

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

**Université 08 mai 1945 de Guelma**  
**Faculté des Sciences et de l'Ingénierie**

**Département de Biologie**



**Mémoire de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire**  
**Option : Biologie Moléculaire des Procaryotes**

---

**Thème : Génétique de la nodulation**

---

**Présenté par :**

- ✓ Dramenia Hakima
- ✓ Hamadi Imen

**Membres de jury :**

**Président :** Mr Ben Ouareth Djamel Eddine, Professeur Université de Guelma.

**Examinatrice :** Melle Bediouí Soraya, maître assistant A Université de Guelma.

**Encadreur :** M<sup>me</sup> Torche Asma, maître assistant A Université de Guelma.

**Juin 2010**

# remerciements

*Nous remercions les membres de jury*

*Le professeur Bencouareth Djameleddine pour nous avoir  
honoré de présider le jury*

*Bediouï Soreya maitre assistant d'avoir accepter  
d'examiner notre modeste travail*

*Nous tenons remercier également,*

*M<sup>me</sup> Torche Assma d'avoir accepter d'être  
l'encadreur de ce modeste travail, pour ses efforts,*

*sa patience,*

*et les heurs qu'elle a sacrifié pour nous.*

*Merci à tous ceux qui nous ont*

*aide pour à bien mener ce travail.*

# TABLE DE MATIERE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCTION .....   | 1  |
| CHAPITRE I : Généralités   |    |
| I-Azote.....   | 3  |
| - I-1-Définition.....  | 3  |
| - I-2-Formes d'azote dans la nature.....   | 3  |
| I-2-1-Azote inorganique.....   | 3  |
| I-2-2-Azote organique.....   | 3  |
| - I-3-Cycle de l'azote.....  | 3  |
| I-3-1-Consommation des végétaux.....   | 4  |
| I-3-2-Consommation des animaux.....  | 4  |
| I-3-3-Ammonification.....  | 5  |
| I-3-4-Nitrification.....   | 5  |
| I-3-4-1-Nitrosation.....   | 5  |
| I-3-4-2-Nitratation.....   | 5  |
| I-3-5-Dénitrification.....   | 5  |
| I-3-6-Lessivage de l'azote minéral.....  | 5  |
| I-3-7-Matière végétale ou animale exportée.....                                      | 5  |
| - I-4-Fixation de l'azote.....   | 6  |
| I-4-1-Fixation non biologique de l'azote atmosphérique, N <sub>2</sub> .....         | 6  |
| I-4-1-1-Industrie des engrais.....   | 6  |
| I-4-1-2-Les combustions industrielles, des feux de forêt, des gaz d'échappement..... | 6  |
| I-4-1-3-Les orages.....  | 6  |
| I-4-2-Fixation biologique de l'azote atmosphérique N <sub>2</sub> .....              | 6  |
| I-4-2-1-Fixateurs symbiotiques.....  | 7  |
| I-4-2-2-Fixateurs libres.....  | 7  |
| II-généralité sur la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse.....                     | 7  |
| II-1-Symbiose.....   | 7  |
| II-1-1- Partenaires végétaux : plante des légumineuses.....                          | 8  |
| II-1-2-Partenaires bactériens :Rhizobia.....   | 8  |
| II-1-2-1-Types de souches.....   | 11 |
| II-1-2-1-1-Souches infectives.....   | 11 |
| II-1-2-1-2-Souche effective.....   | 11 |
| II-1-2-2- Isolement du <i>Rhizobium</i> .....  | 11 |
| II-1-2-3-Morphologie et cytologie du <i>Rhizobium</i> .....                          | 12 |
| II-1-2-4-Caractères antigéniques du <i>Rhizobium</i> .....                           | 12 |
| II-1-2-4-1-Agglutination.....  | 12 |
| II-1-2-4-2-Immunofluorescence.....   | 12 |
| II-1-2-4-3-Immunodiffusion.....  | 13 |
| II-1-2-5-Les conditions de croissance.....   | 13 |
| II-1-2-6-Les exigences nutritives.....   | 13 |



## CHAPITRE II : La nodulation

|   |    |
|---|----|
| 1-Nodulation.....   | 15 |
| I-1-Le nodule.....  | 15 |
| I-1-1- Type de nodules.....   | 15 |
| I-1-2- Organisation du nodule.....  | 16 |
| I.1.3.Principales étapes de la formation et de développement du nodule.....         | 18 |
| I-1-3-1-Attraction.....   | 18 |
| I-1-3-2-Reconnaissance et attachement.....  | 18 |
| I-1-3-3-Formation de pré-nodule ( primordium nodulaire ).....                       | 20 |
| I-1-3-4-Invasion du poil absorbant et formation d'un cordon d'infection.....        | 20 |
| I-1-3-5- Libération et transformation des cellules bactériennes en bactéroïdes..... | 21 |
| I-1-3-6-Sénéissance du nodule.....  | 21 |
| I-2-Biochimie de la nodulation et de la fixation de l' azote.....                   | 22 |
| I-2-1-Les protéines impliqués.....  | 22 |
| I-2-1-1-Nitrogénase.....  | 22 |
| I-2-1-2-Leghémoglobine.....   | 23 |
| I-2-1-3-Protéine NOD (facteur NOD).....   | 24 |
| I-2-1-4-Ferredoxine.....  | 25 |
| I-2-2-Mécanisme biochimique.....  | 25 |
| I-2-2-1-Réduction de l'azote ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ).....                  | 25 |
| I-2-2-2-Assimilation de ammonium.....   | 26 |
| I-2-2-3-Nitrogénase et l'oxygène.....   | 27 |

## CHAPITRE III :Génétique de la nodulation

|   |    |
|---|----|
| I-Les principales groupes des gènes.....  | 28 |
| I-1-Premiers stades de nodulation : Avant l'infection de la racine.....                     | 28 |
| I-1-1-Chez la bactérie.....   | 28 |
| I-1-2-Chez la plante :.....   | 29 |
| I-2-Stade tardif de nodulation.....   | 30 |
| I-2-1-Chez la bactérie.....   | 30 |
| I-2-2-Chez la plante.....   | 31 |
| II- La voie de perception et de transduction de facteur NOD.....                            | 32 |
| II-1-Structure et localisation des protéines impliquées.....                                | 32 |
| II-1-1-Les protéines de la famille des LysM-RLK.....  | 32 |
| II-1-2-La protéine DMI2.....  | 33 |
| II-1-3-la protéine DMI1.....  | 34 |
| II-1-4-Protéine de DMI3.....  | 35 |
| II-1-5- Autres protéines.....   | 36 |
| II-2-Modèle de perception et de transduction de facteur nod chez <i>M. truncatula</i> ..... | 37 |
| III-Régulation de la fixation azotée.....   | 38 |
| IV-Surface cellulaire rhizobienne.....  | 39 |
| IV-1-Polysaccharides de surface.....  | 40 |
| IV-1-1-Les exopolysaccharides (EPS).....  | 40 |
| IV-1-2- Les polysaccharides capsulaires (KPS) : l'Antigène K (CPS).....                     | 41 |

