yousaf, S. and Rajer, F.U., "Plant growth promoting activity of volatile organic compounds produced by Bio-control strains", *Sci. Lett.*, 4 (1), (2016b), 40-43.
47. Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D. and Berg, G., "Plant-driven selection of microbes", *Plant Soil*, 321, (2009), 235-257.
48. Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., van der Putten, W.H. and Wall, D.H., "Ecological linkages between aboveground and belowground biota", *Science*, 304 (5677), (2004), 1629-1633.
49. Lemanceau, P., Pivato, B., Mougél, C., Avoscan, L., and Mazurier, S. "Diversité et activités microbiennes dans la rhizosphère: des atouts majeurs en agroécologie". *Alliances Au Pays Racines - 14e Colloq. Sci. Société Hortic. Fr.* (2014).
50. Brencic, A. and Winans, S.C., "Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria", *Microbiology and molecular biology reviews*, 69 (1), (2005), 155-94.
51. Werner, G.D.A., Cornwell, W.K., Sprent, J.I., Kattge, J. and Kiers, E.T.A., "A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N₂-fixation in angiosperms", *Nat. Commun.*, 5, (2014), 98-114.
52. Drogue, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F. and Prigent-Combaret, C., "Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants?", *Res. Microbiol.*, 163 (8), (2012), 500-10.
53. Doornbos, R.F., Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M., "Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review", *Agronomy for Sustainable Development*, 32, (2012), 227-243.

53. Gray, M.J. and Smith, L.M., "Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians", *Journal of Wildlife Management*, 69, (2005), 515-524.
54. Shridhar, B.S., "Review: nitrogen fixing microorganisms", *Int. J. Microbial. Res.*, 3 (1), (2012), 46-52.
55. Sharma, S.K., Ramesh, A. and Johri, B.N., "Isolation and Characterization of Plant Growth-Promo-ting *Bacillus amyloliquefaciens* Strain sks_bnj_1 and its Influence on Rhizosphere Soil Properties and Nutrition of Soybean (*Glycine max* L. Merrill)", *Journal of Virology and Microbiology*, 19, (2013), 446006.
56. Rathore, P., "A review on approaches to develop plant growth promoting rhizobacteria", *Int. J. Recent Sci. Res.*, 5 (2), (2015), 403-407.
57. Robin, A. *et al.*, "Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition", *Advances in agronomy*, 99, (2008), 183-225.
58. Bashan, Y. and de-Bashan, L.E., "How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth. A critical assessment", *In: Sparks, D.L. (eds) Advances in Agronomy*, 108, (2010), 77-136.
59. Sureshbabu, K., Amaesan, N. and Kumar, K., "Amazing multiple function properties of plant growth promoting rhizobacteria in the rhizosphere Soil", *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 5 (2), (2016), 661-683.
60. El Zemrany, H., Czarnes, S., Hallett, P.D., Alamercery, S., Bally, R. and Monrozier, L.J., "Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1", *Plant and Soil*, 29, (2007), 109-118.
61. Hu, J. and Blanchard, J.L., "Environmental sequence data from the Sargasso Sea reveal that the characteristics of genome reduction in *Prochlorococcus* are not a harbinger for an escalation in genetic drift", *Mol. Biol. Evol.*, 26, (2009), 5-13.
62. Degenhardt, B. and Gimmler, H., "Cell Wall Adaptations to Multiple Environmental Stresses in Maize Roots", *Journal of Experimental Botany*, 51 (344), (2000), 595-603.
63. Menendez, E. and Garcia-Fraile, P., "Plant Probiotic Bacteria: Solutions to Feed the World", *Microbiology*, 3, (2017), 502-524.
64. Tak, H.I., Ahmad, F. and Babalola, O.O., "Advances in the application of plant growthpromoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals", *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 223 (223), (2013), 33-52.
65. Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., McHardy, A.C., Dangl, J.L., Knight, R., Ley, R. *et al.*, "Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms", *Cell Host Microbe*, 17, (2015), 603-616.
66. Lebeis, S.L., "Greater than the sum of their parts: characterizing plant microbiomes at the community-level", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 24, (2015), 82-86.

67. Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A. and Poole, P.S., "Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition", *ISME J.*, 9, (2015), 2349-2359.
68. Gougoulas, C., Clark, J.M. and Shaw, L.J., "The role of soil microbes in the global carbon cycle: tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems", *J. Sci. Food Agric.*, 94, (2014), 2362-2371.
69. Baetz, U. and Martinoia, E., "Root exudates: the hidden part of plant defense", *Trends Plant Sci.*, 19, (2014), 90-98.
70. Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. and Bakker, P.A.H.M., "The rhizosphere microbiome and plant health", *Trends Plant Sci.*, 17, (2012), 478-486.
71. Martínez-Hidalgo, P. and Hirsch, A.M., "The Nodule Microbiome: N₂-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone", *Phytobiomes*, 1, (2017), 70-82.
72. Combes-Meynet, E., Pothier, J.F., Moënne-Loccoz, Y. and Prigent-Combaret, C., "The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4- diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion", *Mol. Plant- Microbe Interact.*, 24, (2011), 271-284.
73. Sprent, J., "Legume Nodulation", John Wiley and Sons, (2009).
74. Willems, A., "The taxonomy of rhizobia: an overview", *Plant Soil*, 287, (2006), 3-14.
75. Van Kessel, C. and Hartley, C., "Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation?", *Field Crops Res.*, 65, (2000), 165-181.
76. Somasegaran, P. and Hoben, H.J., "Methods in legumes-rhizobium technology", Niftal. University of Hawaii, (1985), 1-331.
77. Bala, A., Murphy, P.J. and Giller, K.E., "Classification of Tropical Tree Rhizobia Based on phenotypic characters forms Nested Clusters of phylogenetic Groups", *West African J. Appl. Ecol.*, 6, (2004), 9-19.
78. Frank, B., "Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen", *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 7, (1889), 332-346.
79. Fred, E.B., Baldwin, I.L. and McCoy, E., "Root nodule bacteria and leguminous plants", University of Wisconsin Press, Madison, Wis., (1932).
80. Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W. and Huntoon, F.M., "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", The Williams and Wilkins, Baltimore, (1923).
81. Berrada, H. and Fikri-Benbrahim, K., "Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives", *Br. Microbiol. Res. J.*, 4 (6), (2014), 616-639.
82. Jordan, D.C., "Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32 (1), (1982), 136-139.
83. Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E. and Bedmar, E.J., "Bacterial associations with legumes", *CRC Crit. Rev. in Plant Sci.*, 34, (2015), 17-42.

84. Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P. and Lindström, K., "Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations", *Syst. Appl. Microbiol.*, 38, (2015), 84-90.
85. Bailly, X., "Nickel resistance determinants in *Bradyrhizobium* strains from nodules of the endemic New Caledonia legume *Serianthes calycina*", *Applied and Environmental Microbiology*, 73, (2007), 8018-8022.
86. Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. and Batut, J., "Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?", *Trends Microbiol.*, 17, (2009), 458-466.
87. Young, J.P.W., Mutch, L.A., Ashford, D.A., Zézé, A. and Mutch, K. E., "The molecular evolution of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis", *In: Genes in the Environment*, Edited by Hails, R., Godfray, H.C.J. and Beringer, J., Oxford, Blackwell Science, (2003), 245-257.
88. Selosse, M. and Strullu-Derrien, C., "Origins of the terrestrial flora: A symbiosis with fungi?", *BIO Web of Conferences*, 4, (2015), 00009.
89. Archibald, J. M., "Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution", *Current Biology*, 25 (19), (2015), 911-921.
90. Graham, P.H. and Vance, C.P., "Legumes: importance and constraints to greater use", *Plant Physiol.*, 131, (2003), 872-877.
91. Cleland, E.E. and Harpole, W.S., "Nitrogen enrichment and plant communities", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195 (1), (2010), 46-61.
92. Maathuis, F.J., "Physiological functions of mineral macronutrients", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12, (2009), 250-258.
93. Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M., Cape, J., Reis, S., Sheppard, L., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M. and Voss, M., "The global nitrogen cycle in the twentyfirst century", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 368, (2013), 20130164.
94. Bouwman, A.F., Beusen, A.H.W., Griffioen, J., Van Groenigen, J.W., Hefting, M.M., Oenema, O., Van Puijenbroek, P., Seitzinger, S., Slomp, C.P. and Stehfest, E., "Global trends and uncertainties in terrestrial denitrification and N₂O emissions", *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 368, (2013), 20130112.
95. Franche, C., Lindström, K. and Elmerich, C., "Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants", *Plant Soil*, 321, (2009), 35-59.
96. Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E.G. *et al.*, "Advances in Host Plant and *Rhizobium* Genomics to Enhance Symbiotic Nitrogen Fixation in Grain Legumes", *Advances in Agronomy*, 129, (2015), 1-116.
97. Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L. *et al.*, "*Anthyllis vulneraria*/*Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic

- nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd”, *Plant Soil*, 342, (2011), 405-417.
98. Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., et al., “A new subfamily classification of the *Leguminosae* based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG)”. *Taxon*, 66, (2017), 44-77.
 99. Smykal, P., Coyne, C.J., Ambrose, M.J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M.W., Berger, J., Greene, S.L., Nelson, M.N., Besharat, N., Vymyslicky, T., Toker, C., Saxena, R.K., Roorkiwal, M., Pandey, M.K., Hu, J.G., Li, Y.H., Wang, L.X., Guo, Y., Qiu, L.J., Redden, R.J. and Varshney, R.K., “Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34 (1-3) (2015), 43-104.
 100. Doyle, J.J. and Luckow, M.A., “The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context”, *Plant Physiol.*, 131, (2003), 900-910.
 101. Mahmood, A. and Athar, M., “Cross inoculation studies: Response of *Vigna mungo* to inoculation with rhizobia from tree legumes growing under arid Environment”, *Int. J Environ. Sci. Tech.*, 5 (1), (2008), 135-139.
 102. Pueppke, S.G. and Broughton, W.J., “*Rhizobium* sp. NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host-ranges”, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12, (1999), 293-318.
 103. Dreyfus, B., Garcia, J.L. and Gillis, M., “Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov. a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38, (1988), 89-98.
 104. Lindström, K., “*Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39 (3), (1989), 365-367.
 105. Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., and Martinez Romero, E., “Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes”, *Syst. Appl. Microbiol.*, 34, (2011), 96-104.
 106. Ramirez-Bahena, M.H., Hernandez, M., Peix, A., Velaquez, E., and Leon-Barrios, M., “Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov”. *Syst. Appl. Microbiol.*, 35, (2012), 334-341.
 107. Claverie, J. M., Audic, S. et Abergel, C., “La Bioinformatique: une discipline stratégique pour l'analyse et la valorisation des génomes”, *Conference Proceeding, Rencontres de Luminy*, (1999).
 108. Laurent, N., “Bioinformatique et données biologiques”, *Cours d'introduction à la bioinformatique*, (2012), https://www.lifl.fr/~noe/enseignement/m1-genpro/.../bioinfo_bio1-2x3.pdf.
 109. David, W.M., “Bioinformatics: Sequence and genome analysis”, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, (2004), 665 p.

110. Sean, D.M., Jessica, D.T. and Russ, B., "Bioinformatics", *In*: Shortliffe, E.H. and Cimino, J.J. (eds) Biomedical Informatics, Springer- Verlag, London, (2014), 695-719.
111. Thomas, F., Lefèvre, T. et Raymond, M., "Biologie évolutive", 2^{ème} édition, De Boeck supérieur, (2016), 959 p.
112. Philippe, G., "Automatisation de processus d'annotation génomique contrôlée par système expert", Thèse Doctorat, Université de Provence, Marseille, France, (2009), 13.
113. Perrière, G. et Brochier-Armanet, C., "Concepts et méthodes en phylogénie moléculaire", Springer-Verlag, France, (2010), 250 p.
114. Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L., "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87, (1990), 4576-4579.
115. Stackebrandt, E., Witt, D., Kemmerling, C., Kroppenstedt, R. and Liesack, W., "Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes", *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, (1991), 1468-1477.
116. Kitouni, M., "Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire de substances élaborées", Thèse Doctorat, Université Constantine 1, Algérie, (2007), 42-71.
117. Rodriguez-Valera, F., "Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective", *Env. Microbiol.*, 4 (11), (2002), 628- 633.
118. Klappenbach, A., Saxman, P.R., Cole, J.R. and Schmidt, T.M., "rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database", *Nucleic Acids Res.*, 29, (2001), 181-184.
119. Yap, W.H., Zhang, Z. and Wang, Y., "Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomyce *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon", *Bacteriol.*, 181, (1999), 5201-5209.
120. Kolbert, C.P. and Persing, D.H., "Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens", *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, (1999), 299-305.
121. Romaric, F., "Dico de Bio", Ed. De beock, Bruxelles, (2006), 257 p.
122. Yanez, M.A., Catalan, V., Apraiz, D., Figueras, M.J. and Martinez Murcia, A.J., "Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences", *Int. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, (2003), 875- 883.
123. Pleckaityte, M., "Alzheimer's disease: a molecular mechanism, new hypotheses, and therapeutic strategies", *Medicina (Kaunas)*, 46 (1), (2010), 70-6.
124. Guindon, S. and Gascuel, O., "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood", *Syst. Biol.*, 52, (2003), 696-704.
125. Choudhuri, S., "Bioinformatics for beginners: genes, genomes, molecular evolution, databases and analytical tools", Elsevier, (2014), 238 p.

126. Saitou, N. and Nei, M., "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.*, 4, (1987), 406-425.
127. Kurtzman, C.P., Boekhout, T. and Fell, J.W., "The Yeasts, A Taxonomic Study", 5th Edition, Copyright Elsevier B.V., (2010), 2354 p.
128. Swofford, D.L., Olsen, G.J., Wadell, P.J. and Hillis, D.M., "Phylogenetic inference", *In: Systematic Biology*, (Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. eds), Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts, (1996).
129. Strimmer, K.S., "Maximum likelihood methods in molecular phylogenetics", Herbert Utz Verlag., (1997).
130. Tian, C.F., Young, J.P.W., Wang, E.T., Tamimi, S.M., and Chen, W.X., "Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: the role of recombination and lateral gene transfer", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73, (2010), 563-576.
131. Graham, P.H., and Vance, C.P., "Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs", *Field Crops Res.*, 65, (2000), 93-106.
132. Richardson, A.E., Hocking, P.J., Simpson, R.J. and George, T.S., "Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus", *Crop Pasture Sci.*, 60 (2), (2009), 124-143.
133. Abd-Alla, M.H., El-Enany, A.W.E., Nafady, N.A., Khalaf, D.M., and Morsy, F.M., "Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil", *Microbiol. Res.*, 169, (2014), 49-58.
134. Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Chauhan, V.B., Chand, R., and Verma, M., "Potential Ecofriendly Soil Microorganisms: Road Towards Green and Sustainable Agriculture", *In: Management of Microbial Resources in the Environment*, Malik, A., Grohmann, E. and Alves, M., eds., (Dordrecht: Springer Netherlands), (2013), 249-287.
135. Voisin, A.S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M.H., Magrini, M.B., Meynard, J.M., Mougé, C., Pellerin, S. et Pelzer, E., "Les légumineuses dans l'Europe du XXI^{ème} siècle: Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs? Quels nouveaux défis pour la recherche?", *Innov. Agron.*, 30, (2013), 283-312.
136. Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W. J., "Molecular basis of symbiotic promiscuity", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, (2000), 180-201.
137. Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J. and Palusińska-Szyszk, M., "Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume– rhizobium interactions", *Applied Soil Ecology*, 85, (2015), 94-113.
138. Gaworzewska, E.T. and Carlile, M.J., "Positive Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other Bacteria towards Root Exudates from Legumes and other Plants", *Microbiology*, 128 (6), (1982), 1179-1188.
139. Chen, W.M., James, E.K., Chou, J.H., Sheu, S., Yang, S.Z. and Sprent, J.I., "beta-Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan", *New Phytol.*, 168, (2005), 661-675.

140. Dénarié, J., Debelle, F. and Prome, J.C., "*Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis", *Annu. Rev. Biochem.*, 65, (1996), 503-35.
141. Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N. and Kawaguchi, M., "How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground", *Plant & cell physiology*, 51, (2010), 1381-1397.
142. Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M. and Skorupska, A., "Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*", *Microbiological Research*, 165 (1), (2010), 50-60.
143. Toth, K. and Stacey, G., "Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-rhizobium symbiosis?", *Frontiers in plant science*, 6, (2015), 401.
144. Gibson, K.E., Kobayashi, H. and Walker, G.C., "Molecular determinants of a symbiotic chronic infection", *Annu. Rev. Genet.*, 42, (2008), 413-441.
145. Cooper, J.E., "Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue", *J. Appl. Microbiol.*, 103, (2007), 1355-1365.
146. Hassan, S. et Mathesius, U., "The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions", *Journal of Experimental Botany*, 63, (2012), 3429–3444.
147. Gough, C., "*Medicago truncatula*, un modele pour l'etude des endosymbioses racinaires", *Biofutur*, 298, (2009), 30-32.
148. Masson-Boivin, C., Bontemps, C., Golfier, G., Gris-Liebe, C. et Talini, L., "Détection et typage du gène nodC a l'aide de biopuces a ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia", *Les Actes du BRG*, 6, (2006), 97-110.
149. Skorupska, A., Wielbo, J., Kidaj, D. and Marek-Kozaczuk, M., "Enhancing *Rhizobium*-Legume Symbiosis Using Signaling Factors", *In* : Khan, M.S., Zaidi, A. and Musarrat, J. (eds), *Microbes for Legume Improvement*, Springer-Verlag/Wien Printed in Germany, (2010), p 27.
150. Spaink, H.P., "Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria", *Annu. Rev. Micro.*, 54, (2000), 257-88.
151. Bladergroen, M.R. and Spaink, H.S., "Genes and signal molecules involved in the rhizobia Leguminosae symbiosis", *Current Opinion in Plant Biology*, 1, (1998), 353–359.
152. Roche, P., Maillet, F., Plazenet, C., Debelle, F., Ferro, M., Truchet, G., Promé, J.K. and Dénarié, J., "The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, (1996), 15305-15310.
153. Hirsch, A.M., Lum, M.R. and Downie, J.A., "What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?", *Plant Physiol.*, 127, (2001), 1484-1492.

154. Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., van Montagu, M. and Holsters, M., "The *NodC* protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N acetylglucosaminyltransferase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, (1994), 2669-2673.
155. Mergaert, P., Van Montagu, M. and Holsters, M., "Molecular mechanisms of Nod factor diversity", *Molecular Microbiology*, 25, (1997), 811-817.
156. Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Dénarié, J. and Promé, J.C., "Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nod H and nod PQ genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals", *Cell*, 67, (1991), 131-1143.
157. Fraysse, N., Couderc, F. and Poinso, V., "Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis", *Eur. J. Biochem.*, 270, (2003), 1365-1380.
158. Becker, A., Fraysse, N. and Sharypova, L., "Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides", *Mol. Plant Microbe. Interact.*, 18, (2005), 899-905.
159. Weston, L.A. and Mathesius, U., "Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy", *Journal of Chemical Ecology*, 39, (2013), 283-297.
160. Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C. and Dénarié, J., "Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal", *Nature*, 344, (1990), 781-784.
161. Cohen, M.F., Sakihama, Y. and Yamasaki, H., "Roles of Plant Flavonoids in Interactions with Microbes: from protection against pathogens to the mediation of mutualism", *Recent Res. Devel. Plant Physiol.*, 2, (2001), 157-173.
162. Sieberer, B.J., Timmers, A.C.J. and Emons, A.M.C., "Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation", *Molecular plant-microbe interactions*, 18, (2005), 1195-1204.
163. Gage, D.J., "Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes", *Microbiology and molecular biology reviews*, (June 2004), 280-300.
164. Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S. and Downie, J.A., "The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis", *Annu. Rev. Genet.*, 45, (2011), 119-144.
165. Perrine-Walker, F.M., Lartaud, M., Kouchi, H. and Ridge, R.W., "Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis", *Protoplasma*, (2014), 1099-111.
166. Trevaskis, B., Colebatch, G., Desbrosses, G., Wandrey, M., Wienkoop, S., Saalbach, G. and Udvardi, M., "Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation", *Comparative and Functional Genomics*, 3, (2002), 151-157.
167. Udvardi, M.K. and Day, D.A., "Metabolite Transport across Symbiotic Membranes of Legume Nodules", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, 48, (1997), 493-523.

168. Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A. and Kondorosi, E., "Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis.", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 28, (2006), 5230-5
169. Pawlowski, K. and Bisseling, T., "Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features?", *Plant Cell*, 8, (1996), 1899-1913.
170. Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E. and Gresshoff, P.M., "Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation", *J. Integr. Plant Biol.*, 52, (2010), 61-76.
171. Den Herder, G. and Parniske, M., "The unbearable naivety of legumes in symbiosis", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12, (2009), 491-499.
172. Schumpp, O. and Deakin, W.J., "How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules", *Trends Plant Science*, 15, (2010), 189-195.
173. Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. and Truchet, G., "Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules", *J. Bacteriol.*, 172, (1990), 4295-4306.
174. Foucher, F. and Kondorosi, E., "Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*", *Plant Molecular Biology*, 43, (2000), 773-786.
175. Soupène, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G. and Batut, J., "Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, (1995), 3759-3763.
176. Kereszt, A., Mergaert, P. and Kondorosi, E., "Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims?" *Mol. Plant Microbe Interact.*, 24, (2011), 1300-1309.
177. Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P. and Stacey, G., "*Rhizobium-legume* symbioses: the crucial role of plant immunity", *Trends in Plant Science*, 20 (3), (2015), 186-194.
178. Timmers, A.C., Auriac, M.C., de Billy, F. and Truchet, G., "*Nod* factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa", *Development*, 125, (1998), 339-349.
179. Downie, J.A., "Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules", *Curr. Biol.*, 15 (6), (2005), R196-8.
180. Udvardi, M. and Poole, P.S., "Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses", *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64, (2013), 781-805.
181. Bourcy, M., Berrabah, F., Ratet, P. and Gourion, B., "Failure of self-control: Defense-like reactions during legume/rhizobia symbiosis", *Plant Signal Behav.*, 8, (2013), 23951.
182. Denison, R.F., Hunt, S. and Layzell, D.B., "Nitrogenase activity, nodule respiration, and O₂ permeability following detopping of alfalfa and birdsfoot trefoil", *Plant Physiology*, 98 (3), (1992), 894-900.
183. Ott, T., van Dongen, J.T., Gu, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P. and Udvardi, M.K., "Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but

- not for general plant growth and development", *Current Biology*, 15 (6), (2005), 531-535.
184. Prell, J. and Poole, P., "Metabolic changes of rhizobia in legume nodules", *Trends Microbiol.*, 14, (2006), 161-168.
 185. Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, P. and Samiyappan, R., "Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against Banana bunchy top virus", *Biol. Control*, 51, (2009), 16-25.
 186. Saharan, B.S. and Nehra, V., "Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review", *Life Sciences and Medicine Research*, 11, (2011), 1-4.
 187. Migula, W., "Ube rein neues system de Bakterien. Arb. Bakteriolog. Inst. Karlsruhe, 1, (1894), 235-238.
 188. Choudhary, D.K., Prakash, A., Wray, V. and Johri, B.N., "Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation", *Current Science*, 97 (2), (2009), 170-179.
 189. Haas, D. and Defago, G., "Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads", *Nat. Rev. Microbiol.*, 3 (4), (2005), 307-319.
 190. Eyquem, A., Alouf, J. et Montagnier, L., "Traité de microbiologie clinique: deuxièmes mises à jour et compléments", Piccin Nuova Libreria S.p.A., Italy, (2000).
 191. Almario, J., Gobbin, D., Défago, G., Moënné-Loccoz, Y. and Rezzonico, F., "Prevalence of type III secretion system in effective biocontrol pseudomonads", *Res. Microbiol.*, 165, (2014), 300-304.
 192. Haney, C.H., Samuel, B.S., Bush, J. and Ausubel, F.M., "Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants", *Nat. Plants*, (2015), 15051.
 193. Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., "Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities", *Microbiology Research*, 163, (2008), 232-238.
 194. Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D.V., Davis, E.W., Lim, C.K., Shaffer, B.T. et al., "Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions", *PLoS Genet.*, 8 (7), (2012), 1-27.
 195. Latour, X. et Lemanceau, P., "Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes à oxydase positive", *Agronomie*, 17, (1997), 427-443.
 196. Misko, A.L. and Germida, J.J., "Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 42, (2002), 399-407.
 197. Mulet, M., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E., "DNA sequence based analysis of the *Pseudomonas* species", *Environ. Microbiol.*, 12, (2010), 1513-1530.
 198. Chin-A-Woeng, T.F.C., de Priester, W., van der Bij, A. and Lugtenberg, B.J.J., "Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by

- Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy”, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10, (1997), 79-86.
199. Bloemberg, G.V., Wijnfies, A.H.M., Lamers, G.E.M., Sturman, N. and Lugtenberg, B.J.J., “Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities”, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13, (2000), 1170-1176.
 200. Lee, J.P., Lee, S.W., Kim, C.S., Son, J.H., Song, J.H., Lee, K.Y., Kim, H.J., Jung, S.J. and Moon, B.J., “Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*”, *Biol. Control.*, 37 (3), (2006), 329-337.
 201. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y., “Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere”, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 22 (2), (2003), 107-149.
 202. Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. and Sahin, F., “Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry”, *Sci. Hortic.*, 111 (1), (2006), 38-43.
 203. Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., “Indole acetic production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan”, *Turk. J. Biol.*, 29, (2005), 29-34.
 204. Pallai, R., Hynes, R.K., Verma, B. and Nelson, L.M., “Phytohormone production and colonization of canola (*Brassica napus* L.) roots by *Pseudomonas fluorescens* 6-8 under gnotobiotic conditions”, *Canadian Journal of Microbiology*, 58, (2012), 170-178.
 205. Malik, D.K. and Sindhu, S.S., “Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*)”, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17, (2011), 25-32.
 206. Gao, Y. and Zhao, Y., “Auxin biosynthesis and catabolism”, *In: Zažímalová, E. et al.*, (eds) *Auxin and its role in plant development*, Springer-Verlag, Vienna, (2014), 21-38.
 207. Etesami, H., Alikhani, H.A. and Hosseini, H.M., “Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents”, *MethodsX*, 2, (2015), 72-78.
 208. Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernandez, G., Galvez, L. and Vanderleyden, J., “Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba”, *Plant and soil*, 71, (2008), 92-106.
 209. Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M. and Thonart, P., “Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health”, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15 (2), (2011), 327-337.

