

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité/Option: Biologie Moléculaire et Cellulaire
Département: Biologie

Thème :

Etude symbiotique des bactéries du sol

Présenté par :

ROUABHI Ahlem

SLATNIA Soumia

TORCHE Boutheina

Devant le jury composé de :

Président(e) :	Mme KHALLEF Messaouda	Université de Guelma
Examineur :	Mr AISSAOUI Riyad	Université de Guelma
Encadreur :	Mme TORCHE Esma	Université de Guelma

Juin 2018

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

La première personne que nous tenons à remercier est la présidente du jury **Mme Khallef M**, et ainsi que **Mr Aissaoui R**, pour l'examen de ce travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur **Mme Torche Esma**, pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nos remerciements vont également à **Mme Khallef M** pour les aides qu'ils nous ont apportées.

Nous aimerons également remercier toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers pour leurs conseils et aides et pour nous avoir facilité l'accès au laboratoire.

Nous sommes redevables à l'ensemble des enseignants qui contribué à notre formation durant ces 5 ans.

On réserve enfin nos derniers remerciements aux gens qui nous aidées le près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie le fruit de ce modeste travail :

A mon cher père « Said »

Qu'ALLAH lui fasse miséricorde et fasse de demeure le paradis

A ma très chère mère au monde « Razika »

Qui a ouvert pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçoit à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude

Je leur dit merci mille fois maman je t'aime beaucoup, qu'ALLAH te garde

A mon trinôme,

Torche boutheina et Slatnia soumia, pour les bons moments passés ensemble, merci à vous que dieu vous protège.

A mes chers amis,

Qui j'ai aimés et estimés du fond du cœur : **Khawla, Radia, Amira, Maroua, Amira, Salah, Chouaib.**

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je vous souhaite une brillante réussite dans la vie professionnelle, familiale, une bonne santé et une vie inondée de bonheur.

A toute ma grande famille.

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que j'aime, je dédie ce travail.

AHLEM

Dédicace

J'ai le grand honneur de dédie ce modeste de travail :

A mon père « Mahmoud »

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estimation, le développement et le respect que j'ai toujours en pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuits pour mon éducation et mon bien être.

A ma mère « Nouara »

Que je ne cesserai jamais de remercier pour son soutien et son encouragement durant mes années d'étude, et aussi pour son sacrifice, sa patience sans limite et l'éducation qu'il mont donnée.

Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me les garder.

A mes chères sœurs,

Meriem, Imane, Amina, et mon frère Mouhamed, et à mon mari saddam sans oublié mon petit roi **Mohamed rassim** et ma petite ange **Melina**, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance de courage et de générosité.

A mon trinôme,

Rouabhi Ahlem et Torche Boutheina, pour les bons moments passés ensemble, merci à vous que dieu vous protège.

A toute ma grande famille.

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que j'aime, je dédie ce travail.

SOUMIA

Dédicace

J'ai le grand honneur de dédie ce modeste de travail :

A mon père « Brahim »

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estimation, le développement et le respect que j'ai toujours en pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuits pour mon éducation et mon bien être.

A ma mère « Maryem »

Que je ne cesserai jamais de remercier pour son soutien et son encouragement durant mes années d'étude, et aussi pour son sacrifice, sa patience sans limite et l'éducation qu'il mont donnée.

Je leur dit merci mille fois, qu'ALLAH me les garder.

A mes chères sœurs,

Radia, Ibtissem, Nassima, et mes frères Adlen, Riyad, Imed, Salah et sans oublié mon petit prince **Iyed**, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance de courage et de générosité.

A mon trinôme,

A ma belle amie Rouabhi Ahlem et Mejda Guerrouf,

Pour les bons moments passés ensemble, merci à vous que dieu vous protège.

A toute ma grande famille.

A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que j'aime, je dédie ce travail.

BOUTHEINA

Résumé

Ce travail de recherche est une contribution à l'étude de rôle du plasmide symbiotique P_{sym} dans l'association symbiotique plante légumineuses- bactéries. L'étude consiste à transformer des souches non rhizobiales par le plasmide extrait des souches rhizobiales. La sélection des souches transformées est mise en évidence par la culture sur le milieu YMA+calcofluor. Un profil plasmidique est réalisé pour confirmer la transformation. L'aptitude des souches transformées à noduler la plante légumineuse du genre *Hedysarum* est évaluée par un test de nodulation. Malgré que les profils plasmidiques montrent le transfert plasmidique, il y a eu un échec de la nodulation.

Mots clé : *Rhizobium*, transformation bactérienne, plasmide symbiotique, nodulation.

Abstract

This research work is a contribution to the role study of the symbiotic plasmid *Psym* in the symbiotic plant leguminous-bacteria association. The study consists in transforming non-rhizobial strains by the plasmid extracted from the rhizobial strains. The selection of the transformed strains is demonstrated by the culture on the YMA+calcofluor medium. A plasmid profil is made to confirm the transformation. The ability of the transformed strains to nodulate the leguminous plant *Hedysarum coronarium* is evaluated by a nodulation test. Although the plasmid profiles show the plasmid transfer, there was a failure of nodulation.

Key word : *Rhizobium*, bacterial transformation, symbiotic plasmid, nodulation.

المخلص

هذا البحث هو عبارة عن المساهمة في دراسة دور البلاسميد التعايشي Psym في علاقة التعايش نباتات بقولية البكتيرية الدراسة تتضمن تحويل سلالات غير ريزوبية عن طريق بلاسميد مستخلص من سلالات ريزوبية.

تم انتقاء السلالات المتحولة بواسطة الوسط المغذي YMA-Calcofluor من اجل التاكيد من التحول الوراثي تم اجراء الشريط البلاسميدي.

قدرة السلالات المتحولة على تكوين عقد جذرية على النباتات البقولية Hedysarum تم عن طريق اختبار العقد الجذرية.

بالرغم من ان الاشرطة البلاسميدية بينت التحول البلاسميدي الا انه كان هناك اخفاق في تكوين العقد الجذرية.

الكلمات المفتاحية: الريزوبيم، التحول البكتيري، البلازميد التكافلي، العُقيدات.

Liste d'abréviation

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BET : Bromure d'Ethidium

CaCl₂ : Chlorure de Calcium

CaCo₃ : Carbonate de Calcium

E.coli : *Escherichia coli*

EDTA : Acide Ethylene Di-Aminetetraacétique

EPS: Exopolysaccharide

Fe: Fer

Fe.Mo: Fer molybdene

Fix : Phénotype dans lequel les symbiosome fixent l'azote

hsn: Gène de la spécificité de d'hôte

KDS : Polysaccharides Capsulaires

LCO : Lipochritinooligosaccharides

LPS : Lipopolysaccharides

N : Azote

N₂ : Nitrogène

NH₃ : Nitrate

NH₄⁺ : Ammonium

Nif : Nitrogène de fixation

NO₂ : Ion nitrite

NO₃⁻ : Ion nitrate

Nod : Gène de nodulation

Psym : Plasmide symbiotique

Rh : Rhizobium

rpm : Tour par minute

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate Polycarilamide gel electrophoresis

Sym : Symbiose

T°: Température

TBE : Tris- Acide Borique- EDTA

TE : Tris- EDTA

Tris: Tris hydroxyméthylamino méthane

TY: Tryptone yeast

TYA: Tryptone yeast agar

UV: Ultra violet

YMA: Yeast mannitol agar

µl : Micro-litre

µm : Micro-mètre

C° : Degré Celsius

Liste des figures

Figure 01 : Formation d'un nodule.....	15
Figure 02 : Transformation bactérienne.....	20
Figure 03 : Conservation des souches dans le milieu YMA+CaCo ₃	24
Figure 04 : Germination des graines sur milieu TYA.....	27
Figure 05 : Dispositif utilisé dans test de nodulation.....	28
Figure 06 : Etude morphologique.....	29
Figure 07 : Souche transformée, sur YMA+calcufluor et sur YMA.....	30
Figure 08 : Profil plasmidique après transformation.....	32
Figure 09 : Test de nodulation.....	33

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les souches utilisées dans ce travail.....	22
--	----



Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre 01 : Etude bibliographique

1. la fixation de l'azote	03
1.1. L'azote.....	03
1.2. La fixation biologique de l'azote atmosphérique.....	03
1.2.1. Les fixateurs libres.....	04
1.2.2. Les fixateurs symbiotiques.....	04
1.3. Mécanisme enzymatique : Nitrogénase	04
2. La symbiose légumineuses-bactéries.....	05
2.1. Les légumineuses.....	06
2.2. Les bactéries : <i>rhizobia</i>	07
2.2.1. Caractères morphologique.....	07
2.2.2. Caractères biochimiques.....	08
2.2.3. Caractères physiologique.....	08
2.2.4. Caractères culturaux.....	09
2.2.5. Caractères moléculaire	09
3. Nodulation.....	09
3.1. Génétique de nodulation chez la bactérie.....	09
3.1.1. Gènes nod.....	09
3.1.2. Gènes nif.....	10
3.1.3. Gènes fix.....	10
3.1.4. Autres gènes.....	10
3.2. Génétique de nodulation chez la plante.....	11

3.3. Substances responsable de la nodulation.....	11
3.3.1. Flavonoïdes.....	11
3.3.2. Facteurs nod.....	12
3.3.3. Autres gènes.....	12
3.4. Processus de nodulation.....	13
3.4.1. Pré-écharnage de signal d'infection.....	13
3.4.2. L'infection.....	13
3.4.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes.....	14
3.5. Rôle symbiotique des polysaccharides.....	15
3.5.1. Les exopolysaccharides (EPS).....	15
3.5.2. Les polysaccharide capsulaire (KPS).....	16
3.5.3. Les lipopolysaccharides (LPS).....	16
4. Plasmides.....	16
4.1. Les plasmides symbiotiques.....	17
5. Transformation.....	18
5.1. Les différents types de la transformation bactérienne.....	19
5.1.1. Transformation naturelle.....	20
5.1.2. Transformation artificielle.....	21
Chapitre 02 : matériels et méthode	
1. Matériels biologique.....	22
2. Milieux de cultures utilisées.....	22
3. Etude morphologique des souches bactériennes.....	23
3.1. Caractère culturaux.....	23
3.2. Examen microscopique.....	23
4. Conservation des souches.....	23
5. Transformation bactérienne.....	24

5.1. Extraction de l'ADN plasmidique des souches rhizobiales.....	24
5.2. Transformation bactérienne par choc thermique.....	25
5.3. Sélection des souches transformées.....	25
6. Profil d'ADN plasmidique après transformation.....	26
6.1. Extraction de l'ADN plasmidique des souches transformées.....	26
6.2. Electrophorèse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose.....	26
6.2.1. Préparation du gel d'agarose.....	26
6.2.2. Dépôt des échantillons et migration électrophorétique.....	26
7. Test de nodulation.....	27
7.1. stérilisation des graines.....	27
7.2. Germination des graines.....	27
7.3. Préparation des plantules et inoculation.....	28

Chapitre 03 : Résultats et discussion

1. Étude morphologique bactérienne.....	29
2. Transformation.....	30
3. Profil d'ADN plasmidique.....	31
4. Test de nodulation.....	33

Conclusion

Résumé

Annexe



Introduction

Introduction

Les légumineuses sont des plantes herbacées, des arbustes, des lianes ou des arbres à racines présentant souvent des nodosités traduisant une symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote (Torche, 2006).

En 1838, Boussingault mit en évidence l'aptitude des légumineuses à utiliser l'azote atmosphérique, et en 1888, les chimistes allemands Hellriegel et Wilfarth ont démontré que cette aptitude est liée au développement des nodules suivant l'infection des racines par des microorganismes du sol (Brewin, 2002).