|  |    |
|--|----|
| IV-1-3-Les lipopolysaccharides (LPS).....                                  | 42 |
| IV-2-Rôle dans la nodulation .....   | 43 |
| IV-2-1-Les exopolysaccharides (EPS).....                                   | 43 |
| IV-2-2-Les polysaccharides capsulaires (KPS) .....                         | 44 |
| IV-2-3-Les lipopolysaccharides (LPS).....                                  | 44 |
| V-Généétique de la nodulation chez <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....     | 44 |
| V-1-Définition.....  | 44 |
| V-2-Génome .....   | 45 |
| V-2-1-Chromosome .....   | 45 |
| V-2-2-Mégaplasmide pSymA.....  | 45 |
| V-2-3-Mégaplasmide pSymB .....   | 46 |
| V-3-Exopolysaccharides de chez <i>S.meliloti</i> .....                     | 48 |
| V-3-1-Succinoglycanes (EPS I) .....  | 48 |
| V-3-2- Galactoglucane (EPSII) .....  | 48 |
| V-4- Biosynthèse des EPS.....  | 49 |
| V-4- 1-Succinoglycanes.....  | 49 |
| V-4-1-1-Biosynthèse d'un nucléotide de sucre.....                          | 49 |
| V-4-1-2- Biosynthèse d'unité répétitive .....                              | 50 |
| V-4-1-3-Polymérisation des unités répétitives et l'export des EPS .....    | 50 |
| V-4-2- Galactoglucane .....  | 51 |
| VI-Généétique de la nodulation chez <i>Rhizobium leguminisarum</i> .....   | 52 |
| VI-1-Définition .....  | 52 |
| VI-2-Génome.....   | 52 |
| VI-3-Exopolysaccharides <i>R. leguminisarum</i> .....                      | 54 |
| VI-3-1- Définition .....   | 54 |
| VI-3-2- Biosynthèse des exopolysaccharides.....                            | 55 |
| VI-3-2- 1-Biosynthèse d'un nucléotide de sucre.....                        | 55 |
| VI-3-2- 2-Biosynthèse d'unités répétitive .....                            | 56 |
| VI-3-2- 3- Polymérisation des unités répétitives et l'export des EPS ..... | 56 |
| VI-4-Lipopolysaccharides .....   | 57 |
| VI-4-1-Biosynthèse des lipopolysaccharides .....                           | 57 |
| VI-4-1-1-Kdo2-lipide IV <sub>A</sub> .....                                 | 57 |
| VI-4-1-2-Oligosaccharide de cœur.....                                      | 60 |
| VI-4-1-3-Antigène O .....  | 61 |
| <b>CONCLUSION</b> .....  | 64 |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b>   |    |
| <b>RESUME</b>  |    |

## LISTE DE FIGURES

| N° | Figures  | Pages |
|----|--|-------|
| 1  | Cycle d'azote  | 4     |
| 2  | Les différents types de nodules chez les Légumineuses  | 16    |
| 3  | Organisation de nodule chez les légumineuse  | 17    |
| 4  | Exemples de structures chimiques de flavonoïdes  | 18    |
| 5  | Attachement des <i>Rhizobium</i> au poil absorbant par l'intermédiaire de la rhicadhesine            | 19    |
| 6  | Le lien entre le <i>Rhizobium</i> et le poil racinaire par le biais de la lectine exopolysaccharides | 20    |
| 7  | Stade d'endocytose des bacterie  | 21    |
| 8  | Etapas de la formation d'un nodule dans une racine   | 22    |
| 9  | Structure moléculaire de nitrogénase   | 23    |
| 10 | Structure tertiaire de la Leghémoglobine   | 24    |
| 11 | Schéma structural d'un facteur Nod   | 24    |
| 12 | Structure tertiaire de la <i>ferredoxine</i>   | 25    |
| 13 | Division de travail entre bacteroides et racine de fabacées pour la fixation de N <sub>2</sub>       | 27    |
| 14 | Dialogue moléculaire entre la racine et les <i>Rhizobiums</i>  | 29    |
| 15 | Structure de la protéine de la famille des LysM-RLK  | 33    |
| 16 | Structure de la protéine DMI2  | 34    |
| 17 | Structure de la protéine DMI1  | 35    |
| 18 | Structure de la protéine DMI3  | 35    |
| 19 | Processus d'activation d'une CCaMK   | 36    |
| 20 | Modèle proposé pour la voie de perception/transduction du signal «facteurs Nod »                     | 38    |
| 21 | Structure de la Surface cellulaire Rhizobienne   | 40    |
| 22 | Modèle consensus structural des KPS établi par Reuhs <i>et al.</i> en 1998                           | 41    |
| 23 | Schéma structural des LPS.   | 43    |



|    |   |    |
|----|---|----|
| 24 | Les trois réplicons du génome chez <i>S.melioli</i>                     | 47 |
| 25 | La structure des deux types des exopolysaccharides                      | 48 |
| 26 | Biosynthèse de l'unité répétitive des EPS I de <i>S. meliloti</i>       | 51 |
| 27 | Les sept réplicons du génome chez <i>R. leguminosarum</i>               | 54 |
| 28 | Structure de différents exopolysaccharides chez <i>R. leguminosarum</i> | 55 |
| 29 | Biosynthèse de l'unité répétitive des EPS de <i>R. leguminosarum</i>    | 57 |
| 30 | Biosynthèse du Kdo <sub>2</sub> -lipide A chez <i>R.leguminosarum</i>   | 59 |
| 31 | biosynthèse de l'oligosaccharide de coeur de <i>R. leguminosarum</i>    | 61 |
| 32 | Biosynthèse de l'antigène O   | 63 |

Produced with ScanTopDF

## Introduction :

Après l'eau et de lumière, l'azote est le principal élément limitant la production végétale dans le monde entier alors que l'atmosphère terrestre est constituée à 80% d'azote. Ce paradoxe est dû au fait que l'azote moléculaire ( $N_2$ ) est une molécule très stable, que seuls des organismes appartenant au groupe des procaryotes (mais aucun organisme eucaryote) sont capables de réduire sous une forme combinée assimilable.

L'utilisation d'engrais pour compenser ces insuffisances est maintenant activement refusée en raison de leur prix élevé, leur effet sur les changements climatiques et leur impact environnemental négatif.

Une solution pourrait être d'exploiter les plantes qui ont acquis la capacité de s'adapter à des environnements déficients. Un exemple est donné par les plantes qui développent des associations symbiotiques avec des bactéries fixatrices d'azote permet l'utilisation de l'azote atmosphérique et, ainsi, l'enrichissement des sols en azote assimilable par les plantes. La symbiose la plus importante d'un point de vue écologique et agronomique est celle associant des bactéries du sol les *Rhizobium*, aux légumineuses. Cette association s'établit au sein de nouveaux organes appelés nodosités dont le développement est induit par les bactéries au niveau des racines et contrôlé par la plante qui fournit à son symbiote une niche protectrice et de l'énergie, en échange, les bactéries synthétisent de l'ammoniac, source d'azote assimilable pour leur hôte.