210. Wong, W.S., Tan, S.N., Ge, L., Chen, X. and Yong, J.W.H., "The importance of phytohormones and microbes in biofertilizers" *In*: Maheshwari, D.K., (ed) Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem, sustainable development and biodiversity, Springer International Publishing, Switzerland, 12, (2015), 105-158.
211. Cassán, F., Vanderleyden, J. and Spaepen, S., "Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*", *J. Plant Growth Regul.*, 33, (2014), 440-459.
212. Bleecker, A.B. and Kende, H., "Ethylene: a gaseous signal molecule in plants", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16, (2000), 1-18.
213. Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S. and Glick, B.R., "Cadmium-tolerant plant growth promoting rhizobacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.)", *Soil Biol. Biochem.*, 37, (2005), 241-250.
214. Wang, C., Knill, E., Glick, B.R. and Defago, G., "Effect of transferring 1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO and its gac A derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities", *Can. J. Microbiol.*, 46, (2000), 898-907.
215. Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B.R., "Plant growth promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and peppers", *J. Plant Sci.*, 166, (2004b), 525-530.
216. Reed, M.L.E., and Glick, B.R., "Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons", *Can. J. Microbiol.*, 51, (2005), 1061-1069.
217. Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J., "Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria", *Eur. J. Plant Pathol.*, 119, (2007), 329-39.
218. Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M.S., Ali, S., Ali, B., Hameed, S. and Zhou, W., "Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility", *Plant Growth Regul.*, 80 (1), (2016), 23-36.
219. Damam, M., Kaloori, K., Gaddam, B. and Kausar, R., "Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants", *Int. J. Pharm. Sci. Rev.*, 37 (1), (2016), 130-136.
220. Anand, K., Kumari, B. and Mallick, M.A., "Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as bio-fertilizers", *Int. J. Pharm. Sci.*, 8 (2), (2016), 37-40.
221. Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J. and Dowling, D.N., "Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates", *Front. Microbiol.*, 6, (2015), 745.
222. Hussein, K.A. and Joo, J.H., "Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production",

- Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 58, (2015), 847-855.
223. Vyas, P. and Gulati, A., "Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*", BMC Microbiol., 9, (2009), 174.
 224. Sujatha, N. and Ammani, K., "Siderophore production by the isolates of fluorescent Pseudomonads", Int. J. Cur. Res. Rev., 5, (2013), 1-7.
 225. Sah, S., Singh, N. and Singh, R., "Iron Acquisition in Maize (*Zea Mays* L.) Using *Pseudomonas* Siderophore", 3 Biotech, 7 (2), (2017), 121.
 226. Suty, L., "La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques Sciences en partage", Editions Quae, Paris, (2010), 328 p.
 227. Jacques, P., Delfosse, P., Ongena, M., Lepoivre, P., Cornélis, P., Koedam, N., Neirinckx, L. et Thonart, P., "Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol", Cahier Agriculture, 2, (1993), 301-307.
 228. Tariq, M., Hameed, S., Yasmeen, T., Zahid, M. and Zafar, M., "Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.)", World J. Microbiol. Biotechnol., 30 (2), (2014), 719-725.
 229. Sivasakthi, S., Usharani, G. and Saranraj, P., "Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: a review", Afr. J. Agric., 9, (2014), 1265-1277.
 230. Adam, A., "Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-115 pathogènes". Thèse Doctorat en sciences. Université de Liège, Belgique., (2008), 165p.
 231. Dwevedi, D. and Johri, B.N., "Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation", Curr. Sci., 85 (12), (2003), 1693-1673.
 232. Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J., "Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria", New. Phyto., 157, (2003), 503-523.
 233. Ramette, A., Moëgne-Loccoz, Y. and Défago, G., "Prevalence of fluorescent Pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/ or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot", FEMS Microbiol. Ecol., 44, (2003b), 35-43.
 234. McGowan, S.J., Barnard, A.M.L., Bosgelme, G., Sebaihia, M., Simpson, N.J.L., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. and Salmond, G.P.C., "Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway", Mol. Microbiol., 55 (2), (2005), 526-545.
 235. Mathieu, A., "Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel", Mémoire de Maître en Sciences, Université Laval, Québec, (2005), 80p.

236. Bergsma-Vlami, M., Prins, M.E. and Raaijmakers, J.M., "Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp.", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52 (1), (2005), 59-69.
237. Van Loon, L.C., "Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria", *Eur. J. Plant Pathol.*, 119, (2007), 243-254.
238. Kloepper, J. W., Ryu, C. M. and Zhang, S., "Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp.", *Phytopathology*, 94, (2004), 1259-1266.
239. Rudrappa, T. *et al.*, "The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*", *Commun Integr. Biol.*, 3 (2), (2010), 130-138.
24. Tariq, M., Hameed, S., Yasmeen, T. and Ali, A., "Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]", *Afr. J. Biotechnol.*, 11, (2012), 15012-15019.
240. Nadeem, S.M., Naveed, M., Ahmad, M. and Zahir, Z.A., "Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: mechanisms of action, applications, and future prospects", *In: Arora, N.K. (ed) Plant microbes symbiosis: applied facets*, 1, Springer, India, (2015), 1-36.
241. Pieterse, C.M., Van Pelt, J.A., Van Wees, S.C., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J. and Van Loon, L.C., "Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression", *Eur. J. Plant Pathol.*, 107 (1), (2001), 51-61
242. Jain, A., Singh, A., Singh, S., Sharma, B.K. and Singh, H.B., "Biocontrol agents-mediated suppression of oxalic acid induced cell death during *Sclerotinia sclerotiorum*-pea interaction", *Journal of Basic Microbiology*, 55 (5), (2015), 601-606.
243. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., "*Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts", *Nature Reviews*, 2, (2004), 43-56.
244. Saravanakumar, D. and Samiyappan, R., "ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants", *Journal of Applied Microbiology*, 102, (2007), 1283-92.
245. Joe, M.M. and Sivakumar, P.K., "Seed priming with co-flocs of *Azospirillum* and *Pseudomonas* for effective management of rice blast", *Arch. Phytopath. Plant Protec.*, 43, (2010), 1551-1563.
246. Couillerot, O., Loqman, S., Toribio, A., Hubert, J., Gandner, L., Nuzillard, J.-M., Ouhdouch, Y., Clément, C., Ait Barka, E. and Renault, J.H., "Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography", *J. Chromatography B*, 944, (2014), 30-34.
247. Taqarort, N., Bouzerda, L., Boubaker, H., Ait Ben Aoumar, A. et Boudyach E., "Lutte biologique contre la pourriture verte des agrumes en post-récolte par l'utilisation de levures antagonistes", *Acta Bot. Gallica*, 155, (2008), 235-244.

248. Compant, S., "Interaction between grapevine, *Vitis vinifera* L., and the endophytic bacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: colonization, induced defense responses and systemic resistance towards *Botrytis cinerea*", URCA, Remis, (2007), 210 p.
249. Grover, M., Ali, S.K.Z., Sandhya, V., Rasul, A. and Venkateswar-lu, B., "Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses", World J. Microbiol. Biotechnol., 27, (2011), 1231-1240.
250. Yang, J., Kloepper, J.W. and Ryu, C.M., "Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress", Trends Plant Sci., 14, (2009), 1-4.
251. Ali, S.Z., Sandhya, V., Grover, M., Rao, L.V., Kishore, V.N. and Venkateswarlu, B., "*Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures", Biol. Fertil. Soils, 46, (2009), 45-55.
252. Dell'Amico, E., Cavalca, L. and Andreoni, V., "Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium resistance rhizobacteria", Soil Biol. Biochem., 40, (2008), 74-84.
253. Zahir, Z.A., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S.M. and Arshad, M., "Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions", Archives of Microbiology, 191, (2009), 415-424.
254. Zhuang, X., Chen, J., Shim, H. and Bai, Z., "New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation", Environ. Int., 33, (2007), 406-13.
255. Sandhya, V., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G. and Venkateswarlu, B., "Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopoly saccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45", Biol. Fertil. Soils, 46, (2009), 17-26.
256. Costerton, J.W., Stewart, P. and Greenberg, E., "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections", Science, 284, (1999), 1318-1322.
257. Babalola, O., "Ethylene quantification in three rhizo-bacterial isolates from *Striga hermonthica*-infested maize and sorghum", Egyptian Journal of Biology, 12, (2010), 1-5.
258. Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y. and Faure, D.D., "Quorum quenching: role in nature and applied developments", FEMS Microbiol. Rev., 40, (2015), 86-116.
259. Steindler, L., Bertani, I., De Sordi, L., Bigirimana, J. and Venturi V., "The presence type and role of N -acyl homoserine lactone quorum sensing in fluorescent *Pseudomonas* originally isolated from rice rhizospheres are unpredictable", FEMS Microbiol. Lett., 288, (2008), 102-111.
260. Miller, M.B. and Bassler, B.L., "Quorum sensing in bacteria", Annu. Rev. Microbiol., 55, (2001), 165-199.
261. Liu, M.S., Chien, C.T. and Lin, T.P., "Constitutive components and induced gene expression are involved in the desiccation tolerance of *Selaginella tamariscina*", Plant and Cell Physiology, 49, (2008), 653-663.