L'établissement d'une association fixatrice d'azote est important pour la plante, essentiellement lorsque la plante est dans un sol dépourvu des éléments nutritifs nécessaires pour son développement (Murray, 2011).

De nombreux gènes contrôlant la nodulation et la fixation de l'azote reposent sur un seul plasmide de haut poids moléculaire, connu sous le nom de plasmide symbiotique (Ibanez et al., 2010). Les méga-plasmides hébergent des gènes essentiels qui sont nécessaires pour la viabilité et la survie des bactéries (Landeta et al., 2011).

La transformation est un mécanisme important par lequel les gènes sont transférés naturellement dans l'environnement. La transformation naturelle est un mécanisme génétiquement programmé pour le transfert horizontal de gènes chez les bactéries. Contrairement à d'autres mécanismes, tels que la transduction ou la conjugaison (Chen et al., 2005), il est inhérent à l'espèce et indépendant des éléments mobiles extrachromosomiques ou intégratifs. Il a été comparé à une tentative bactérienne de sexualité (Maynard Smith et al., 1991). Le dernier recensement des espèces naturellement transformables (Lorenz et Wackernagel, 1994) a enregistré au moins 40 espèces bactériennes réparties uniformément parmi les groupes taxonomiques. La transformation passe par l'absorption de l'ADN exogène et son intégration ultérieure dans le génome du receveur par recombinaison homologue. Les espèces naturellement transformables utilisent des machines multiprotéines fondamentalement similaires pour importer de l'ADN (Chen et Dubnau, 2004).

Nos objectifs ont consisté en l'étude de *R.sullae*, pour cela nous avons opté pour :

- Transformer des souches non rhizobiales par des souches rhizobiales.
- Faire un profil plasmidique des souches transformées.
- Test de nodulation pour voir l'aptitude des souches transformées à noduler les légumineuses.

Chapitre 1

Etude bibliographique

1. La fixation biologique de l'Azote

1.1. L'azote

L'azote, en tant que composant omniprésent dans les biomolécules (protéines, acides nucléiques, vitamines...), est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone. Malheureusement, la concentration de ses formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, etc.) est souvent limitant pour la bonne croissance des plantes et constitue de ce fait, très fréquemment, le facteur clé de la production agricole (Roger *et al.*, 1996). L'atmosphère terrestre est composée majoritairement d'azote sous forme gazeuse ou moléculaire (N_2) (diazote) non assimilable par les plantes (Cleland et Harpole, 2010). Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse et il est assimilé par les plantes sous formes de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) (Lamare *et al.*, 1990).

Le cycle de l'azote est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substance organique et soumet de nouveau l'azote dans la nature. C'est un cycle continu et peut être décomposé en quatre types de réaction où les microorganismes jouent un rôle dans ces derniers (Torche, 2006).

En général, l'azote de l'atmosphère passe successivement par les étapes de fixation, de nitrification et de dénitrification. Les nitrates assimilés par les plantes et les animaux après la nitrification passe par une décomposition et une ammonification, puis il est de nouveau soumis à une nitrification (Torche, 2006).

1.2. La fixation biologique de l'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est le processus par lequel certains micro-organismes transforment l'azote de l'air (N_2 ou diazote) en ammoniac (Hopkins, 2003). Elle résulte de l'activité d'une enzyme qui s'appelle la nitrogénase (Davet, 1996 ; Prescott *et al.*, 2003.), une enzyme catalysant plusieurs réactions de réduction dont celle du diazote (N_2) en ammoniac (NH_3), forme de l'azote assimilable par les végétaux (Dixon et Wheeler, 1986). La majorité du processus de fixation est la fixation biologique de N_2 . C'est une étape très importante du cycle de l'azote, qui fournit de l'azote utilisable pour la nutrition des plantes (Modigan et Martinko, 2007). La fixation est symbiotique lorsqu'elle est réalisée par des bactéries, comme le *Rhizobium*, qui vivent en association avec les plantes de type légumineuse.

Elle est non-symbiotique lorsqu'elle est réalisée par des bactéries, comme celles du genre *Clostridium*, qui fixent l'azote de façon indépendante. La quantité d'azote fixé est faible lorsqu'il s'agit de fixation non-symbiotique, mais dans le cas de la fixation symbiotique, l'apport peut valoir jusqu'à deux fois l'ajout d'azote par les fertilisants (Paul et Clark, 1988). Les conditions optimales pour une bonne fixation de l'azote comprennent un rapport carbone/azote élevé, une humidité adéquate et un pH neutre (Stevenson, 1982).

1.2.1. Les fixateurs libres

Sont représentés essentiellement par de *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Rhodospirillum* (Madigan et Martinko, 2007). Les fixateurs associatifs sont représentés essentiellement par les *Azospirillum* (Pelmont, 2005).

1.2.2. Les fixateurs symbiotiques

Sont représentés par :

Les *Rhizobia*, l'un des principaux groupes et le plus anciennement connu, s'associent aux légumineuses (Hopkins, 2003).

Les *Frankia*, bactéries filamenteuses sporulantes (actinomycètes) associées à des arbres et des arbustes comme les *Casuarina*, les *Myrica* et les *Alnus* (Dolery et al., 2003).

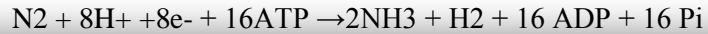
Anabaena (cyanobactérie) vit en symbiose avec *Azolla*, une fougère aquatique importante pour la culture du riz (Prescott et al., 2003).

1. 3. Mécanisme enzymatique : Nitrogénase

Le complexe nitrogénase catalyse la réaction de fixation de l'azote atmosphérique. Cette enzyme n'existe que chez les organismes procaryotes (Rees et Howard, 2000).

Le complexe nitrogénase est très conservé chez les bactéries fixatrices d'azote tant au niveau de sa séquence que de sa structure. Il est constitué de deux métalloprotéines : le site de la réduction du substrat est la protéine MoFe (composant I ou dinitrogénase) et le donneur d'électrons est la protéine Fe (composant II ou dinitrogénase réductase). Le composant I est un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ codé par les gènes *nifD* et *nifK* et le composant II est un homodimère codé par le gène *nifH* (Howard et Rees, 2000).

Le complexe nitrogénase est extrêmement labile en présence de dioxygène. La réaction catalysée par cette enzyme est la suivante :



2. La symbiose légumineuses- bactéries

En 1838, l'agronome français J.B.Boussingault montra que les légumineuses peuvent assimiler l'azote de l'air. En 1887, Hellriegel et Wilfarth ont montré que la fixation de l'azote est associée avec la nodulation des racines des légumineuses. Cette fixation est liée à la présence de nodosités ou nodules sur leurs racines, qui n'apparaissent qu'après infestation par des bactéries isolées par le Hollandais Beijerinck en 1888, les *Rhizobiums* (Heller *et al.*, 1989).

C'est une bactérie collectivement connue comme *rhizobia* ; elle est capable d'établir des associations symbiotiques avec beaucoup de légumineuses et quelques espèces non légumineuses. Le trait le plus important est leur capacité de former des nodules sur les racines(ou parfois sur la tige) dans lesquelles la fixation d'azote atmosphérique (N₂) a lieu (Pelmont, 1995).

La symbiose *Rhizobium*/légumineuse est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi au *Rhizobium* pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Raven *et al.*, 2000). Ces bactéries n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante ; cette assimilation du N₂ est une propriété qu'elles n'acquièrent qu'à l'état de symbionte. L'association symbiotique est généralement très spécifique ; chaque souche n'infecte qu'une espèce de plante ou une gamme très limitée d'hôtes (Pelmont, 1995).

L'optimisation de la symbiose entre les légumineuses et le microsymbionte le *Rhizobium* exige la présence dans la rhizosphère de souches compatibles, compétitives et infectives qui sont hautement effectives pour la fixation de l'azote et présentes par un nombre suffisant pour maximiser la nodulation (Vessey et Chemining, 2006).

2.1. Les légumineuses

Les légumineuses représentent la plus grande famille d'Angiospermes en nombre d'espèces (après les Orchidacées et les Astéracées) avec plus de 18000 espèces de répartition mondiale, classées en environ 750 genres (cité par Bensalama, 2015). Elles sont présentes dans presque tous les milieux terrestres, caractérisées par une large diversité et sont dominées par les espèces ligneuses et vivaces (Chang, 2011). Du point de vue écologique, les légumineuses sont responsables pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixe tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables (Wani et al., 1995 ; Chalck, 1998). Elles jouent également un rôle très important dans la lutte contre l'érosion, la désertification et la dégradation des sols (Thami et El Menzouri, 2000).

La famille des légumineuses est divisée en trois sous-familles : les *Mimosoideae*, les *Caesalpinioideae* et les *papilionoideae* (*Fabiodeae*) (Polhill, 1981 ; Udvardi et al., 2005). Les *Mimosoideae* (62 genres et 2500 espèces) et les *Caesalpinioideae* (150 genres et 22000 espèces), se composent essentiellement d'arbres et d'arbustes des régions tropicales et subtropicales. les *Faboideae* avec 467 genres et environ 14000 espèces (Sprent, 2009 ; Lewis et al., 2003) représentent la partie la plus grande et la plus diversifiée des légumineuses. On y trouve des arbres, la plus part exotiques, des arbustes voir des lianes, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles ; souvent volubiles et grimpantes, soit par enroulement (*Phaseolus*, *Physostigma*), soit grâce à des vrilles foliaires (*Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia*) (Guignard et Dupont, 2004).

Les plantes de cette sous famille (*Faboideae*) sont particulièrement adaptées aux conditions méditerranéennes (Laguerre, 2012). Bien que la nodulation des légumineuses par les rhizobia est un phénomène très fréquent, jusqu' à présent seulement 20% des 18000 espèces de plantes légumineuses sont étudiées du point de vue nodulation (Sprent, 2009). Dans cette portion, 30% de la sous famille des *Caesalpinioideae*, 90% de la sous-famille des *Mimosoideae* (robinier, glycine, acacia,...) et 97% des espèces de la sous-famille des *Faboideae* (pois, haricot, fève, lentille....) sont nodulées (De Faria et al., 1989 ; Sprent, 2009).

Les légumineuses alimentaires tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin, 2001).

Les principaux objectifs de recherche, sur légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur cout énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet et *al.*, 2006).

La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des couts et bilans énergétiques sont aujourd'hui un objectif commun à plusieurs filières dans la perspective, non seulement d'améliorer une compétitivité économique, ou de réduire des impacts environnementaux, mais surtout de développer des biocarburants (Pinochet et al, 2006).

2.2. Les bactéries : rhizobia

Rhizobium, ou *rhizobia* est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les racines des légumineuses et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Récemment ce terme a été substitué par le terme de BNL (Bactéries Nodulant les légumineuses) (Zakhia et de Lajudie, 2006 ; Zakhia *et al.*, 2004).

2.2.1. Caractères morphologiques

Les *Rhizobia* sont des bactéries Gram négatifs, non sporulants, on distingue deux formes :

La forme végétative

Les *Rhizobia* sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles pérित्रiches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,8 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur pour les *Rhizobia* à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles pérित्रiches. Les *Rhizobia* à croissance lente

sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

La forme bactéroïde

À l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les *Rhizobia* se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry *et al.*, 2004). Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.2.2. Caractères biochimiques

Les *Rhizobia* sont des bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994). Les *Rhizobia* à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure dans le glucose, le mannitol ou le saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose (Somasegaran et Hoben, 1994). Les *Rhizobia* n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).