L'établissement de la symbiose *Rhizobium* -Légumineuse est un processus complexe qui comprend plusieurs étapes. Un dialogue moléculaire était à l'origine de la reconnaissance entre le symbiote bactérien et sa plante-hôte. Les gènes bactériens dits de nodulation (gènes *nod*, *nol*, *noe*), qui comprennent les gènes de structure et les gènes régulateurs, jouent un rôle central dans ce dialogue. En présence d'inducteurs végétaux (flavonoïdes, bêtaïnes), les protéines régulatrices NodD sont activées et induisent l'expression des gènes de structure. L'expression des gènes structuraux conduit à la production de signaux bactériens extracellulaires ou facteurs Nod, qui jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodules au sein desquelles les bactéries se différencient en bactéroïdes capables de réduire l'azote moléculaire  $N_2$  en  $NH_3$ .

La mise en place de cette interaction implique un processus de reconnaissance spécifique qui nécessite la production des exopolysaccharides de la part de *Rhizobium*, ainsi que de la lectine de la part de la plante légumineuse. Ainsi *Sinorhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* appartenant à





Rhizobia sont capables d'induire la formation de nodules sur leur hôte en synthétisant différents types des polysaccharides sur leurs surfaces.

L'objet de ce travail est d'étudier la nodulation racinaire et la fixation d'azote chez *Rhizobium* et les légumineuses aux niveaux cellulaires, moléculaire, et les mécanismes qui contrôlent la mise en place et le fonctionnement de ce type d'association symbiotique.

Nous présenterons dans un premier chapitre quelques connaissances acquises à propos de l'azote ainsi qu'une étude modeste sur le phénomène de la symbiose existant entre *Rhizobium* et la plante légumineuse. Le deuxième chapitre sera consacré au phénomène de la nodulation et la fixation d'azote aspect morphologique, biochimique enfin le troisième chapitre sera une étude génétique de la nodulation où nous allons choisir *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* comme exemple pour cette étude.

## chapitre I

# Généralités

Produced with ScantOPDF

## I-Azote

### I.1-Définition

L'azote est un élément chimique de symbole N et de numéro atomique 7 (1).il joue un rôle critique tant pour les protéines que pour les acides nucléiques ; dès lors, tous les organismes vivants doivent le métaboliser pour survivre(2). Dans le langage courant, l'azote désigne le gaz diatomique diazote  $N_2$ , constituant majoritaire de l'atmosphère terrestre, représentant presque les 4/5<sup>e</sup> de l'air (78.06 %, en volume) (1).L'azote est le 34<sup>e</sup> élément constituant la croûte terrestre par ordre d'importance(1).

### I-2-Formes d'azote dans la nature

#### I-2-1-Azote inorganique:

- Gazeux:  $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NH_3$
- soluté;  $NH_4^+$ ( ammonium ),  $NO_3^-$ (nitrate ),  $NO_2^-$  (nitrite), $NO$  (nitrite)
- Minéraux (rares, très solubles): Niter -  $KNO_3$  (salpêtre, Golfe Persique) Nitratine -  $NaNO_3$  (Nitrate du Chili) ( Ndoye . 1990 ).

#### I-2-2-Azote organique

- Acides aminés, protéines:
- Nucléotides, acides nucléiques ( Ndoye , 1990 ).

### I-3- Cycle de l'azote

L'azote se déplace sans cesse entre sa forme inorganique et sa forme organique il subit différentes transformations chimiques et biologiques .Ces réactions amènent la production de molécules et de composés azotés qui sont indispensables à la croissance des végétaux, des animaux et des humains (4).

les échanges entre ses différentes formes sont connus sous le terme de cycle d'azote qui est résumé ici :



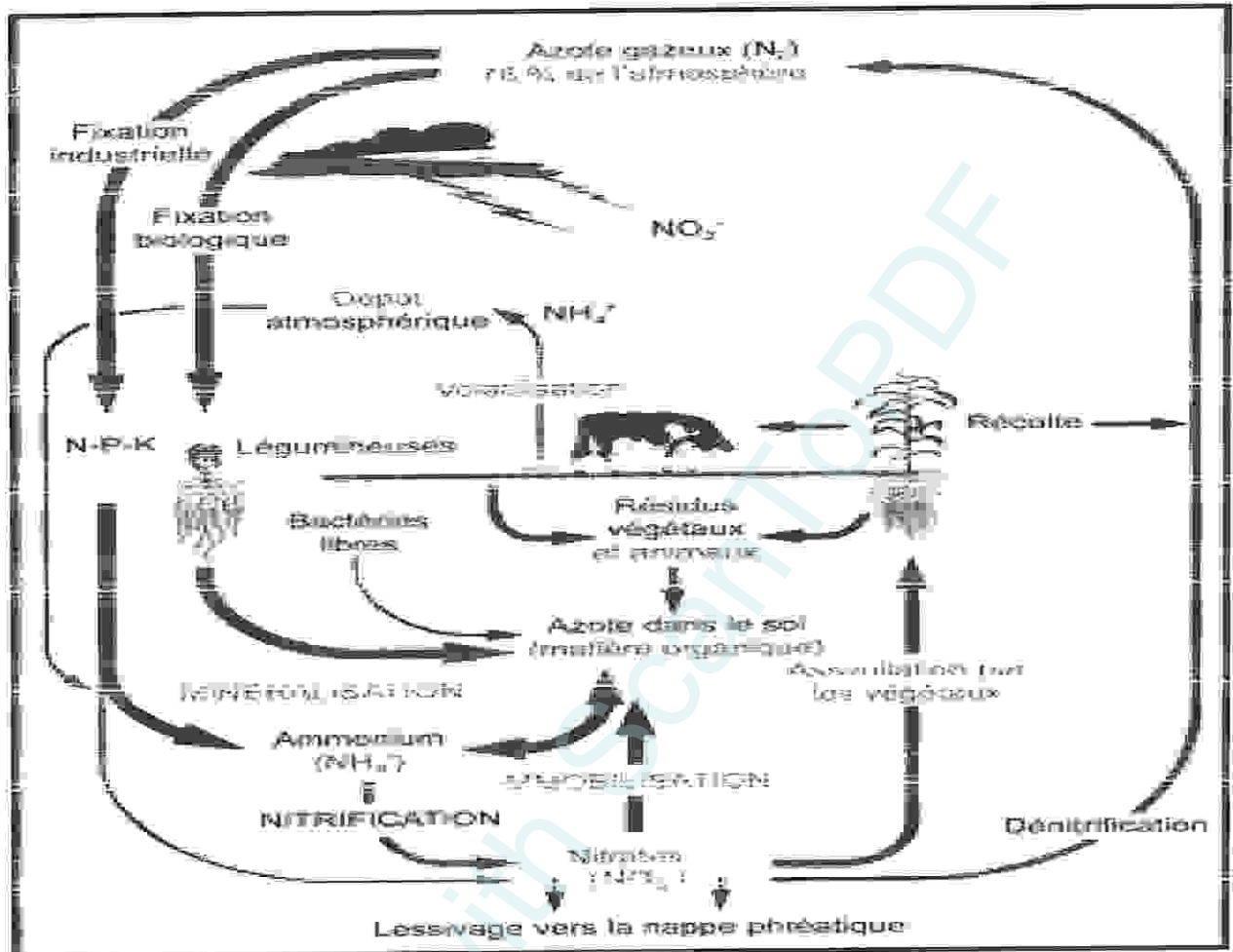


Figure 1 : Cycle d'azote (12)