262. Cornelis, P., "The 'core' and 'accessory' regulons of *Pseudomonas*-specific extracytoplasmic sigma factors", *Molecular Microbiology*, 68 (4), (2008), 810-812.
263. Del Gallo, M. and Fendrik, I., "The rhizosphere and *Azospirillum*", *In: Azospirillum / Plant Associations*, CRC press, Boca Raton, Fla, (1994), 57-75.
264. Bahme, J.B. and Schroth, M.N., "Spatial Temporal Colonization Patterns of a Rhizobacterium on Underground Organs of Potato", *Phytopathology*, 77, (1987), 1093-1100.
265. Brimecombe, M.J., De Leij, F.A. and Lynch, J.M., "Rhizodeposition and microbial population", *In: Pinto, R., Varanini, Z. and Nannipierei, P. (ed.) The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, CRC Press, New York, (2007), 74-98.
266. Van Loosdrecht, M.C., Norde, W., Zehnder, A.J.B., "Physical chemical description of bacterial adhesion", *J. Biomaterials Appl.*, 5, (1990), 91-106.
267. Rodríguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S. and Ruíz-Saínz, J.E., "Attachment of bacteria to the roots of higher plants", *FEMS Microbiology Letters*, 272, (2007), 127-136.
268. Anderson, A.J., "Isolation from root and shoot surfaces of agglutinins that show specificity for saprophytic pseudomonads", *Can. J. Bot.*, 61, (1983), 3438-3443.
269. Mercado-Blanco, J. and Bakker, P.A.H.M., "Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection", *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, (2007), 367-389.
270. Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G. and Lemanceau, P., "Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria", *Agronomy*, 23, (2003), 407-418.
271. Benizri, E., Baudoin, E. and Guckert, A., "Root colonization by inoculated plant growth rhizobacteria", *Biocontrol Science and Technology*, 11, (2001), 557-574.
272. Pagnani, G., Marika Pellegrini, M., Angelica Galieni, A. *et al.*, "Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* 'Finola' cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics", *Industrial Crops and Products*, 123, (2018), 75-83.
273. Hansen, M.L., Kregelund, L., Nybroe, O. and Sørensen, J., "Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy", *FEMS Microbiology Ecology*, 23, (1997), 353-360.
274. Hallmann, J., "Plant interactions with endophytic bacteria", *In: Jeger, M.J. and Spence, N.J. (Eds.) Biotic Interactions in Plant Pathogen Associations*, CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, (2001), 87-119.
275. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Ait Barka, E., "Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects", *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, (2005), 4951-4959.

276. Compant, S., Kaplan, H., Sessitsch, A., Nowak, J., Ait Barka, E. and Clément, C., "Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues", *FEMS Microbiology Ecology*, 63, (2008), 84-93.
277. Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W. and Sessitsch, A., "Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*", *Applied and Environmental Microbiology*, 70, (2004), 2667-2677.
278. Krechel, A., Ditz, M., Ulrich, A., Faupel, A., Hallmann, J. and Berg, G., "Bacterial life inside and outside potato roots and leaves", *Bulletin OILB/SROP*, 27, (2004), 157-163.
279. Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. and Hallmann, J., "Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi", *FEMS Microbiology Ecology*, 51, (2005), 215-229.
280. Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S. and Elsas, J.D., "Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth", *Trends in Microbiology*, 16, (2008), 463-471.
281. Hallmann, J. and Berg, B., "Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes", *In: Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C. and Sieber, T.N. (Eds) Microbial Root Endophytes*, Springer, Berlin Heidelberg, (2007), 15-31.
282. Chanway, C.P., Shishido, M., Nairn, J., Jungwirth, S., Markham, J., Xiao, G. and Holl, F.B., "Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria", *Forest Ecology Management*, 133, (2000), 81-88.
283. Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T., "Life in grasses: diazotrophic endophytes", *Trends in Microbiology*, 6, (1998), 139-144.
284. Böhm, M., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B., "Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, (2007), 526-533.
285. Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M. and van der Lelie, D., "Endophytic bacteria and their potential applications", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, (2002), 583-606.
286. Krause, A., Ramakumar, A., Bartels, D., Battistoni, F., Bekel, T., Boch, J., Böhm, M., Friedrich, F., Hurek, T., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Sarkar, A., Schneiker, S., Syed, A.A., Thauer, R., Vorhölter, F., Weidner, S., Pühler, A., Reinhold-Hurek, B., Kaiser, A. and Goesmann, A., "Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72", *Nature Biotechnology*, 24, (2006), 385-391.
287. Fouts, D.E., Tyler, H.E., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Ren, W., Badger, J.H., Durkin, A.S., Huot, H., Shrivastava, S., Kothari, S., Dodson, R.J., Mohamoud, Y., Khouri, H., Roesch, L.F.W., Krogfelt, K.A., Struve, C., Triplett, E.W. and Methe, B.A., "Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice", *PLoS Genetics*, 4 (7), (2008), e1000141.

288. Gregory, P.J., "Plant Roots: Growth, Activity and Interaction with Soils", Blackwell Publishing, Oxford, (2006), 318 p.
289. James, E.K., Gyaneshwar, P., Manthan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., lanetta, P.P.M., Olivares, F.L. and Ladha, J.K., "Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67", Molecular Plant-Microbe Interactions, 15, (2002), 894-906.
290. Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R. and Crowley, D., "Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere", Soil Biol. Biochem., 33, (2001), 1437-1445.
291. Dias, A., Santos, S.G., Vasconcelos, V.G.S. *et al.*, "Screening of plant growth promoting rhizobacteria for the development of vegetable crops inoculants", Afr. J. Microbiol. Res., 7(19), (2013), 2087-2092.
292. Xu, Y., Wang, G., Jin, J., Liu, J., Zhang, Q. and Liu, X., "Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage", Soil Biol. Biochem., 41, (2009), 919-925.
293. Raynaud, X., "Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model", Soil Biol. Biochem., 42, (2010), 210-219.
294. Sanaullah, M., Blagodatskaya, E., Chabbi, A., Rumpel, C. and Kuzyakov, Y., "Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition", Appl. Soil Ecology, 48, (2011), 38-44.
295. McGahan, D.G., Southard, R.J. and Zasoski, R.J., "Rhizosphere effects on soil solution composition and mineral stability", Geoderma, 226–227 (1), (2014): 340-347.
296. Sul, W.J., Asuming-Brempong, S., Wang, Q., Turlousse, D.M., Penton, C.R., Deng, Y., Rodrigues, J.L.M., Adiku, S.G.K., Jones, J.W., Zhou, J., Cole, J.R. and Tiedje, J.M., "Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon", Soil Biol. Biochem., 65, (2013), 33-38.
297. Fierer, N., Schimel, J.P. and Holden, P.A., "Variations in microbial community composition through two soil depth profiles", Soil Biol. Biochem., 35, (2003), 165-176.
298. Nelson, D.R. and Mele, P.M., "Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations", Soil Biol. Biochem., 39, (2007), 340-351.
299. Buyer, J.S., Teasdale, J.R., Roberts, D.P., Zasada, I.A. and Maul J.E., "Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems", Soil Biol. Biochem., 42, (2010), 831-841.
300. Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R. and Fierer, N., "Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of soil bacterial community structure at the continental scale", Appl. Environ. Microbiol., 75, (2009), 5111-5120.
301. Zhang, C., Liu, G., Xue, S. and Song, Z., "Rhizosphere soil microbial activity under different vegetation types on the Loess Plateau, China", Geoderma, 161, (2011), 115-125.

302. Chao, Z., Guo-bin, L., Sha, X. and Lie, X., "Effect of Different Vegetation Types on the Rhizosphere Soil Microbial Community Structure in the Loess Plateau of China", *J. Integra. Agricul.*, 12, (2013), 2103-2113.
303. Prescott. C. E. and Grayston, S. J., "Tree species influence on microbial communities in litter and soil: current knowledge and research needs", *For. Ecol. Manag.*, 309, (2013), 19-27.
304. Koranda, M., Schnecker, J., Kaiser, C., Fuchslueger, L., Kitzler, B., Stange, C.F., Sessitsch, A., Zechmeister-Boltenstern, S. and Richter, A., "Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech –The influence of plant C exudates", *Soil Biol. Biochem.*, 43, (2011), 551-558.
305. Tian, J., Dippold, M., Pausch, J., Blagodatskaya, E., Fan, M., Li, X. and Kuzyakov, Y., "Microbial response to rhizodeposition depending on water regimes in paddy soils", *Soil Biol. Biochem.*, 65, (2013), 195-203.
306. Zhang, W., Wu, X., Liu, G., Chen, T., Zhang, G., Dong, Z., Yang, X. and Hu, P., "Pyrosequencing Reveals Bacterial Diversity in the Rhizosphere of Three *Phragmites australis* Ecotypes", *Geomicrobiol. J.*, 30, (2013), 593-599.
307. Blagodatskaya, E., Littschwager, J., Lauerer, M. and Kuzyakov, Y., "Plant traits regulating N capture define microbial competition in the rhizosphere", *Eur. J. Soil Biol.*, 61, (2014), 41-48.
308. Li, X., Rui, J., Mao, Y., Yannarell, A. and Mackie, R., "Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar", *Soil Biol. Biochem.*, 68, (2014), 392-401.
309. Boukerma, L., "Effets des PGPR (*Pseudomonas* spp. fluorescent) sur le biocontrol et l'induction de la résistance systémique (ISR) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire", Mémoire Magister en Biotechnologies végétales, ENSA, Alger, Algérie, (2012), 140 p.
310. Toua, D., "Essai d'utilisation de *Pseudomonas fluorescens* dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum* et de *Verticillium dahliae* sur tomate et dans la promotion de la croissance végétale", Mémoire Magister, INA, El Harrach, Alger, (1996), 138 p.
311. Défago, G., Haas, D., Berling, C.H., Burger, U., Keel, C., Voisard, C., Wirthner, P. and Wuthrich, B., "Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: potential applications and mechanisms", *In: Biological control of soil – borne plant pathogens*, (D. Hornby, ed), CAB, Int., (1990), 93-108.
312. Keel, C., Schneider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthmer, P., Haas, D. and Défago, G., "Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the Bacterial secondary metabolite 2,4- diacetylphloroglucinol", *Mol. Pant. Microbe Interact.*, 5, (1992), 4-13.
313. Georgakopoulos, D.G., Hendson, M.N., Panopoulos, J. and Schroth, M.N., "Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, (1994), 2931 - 2938.