2.2.3. Caractères physiologique

Rhizobium est un micro-organisme aérobie ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6,8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

2.2.4. Caractères culturels

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

2.2.5. Caractères moléculaire

Le génome des bactéries est constitué en plus de l'ADN chromosomique, d'ADN plasmidique qui peut constituer jusqu'à 50 % du génome entier. Les méthodes d'analyse impliquent par conséquent des gènes d'origine chromosomique et d'autres d'origine plasmidique comme les gènes symbiotiques dans le cas des rhizobiums (Squartini *et al.*, 2002).

3. Nodulation

3.1. Génétique de la nodulation chez la bactérie

Un certain nombre de gènes bactériens indiqués *nod* et *nol* est exigé pour la nodulation. Ces gènes sont localisés sur un grand plasmide appelé plasmide Sym, mais de tels gènes sont situés sur le chromosome de *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*. Plusieurs groupes de gènes de microsymbionte contribuent à la nodulation et à la fixation biologique de l'azote. (Sharma *et al.*, 1993).

3.1.1. Gènes *nod*

Trois ensembles de gènes semblent négocier les premières étapes de la nodulation :

Les gènes *nod* communs

Les gènes *nod* ABCJI sont présents chez tous les *rhizobia* étudiés jusqu'ici et les mutations dans ces gènes mènent à un phénotype Nod⁻. Ces gènes codent pour les étapes conservées évolutives essentielles pour le processus de nodulation (Sharma

et *al.*, 1993). Ces gènes sont situés sur un opéron du quel *nod* ABC sont essentiels pour la nodulation. Ces derniers sont fonctionnellement interchangeable entre les espèces et nécessaires notamment pour induire le curling et inciter les cellules végétales à se diviser (Brewin et *al.*, 1992 ; Pelmont, 1995).

Les gènes *hsn*

Host specific nodulation sont des gènes spécifiques de la plante à infecter et non interchangeables (Pelmont, 1995). Ils ne sont pas nécessairement présents ou fonctionnellement conservés chez tous les *rhizobia* (Sharma et *al.*, 1993). Ces gènes sont responsables de la spécificité d'hôte et de la reconnaissance entre la bactérie et la plante, étape préalable à l'infection (Davet, 1996).

Les gènes *nodD*

Gènes de régulation présents en plusieurs exemplaires dans certaines souches et sont nécessaires à l'activation des autres gènes *nod* sous l'action des flavonoïdes (Pelmont, 1995 ; Sharma et *al.*, 1993).

3.1.2. Gènes *nif*

La synthèse de la dinitrogénase est sous la dépendance d'une série de gènes connus sous le terme de gènes *nif* (Hopkins, 2003). Ces gènes comprennent les gènes structuraux de la nitrogénase ; *nifH*, *nifD*, *nifK* dont *nifH* code pour la réductase et *nifD* et *nifK* pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (Pelmont, 1995). Aussi les gènes par exemple, *nifB*, *nifE* sont impliqués dans la synthèse du cofacteur FeMo qui est nécessaire pour le fonctionnement de la nitrogénase (Brewin et *al.*, 1992).

3.1.3. Gènes *fix*

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote. (Brewin et *al.*, 1992; Hopkins, 2003).

3.1.4. Autres gènes

Les gènes affectant les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides (*exo* et *lps*) et les déterminants pour la prise d'acide dicarboxilique par les bactéroïdes (*bct*) peuvent être nécessaire pour la symbiose mais pas uniquement exprimés en état symbiotique (Brewin et *al.*, 1992).

3.2. Génétique de la nodulation chez la plante

Le développement d'un nodule fonctionnel nécessite la production par les cellules hôtes d'un certain nombre de protéines nommées nodulines en réponses des stimuli provenant des bactéries symbiotiques. Ces protéines sont codées par des gènes NOD localisés dans le génome des cellules hôtes (Hopkins, 2003 ; Davet, 1996). Une distinction est parfois faite entre les nodulines tardives, qui sont exprimées autour du début de la fixation de l'azote, et les nodulines précoces, qui sont exprimées aux étapes initiales de l'infection et du développement de nodule (Brewin et *al.*, 1992).

Certaines nodulines sont des enzymes du métabolisme azoté (glutamine synthétase, GOGAT) ou carboné (saccharose synthase, PEP carboxylase). La plus spectaculaire est une protéine qui, associée à l'hème produit par les bactéroïdes, constitue la légghémoglobine, protéine fixatrice d'oxygène, et ce dispositif est indispensable à la fixation de l'azote (Pelmont, 1995).

3.3. Substances responsables de la nodulation

3.3.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés excrétés des plantes, les plus importants de la perspective symbiotique (Perret et *al.*, 2000). Ces substances phénoliques sont les facteurs les plus subtils qui aident les associés à s'assortir (Broughton et *al.*, 2000).

Les flavonoïdes, qui incluent des isoflavones, des chalcones, des flavonols, des flavones, et des anthocyanidines et autres composés relatifs induisent des gènes pour la nodulation (Terefework, 2002), déclenchent spécifiquement leur expression (Perret et *al.*, 2000), et interagissent avec les protéines NodD qui servent comme sondes environnementales et activateurs de transcription (Broughton et *al.*, 2000). Parfois, les flavonoïdes sont catabolisés et leur dégradation pourrait mener à l'apparition de quelques composés qui peuvent être des inducteurs plus efficaces des gènes *nod* qu'eux même (Broughton et *al.*, 2000). Bien que des petites quantités sont excrétés sans interruption, les concentrations des flavonoïdes dans la rhizosphère augmentent en réponse du *rhizobia* compatibles (Broughton et *al.*, 2000).

Habituellement, les *rhizobia* les plus promiscueux sont induits par un grand nombre de flavonoïdes et de composés relatifs (Terefework, 2002). La capacité induisante change avec les flavonoïdes et le *rhizobia* et dans certains cas des

flavonoïdes telles que le chrysin peuvent contrarier l'induction des gènes *nod* (Perret et *al.*, 2000 ; Terefework, 2002). En plus à l'induction des gènes *nod*, les flavonoïdes semblent avoir des rôles multiples pendant plusieurs étapes du développement du nodule et de la plante (Terefework, 2002), et leur production est limitée à la zone de prolongation des poils racinaires à partir de laquelle la plupart des nodules se développent plus tard (Broughton et *al.*, 2000).

3.3.2. Facteurs Nod

L'identification du signal Nod, qui lance le dialogue moléculaire entre les légumineuses et leur *rhizobia*, est une étape essentielle dans la nodulation. Les signaux Nod, qui sont généralement connus sous le nom de facteurs Nod sont des molécules lipochitooligosaccharidiques (Terefework, 2002).

Ces facteurs à des concentrations minimales peuvent déclencher des réponses symbiotiques chez la plante telles que la déformation des poils radiculaires, la division corticale des cellules et la formation de nodule primordial (Debellé et *al.*, 2001).

La biosynthèse et la sécrétion des facteurs Nod sont l'expression de gènes de nodulation où les gènes *nod* ABCD codent pour la synthèse du noyau lipooligosaccharide de tous les facteurs Nod, et les gènes *hsn* pour les diverses substitutions des facteurs Nod (Broughton et *al.*, 2000).

La longueur et la saturation des composants de substitués d'acides gras du noyau lipooligosaccharide, le type et la position des divers substitués sur les facteurs Nod, jouent un rôle crucial dans la spécificité (Terefework, 2002).

3.3.3. Autres substances

D'autres produits semblent être nécessaires pour le développement continu du fil d'infection et de l'organogenèse du nodule, et ceux-ci représentent un troisième ensemble de signaux. Parmi ce dernier, les polysaccharides extracellulaires (EPS), les lipopolysaccharides, les antigènes K, les glucanes cycliques, les lectines et les protéines exportés par le système de sécrétion de type trois (TTSS) (Broughton et *al.*, 2000; Terefework, 2002).

3.4. Processus de nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien (**Fig01**).

3.4.1. Pré-échange de signal d'infection

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. En condition de carence en ions ammonium (NH_4^+), les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca *et al.*, 2004). Ce signal, une fois perçu par le *Rhizobium*, induit l'expression de gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitinoooligosaccharides ou LCO) (Dénarié, 2000). Ceux-ci sont des signaux de nodulation ciblant le programme organogénétique de la plante (Patriarca *et al.* 2004). Les *Rhizobiums* différents dans la structure de leurs facteurs de nodulation constituent un premier niveau de contrôle de la spécificité d'hôte (Moschetii *et al* , 2005).

3.4.2. L'infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, la rhicadhésine. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (Perry *et al.*, 2004). Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et libèrent à leur tour des hormones (acides gibbéréllique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005). Le *Rhizobium* s'apprête alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induira une dépolarisation de la membrane, une fuite d'électrolytes et une oscillation de la concentration du calcium (Bélangier, 1998). Cette interaction induit une déformation du poil absorbant à 360° appelée «crosse de berger ». Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (Machrafi, 2001). En réponse le poil absorbant secrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi ; la pénétration des bactéries est ainsi facilitée (Dupuy et Nougier, 2005). Cette pénétration se fait par un mécanisme d'invagination (Perry *et al.*, 2004). Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et

changent de forme, tout en produisant une cytokinine (sorte d'hormone de croissance). (Pelmont, 2005).

3.4.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Dans le poil absorbant, des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact, forment un cordon amorphe contenant des mucilages limités par des fibrilles cellulosiques d'origine végétale ; c'est le filament d'infection (Dupuy et Nougier, 2005). Ce cordon relie les cellules épidermiques aux cellules corticales. De là, l'organogenèse se poursuivra jusqu'à l'obtention d'un nodule (Bélanger, 1998). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit la presque totalité de la racine. La zone corticale réagit par l'augmentation de taille mais aussi par la multiplication cellulaire activée par la libération de cytokinines bactériennes ; un méristème se forme ou différencie une excroissance appelée nodule (Dupuyt Nougier, 2005).

La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des *rhizobia* à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des *rhizobia* en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (Machrafi, 2001). Une membrane pér bactéroidienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *et al.*, 2004).