### 1-3-1-Consommation des végétaux

Les plantes produisent de la matière organique azotée (acides aminés et autres molécules organiques azotées) à partir des sucres fabriqués par photosynthèse et d'ions  $NO_3^-$  puisés dans le sol (3).

### 1-3-2-Consommation des animaux

Les animaux utilisent la matière organique azotée des plantes pour fabriquer leur propre matière organique azotée. Les protéines de la viande, par exemple, sont produites à partir des acides aminés fabriqués par les plantes et mangés, sous forme de protéines végétales, par l'animal (3)



### I-3-3-Ammonification

Les décomposeurs du sol (bactéries, mycètes) transforment la matière organique azotée provenant des plantes ou des animaux morts en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et/ou en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (5). (Au contact de l'eau, l'ammoniac se transforme en ions  $\text{NH}_4^+$ ) (3).

### I-3-4-Nitrification

D'autres bactéries du sol, les bactéries nitrifiantes, transforment le  $\text{NH}_4^+$  en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) cette nitrification se déroule en deux étapes :

#### I-3-4-1-Nitrosation

L'ammonium et l'ammoniac sont transformés en nitrites  $\text{NO}_2^-$ , sous l'action de bactéries du genre "nitrosomonas" en phase aérobie (5).

#### I-3-4-2- Nitratation

Les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) à leur tour sont transformés en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) sous l'action d'autres bactéries, du genre "nitrobacter", en phase aérobie (5).

### I-3-5-Dénitrification

Certaines bactéries du sol, dans certaines conditions, peuvent transformer l'azote minéral des sols ( $\text{NO}_3^-$ ) en azote atmosphérique ( $\text{N}_2$ ) inutilisable par les plantes (La dénitrification). Ces bactéries ont peu de chances de se développer (3). Mais si le sol est inondé (donc privé d'oxygène) il peut alors rapidement perdre ses engrais azotés (3).

### I-3-6-Lessivage de l'azote minéral

Si le sol retient mal l'eau, l'azote minéral peut être entraîné en profondeur vers les nappes d'eau souterraines ou vers les cours d'eau avoisinants (3)

### I-3-7- Matière végétale ou animale exportée

Toute matière vivante qui est enlevée du milieu ne sera pas recyclée en engrais azoté. C'est le cas en agriculture ou lorsqu'on déboise une forêt (3)

## I-4-Fixation de l'azote

L'azote moléculaire contenu dans l'atmosphère terrestre e représente une réserve pratiquement illimitée d'environ  $4 \cdot 10^{15}$  tonnes mais, pour être assimilable par les végétaux l'azote doit être combiné à d'autres éléments tels que l'hydrogène ou l'oxygène (3). La transformation de l'azote moléculaire en azote combiné est appelée fixation d'azote (Boguez et al., 1985) . Il est difficile de déterminer avec précision la quantité totale d'azote fixé .Des valeurs de l'ordre 200 à 250 tonne par an ont été avancés (Hopkins, 2003).

On peut distinguer deux processus : la fixation biologique apanage uniquement des microorganismes fixateurs, et la fixation non biologique portant sur l'azote minéral.

### I-4-1-Fixation non biologique de l'azote atmosphérique, $N_2$

#### I-4-1-1-Industrie des engrais ; Procédé HABER (1868-1934, Prix Nobel 1918)

30% de la quantité totale de l'azote fixé sont produits par la fixation industrielle de l'azote. ce procédé industriel (connu sous le nom Procédé HABER BOSCH ) provoque la combinaison de l' azote et de l' hydrogène à des températures et des pression élevées (400-450°C, 200 atm, catalyseur Fe) la fixation industrielle de l' azote est un procédé couteux et dépend étroitement des combustibles fossiles ,autant pour la fourniture d'hydrogène ( gaz naturel ) que pour l'énergie nécessaire pour atteindre les températures et les pressions requises. L'essentiel de l'azote fixé industriellement est destiné, sous forme d'engrais, à des usages agricoles : environ 1,5 Kg de pétrole est nécessaire pour produire et livrer 1 Kg d'azote à une ferme. (Hopkins 2003).

#### I-4-1-2-Les combustions industrielles, des feux de forêt, des gaz d'échappement

Représentent d'autres sources d'oxyde d'azote atmosphérique (Hopkins ,2003).

#### I-4-1-3.-Les orages

Au voisinage des éclairs, les hautes températures et pressions engendrées permettent la formation d'oxydes d'azote qui retombent au sol avec la pluie. Il y a 45.000 orages par jour sur notre planète (3).

### I -4-2- Fixation biologique de l'azote atmosphérique $N_2$

A l'échelle mondiale le reste de l'azote fixé, environ 60% de 150à190 million de tonnes par an est représentée par la réduction de l'azote en ammoniac par des organismes vivants .Ce processus est connu sous le terme fixation biologique de l'azote. (Hopkins ,2003).



Les procaryotes qui fixent l'azote, nommés fixateurs d'azote comprennent à la fois des organismes libres et des organismes, qui forment des associations symbiotiques avec d'autres organismes. (Hopkins, 2003).

#### 1-4-2-1- Fixateurs symbiotiques

la fixation symbiotique d'azote implique des interactions anatomiques, morphologique et biochimiques importantes entre la plante hôte et les microorganismes qui l'envahissent. (Hopkins 2003).

- *Rhizobium* (bactérie) : chez légumineuses
- *Frankia* (actinomycète) : chez l'aulne
- *Anabaena* (cyanobactérie) : chez *Azolla*
- algues : chez les champignons (lichens) ( Ndoye , 1990 ).

#### 1-4-2-2-Fixateurs libres

les bactéries libres fixatrices d'azote, sont très répandues. Elles habitent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces. (Hopkins, 2003).

- *Azospirillum* (rhizosphère graminées tropicales)
- *klebsiella pneumoniae*
- *Azotobacter Azomonas* (aérobies)
- *Clostridium Citrobacter...* (anaérobies)
- *Rhodospirillum rubrum* ( Ndoye , 1990 ).