314. Youard, Z.A., Mislin, G.L.A., Majcherczyk, P.A., Schalk, I.A. and Reimann, C., "*Pseudomonas fluorescens* CHA0 Produces Enantio-pyochelin, the Optical Antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* Siderophore Pyochelin", J. Biol. Chem., 282 (49), (2007), 35546-35553.
315. Jousset, A., Scheu, S. and Bonkowski, M., "Secondary metabolite production confers high competitive advantage for *Pseudomonas fluorescens* CHA0 through grazing resistance against protozoan predators (*Acanthamoeba castellanii*)", International conference, Rhizosphere, 2 (6), (2007), 95-116.
316. Grainger, J., "microbes in the environnement, isolation of rhizobium, a nirtogen-fixing bacterium", Society for general microbiology, Janet Hurst, SGM, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading, RG71AG, (2002).
317. Berraho, E., "caracterisation des souches de *Rhizobium* du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) isolées de différents sols du Maroc", Mémoire ingénieur, Faculté des sciences Rabat, Maroc, (1984), 75 p.
318. Vincent, J.M., "*Rhizobium*: General Microbiology", In: Section III: A Treatise on Dinitrogen Fixation, R. W. F. Hardy and W. S. Silver (eds) John Wiley and Sons, Inc., New York. (1977).
319. Jordan, D.C., "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Krieg NR, Holt JG (Eds) Williams and Wilkins, Baltimore, (1984), 234 p.
320. Prescott, L.M., Harley, J.P. and Donald, A.K., "Microbiologie", Edition de boeck université, (2003), 1164 p.
321. Benchabane, M., Bakour, R., Toua, D. and Boutekrabt, A., "Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate". Bulletin OEPPL/EPPO, Bulletin, 30, (2000), 243 - 246.
322. King, E.O., Wark, M.K. and Raney, D.E., "Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein", Journal of Laboratory and chimical medicine, 44, (1954), 301-307.
323. Kjeldahl, J., "A new method for the determination of nitrogen in organic matter". Zeitschreft fur Analytische Chemie, 22, (1983), 366-382.
324. Dagenelie, P., "Théories et méthodes statistiques. Les méthodes de l'interférence statistique". Les presses agronomiques de Gem blouse, (1975), pp. 463.
325. Tian, C.F., Wang, E.T., Wu, L.J., Han, T.X., Chen, W.F., Gu, C.T., Gu, J.G. and Chen, W.X., "*Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, (2008), 2871-2875.
326. Ramirez-Bahena, M.H., Garcia-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E. and Velazquez, E., « Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov.", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, (2008), 2484-2490.

327. Segovia, L., Young, J.P. and Martinez-Romero, E., "Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov.", Int. J. Syst. Bacteriol., 43, (1993), 374-377.
328. Amarger, N., Macheret, V. and Laguerre, G., "*Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules", Int. J. Syst. Bacteriol., 47, (1997), 996-1006.
329. Ribeiro, R.A., Rogel, M.A., Lopez-Lopez, A., Ormeno-Orrillo, E., Barcellos, F.G., Martinez, J., Thompson, F.L., Martinez-Romero, E. and Hungria, M., "Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. ", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 62, (2012), 1179-1184.
330. Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, FM., Franco, AA., Graham, P., Pardo, MA., Int J Syst Bacteriol. Jul;41(3), (1991), 417-26.
331. Ramette, A., Frapolli, M., Saux, M.F., Gruffaz, C., Meyer, J.M., Defago, G., Sutra, L. and Moenne-Loccoz, Y., "*Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin", Syst. Appl. Microbiol., 34, (2011), 180-188.
332. Skerman, V.B.D., McGowan, V. and Sneath, P.H.A., "Approved lists of bacterial names", Int. J. Syst. Bacteriol., 30, (1980), 225-420.
333. Hill, L.R., Skerman, V.B.D. and Sneath, P.H.A., "Corrigenda to the Approved Lists of Bacterial Names edited for the International Committee on Systematic Bacteriology", Int. J. Syst. Bacteriol., 34, (1984), 508-511.
334. Aude, J.C., "*Alignement multiple : ClustalW*". Fiche 21. P. 88. In : Tagu, D., Risler, J.L., "*Bio-informatique : principe d'utilisation des outils*". Ed. Quae. Versailles Cedex. France. ISBN : 978-2- 7592-0870-8. (2010). 270 p
335. Scher, F.M., Leigle, J.S. and Kloepper, W., "A methode for assessing the root colonizing capacity of bacteria on maize", Can. J. Microbiol., 44, (1984), 156-161.
336. Loper, J.E., Haak, C. and Schroth, M.N., "Population dynamics of soil Pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L)", Appl. Environ. Microbiol., 49, (1985), 416-422.
337. Di Battista-Leboeuf, C., Benzili, E., Corbel, G., Puitti, S. and Guckert, A., "Distribution of *Pseudomonas* sp. populations in relation to maize root location and growth stage", Agronomie, 23, (2003), 441-446.
338. Botelho, G.R. and Mendonça-Hagler, L.C., "Fluorescent *Pseudomonas* associated with the rhizosphere of crops – An overview", 37, (2006), 401-416.
339. Benizri, E., Dedourage, O., Di Batista-Leboeuf, C., Nguyen, C.S. and Guckert, A., "Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure", Applied Soil Ecology, 21, (2002), 261-265.
340. Wardle, D.A., "Communities and Ecosystems. Linking the Above and Belowground components", Princeton University Press, USA, (2002), 392 p.

341. Warembourg, F.R., Roumet, C. and Lafont, F., "Differences in rhizosphere carbon-partitioning among plant species of different families", *Plant and Soil*, 256, (2003), 347 - 357.
342. Raaijmakers, J.M. and Weller, D.M., "Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: Characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, (2001), 2545-2554.
343. Alsohim, A.S. *et al.*, "The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion", *Environ. Microbiol.*, 16, (2014), 2267-2281.
344. Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B., "Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria", *Environ. Microbiol.*, 7, (2005), 1809-1817.
345. Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L. and O'Toole, G.A., "Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein", *Mol. Microbiol.*, 49, (2003), 905-918.
346. de Weert, S. *et al.*, "The two-component colR/S system of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 plays a role in rhizosphere competence through maintaining the structure and function of the outer membrane", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 58, (2006), 205-213.
347. Gal, M., Preston, G.M., Massey, R.C., Spiers, A.J. and Rainey, P.B., "Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces", *Mol. Ecol.*, 12, (2003), 3109-3121.
348. Garrido-Sanz, D. *et al.*, "Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex", *PLoS One*, 11, (2016), e0150183.
349. Fuqua, C. and Greenberg, E.P., "Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3 (9), (2002), 685-95.
350. Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R.J., "Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA)", *Soil. Biol. Biochem.*, 39, (2007), 1968-1977.
351. Morot-Gaudry, J.F., "Assimilation de l'azote chez les plantes", INRA, Editions Quae, (1997), 422 p.
352. Martins, A., Kimura, O., Ribeiro, R.L.D. and Baldani, J.I., "Efeito da microbiolização de sementes com rizobactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* sobre a —murcha fusarianall do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ", *Agronomia*, 37 (1), (2003), 69-75.
353. Lucas Guarcia, J.A., Probanza, A., Ramos, B., Barriuso, J. and Gutierrez, M., "Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. Osumi", *Plant and Soil*, 267, (2004), 143-153.
354. Rudresha, D.L., Shivaprakasha, M.K. and Prasad, R.D., "Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma*

- spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.)", *Applied Soil Ecology*, 28, (2005), 139-146.
355. Grimes, H.D. and Mount, M.S., "Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*", *Soil Biol. Biochem.*, 16, (1984), 27-30.
 356. Bolton, H., Elliott, L.F., Turco, R.F. and Kennedy, A.C., "Rhizoplane colonization of pea seedlings by *Rhizobium leguminosarum* and a deleterious root colonizing *Pseudomonas* spp. and effects on plant growth", *Plant Soil*, 123, (1990), 121-124.
 357. Nishijima, F., Evans, W.R. and Vesper, S.J., "Enhanced nodulation of soybean by *Bradyrhizobium* in the presence of *Pseudomonas fluorescens*", *Plant Soil*, 111, (1988), 149-150.
 358. Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D.L. and Driscoll, B.T., "Isolation of plant-growth promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules", *Can. J. Microbiol.*, 48, (2002), 230 -238.
 359. Hamaoui, B., Abbadi, J.M., Burdman, S., Rashid, A., Sarig, S. and Okon, Y., "Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions", *Agron.*, 21, (2001), 553-560.
 360. Kozdroja, J., Trevorsb, J.T. and van Elsasc, J.D., "Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere", *Soil. Biol. Biochem.*, 36, (2004), 1775-1784.
 361. Salantur, A., Ozturk, A. and Akten, S., "Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria", *Plant Soil Environ.*, 52, (2006), 111-118.
 362. Cakmakc, R.I., Aydyn, D.F. and Sahin, A.F., "Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions", *Soil Biol. Biochem.*, 38, (2006), 1482-1487.
 363. Satveer, K. and Veena, K., "Evaluation of synergistic potential of plant growth promoting rhizobacteria with *Rhizobium* in mungbean (*Vigna radiata* L.)", *Journal of Applied and Natural Science*, 8 (2), (2016), 995-998.
 364. Korir, H., Mungai, N.W., Thuita, M., Hamba, Y. and Masso, C., "Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil", *Front. Plant Sci.*, 8, (2017), 141.
 365. Esashi, Y., "Ethylene and seed germination", *In*: Matoo, A.K. and Suttle, J.C. (ed.) *The plant hormone ethylene*, CRC Press, Boca Raton, FL, (1991), 133-157.
 366. Dhami, N. and Prasad, B., "Increase in root nodulation and crop yield of soybean by native *Bradyrhizobium japonicum* strains", *J. Plant Sci.*, 6, (2009), 1-3.
 367. Stajkovic, O., Delić, D., Jošić, D., Kuzmanović, D., Rasulić, N. and Knežević-Vukčević, J., "Improvement of common bean growth by coinoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria", *Rom. Biotech. Lett.*, 16 (1), (2011), 5919-5926.

368. Verma, J.P., Yadav, J. and Tiwari, K.N., "Enhancement of nodulation and yield of chickpea by co-inoculation of indigenous *Mesorhizobium* spp. and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Eastern Uttar Pradesh", *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 43, (2012), 605-621.
369. Yildirim, E., Turan, M., Ekinci, M., Dursun, A., Gunes, A. and Donmez, M., "Growth and mineral content of cabbage seedlings in response to nitrogen fixing rhizobacteria treatment", *Rom. Biotechnol. Lett.*, 20 (6), (2015), 10929-10935.
370. Gunasekaran, S., Balachandar, D. and Mohanasundaram, K., "Studies on synergism between *Rhizobium*, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and phosphate solubilizing bacteria in blackgram", *In: Biofertilizer technology for rice based cropping system*, Kannaiyan, S., Kumar, K. and Govimdarajan, K. (eds) Scientific Publ. Jodhpur, (2004), 269-273.
371. Chebotar, V.K.K, Asis, C.A. and Akao, S., "Production of growth-promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*", *Biol. Fert. Soils*, 34, (2001), 427-432.
372. Haas, D. and Keel, C., "Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41, (2003), 117-153.
373. Wang, F.Q., Wang, E.T., Liu, J., Chen, Q., Sui, X.H., Chen, W.F. and Chen, W.X., "*Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China", *Int .J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, (2007), 1192-1199.
374. Kumar, B.S.D., Berggren, I. and Martensson, A.M., "Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*", *Plant Soil*, 229, (2001), 25-34.
375. Goel, A.K., Sindhu, S.S. and Dadarwal, K.R., "Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas* spp. antagonistic to fungal pathogens", *Biol. Fertil. Soils*, 36, (2002), 391-396.
376. Abbass, Z. and Okon, Y., "Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere", *Soil Biol. Biochem.*, 25, (1993), 1075-1083.
377. Vikram, A., "Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum", *Res. J. Microbiol.*, 2, (2007), 550-559.
378. Arshad, M. and Frankenberger, W.T.Jr., "Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions", *Advances in Agronomy*, 62, (1998), 146-151.
379. Khalid, A., Arshad, M. and Zahir, Z.A., "Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat", *J. Applied Microbiol.*, 29, (2004), 473-480.
380. Peix, A., Rivas-Boyer, A.A., Mateos, P.F., Ridriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E. and Velazquez, E., "Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions", *Soil Biol. Biochem.*, 33, (2001), 103-110.

381. Egamberdiyeva, D., "The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils", *Appl. Soil. Eco.*, 36, (2007), 184-189.
382. Jeudy, C., Ruffel, S., Freixes, S., Tillard, P., Santoni, A.L., Morel, S., Journet, E.P., Duc, G., Gojon, A., Lepetit, M. and Salon, C., "Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses", *New Phytol*, 185 (3), (2010), 817-28.
383. Penmetsa, R.V., Frugoli, J.A., Smith, L.S., Long, S.R. and Cook, D.R., "Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*", *Plant Physiol.*, 131, (2003), 998-1008.
384. Lee, K.H. and LaRue, T.A., "Ethylene as a possible mediator of light- and nitrate induced inhibition of nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle", *Plant physiol.*, 100, (1992), 1334-1338.
385. Schnabel, E., Journet, E.P., de Carvalho-Niebel, F., Duc, G. and Frugoli, J., "The *Medicago truncatula* *SUNN* gene encodes a *CLV1*-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length", *Plant Molecular Biology*, 58 (6), (2005), 809-822.
386. Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y. and Kawaguchi, M., "Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase", *Nat. Commun.*, 4, (2013), 2191.
387. Mortier, V., Den Herder, G., Whitford, R., Van de Velde, W., Rombauts, S., D'haeseleer, K., Holsters, M. and Goormachtig, S., "CLE Peptides Control *Medicago truncatula* Nodulation Locally and Systemically", *Plant Physiology*, 153 (1), (2010), 222-237.
388. Mortier, V., De Wever, E., Vuylsteke, M., Holsters, M. and Goormachtig, S., "Nodule numbers are governed by interaction between CLE peptides and cytokinin signaling", *Plant Journal*, 70, (2012), 367-376.
389. Ahemad, M. and Khan, M.S., "*Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances growth parameters of green gram [*Vigna radiata* L.] Wilczek in insecticide-stressed soils", *Journal of Pest Science*, 84, (2011), 123-131.
390. De Leij, F.A.A.M., Dixon-Hardy, J.E. and Lynch, J.M., "Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing and non-producing strains of *Pseudomonas fluorescens* on root development of pea seedlings in three different soil types and its effect on nodulation by *Rhizobium*", *Biol. Fertil. Soils*, 35, (2002), 114-121.
391. Oka-Kira, E. and Kawaguchi, M., "Long-distance signaling to control root nodule number", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, (2006), 496-502.
392. Okazaki, S., Nukui, N., Sugawara, M. and Minamisawa, K., "Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: Rhizobitoxine and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate deaminase", *Microbes Environ.*, 19 (2), (2004), 99-111.
393. Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R. and Singh, C.S., "Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria', *Microbiol. Res.*, 156, (2001), 209-223.

394. Ahmad, M., Zahir, Z.A., Asghar, H.N. and Asghar, M., "Inducing salt tolerance in mung bean through coinoculation with rhizobia and plant-growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase", *Can. J. Microbiol.*, 57, (2011), 578-589.
395. Chabot, R., Antoun, H. and Cescas, M.P., "Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique", *Can. J. Microbiol.*, 39, (1993), 941-947.
396. Bashir, K., Ali, S. and Umair, A., "Effect of different phosphorus levels on xylem sap components and their correlation with growth variables of mash bean", *Sarhad J. Agric.*, 27, (2011), 1-6.
397. Toro, M., Azcon, R. and Barea, J.M., "The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*", *New Phytologist*, 138, (1998), 265-273.
398. Bano, A. and Fatima, M., "Salt tolerance in *Zea mays* (L) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*", *Biology and Fertility of Soils*, 45, (2009), 405-413.
399. Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.F., Curie, C. and Lemanceau, P., "Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*", *Mol. Plant-Microbes Interact.*, 20, (2007), 441-447.
400. Mazurier, S., Lemunier, M., Siblot, S., Mougel, C. and Lemanceau, P., "Distribution and diversity of type III secretion system like genes in fluorescent pseudomonads", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 49, (2004), 455-467.
401. Zheng, J.Z., Wang, R., Liu, R.R., Chen, J.J., Wei, Q., Wu, X.Y., Pang, X.W., James, E.K. and Liu, X.Y., "The Structure and Evolution of Beta-Rhizobial Symbiotic Genes Deduced from Their Complete Genomes", *Immunome Res.*, 13, (2017), 2.
402. Rubio, L.M. and Ludden, P.W., "Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase", *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, (2008), 93-111.
403. Dixon, R. and Kahn, D., "Genetic regulation of biological nitrogen fixation", *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, (2004), 621-631.
404. Chowdhury, N. and Bagchi, A., "Structural Insight into the Gene Expression Profiling of the hcn Operon in *Pseudomonas aeruginosa*". *Applied biochemistry and biotechnology.*, (2017).
405. Newton, S.M., Trinh, V., Pi, H., Klebba, P.E., "Direct measurements of the outer membrane stage of ferric enterobactin transport: postuptake binding". *J Biol Chem.*, 285, (2010), 17488–17497.
406. Schrodinger, LLC., "The PyMOL molecular graphics system". Version 1.8., (2015).
407. Akanbi, T.O., Kamaruzaman, A.L., Baka, F.A., Hamid, N.S.A., Radu, S., Manap, M.Y.A. and Saari, N., "Highly thermostable extracellular lipase producing *Bacillus* strain isolated from a Malaysian hot spring and identified using ARNr 16S gene sequencing", *Int. Food. Res. J.*, 17, (2010), 45-53.