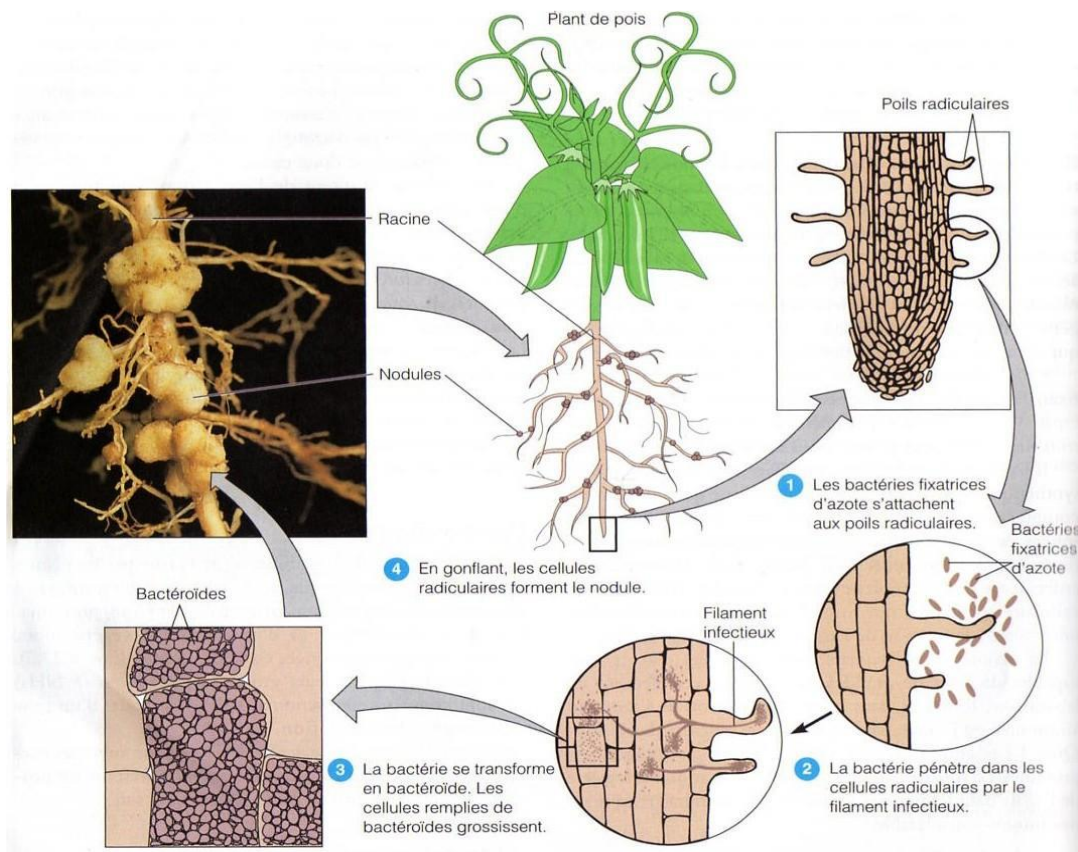


Figure 01 : Formation d'un nodule (Tortora et *al.*, 2003)

3.5. Rôle symbiotique des polysaccharides de surface

3.5.1. Les exopolysaccharides (EPS)

Ce sont les plus étudiés de tous les polysaccharides de surface. Un intérêt particulier a été porté aux succinoglycane présents à la fois chez *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium*. L'absence des exopolysaccharides bactériens provoque chez la plante la production excessive de composés phénoliques qui colorent en brun les racines et provoquent une apoptose des cellules infectées, ainsi que la mort des bactéries. De plus, le cordon d'infection ne progresse pas et des aberrations (poches) apparaissent. Ainsi leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote réside dans l'inhibition des réactions de défenses des plantes et dans la progression du cordon d'infection (Chataigné, 2007).

3.5.2. Les polysaccharides capsulaires (KPS)

Au contact de la surface de la bactérie se trouvent les polysaccharides capsulaires.

Ceux de la famille des *Rhizobia* sont composés de sucres appartenant à la famille de l'acide 2- céto-3-désoxy-ulosonique (Kdo), notés Kdx. Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote est inconnu à ce jour. Peu d'études ont été réalisées pour comprendre leurs modes d'action. Ils pourraient avoir un simple rôle passif de protection lors des changements brusques d'environnement (passage du sol à la plante) et faces aux défenses de la plante (antibiotiques de nature peptidique) et au choc alcalin (Chataigné, 2007).

3.5.3. Les lipopolysaccharides (LPS)

Beaucoup de structures de LPS de *Rhizobia* sont partiellement décrites mais relativement peu sont complètes à ce jour. Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote réside dans l'inhibition des réactions de défenses de la plante dans les étapes plus tardives de l'infection, lorsque les EPS ne sont plus synthétisées, en empêchant la mise en place du choc oxydant. Ils ont par ailleurs un rôle dans la pénétration des bactéries dans les cellules nodulaires, lorsqu'elles sont libérées du cordon d'infection. Les composés sont aussi des agents de cohésion membranaire. Pour cette raison, les LPS semblent nécessaires à la survie de la bactérie lors de sa transformation en bactéroïde (Chataigné, 2007).

4. Les Plasmides

Les éléments qui déplacent de nombreux gènes bactériens d'une cellule bactérienne à l'autre, le transfert de gène horizontal, sont des plasmides bactériens, spécifiquement des plasmides conjugatifs, c'est-à-dire capables de favoriser leur propre transfert et le transfert d'autres plasmides d'une cellule bactérienne à un autre. Il existe ainsi une grande variété de plasmides.

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire circulaires ou linéaires capables de répllication et de conjugaison autonomes. Ils, ont été décrits dans les trois domaines de la vie (Antipov et al., 2016), confèrent souvent des caractères bénéfiques

à leurs hôtes, comme la résistance aux antimicrobiens, qui a directement contribué à l'augmentation rapide des bactéries multirésistantes, décrites comme l'un des plus grands dangers pour la santé humaine (Nyberg et *al.*, 2016). Ainsi, des efforts considérables ont été déployés pour la détection et la surveillance des plasmides. Ces derniers sont des fragments d'ADN extrachromosomaux largement utilisés en tant qu'outil en biologie moléculaire. Un plasmide code pour sa propre fréquence de répllication et peut être à copies multiples au sein de son hôte (e.g. la bactérie).

Les plasmides sont des réplicons que l'on trouve dans de nombreux microorganismes des domaines Bactéries, *Archaea* et *Eucaryotes* (Funnell et Phillips, 2004). Ils sont transmissibles par conjugaison (Frost et *al.*, 2005, Sota et Top, 2008, Frost et Koraimann, 2010, Smillie et *al.*, 2010) ont signalé qu'environ 14% des plasmides séquencés complets étaient prédisposés à la conjugaison. La conjugaison est l'un des mécanismes les plus efficaces pour propager des éléments génétiques parmi les bactéries (Guglielmini et *al.*, 2011). C'est donc l'un des «véhicules» les plus importants pour la communication bactérienne de l'information génétique, facilitant l'évolution rapide et les capacités d'adaptation observées chez les bactéries (Aminov, 2011).

4.1. Plasmide symbiotique

De nombreux gènes contrôlant la nodulation et la fixation de l'azote reposent sur un seul plasmide de haut poids moléculaire, connu sous le nom de plasmide symbiotique. Ce plasmide contenant les gènes *nod* /*nif* /*fix* primaires (Zahran, 2017). Les plasmides restants ont été définis comme plasmides non symbiotiques.

Les plasmides non symbiotiques codent un ensemble varié de gènes, leur permettant de collaborer avec le plasmide symbiotique (pSym), et offrant à leurs cellules hôtes des capacités substantielles pour les communautés de catalyser de vastes activités métaboliques et soutenir le processus symbiotique (Barreto et *al.*, 2012, Cervantes et *al.*, 2011, Pappas et Cevallos, 2011, Tejerizo et al. 2010).

Le plasmide non-symbiotique auto-transmissible (pCFN42a) de *Rhizobium etli* CFN42 facilite le transfert du pSym (pCFN42d) après la co-intégration (Pérez-Mendoza et *al.*, 2004, Pérez-Mendoza et *al.*, 2005). Le plasmide pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021, d'autre part, n'a pas les gènes symbiotiques directement

impliqué dans la nodulation et la fixation de l'azote (Zahran, 2017) ; néanmoins, des mutations dans certains gènes de ce plasmide abolir complètement la fixation d'azote symbiotique (Finan et *al.*, 2001).

Trois gènes à copie unique provenant du plasmide symbiotique central (nodI, nodJ et fixA) (Tamura et *al.*, 2013).

Les plasmides sont des composants génétiques importants pour la divergence et l'adaptation des populations microbiennes car elles contribuent à la plasticité génomique. Bien que les profils plasmidiques chez les *rhizobia* puissent être considérés comme un caractère relativement stable, les souches peuvent perdre certains de leurs caractères en raison de la perte ou de la délétion partielle d'un plasmide (Djordjevic., 1982 ; Weaver., 1990). Les plasmides sont également des outils génétiques importants utilisés pour manipuler et analyser les micro-organismes par l'introduction, la modification ou l'élimination de gènes cibles (Frost et *al.*, 2005, Sota et Top, 2008).

5. Transformation

La capacité à acquérir de nouveaux caractères par transformation génétique naturelle a été démontrée dès 1928 chez *S. pneumoniae* par Frederick Griffith. Ce bactériologiste anglais a démontré qu'il pouvait y avoir un transfert de caractère entre deux types de *pneumocoques*. Il disposait alors de deux souches, l'une, virulente chez la souris et formant sur boîtes des colonies d'aspect lisse (nommée S, pour Smooth) ; et l'autre, avirulente, formant des colonies d'aspect rugueux (nommée R, pour Rough). L'observation de Griffith fut la suivante : une injection d'un mélange de bactéries R (non virulentes) et de bactéries S tuées par la chaleur à une souris induit la mort de celle-ci par septicémie et on retrouve dans son sang des bactéries S vivantes. Il en conclut que le caractère morphologique « S » porté par les bactéries S mortes avait été transmis aux bactéries R. Il appela ce phénomène « la transformation » et en déduit l'existence d'un « principe transformant » dans la suspension de bactéries tuées.

Il a fallu attendre 1944 pour que cette expérience soit reprise et que le « principe transformant » soit identifié comme étant l'ADN (Avery, MacLeod, & McCarty 1944).

Avery, MacLeod et McCarthy ont testé les différents composants présents dans une suspension de bactéries S tuées pour leur capacité à transformer des bactéries R en S. Leurs résultats ont permis de montrer que l'ADN permettait le transfert de caractères d'une bactérie à l'autre et qu'il était donc le support de la transformation et de l'hérédité.

5.1. Les différents types de transformation bactérienne

La transformation correspond à l'incorporation d'un ADN extracellulaire, linéaire ou circulaire, que la bactérie a acquis dans son environnement proche (Dubnau, 1999). Ces ADN extracellulaires ont été soit libérés par la lyse de cellules mortes ou de particules virales, soit excrétés par des cellules viables. Pour parvenir à intégrer ces fragments d'ADN, il est nécessaire que la bactérie se trouve dans un état physiologique particulier appelé compétence qui implique environ 20 à 50 protéines. Cet état de compétence est limité dans le temps et il est induit en réponse à des conditions environnementales spécifiques (stress nutritif, altération des conditions de croissance, densité cellulaire, présence d'antibiotique, ...) variables selon l'espèce et la souche bactérienne considérée (Cohan *et al.*, 1991).

Les mécanismes d'acquisition d'ADN par transformation, connus à ce jour peuvent être résumés ainsi :

Les ADN extracellulaires se fixent à la surface de la cellule sur des récepteurs spécifiques dont le nombre peut varier de 30 à 80 par cellule (Dreiseikelmann, 1994 ; Puyet *et al.*, 1990).

L'ADN double brin fixé est transloqué au niveau de la membrane interne, clivé, puis converti en ADN simple brin pendant la translocation (Chen et Dubnau, 2004).

Si l'ADN transformé est maintenu sous une forme stable dans la cellule, il peut être intégré au chromosome bactérien, à un plasmide ou à de l'ADN phagique par recombinaison homologue. Dans le cas de l'intégration d'un plasmide par transformation, l'élément doit être recircularisé pour être maintenu (Lorenz et Wackernagel, 1994 ; Averhoff, 2004 ; Thomas et Nielsen 2005).

Si ce mécanisme est relativement important pour la réparation du génome de certaines bactéries en intégrant des séquences homologues, il contribue largement à l'évolution du génome par les mutations et l'acquisition de nouvelles séquences qu'il engendre (De Vries *et al.*, 2001 ; Majewski *et al.*, 2000 ; Townsend *et al.*, 2003).

L'intégration du fragment nécessite une seule extrémité homologue pour se fixer au niveau de zones facilitant l'intégration de ces ADN exogènes nommées «homology-facilitated illegitimate recombination » (Meier et Wackernagel, 2003). (Fig02).