## II-généralité sur la symbiose *Rhizobium*-légumineuse

### II-1-Symbiose

La symbiose est une association intime et durable à bénéfice réciproque entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes). Les organismes sont qualifiés de symbiotes, ou, plus rarement *symbiontes* ; le plus gros peut être nommé *hôte* (6). La symbiose peut être de deux types :

- l'ectosymbiose : correspond à une relation où les deux partenaires sont extérieurs l'un à l'autre (le symbiote vit à la surface de l'hôte) (6).
- l'endosymbiose : le symbiote est situé dans l'espace intercellulaire, intracellulaire (intravacuolaire ou libre dans le cytoplasme) (6)

La symbiose chez *Rhizobium* -légumineuses est une endosymbiose dans laquelle le *Rhizobium* prélève de la plante les glucides nécessaires à sa nutrition carbonée, tandis que la

plante profite des substances azotées produites par la bactérie (7). L'interaction entre les rhizobia et leurs plantes hôtes induit la formation d'un nouvel organe, appelé la nodosité racinaire (le nodule) (7).

### II-1-1- Partenaires végétaux : plante des légumineuses

La famille des légumineuses est l'un des groupes des végétaux supérieur les plus abondants et les plus diversifiés, elle est subdivisée en trois sous famille : *Caesalpinioideae*, *Mimosoidea* et les *Fabacées* (ex : *Papilionoideae*) (Guerrouj et al,2009). La première sous famille est primitive, les deux autres sont plus évoluées : *Mimosoidea* tel que *Acacia*(arbre), les *Fabacées* tels que les pois les haricot la luzerne les trèfles , les genêts (Gobat et al.,2003).

Elle comporterait plus de 19000 espèces réunie en 750 genres et dont seulement 10% ont été examinées pour la nodulation racinaire ou caulinaires. Celle-ci a été observée dans plus de 90 % des cas chez les *Mimosacées* et les *Fabacées*. En revanche, on trouve peu d'espèces nodulées chez les *Caesalpinacées* (Guerrouj et al. 2009) .

### II-1-2-Partenaires bactériens :Rhizobia

Les Rhizobia sont des bâtonnets du sol Gram-négatifs, aérobies, hétérotrophes et non-sporulantes appartenant à la famille des Rhizobiaceae. Ils sont souvent arrangés seuls ou en paires et motiles surtout lorsque les cellules sont jeunes. Ils ont une taille variant de 0,5 à 0,9 µm de largeur par 1.2 à 3.0 µm de longueur (Guillaume., 2004) . De point de vue phylogénétique, ces bactéries appartiennent à la classe des α protéobactéria .

Une caractéristique des Rhizobia est leur aptitude à infecter la racine ou parfois la tige des légumineuses pour former des nodules .A l'état libre ces bactéries vivent en saprophytes sans fixer l'azote (Duhoux et Nicol ,2004 .,Myer et al).

**Tableau 02** : Les différents espèces des Rhizobia et leur plante hôte (Zakihiaet de Lajudi, 2001; Weir, 2005 cité in Gharzouli R., 2006)

| Espèce                    | Plante hôte  |
|---------------------------|--|
| <b>Rhizobium</b>          |  |
| <i>R. leguminosarum</i>   |  |
| biovar <i>viciae</i>      | <i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>              |
| biovar <i>trifolii</i>    | <i>Trifolium pratense</i>  |
| biovar <i>phaseoli</i>    | <i>Phaseolus vulgaris</i>  |
| <i>R. tropici</i>         |  |
| Type II A                 | <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena leucocephala</i>                         |
| Type II B                 | <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena leucocephala</i>                         |
| <i>R. elii</i>            |  |
| biovar <i>phaseoli</i>    | <i>Phaseolus vulgaris</i>  |
| biovar <i>mimosae</i>     | <i>Mimosa affinis</i> <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> L |
| <i>R. hainanense</i>      | <i>Dasmodium sinuatum</i> & other plants of arid regions                         |
| <i>R. gallicum</i>        |  |
| biovar <i>gallicum</i>    | <i>Phaseolus vulgaris</i>  |
| biovar <i>phaseoli</i>    | <i>Phaseolus vulgaris</i>  |
| <i>R. mongolense</i>      | <i>Medicago ruthenica</i>  |
| <i>R. galegae</i>         |  |
| biovar <i>orientalis</i>  | <i>Galega orientalis</i>   |
| biovar <i>officinalis</i> | <i>Galega officinalis</i>  |
| <i>R. giardinii</i>       |  |
| biovar <i>giardinii</i>   | <i>Phaseolus vulgaris</i>  |
| biovar <i>phaseoli</i>    | <i>Phaseolus vulgaris</i>  |
| <i>R. huautlense</i>      | <i>Sesbania herbacea</i>   |
| <b>Mesorhizobium</b>      |  |
| <i>M. loti</i>            | <i>Lotus corniculatus</i>  |
| <i>M. huakuii</i>         | <i>Astragalus sinicus</i> , <i>Acacia</i>  |
| <i>M. ciceri</i>          | <i>Cicer arietinum</i>   |
| <i>M. tianshanense</i>    | <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> & other tropical plants                          |
| <i>M. mediterraneum</i>   | <i>cicer arietinum</i>   |
| <i>M. plurifarum</i>      | <i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>  |
| <i>M. amarophilus</i>     | <i>Amarpha fluviocosa</i>  |



|                          |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------|
| <b>Sinorhizobium</b>     |                                       |
| <i>S. meliloti</i>       | <i>Medicago, Medicago, Trigonella</i> |
| <i>S. fredii</i>         |                                       |
| chemovar <i>fredii</i>   | <i>Glycine max</i>                    |
| chemovar <i>siensis</i>  | <i>Glycine max</i>                    |
| <i>S. sahelense</i>      | <i>Sesbania spp</i>                   |
| biovar <i>acaciae</i>    | <i>Acacia spp</i>                     |
| biovar <i>sesbaniae</i>  | <i>Sesbania spp</i>                   |
| <i>S. terangoe</i>       |                                       |
| biovar <i>acaciae</i>    | <i>Acacia spp</i>                     |
| biovar <i>sesbaniae</i>  | <i>Sesbania spp</i>                   |
| <i>S. medicae</i>        | <i>Medicago</i>                       |
| <i>S. kostiense</i>      | <i>Acacia, Prosopis</i>               |
| <i>S. arboris</i>        | <i>Acacia, Prosopis</i>               |
| <b>Azorhizobium</b>      |                                       |
| <i>A. caulinodans</i>    | <i>Sesbania rostrata</i>              |
| <i>Azorhizobium sp</i>   | <i>Sesbania rostrata</i>              |
| <b>Bradyrhizobium</b>    |                                       |
| <i>B. japonicum</i>      | <i>Glycine max, Glycine soja</i>      |
| <i>B. elkanii</i>        | <i>Glycine max</i>                    |
| <i>B. liaoningense</i>   | <i>Glycine max Glycine soja</i>       |
| <i>Bradyrhizobium sp</i> | <i>Vigna, Lupinus, Mimosa</i>         |
|                          | <i>Acacia</i>                         |
|                          | <i>Aeschynomene</i>                   |
| <b>Allorhizobium</b>     |                                       |
| <i>A. indicola</i>       | <i>Neptunia natans</i>                |

Les différents *Rhizobiums* se distinguent selon leur vitesse de croissance dans un milieu synthétique à base de glucose et d'extrait de levure. En effet, on retrouve les Rhizobia à croissance rapide (temps de génération inférieur à 6 heures) comme ceux du genre *Rhizobium* et *Sinorhizobium* ainsi que ceux à croissance lente (temps de génération supérieur à 6 heures) du genre *Bradyrhizobium*, (Guillaume, 2004).