408. Zakhia, F. et de Lajudie, P., "La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL) ", Can. J. Microbiol., 52, (2006), 169-181.
409. Ludwig, W. and Schleifer, K.H., "Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA Standard", ASM News, 65, (1999), 752-757.
410. Hillis, D.M. and Dixon, M.T., "Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference", Q. Rev. Biol., 66, (1991), 411-453.
411. Bouvert, P.J.M. and Grimont, P.A.D., "Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*", Int. J. Syst. Bacteriol., 36 (2), (1986), 228-240.
412. Dénarié, J., Debellé, F. and Rosenberg, C., "Signaling and host range variation in nodulation", Annual Review of Microbiology, 46, (1992), 497-531.
413. Youseif, S.H., Abd El-Megeed, F.H., Ageez, A., Cocking, E.C. and Saleh, S.A., "Phylogenetic multilocus sequence analysis of native rhizobia nodulating fababean (*Vicia faba* L.) in Egypt", Syst. Appl. Microbiol., 37, (2014), 560-569.
414. Xu, K.W., Zou, L., Penttinen, P., Wang, K., Heng, N.N., Zhang, X.P., Chen, Q., Zhao, K. and Chen, Y.X., "Symbiotic effectiveness and phylogeny of rhizobia isolated from faba bean (*Vicia faba* L.) in Sichuan hilly areas, China", Syst. Appl. Microbiol., 38, (2015), 515-523.
415. Zhang, Y.J., Zheng, W.T., Overall, I., Young, J.P., Zhang, X.X., Tian, C.F., Sui, X.H., Wang, E.T. and Chen, W.X., "*Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 65, (2015), 2960-2967.
416. Saïdi, S., Ramírez-Bahena, M.H., Santillana, N., Zúñiga, D., Álvarez-Martínez, E., Peix, A., Mhamdi, R. and Velázquez, E., "*Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 64, (2014), 242-247.
417. Poza-Carrion, C., Echavarri-Erasun, C. and Rubio, L.M., "Regulation of *nif* gene expression in *Azotobacter vinelandii*", In: de Bruijn, F.J. (eds) Biological Nitrogen Fixation, 1, Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc., (2015), 101-7.
418. Mishra, P.K., Bisht, S.C., Bisht, J.K. and Bhatt, J.C., "Cold-tolerant PGPRs as bioinoculants for stress management", Bacteria in Agrobiol., 95, (2012), 118-20.
419. Lemaire, B., Van Cauwenberghe, J., Verstraete, B., Chimphango, S., Stirton, C. et al., "Characterization of the papilionoid-*Burkholderia* interaction in the Fynbos biome: The diversity and distribution of beta-rhizobia nodulating *Podalyria calyptata* (Fabaceae, Podalyrieae)", Syst. Appl. Microbiol., 39, (2016), 41-48.
420. Quinto, C., De La Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A. et al., "Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*", PNAS, 82, (1985), 1170-1174.

421. Raven, J.A. and Yin, Z.H., "The past, present and future of nitrogenous compounds in the atmosphere, and their interactions with plants", *New Phytol.*, 139, (1998), 205-219.
422. Yu, F., Jing, X., Li, X., Wang, H., Chen, H., Zhonga, L., Yin, J., Pan, D., Yin, Y., Fu, J., Xia, L., Bian, X., Tu, Q. and Zhang, Y., "Recombineering *Pseudomonas protegens* CHA0: An innovative approach that improves nitrogen fixation with impressive bactericidal potency", *Microbiological Research*, 218, (2019), 58-65.
423. Celia, H., Noinaj, N., Zakharov, S.D., Bordignon, E., Botos, I., Santamaria, M., Barnard, T.J., Cramer, W.A., Lloubes, R. and Buchanan, S.K., "Structural insight into the role of the ton complex in energy transduction", *Nature*, 538 (7623), (2016), 60-65.
424. Posey, J.E. and Gherardini, F.C., "Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen", *Science*, 288 (5471), (2000), 1651-3.
425. Chen, W.M., De Faria, S.M., James, E.K., Elliott, G.N., Lin, K.Y., Chou, J.H., Sheu, S.Y., Cnockaert, M., Sprent, J.I. and Vandamme, P., "*Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, (2007), 1055-1059.
426. Hartney, S., Duboy, R., Goebel, N.C., Zabriskie, T.M., Paulsen, I.T. and Loper, J.E., "Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences", *Environmental Microbiology*, 12 (4), (2010), 899-915.
427. Ramette, A., Frapolli, M., Defago, G. and Moenne-Loccoz, Y., "Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability", *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 16 (6), (2003), 525-535.
428. Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C. and Wong, M.H., "Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial", *Geoderma*, 125, (2005), 155-166.
429. Kaymak, H.C., "Potential of PGPR in agricultural innovations", *In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria* (eds) Maheshwari, D.K., Berlin, Springer, (2011), 45-79.
430. Sorensen, J., Jensen, L.E. and Nybroe, O., "Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: New knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies", *Plant and soil*, 232, (2001), 97-108.
431. Guerrero-Molina, M.F., Winik, B.C. and Pedraza, R.O., "More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*", *Appl. Soil Ecol.*, 61, (2012), 205-212.
432. Gamalero, E., Lingua, G., Tombolini, R., Avidano, L., Pivato, B. and Berta, G., "Colonization of tomato root seedlings by *Pseudomonas fluorescens* 92rkG5: spatio-temporal dynamics, localization, organization, viability, and culturability", *Microbial Ecology*, 50, (2005), 289-297.

433. Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J., "Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria", *Current Opinion in Plant Biology*, 4, (2001), 343-350.
434. Shishido, M. and Chanway, C.P., "Colonization and growth promotion of out-planted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse", *Canadian journal of forest research*, 30, (6), (2000), 845-854.
435. Qaisrani, M.M., Mirza, M.S., Zaheer, A. and Malik, K.A., "Isolation and identification by 16s rRNA sequence analysis of *Achromobacter azospirillum* and *Rhodococcus* strains from the rhizosphere of maize and screening for the beneficial effect on plant growth", *Pak. J. Agric. Sci.*, 51, (2014), 91-99.
436. Lynch, J.M., "The rhizosphere: Effects of culture filtrates of rhizobacteria isolated from wild lupin on germination, growth, and biological nitrogen fixation of lupin seedlings", *Journal of Plant Nutrition*, 26, (1990), 1101-1115.
437. Pothier, J.F., Wisniewski-Dye, F., Weiss-Gayet, M., Moënne-Loccoz, Y. and Prigent-Combaret, C., "Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245", *Microbiology*, 153, (2007), 3608-3622.
438. Prasad, A.A. and Babu, S., "Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogaea* L.)", *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 89 (2), (2017), 1027-1040.
439. Rainey, P.B., "Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere", *Environ. Microbiol.*, 3, (1999), 243-257.
440. Cagide, C., Riviezz, B., Minteguiaga, M., Morel, M.A. and Castro-Sowinski, S., "Identification of Plant Compounds Involved in the Microbe-Plant Communication During the Coinoculation of Soybean with *Bradyrhizobium elkanii* and *Delftia* sp. strain JD2", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31 (11), (2018), 1192-1199.
441. Schlaeppi, K. and Bulgarelli, D., "The plant microbiome at work", *Mol. Plant Microbe Interact.*, 28, (2015), 212-217.
442. Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A. and Howieson, J.G., "*Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae*, a novel biovar nodulating the pasture legume *Biserrula pelecinus* L.", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, (2007), 1041-1045.
443. Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J. and Chen, Y., "Co-existence of Rhizobia and Diverse Non-rhizobial Bacteria in the Rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* Seedlings Inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-Like and *Burkholderia pyrrocinia*-Like Strains", *Front. Microbiol.*, 8, (2017), 2255.
444. Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L., Buckler, E.S. and Ley, R.E., "Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110, (2013), 6548-6553.

445. Shi, S.J., Nuccio, E., Herman, D.J., Rijkers, R., Estera, K., Li, J.B., Da Rocha, U.N., He, Z.L., Pett-Ridge, J., Brodie, E.L., Zhou, J.Z. and Firestone, M., "Successional trajectories of rhizosphere bacterial communities over consecutive seasons", *Mbio.*, 6, (2015), 8.
446. Denton, M.D., Pearce, D.J. and Peoples, M.B., "Nitrogen contributions from faba bean (*Vicia faba* L.) reliant on soil rhizobia or inoculation", *Plant Soil*, 365, (2013), 363-374.
447. Rincon, A., Ruiz-Diez, B., Garcia-Fraile, S., Garcia, J., Fernandez-Pascual, M., Pueyo, J. and de Felipe, M., "Colonization of *Pinus halepensis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*", *FEMS Microbial Ecology*, 51, (2005), 303-311.