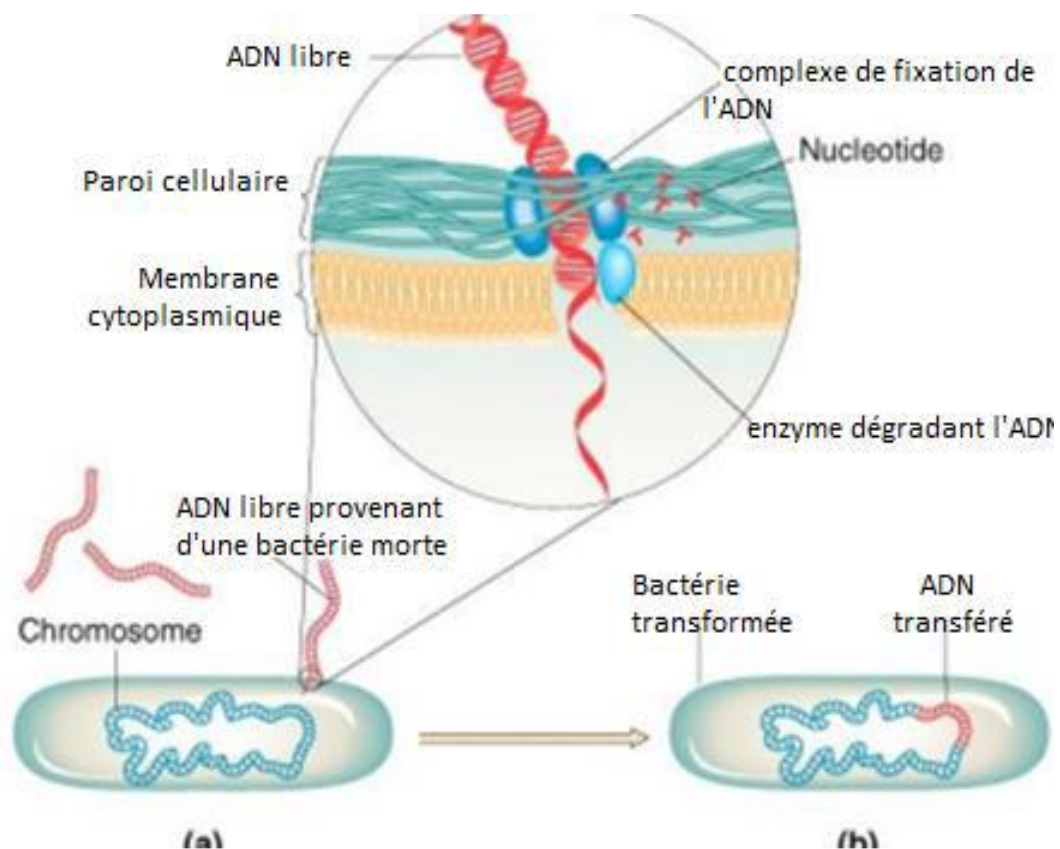


Figure 02 : Transformation bactérienne, (a) fixation de l'ADN nu, (b) intégration du fragment d'ADN après recombinaison homologue (Mezaache-aichour , 2016).

5.1.1. La transformation naturelle

Par Définition, la transformation "naturelle" ou physiologique est le premier modèle connu de transfert de matériel génétique, qui est fixé et absorbé par des bactéries réceptrices, dites en état de compétence. (Mezaache-aichour , 2016).

Certaines bactéries possèdent la capacité à prendre de l'ADN du milieu extérieur et ça s'appelle la compétence naturelle.

5.1.2. La transformation artificielle (la plus récente)

C'est un outil de génie génétique. On va faire entrer de l'ADN (circulaire ou linéaire) de force dans une cellule. L'une des techniques de transformation artificielle la plus courante c'est l'électroporation, généralement on utilise de l'ADN plasmidique parce que ça va tenir facilement dans les cellules qui vont être transformées. Incuber l'exogénote avec les bactéries dans un milieu propice d'électroporation et appliquer un choc électrique aux bactéries ce qui entrainera des micros perforations au niveau de la membrane et de la paroi des bactéries et les plasmides vont pouvoir entrer librement dans les bactéries et à leurs conférer des propriétés. Les plasmides sont porteurs d'une information génétique qui est d'intérêt pour apporter une nouvelle propriété à ces bactéries. Il suffit ensuite de cultiver les bactéries.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

Dans cette étude nous avons utilisé des souches bactériennes du genre *Rhizobium* et des souches bactériennes non rhizobiales issues du laboratoire de biologie moléculaire et m, universités Constantine1. Nous avons également utilisé une souche d'*E.coli*.

Tableau 01 : les souches utilisées dans le travail.

Souches	Nom	Source
R1	<i>Rhizobium sullae A6</i>	Laboratoire BMC : universités Constantine1
R2	<i>Rhizobium sullae F</i>	
R3	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
NR1	Non <i>Rhizobium</i> 1	
NR2	Non <i>Rhizobium</i> 2	
NR3	Non <i>Rhizobium</i> 3	

2. Milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont mentionnés dans (Annexe1) :

YMB: (Yeast Mannitol Broth)

YMB CaCl₂: (Yeast Mannitol Broth additonné + chlorure de calcium)

TY: (Tryptone Yeast)

YMA: (Yeast Mannitol Agar)

YMA CaCO₃: (Yeast Mannitol Agar additionné + carbonate de calcium)

YMA Calcufluor: (Yeast Mannitol Agar + Calcufluor)

TYA: (Tryptone Yeast Agar)

Solution nutritive de Farheus.

3. Etude morphologique des souches bactériennes

3.1. Caractères cultureux

Les caractères cultureux des souches sont mis en évidence à partir des colonies développées d'une culture 24 - 48h à 30°C sur milieu YMA.

3.2. Examen microscopique

A partir des cultures obtenues dans le milieu YMA, nous avons préparé des frottis pour la coloration de Gram. Les préparations sont étalées en couche mince, séchée et fixée.

Les étapes de coloration :

- Recouvrir le violet de gentiane, laisser agir 1 min.
- Verser sur la lame la solution lugol et laisser agir 30 secondes.
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool-acétone.
- Laver avec de l'eau distillée.
- Recolorer avec de la fuschine, laisser agir 1 min.
- Observer à immersion (Torche., 2006).

4. Conservation des souches

La méthode utilisée est la conservation sur YMA additionné de 3 g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes à essai en formant des géloses inclinées (**Fig03**). A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose. Après incubation à 30°C pendant 3 jours, les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Gharzouli., 2006).



Figure 03 : Conservation des souches dans le milieu YMA+CaCo₃. (A été prise par Rouabhi Ahlem)

5. Transformation bactérienne

5.1. Extraction de l'ADN plasmidique des souches rhizobiales

Le protocole utilisé est celui décrit par Charaoui –Boukerzaza (2011) :

- Ensemencer 2 ml du milieu YMB par les souches bactériennes rhizobiales, incubé 24-28h à 30 °C.
- Centrifuger 1.5 ml de la culture pendant 2 min à 9000 rpm à température ambiante.
- Jeter le surnageant, mettre le culot dans la glace 30 min.
- Resuspendre le culot dans 100 µl de la solution I froide et vortexer (5 mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris, PH=8).
- Ajouter 200 µl de solution II fraîchement préparé (0,2 NaOH, 1% SDS).
- Mélanger délicatement en inversant doucement le tube 2 à 3 fois.
- Laisser le tube 3 min avant d'ajouter 150 µl de la solution III froide (3M acétate de potassium, PH=4,8).
- Mélanger délicatement en inversant doucement le tube 2 à 3 fois (un caillot blanc d'ADN/ protéine/ SDS doit être formé).
- Incuber les tubes sur la glace 20 min.

- Centrifuger 10 min à 9000 rpm à température ambiante.
- Transférer délicatement le surnageant (400µl) dans un tube propre.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 95%, et vortexer.
- Centrifuger 10 min à 9000 rpm à température ambiante.
- Eliminer le surnageant rapidement en retournant le tube (un culot est généralement visible à cette étape).
- Laver le culot avec 500 µl d'éthanol 80%.
- Centrifuger 10 min à 9000 rpm à température en retournant le tube.
- Sécher le culot à l'air libre pendant 5 à 10 min.
- Ajouter 100 µl de l'eau physiologique stérile.

5.2. Transformation bactérienne par choc thermique

- Les souches bactériennes non rhizobiales et *E.coli* sont cultivées sur milieu YMB additionné de mM CaCl₂ et incubés à 37 °C pendant 24 h
- 5 µl d'ADN plasmidique extrait est ajouté à 150 µl des souches bactériennes compétentes.
- Placer dans la glace pendant 15 à 20 min, puis transférer rapidement dans l'étuve à 42°C pendant 45 secondes pour provoquer un choc thermique. Puis rapidement une autre fois 1 ou 2 min dans la glace. Ajouter 500 µl du milieu YMB+CaCl₂ (50 mM).
- Incuber à 37°C pendant 40 min. (Gharzouli, 2013).

5.3. Sélection des souches transformées

Après incubation, 100 à 200 µl de la culture sont étalés sur le milieu YMA+Calcofluor, et incubés à 37°C pendant 24h (Gharzouli, 2013). Le Calcofluor est un colorant de la cellulose et des structures capsulaires. Il est fluorescent sous la lumière ultraviolette (UV).

Les colonies transformées seront fluorescentes et visqueuses, ce qui indique la production des exopolysaccharides.

6. Profil d'ADN plasmidique après transformation

6.1. Extraction de l'ADN plasmidique des souches transformées

Le protocole d'extraction est celui utilisé pour les souches rhizobiales.

6.2. Electrophorèse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose

6.2.1. Préparation du gel d'agarose

- Mettre 1 g d'agarose, dans un Erlen Meyer de 250 ml, ajouter 100 ml de tampon TBE 1X.
- Faire fondre le mélange sur une plaque chauffante en arrêtant de temps en temps pour agiter. Le mélange doit être parfaitement transparent, sans particules d'agarose.
- Refroidir, ajouter 10 µl de la solution de bromure d'éthidium (BET) 10 mg/ml.
- Homogénéiser.
- Couler le gel sans faire de bulles.
- Placer la peine (veiller à ce que la base des dents soit à 1 mm du fond du plateau), laisser polymériser.
- Enlever la peine.
- Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.
- Placer le plateau avec le gel dans la cuve d'électrophorèse, ensuite remplir la cuve de tampon TBE 1X de façon à ce que le gel soit immergé sous environ 1 mm de tampon.

6.2.2. Dépôt des échantillons et migration électrophorétique

- Dans un tube Eppendorf, mélanger 35 µl de la solution d'ADN et 10 µl du bleu de bromophénol.
- Remplir les puits avec 12 µl d'échantillons (ADN plasmidique+bleu de bromophénol) en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la micropipette.
- Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension.

- Laisser migrer, 1h 30min à 80 V (la durée de migration est éminemment variable selon que l'on désire séparer de grands ou petits fragments).
- Récupérer le gel délicatement, le mettre sur la table UV, prendre une photo au polaroid.

7. Test de nodulation

Le but de ce test est d'évaluer l'aptitude des souches transformées à provoquer une nodulation et former des nodules sur les racines des légumineuses. Nous avons utilisé la plante légumineuse du genre *Hedysarum*.

7.1. Stérilisation des graines

Les graines placées dans des tubes stériles, sont stérilisées à l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis à l'acide sulfurique concentré pendant 3 min et enfin rincées 10 fois à l'eau distillée stérile. On les laisse gonfler pendant 2 heures après le dernier rinçage.

7.2. Germination des graines

Après stérilisation des graines, elles sont mises en germination sur les boîtes TYA (Bringer., 1974) à l'obscurité total (enveloppées avec du papier aluminium) à température ambiante pendant 3 à 7 jours, jusqu'à l'apparition des radicules (**Fig04**).