### II-1-2-1-Types de souches

#### II-1-2-1-1-Souches infectives

Se dit d'une souche bactérienne capable d'infecter la racine et de produire un petit nodule, fixateur ou non de couleur pale sans leghémoglobine, (Gobat et al,2003).

#### II-1-2-2-Souche effective

Se dit d'une souche bactérienne capable de produire un nodule actif, fixateur à couleur rouge ou bien rose qui est due de la présence de leghémoglobine.( Gobat et al,2003).

#### II-1-2-2- Isolement du Rhizobium

La méthode est proposé par :Somasegaran et Hoben (1994); Beck et al.1993); Vincent(1970);

Asadik et ElSORA(2000) consiste à :

- une extraction des plantes légumineuses et leur appareil racinaire.

Manuellement, on essaye de se débarrasser du sol lié au niveau des racines sans toute fois endommager, les nodules.

- Collecte environ 10 nodules à partir de chaque plante. Les nodules sont détachés 0.5cm du site d'attache avec une pince.
- un lavage des nodules pour éliminer les restes de terre, puis séchés avec du papier de filtre.
- une conservation des nodules par dessiccation qui sont réhydratés une nuit au réfrigérateur dans de l'eau distillé puis abandonné pendant une heure à température ambiante.
- la stérilisation qui se fait par une immersion du nodule dans l'éthanol à 95% pendant 5 à 10 secondes puis transférés immédiatement dans un désinfectant pendant une durée de 3 à 4 min. Ce dernier peut être soit du calcium hypochlorite à 5%, de l'hydrogène peroxydique à 3%, ou l'HCL à une concentration de 0.1%, ou chlorure de mercure acidifier.
- une élimination du stérilisant par rinçage répété à l'eau distillé (7 à 10 fois) selon l'agent stérilisant.
- Ecrasement du nodule : dans une boîte de pétri sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillé stérile. Dans chacune d'elle est déposé un nodule stérile. Avec une pince stérile on écrase le nodule et à l'aide d'une anse de platine on ensemence une boîte de milieu de Yeast Manitol Agar (YMA) contenant du rouge congo.

- l'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre cadrans de manière à isoler des simples colonies.
- les boîtes sont incubées 72h à 28-30°C.

### II-1-2-3-Morphologie et cytologie du *Rhizobium*

Les *Rhizobia* sont des bacilles Gram négatif, mobiles par un seul flagelle polaire ou 2 à 6 flagelles péritriches, elles sont capables de croître à une tension de 0.01atm d'O<sub>2</sub>. Elles produisent de grandes quantités de dépôt visqueux extracellulaire. Elles métabolisent le glucose par voie d'Entner-Doudroff. Elles fixent N<sub>2</sub> en condition microaérophiles. Certaines espèces croissent comme des chimioautotrophe pour H<sub>2</sub> (Somasegaran et Hoben, 1994 ; Pery et al. ; 2004).

L'organisation structurale du noyau n'est pas bien définie. Les dimensions du noyau de *Rhizobium* du trèfle sont de 0.3 à 0.8µ (Allen et Allen, 1950).

Les colonies des *Rhizobia* sont blanches opaque, ou laiteuses, translucides. Les colonies opaques ont peu de gomme mais les colonies dense sont toujours gommenses. D'autre colonies apparaissent rouge ou rose et jaune mais ceci n'est pas stable (Somasegaran et Hoben, 1994).

### II- 1-2-4- Caractères antigéniques du *Rhizobium*

les techniques sérologiques ou immunologiques se basent sur la capacité des constituants de la cellule bactérienne à agir comme antigène, dans de réagir avec les anticorps des vertébrés. Les plus utilisées sont l'agglutination, l'immunofluorescence, immunodiffusion (Benguedouar, 2000).

#### II-1-2-4-1-Agglutination

C'est la liaison entre l'antigène peut être microscopique ou macroscopique visible comme masse agglutinat ou agrégat, la réaction d'agglutination dépend d'une relation structurale formé entre une bactérie (*rhizobium*) qui expose l'antigène et l'anticorps (Somasegaran et Hoben, 1994).

#### II-1-2-4-2-Immunofluorescence

Se sert d'anticorps marqué par le réactif fluorescent, elle permet de détecter deux antigènes ou plus simultanément. L'immunofluorescence est également utilisée pour l'analyse des cellules en suspension de section de frottis de (*Rhizobium*) (Burmster et Bezzuto, 1998).



### II-1-2-4-3-Immunodiffusion

Il s'agit de préparer des antigènes à partir des cellules de (*Rhizobium*) et les faire diffuser avec l'antisérum qui contient des cellules somatiques de lapin. L'analyse se fait dans des boîtes de pétri contenant l'immunodiffusion agar (Somasgaran et Hoben, 1994).

### II- 1-2-5-Les conditions de croissance

- **Aération** : les *Rhizobia*, étant des bactéries aérobies obligatoires, nécessitent un fermenteur (idéalement) capable de fournir de l'air stérile dans le milieu de culture. Toutefois, l'aération des erlenmeyers agités est suffisante pour la culture des *Rhizobia*. Généralement, au moins 1 Litre d'air par minute devrait être fourni pour chaque 20 litres de milieu de culture (Dufresne, 2004)
- **Température** : la température de croissance idéale de la plupart des *Rhizobia* varie entre 25 et 30°C. Bien que la température ne soit pas un facteur limitant de croissance, il est important de maintenir une température optimale afin que le temps de fermentation demeure le plus court possible. Une agitation soutenue est nécessaire afin que la chaleur soit bien répartie et que l'oxygène diffuse adéquatement dans tout le milieu de culture afin de ne pas asphyxier les bactéries. L'agitation permet également de bien mélanger tous les éléments nutritifs dans le milieu culture (Dufresne, 2004)
- **PH de milieu** : les *Rhizobia* croient confortablement dans un milieu où le pH est près de la neutralité. Tous les *Rhizobia* sont affectés par l'acidité et, *S. meliloti* est le plus sensible (pH 5,0) alors que *Bradyrhizobium japonicum* est le plus résistant (pH 3,2 à 4,0).
- **le volume de l'inoculum** : Finalement, le volume de l'inoculum va également grandement influencer la culture des *Rhizobia*. En effet, plus le volume de l'inoculum est important, plus le temps de latence sera court et la concentration de cellules maximum sera atteinte rapidement. Ils varient selon les chercheurs, les souches et la nature des milieux de culture utilisés (Dufresne, 2004)

### II-1-2-6-Les exigences nutritives

- **Sources de carbone** : Les *Rhizobia* utilisent différentes sources de carbone. Ils utilisent les monosaccharides, les disaccharides et en moins grande importance les trisaccharides, les alcools et les acides. Les pentoses, tels les arabinoses et les xyloses sont les sources de carbone que préfèrent les souches à croissance lente (Burton, 1979). La capacité des *Rhizobia* à utiliser des hydrates de carbone dépend en partie de la nature du milieu de culture, du potentiel d'oxydo-réduction, de la taille de l'inoculum et de la méthode de culture. Le sucrose, le mannitol et le glycérol sont les sources de carbone les plus communément utilisées dans la composition des milieux de culture dans le secteur industriel (Burton, 1979).

• **Les facteurs de croissance** : Sont des composés organiques que l'on peut ajouter au bouillon nutritif afin de combler les besoins en certains constituants cellulaires (ou leurs précurseurs) indispensables à la croissance lorsque qu'une bactérie en question ne possède pas les enzymes nécessaires afin de les synthétiser (Dufresne, 2004). Les acides aminés et les vitamines font parties de ces facteurs de croissance qui doivent être ajoutés au milieu de culture des Rhizobia. L'extrait de levure est utilisé afin de combler les besoins en vitamines, acides aminés et en azote inorganique. La demande en facteurs de croissance est simple et varie selon l'espèce et la souche qui est utilisée. Les Rhizobia nécessitent une, toutes ou plusieurs des combinaisons de certaines vitamines telles la biotine, thiamine, riboflavine et pantothenate et calcium (Dufresne, 2004). Par exemple, *S. meliloti* nécessite uniquement de la biotine comme source de vitamine. Bien que certaines souches de Rhizobia puissent utiliser le nitrate et l'ammonium comme source d'azote, une meilleure croissance est normalement observée lorsque des acides aminés de faibles poids moléculaires sont ajoutés (Burton, 1979).

• **Oligo-éléments (micronutriments)**: les Rhizobia ont également besoin d'oligo-éléments afin de combler leurs exigences nutritives tel le cobalt, le manganèse, le zinc et le fer. Les oligo-éléments font normalement partie des enzymes et des cofacteurs aidant ainsi la catalyse des réactions et le maintien de la structure des protéines. Le cobalt aide à prévenir contre la toxicité reliée au nickel et au cuivre alors que le zinc et le manganèse, à de faibles concentrations, stimulent la croissance des Rhizobia. Pour sa part, le fer fait partie de la ferrédoxine qui est une protéine qui agit comme plaque tournante dans le mécanisme de transfert d'électrons (Dufresne, 2004).

• **Les sels minéraux** : Sont essentiels au bon développement des Rhizobia. Encore une fois, c'est l'extrait de levure qui fournit les concentrations adéquates de calcium, de potassium et de magnésium. Puisque que les Rhizobia dans les nodules sont nourris par la plante hôte, il semble raisonnable de penser que leurs besoins en sels minéraux sont semblables (Dufresne, 2004). A démontré que le calcium stimulait la croissance des Rhizobia et qu'à de faibles concentrations (0,1 ppm), la période de latence était plus longue, la phase exponentielle était plus courte, le taux de croissance dans la phase exponentielle était plus faible ou bien on observait une diminution de la production de cellules. Le potassium, pour sa part, agit comme un régulateur enzymatique dans la synthèse des polypeptides bactériens. Le magnésium est un élément essentiel pour la croissance car il joue également un rôle de régulateur enzymatique. Une déficience en cet élément produit une division anormale des cellules (Dufresne, 2004).

## chapitre II

# Ndulation

Produced with ScantOPDF

## 1-Nodulation

La nodulation est le processus par lequel s'exprime la symbiose entre des bactéries fixatrice d'azote et la plante hôte spécifique qui est ciblé engendrant Le nodule (Dufresne, 2004)

### 1-1-Le nodule

les racines des légumineuses portent de nombreux nodule ou nodosités qui sont des organes globuleux, irréguliers, isolés ou encore plus ou moins concrets. ils sont engendrés par l'interaction entre les racines des légumineuses et les bactéries du genre *rhizobium* qui permet la plante d'acquérir la faculté de fixer directement l'azote atmosphérique et sa transformation en ammoniac ( Gobat et al,2003 ;Macheix et al,2005. Dufresne, 2004)

#### 1-1-1- Type de nodules

- **Nodules déterminés**

On trouve un méristème diffusé, a une durée de vie limitée à une dizaine de jours et le nodule est plus ou moins sphérique avec des tissus centraux uniforme, le primordium nodulaire est initié dans la région externe du cortex. On les trouve chez : luzerne, trèfle, vesce. ( Duhoux et Nicol ,2004 ) (8).

- **Nodules indéterminés**

On distingue le méristème apical à activité persistant, qui donne naissance à toute la structure du nodule de manière basipète (forme cylindrique parfois ramifié) avec une zonation du tissu central, le primordium nodulaire est initié dans le cortex interne de la racine. On les trouve chez : soja, haricot. ( Duhoux et Nicol ,2004 ) (8).