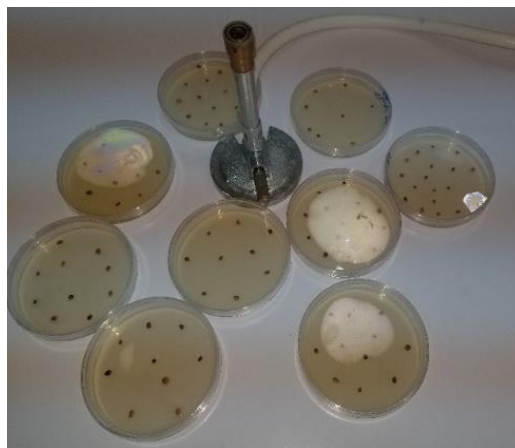


Figure 04 : germination des graines sur milieu TYA. (A été prise par Rouabhi Ahlem)

7.3. Préparation des plantules et inoculation

Après germination des graines, les jeunes plantules sont transférées dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu Fahraeus solidifié, à raison d'une plantule par tube (**Fig05**). Chaque tube est inoculé par 1 ml des souches transformées.

Les tubes sont maintenus dans les conditions ambiantes du laboratoire durant toute la période du test de nodulation. Après 4 semaines, les plantes inoculées sont récoltés pour évaluer la nodulation (Benhamed,.2010).



Figure 05 : dispositif utilisé dans test de nodulation. (A été prise par Rouabhi Ahlem)

Chapitre 3

Résultats et discussion

1. Etude morphologique des souches bactériennes

L'examen microscopique des souches donne des bâtonnets roses, Gram négatif pour les *rhizobia* et les non *rhizobia* (Fig06).

La croissance des souches sur le milieu YMA, nous a permis de vérifier la pureté des souches ainsi que déterminer les caractères morphologiques des souches. Les souches de *rhizobia* utilisées dans cette étude ont une croissance rapide du fait que les colonies apparaissent en 24 heures. On observe aussi des colonies lisses brillantes avec une texture translucide et visqueuse due à la production abondantes des exopolysaccharides, contrairement aux souches non rhizobiales qui apparaît moins visqueuses.

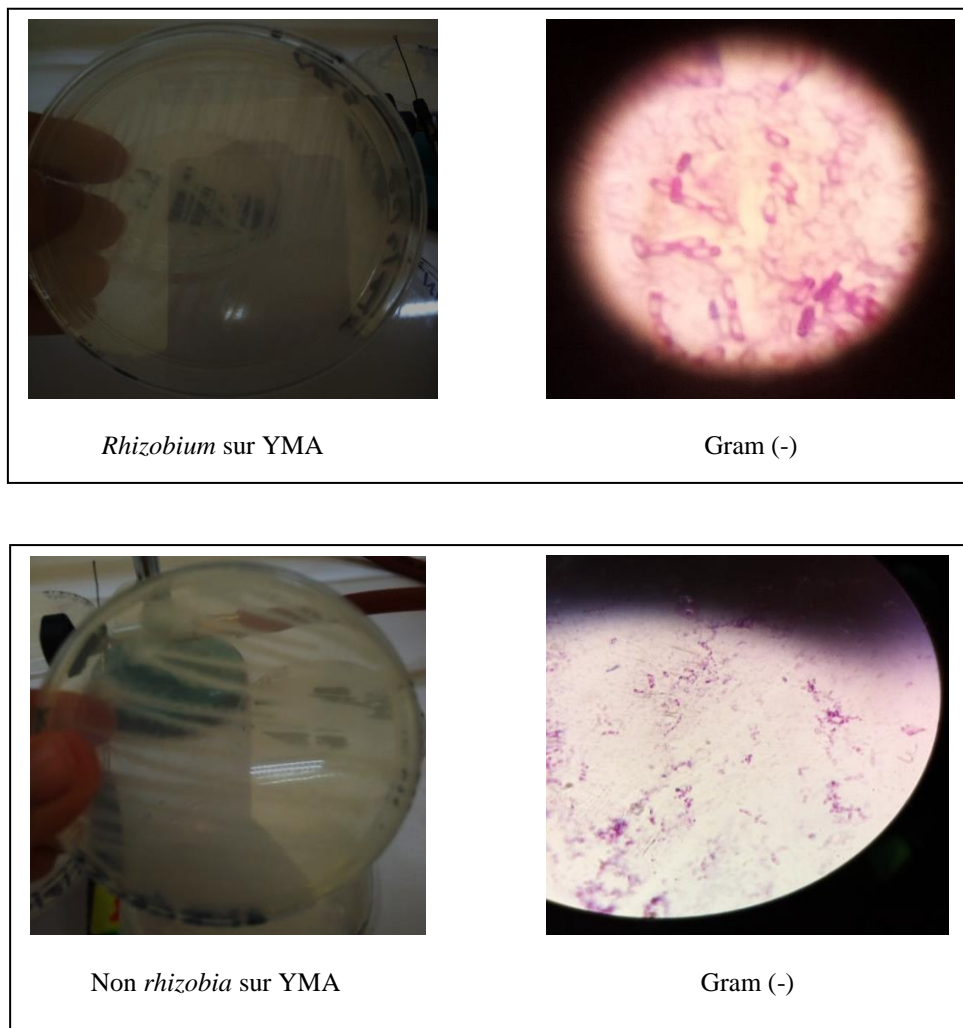


Figure 06 : Etude morphologique.

2. Transformation

La transformation est un type d'échange d'ADN entre bactéries, un transfert actif d'ADN d'une bactérie donatrice à d'autre bactérie réceptrice dite en état de compétence.

Après l'extraction de l'ADN plasmidique à partir les souches rhizobia et l'induction de l'état de compétence chez les souches non rhizobiales, nous avons réalisé une transformation de ces dernières.

La sélection des souches transformées est effectuée par la culture des souches sur milieu YMA+Calcofluor. Le calcofluor est un colorant de la cellulose et des structures capsulaires. Il est fluorescent sous la lumière ultraviolet (UV), permet la détection des souches productrices des exopolysaccharides et ainsi transformées.

Après observation des boîtes dans une chambre noire et en utilisant une lampe UV, nous avons pu sélectionner les souches transformées qui donnent sous les UV des colonies fluorescent, lisses et visqueuses.

Les souches transformées sont (R1NR1, R1NR2, R1NR3, R1*E.coli*, R2NR1, R2NR2, R2NR3, R2*E.coli*, R3NR1, R3NR2, R3NR3, R3*E.coli*)

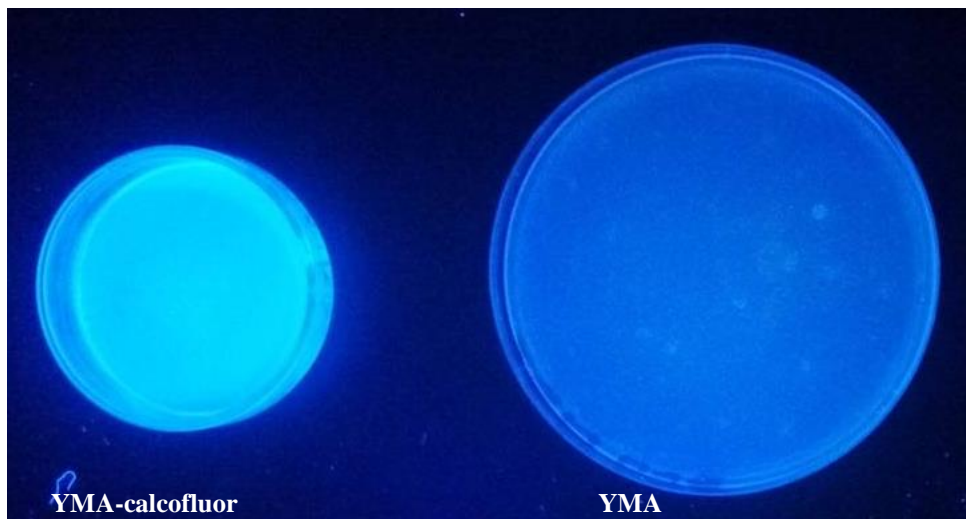


Figure 07 : Souche transformée, sur YMA+calcofluor et sur YMA

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasme (Psym) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches. Le plasmide Psym possède une diversité importante de gène dont les gènes de synthèse d'exopolysaccharides (EPS) qui interviennent dans la mise en place de la symbiose. Les polysaccharides extracellulaires produits par les *rhizobia* sont essentiels pour l'établissement d'une fixation symbiotique d'azote avec les légumineuses (Chataigné G. 2007).

3. Profil d'ADN plasmidique

Après la transformation, nous avons fait l'électrophorèse d'ADN plasmidique sur gel d'agarose pour vérifier et confirmer de la transformation.

Les résultats obtenus montrent des profils plasmidiques des souches transformées ressemblant aux profils plasmidiques rhizobiales ce qui confirme leur transformation, 6 souches transformées ont donné les profils plasmidiques (R1NR1, R1NR2, R2NR1, R2NR2, R3NR2, R3NR3)

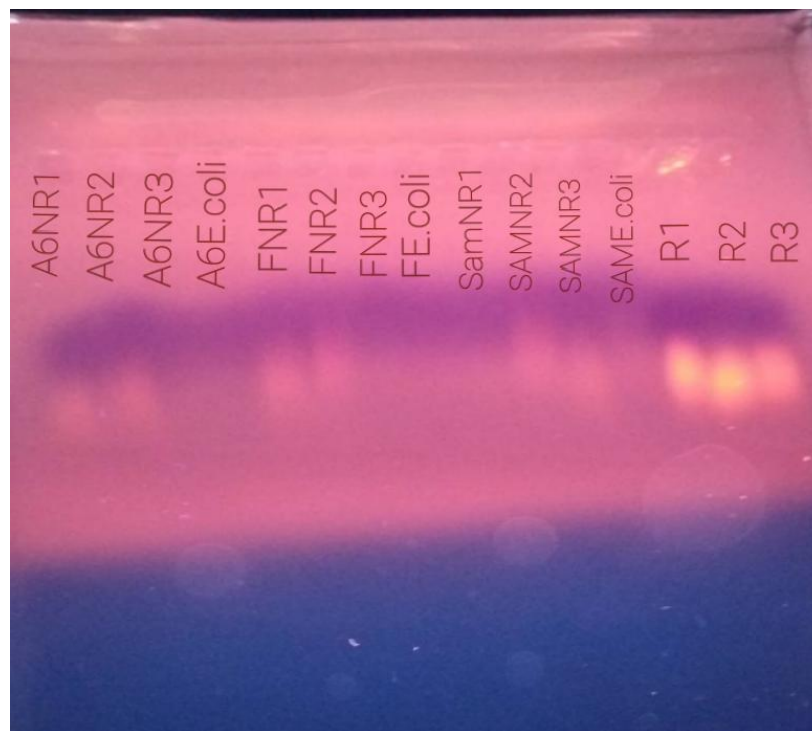


Figure 08 : Profil plasmidique après transformation.

NR : *Non rhizobium*

R : *Rhizobium*

E.Coli : *Esherichia.Coli*

La transformation correspond à l'incorporation d'un ADN extracellulaire, linéaire ou circulaire, que la bactérie a acquis dans son environnement proche (Dubnau, 1999). Parmi les acteurs principale de ce transfert , les plasmides qui sont l'un des «véhicules» les plus importants pour la communication bactérienne de l'information génétique, facilitant l'évolution rapide et les capacités d'adaptation observées chez les bactéries (Aminov, 2011). Ce sont des composants génétiques importants pour la divergence et l'adaptation des populations microbiennes car elles contribuent à la plasticité génomique. Ils sont utilisés pour manipuler et analyser les micro-organismes par l'introduction, la modification ou l'élimination de gènes cibles (Frost et al., 2005, Sota et Top, 2008).

L'évidence du transfert latéral du Psym chez les populations du sol a été démontrée entre les souches d'une même espèce dans le cas de *R.leguminosarum*, entre

deux espèces différentes dans le cas *R. leguminosarum* et *Sinorhizobium freddi*, voire même entre des genres différents dans le cas *R. leguminosarum* et *Enterobacter*. Cette instabilité plasmidique peut résulter à la perte ou au gain de la performance symbiotique. (El-Hilali, 2006).

4 . Tests de nodulation

Pour évaluer l'aptitude des souches transformées à noduler les plantes légumineuses, nous avons réalisé un test de nodulation. Après un mois la nodulation est évaluée. Les résultats obtenus montrent un échec total de la nodulation.



Figure 09 : Test de nodulation (absence des nodules racinaires).

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Dhane Fitouri S., 2011).

Bien que les profils plasmidiques chez les *rhizobiums* puissent être considérés comme un caractère relativement stable, les souches peuvent perdre certains de leurs caractères en raison de la perte ou de la délétion partielle d'un plasmide (Djordjevic ,1982 ;Weaver.,1990).

Le plasmide PsymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021, n'a pas les gènes symbiotiques directement impliqués dans la nodulation et la fixation de l'azote (Zahran,

2017), néanmoins des mutations dans certains gènes de ce plasmide abolir complètement la fixation d'azote symbiotique (Finanet *al.*, 2001).

L'acquisition de nouveaux gènes symbiotiques peuvent présenter un avantage écologique du genre *Rhizobium*, probablement la capacité de nodulation de certaines plantes. Cette instabilité compromet l'utilisation des souches dans la production commerciale des inoculums. Une utilisation de la symbiose fixatrice d'azote peut diminuer l'apport d'engrais azoté chimique nécessaire aux cultures tout en structurant les sols en réalisant des cycles légumineuses/céréales performants ou tout simplement une bactérisation (Ben Ahmed, 2010).



Conclusion

Conclusion

Dans cette étude, nous avons essayée à faire un transfert plasmidique entre des souches Rhizobials portant le plasmide symbiotique P_{sym} et des souches non Rhizobials.

Le P_{sym} est un méga plasmide qui contient les groupes de gènes responsables à l'établissement de l'association symbiotique dont l'expression de ces gènes c'est des molécules signales qui provoquent la formation des nodules racinaires siège de la fixation symbiotique de l'azote.

Nous avons commencé par une extraction plasmidique à partir des souches de *Rhizobium* et après avoir induit l'état de compétence chez les souches non Rhizobials, on les a transformées par choc thermique.

La sélection des souches transformées est réalisée sur milieu spécifique YMA + calcufluor ou les colonies apparaissent fluorescente sous lumière UV. Ceci est due a la production des exopolysaccharides caractéristiques des *Rhizobia* et qui jouent un rôle important dans le développement des nodules.

Pour confirmer la transformation, une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée. Les profils plasmidique obtenus démontrent la présence des bandes chez les souches transformées au même niveau que les bandes des souches Rhizobials.

Un test de nodulation en conditions microbiologiques contrôlées est réalisé pour évaluer l'aptitude des souches transformées a provoquer une nodulation sur les racines de les plantes légumineuses du genre *Hedysarum*. Les résultats obtenus démontrent un échec total de la nodulation.

Ce travail est une contribution à la compréhension des mécanismes de l'établissement d'une associations symbiotiques entre les bactéries du sol et les racines des plantes légumineuses , ainsi que on a voulu démontré qu'il peut y avoir une transformation naturelle entre des bactéries du genre *Rhizobia* et les autres bactéries du sol du fait qu'il y a dans littérature plusieurs travaux qui démontrent l'isolement des bactéries non Rhizobials à partir des nodules racinaires de certaines plantes légumineuses.

Il est judicieux d'approfondir cette étude en l'améliorant par plusieurs points :

- Faire un profil plasmidique en présence d'un Kit (marqueurs de taille) pour confirmer que le plasmide extrait c'est le méga plasmide P_{sym}.
- Étudier les gènes de la nodulation et contrôler les facteurs affectant la nodulation.
- Réaliser un test de nodulation dans le sol
- Développer le rôle des EPS.



Références
bibliographiques

Les références bibliographiques

A

- **Aminov, R. I. (2011).** Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2:158. doi: 10.3389/fmicb.2011.00158 Cité par Masaki, 2015
- **Antipov D, Hartwick N, Shen M, Raiko M, Lapidus A, Pevzner P.(2016).** Plasmid SPA des: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics.*
- **Averhoff B., (2004).** DNA transport and natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria, *Journal of Bioengineering and Biomembrane.*
- **Avery, O.T., MacLeod, C.M. & McCarty, M. (1944).** Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *Journal of Experimental Medicine.*

B

- **Barreto, E. F., et al., (2012).** Curing of a non-symbiotic plasmid of the *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 affected nodule occupancy and competitiveness of the bacteria in symbiosis with common beans. *European journal of soil biology.*
- **Barreto, E. F., et al., (2012).** Curing of a non-symbiotic plasmid of the *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 affected nodule occupancy and competitiveness of the bacteria in symbiosis with common beans. *European journal of soil biology.*
- **Baudoin, T. (2001).** Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Toward a polyphasic approach using Nod factors and nod genes, in: Martinez-Romero E., Hernandez G. (Eds.), *Highlights of Nitrogen fixation Research*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- **Bélanger E. (1998).** Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium sp. (Oxytropis Arctobla)* souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.

- **Ben Ahmed A. (2010).** Role et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulations de la légumineuse *Hedysarum coronarium*. Mémoire de Magister. Université Mentouri. Constantine.
- **Benselama Amel, (2016).** Réhabilitation de la culture de *Lablab purpureus L.* ex .sweet et « tude de son partenaire symbiotique.
- **Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L., (2006).** Détection et typage du gène *nodC* à l'aide de biopuces à ADN: perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. Les Actes du BRG.
- **Brewin N. J., 2002.** - Pods and Nods: a new look at symbiotic nitrogen fixing. *Biologist.Rev.*
- **Brewin N.J., Downie J.A., Young J.P.W., (1992)** - Nodule formation legumes. *Encyclopedia of microbiology*, M.R Josha Lederberg. Rockefeller University Newyork.
- **Bringer J. E.(1947).** R-Factor Transfer in rhizobium legume. *J. Gen. Microbiol.*
- **Broughton W. J., Jabbouri S., Perret X., (2000).** - Keys to SymbioticHarmony” *Journal of Bacteriology.*

C

- **Chalck, P . M. (1998)** Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review . *Aust. J . Res.*
- **Chang, , Y ., Catt, P. C., Jenjareontham, R., et Mann, K. (2011).** Fast-growing root nodule bacteria from Australian *Acacia* spp., in *New Horizons in Nitrogen Fixation*, Palacios, R. et al., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- **Chataigné G. (2007).** Détermination structurales des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. These de Doctorat, Université de Paul Sabatier. Toulouse.
- **Chen I., Dubnau D., (2004).** DNA uptake during natural transformation, *Nature Reviews. Microbiology.*
- **Chen I., Christie P.J.,Dubnau D.,(2005).** The ins and outs of DNA transfer in bacteria *Science.*

- **Cleland, E.E., and Harpole, W.S. (2010).** Nitrogen enrichment and plant communities. *Ann N Y Acad Sci* .
- **Cohan F.M., Roberts M.S., King E.C., (1991).** The potential for genetic exchange by transformation within a natural population of *Bacillus subtilis*, *Evolution*, 45:1383-1421. conjugation. *PLoS Genet*. Cité par **Masaki, 2015**.

D

- **Davet P., (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris.
- **De faria, M., Eaglesham, J., hassouna, S., Seaman, B., Ayanaba, A., Mulongoy, k., (1989).** examining the potential for inoculant use of cowpeas in West Africans soils. *Tropic Agron. (Trin)*.
- **De Vries J., Meier J., Wackernagel W., (2001),** The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells, *FEMS Microbiology Letters*.
- **Debellé F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C., (2001).** nodGenes and Nod signals and the evolution of the rhizobium-legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica* Minireview.
- **Dénarié J., (2000).** Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.
- **Dhane Fitouri S. (2011).** Diversité phénotypiques et moléculaire des microbiotes du Sula du nord (*Hedysarum coronarium* L) et sélection des souches rhizobiales efficaces. These Doctorat. Université de Carthage. Tunisie.
- **Dixon, R.O.D., and Wheeler, C.T., (1986).** Nitrogen Fixation in Plants. (New York: Chapman et Hall Press).
- **Djordjevic M A, Zurkowski W, Rolfe B G., (1982).** Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*. *J Bacteriol.* cité par **Xue-Xian Zhang 2001**.
- **Dolery I., Pedallu C., Vanpeene. Bruhier S., (2003).** Réaménagement forestier des carriers de granulats. Ed. Quae.

- **Dreiseikermann B., (1994).** Translocation of DNA across bacterial-membrane, *Microbiological Revue.*
- **Dubnau D., (1999).** DNA uptake in bacteria, *Annual Revue of Microbiology.*
- **Dupuy Y., Nougier P., (2005).** Les microorganismes. Du gène à la biosphère.

E

Edition Ellipses. Paris.

- **El-Hillali I. (2006).** La symbiose Rhizobium-Lupin : Biodiversité des Microsymbiotes et mise en evidence d'une Multi-Infection Nodulaire chez *Lupinus luteus*. These de Doctorat. Université Mohamed V- Agdal Rabat.

F

- **Finan, T. M., et al., (2001).** The complete sequence of the 1,683-kb pSymbmegaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- **Frost, L. S., and Koraimann, G. (2010).** Regulation of bacterial conjugation : balancing opportunity with adversity *Future Microbio.* Cité par **Masaki, 2015.**
- **Frost, L., Leplae, R., Summers, A., and Toussaint, A. (2005).** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722–732. doi: 10.1038/nrmicro1235 Cité par Masaki, 2015 .
- **Funnell, B., and Phillips, G. (2004).** “Preface,” in *Plasmid Biology*, eds B. Funnell and G. Phillips (Washington, DC: ASM Press). Cité par **Masaki, 2015.**

G

- **Gharzouli R. (2006).** Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-Violet .sur la *Hedysarum*. Mémoire de Magister. Université de Mentouri. Constantine.
- **Gharzouli.,R. (2013).** Etude Structurale et Génétique des Exopolysaccharides produits par l'espèce *Rhizobium sulae*. Thèse En vue de l'obtention du DOCTORAT en Sciences En Génétique Moléculaire.
- **Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., and Rocha, E.P. (2011).** The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity.

- **Guignard, J.L., et Dupont, F., (2004).** Botanique : systématique moléculaire. 13eme Edition, Masson. Paris. France.

H

- **Heller R., Esnart R., Lance C., (1989).** Physiologie végétale. 4ème Edition Masson, Paris.
- **Hopkins W.G., (2003).**- Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck.

L

- **Laguerre, G., Fernandez, M., Edel, V., Normand, P., Amarger, N. (2012).** Genomic Heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *phaseolus vulgaris* L. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
- **Landeta, C., et al., (2011).** Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. *J Bacteriol.* 193, 1317-1326
- **Lewis, A., Gour, R., Jain, P., Bisen, U., Sengupta, K. (2003).** Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza-*Rhizobium* inoculation interaction on heavy metal (Cu, Zn and Fe) Uptake in soybean (*Glycine max*, var. JS-335) under variable P doses. *Int. J. Tropic. Agric.*
- **Lorenz M.G., Wackernagel W., (1994),** Bacterial gene-transfer by natural genetic transformation in the environment, *Microbiology Reviews.*
- **Lorenz M.G., Wackernagel W., (1994),** Bacterial gene-transfer by natural genetic transformation in the environment, *Microbiology Reviews.*

M

- **Machrafi Y., (2001).** Inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.
- **Madigan M et Martinko, (2007).** Biologie des micro-organismes. Ed. Pearson. Paris.
- **Majewski J., Zawadski P., Pickerill P., Cohan F.M., Dowson C.G., (2000),** Barriers to genetic exchange between bacterial species : *Streptococcus pneumoniae* transformation, *Journal of Bacteriology.*

- **Maynard Smith, C.G. Dowson, B.G. Spratt(1991).** Localized sex in bacteria Nature.
- **Meier P., Wackernagel W., (2003),** Mechanisms of homology-facilitated illegitimate recombination foreign DNA acquisition in transformable *Pseudomonas stutzeri*, *Molecular Microbiology*.
- **Mézaache Aichur, (2016).** Génétique microbienne. Université de Constantine.
- **Moschetti G., Peluso A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O., Defez R., (2005).** Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes.

N

- **Nyberg et al. (2016) Nyberg LK, Quaderi S, Emilsson G, Karami N, Lagerstedt E, Müller V, Noble C, Hammarberg S, Nilsson AN, Sjöberg F, Fritzsche J, Kristiansson E, Sandegren L, Ambjörnsson T, Westerlund F.** Rapid identification of intact bacterial resistance plasmids via optical mapping of single DNA molecules. Scientific Reports.

P

- **Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., (2004).** Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol*.
- **PAUL, E.A. et al-ARK, F.E. (1988).** Soil microbiology and biochemistry. Academic Press. San Diego, CA. 273P. Cité par Marie Laroque 1992.
- **Pelmont J., (1995).** - bactérie et environnement adaptation physiologique. Vol 2. Office des Publications Universitaires. Grenoble.
- **Pelmont J., (2005).** Biodégradations et métabolismes : les bactéries pour les technologies de l'environnement. Ed. EDP Science.
- **Pérez-Mendoza, D., et al., (2004).** Identification of functional mob regions in *Rhizobium etli*: evidence for self-transmissibility of the symbiotic plasmid pRetCFN42d. Journal of bacteriology.
- **Pérez-Mendoza, D., et al., (2005).** Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic mega plasmids. Journal of bacteriology.
- **Perret X., Staehelin C., Broughton W.J., (2000).** - Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol Mol Biol Rev.

- **Perry J.J., Staley J.T., Lory S., (2004).** Microbiologie. Edition Dunod, Paris.
- **Pinochet, J., Freire, I., Schrank, K. (2006).** Isolation and characterization of variants of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. MircenJournal.
- **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., (2003).** Microbiologie. Ed. De Boeck université.
- **Puyet A., Greenberg B., Lacks S.A., (1990).** Genetic and structural characterization of EndA—a membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*, *Journal of Molecular Biology*.

R

- **Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E., (2000).** Biologie végétale. 6ème Edition de boeck ,Paris.
- **Rees, D. C. et J. B. Howard. (2000).** Nitrogenase: standing at the crossroads, Elsevier Science.
Rhizobium leguminosarium biovar viciae. Systematic and applied Microbiology.
- **Roger P., Dommergues Y., Balandreau J., Dreyfus B. & Sougoufara B., (1996).** Résumé et introduction. In : ROGER P., dommergues y., balandreau j., dreyfus b. & sougoufara b., eds. *La fixation biologique de l'azote : quelles potentialités pour le développement ? Compte rendu de conférence-débat de l'ORSTOM, 30 Mai, 1996, Paris*.

S

- **Sharma P. K., Kundu B.S., Dogra R. C. (1993).** - Molecular mechanism of host specificity in legume-rhizobium symbiosis. Biotech. Adv.
- **Somasegaran P., Hoben H.J., (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag New York.
- **Sprent, A., Struff, P., Doring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Venramin, E., Velazquez, E., Mateos, F., Martinez-Molina, E., Dazzo, B., Casella, S., Nuti, M. (2009).** *Rhizobium sulaespnov* (Formerly *Rhizobium hedysari*), the root-Nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.
- **Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo**

F. B., Casella S. and Nuti M. P. (2002). *Rhizobium sullaesp. nov.* (formerly *Rhizobium hedysari*): The root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. Int J SystEvolMicrobiol .

- **Stevenson ,F.J.(1982).** Nitrogen in agricultural soils. Agronomy monograph no.22.ASA-CSSA-SSSA.Madison,WI-940 p. Cité par marie laroque 1992.

T

- **Tami K., Mansouri, H.(2000).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol .
- **Tamura, K., et al., (2004).** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- **Terefework Z., (2002).**- Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legumes symbiosis. ACADEMIC DISSERTATION IN MICROBIOLOGY. University of Helsinki. ISSN .
- **Thomas C.M., Nielsen K.M., (2005),** Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria, *Nature Reviews, Microbiology*.
- **Torche A., (2006).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Mémoire de magister en Biochimie et Microbiologie Appliquée.
- **Tortora G.j., Funk B.R., Case C.L., 2003.-** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc.
- **Townsend J.P., Nielsen K.M., Fisher D.S., Hartl D.L., (2003),** Horizontal acquisition of divergent chromosomal DNA in bacteria: effects of mutator phenotypes, *Genetic* .

V

- **Vessey J.K., Chemining G.N., (2006).** The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarium* bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. Soil Biology & Biochemistry.
- **Vincent J.M.(1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N° 15. Blackwell Scientific publishers, Oxford.

W

- **Wani, S. P., Rupela, O. P., et Lee., K. K. (1995).** Sustainable agriculture in the semi Arid tropicsthrough biological nitrogen fixation in grain legumes.Plant and soil.
- **Weaver R W, Wei G R, Berryhill D L., (1990).**Stability of plasmids in *R. phaseolid*during culture. *SoilBiolBiochem.* cité par **Xue-Xian Zhang 2001.**

Z

- **Zahran, H. H., (2017).**Plasmids impact on rhizobia-legumessymbiosis in diverse environments. *Symbiosis.*
- **Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C., Gillis M., DreyfusB. et de Lajudie P. (2004).**Characterisation of Legume-Nodulating Bacteria (LNB) in Arid regions of Tunisia.*Syst.Appl.Microbiol.*
- **Zakhia F. et de Lajudie P . (2006).** La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulantes légumineuses (BNL).



Annexes

Annexe 01

Composition du milieu YMB : (Yeast Mannitol broth) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol	10g
K ₂ HPO ₄	0,5g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Extrait de levure	0,5g
PH	6,8
Autoclavage	120°C pendant 20min.

Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l

YMB	500 ml
Agar	7,5g
PH	6,8
Autoclavage	120°C pendant 20 min.

Composition du milieu YMA+CaCo₃

YMB.	500ml
Agar.	7,5g
CaCo ₃ .	1,5g
PH.	6,8
Autoclavage.	120°C pendant 20 min.

Composition du milieu YMB+CaCl₂

YMB.	500ml
CaCl ₂ .	3,67g
PH.	6,8
Autoclavage.	120°C pendant 20 min.

Composition du milieu TY (Tryptone Yeast) en g/l. (Beringer, 1947)

Tryptone.	5g
Extrait de levure.	3g
CaCl ₂ H ₂ O.	0,87g
Eau distillée.	1000ml
PH.	6,8
Autoclavage.	120°C pendant 20 min.

Composition du milieu TYA (Tryptone Yeast Agar) en g/l

Tryptone.	2,5g
Extrait de levure	1,5g
CaCl ₂ H ₂ O.	0,435g
Eau distillée.	500ml
Agar.	7,5g
PH.	6,8
Autoclavage.	120°C pendant 20 min.

Composition de la solution nutritive en g/l (Fahreus et all., 1957)

CaCl ₂ .	0,10g
Mg SO ₄ 7H ₂ O.	0,12g
KH ₂ PO ₄ .	0,10g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,15g
Citrate de fer	0,005g
CaCo ₃	10g
Solution stock des oligoéléments	1 ml
Agar	10g

Solution stock des oligoéléments g/l

H ₃ BO ₃	2,86g
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.03g
ZnSO ₄ 5H ₂ O	0,22g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,08g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,14g
PH	6,8
Autoclavage	120°C pendant 20 min.

Annexe 02**Tableaux 02 : les principaux résultats du test de nodulation**

Plante /	Nbre du pied	Nbre de nodule
P1/NR1A6	1	0
P1/NR1A6	1	0
P1/NR1F	1	0
P1.NR1F	1	0
P1/NR1SAM	1	0
P1/NR1SAM	1	0
P2/NR2A6	1	0
P2/NR2A6	1	0
P2/NR2F	1	0
P2/NR2F	1	0
P2/NR2SAM	1	0
P2/NR2SAM	1	0
P3/NR3A6	1	0
P3/NR3A6	1	0
P3/NR3F	1	0
P3/NR3F	1	0
P3/NR3SAM	1	0
P3/NR3SAM	1	0

Résumé

Ce travail de recherche est une contribution à l'étude de rôle du plasmide symbiotique P_{sym} dans l'association symbiotique plante légumineuses- bactéries. L'étude consiste à transformer des souches non rhizobiales par le plasmide extrait des souches rhizobiales. La sélection des souches transformées est mise en évidence par la culture sur le milieu YMA+calcofluor. Un profil plasmidique est réalisé pour confirmer la transformation. L'aptitude des souches transformées à noduler la plante légumineuse du genre *Hedysarum* est évaluée par un test de nodulation. Malgré que les profils plasmidiques montrent le transfert plasmidique, il y a eu un échec de la nodulation.

Mots clé : *Rhizobium*, transformation bactérienne, plasmide symbiotique, nodulation.

Abstract

This research work is a contribution to the role study of the symbiotic plasmid P_{sym} in the symbiotic plant leguminous-bacteria association. The study consists in transforming non-rhizobial strains by the plasmid extracted from the rhizobial strains. The selection of the transformed strains is demonstrated by the culture on the YMA+calcofluor medium. A plasmid profil is made to confirm the transformation. The ability of the transformed strains to nodulate the leguminous plant *Hedysarum coronarium* is evaluated by a nodulation test.

Although the plasmid profiles show the plasmid transfer, there was a failure of nodulation.

Key word : *Rhizobium*, bacterial transformation, symbiotic plasmid, nodulation.

المخلص

هذا البحث هو عبارة عن المساهمة في دراسة دور البلاسميد التعايشي P_{sym} في علاقة التعايش نباتات بقولية البكتيرية الدراسة تتنظم من تحويل سلالات غير ريزوبية عن طريق بلاسميد مستخلص من سلالات ريزوبية.

تم انتقاء السلالات المتحولة بواسطة الوسط المغذي YMA-Calcofluor من اجل التأكد من التحول الوراثي تم اجراء الشريط البلاسميدي.

قدرة السلالات المتحولة على تكوين عقد جذرية على النباتات البقولية *Hedysarum* تم عن طريق اختبار العقد الجذرية. بالرغم من ان الاشرطة البلاسميدية بينت التحول البلاسميدي الا انه كان هناك اخفاق في تكوين العقد الجذرية.

الكلمات المفتاحية: الريزوبيم، التحول البكتيري، البلازميد التكافلي، العقيدات