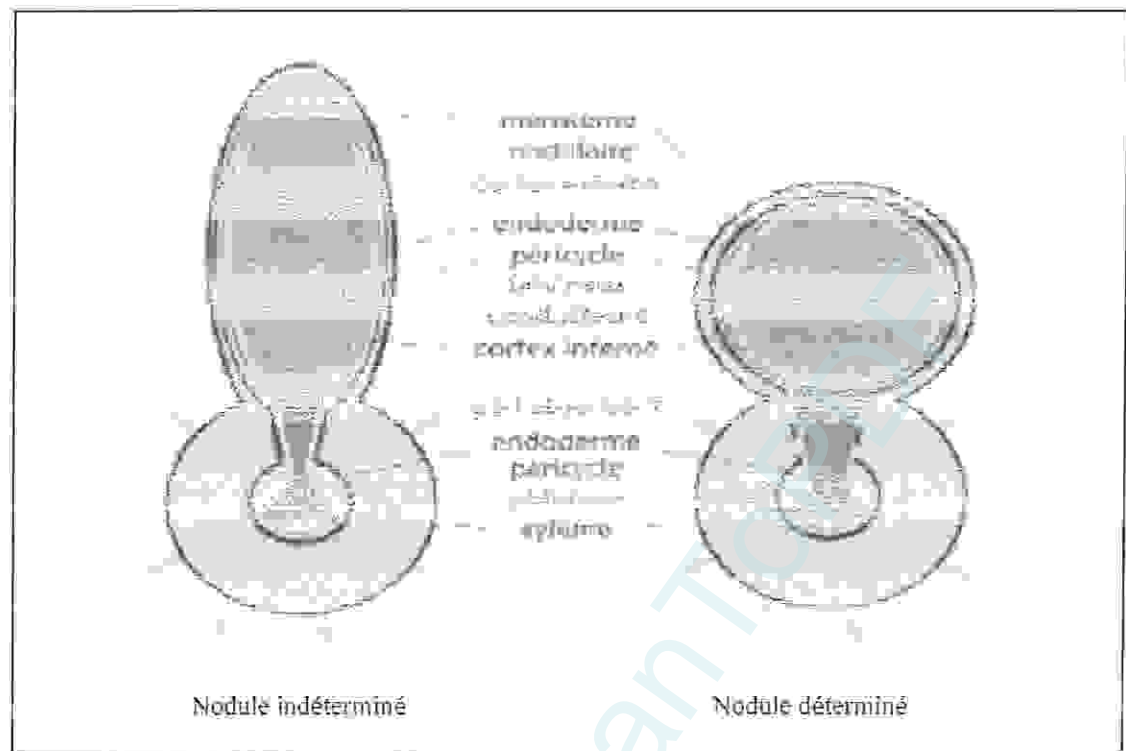


Figure 2 : Les différents types de nodules chez les Légumineuses (Vernié,2008).

#### II-1-2- Organisation du nodule

Un nodule indéterminé mature est caractérisé par des tissus spécifiques périphériques et centraux. La région périphérique compte trois types de tissus, de l'extérieur vers l'intérieur, (Vernié, 2008):

- Le cortex, constitué de grandes cellules vacuolisées
- L'endoderme
- Le parenchyme, qui contient les faisceaux vasculaires

La région centrale est divisée en quatre zones à partir de l'apex :

-**Zone périphérique méristématique (zone I):** A activité continue. Elle assure la formation et la croissance du nodule. Elle est formée de petites cellules qui ne sont jamais envahies par les bactéries. (Heller et al, 2004).

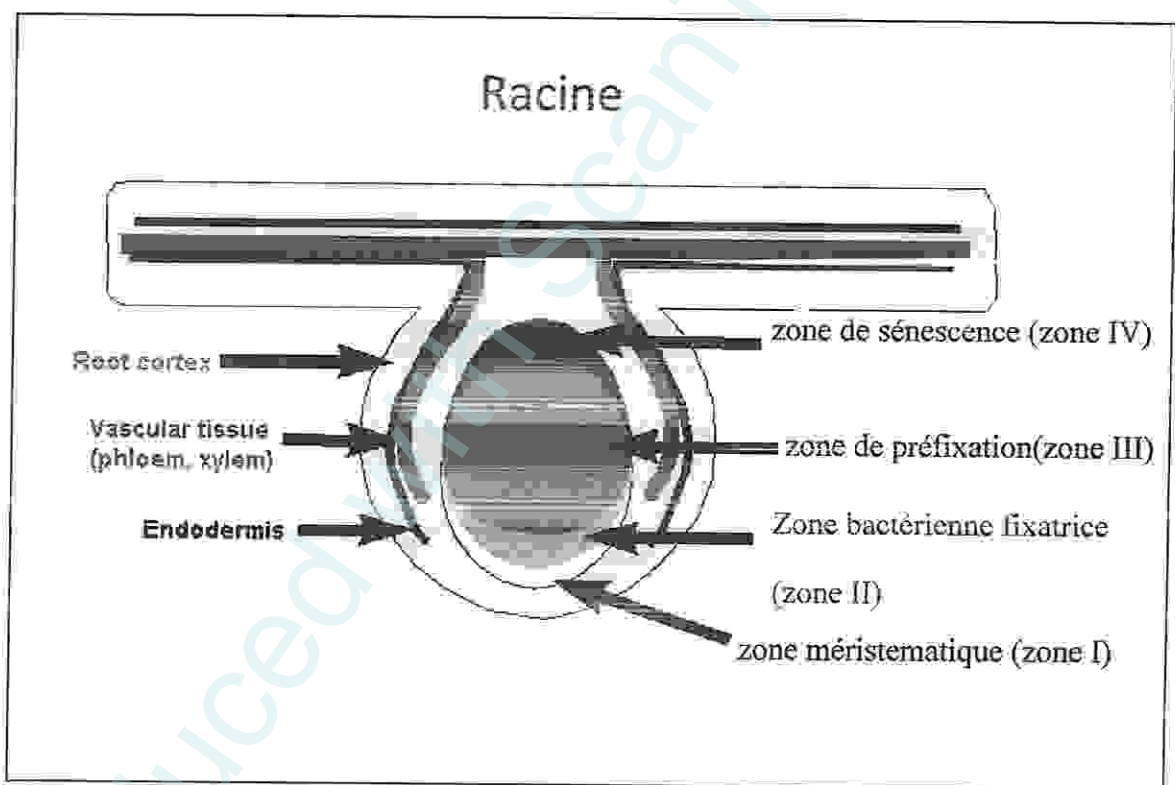
-**Zone d'accroissement de nodule (de préfixation (zone II):** Riche en amyloplaste où le cordon d'infection libère les bactéries à l'intérieur des cellules qui se multiplient activement. (Heller et al, 2004).

- **Zone bactérienne fixatrice d'azote (zone III):** De couleur rouge où l'activité fixatrice est induite et les bactérioses différenciés. (Heller et al, 2004). (Gobat et al, 2003).

**-Zone de dégénérescence (de sénescence (zone IV).)** : De couleur verdâtre où les bactérioses dégèrent et sont dégradés par la plante. Un système vasculaire permettant les échanges entre la zone fixatrice et la plante hôte s'y installe. (Heller et al, 2004). (Gobat et al, 2003).

tandis que le nodule indéterminé se différencie en plusieurs zones, le nodule déterminé mature possède uniquement une zone de fixation (zone III). (Vernié, 2008)

Le centre du nodule est entouré de faisceaux conducteurs dans lesquels le xylème est externe, le phloème est interne, disposition inverse de la disposition normale dans une racine. (Heller et al, 2004).



**Figure 3 :** Organisation de nodule chez les légumineuse( Ndoye , 1990 ).

La nodulation, la croissance des nodules et la fixation de l'azote dépendent d'un certain nombre de facteurs, dont l'excès ou le manque d'humidité, les concentrations de nitrates dans le sol, le pH du sol, les maladies, la teneur en matière organique, la température et la qualité des *Rhizobium*, (9)

### I-1-3-Principales étapes de la formation et de développement du nodule

L'organogénèse des nodosités depuis l'infection jusqu'au développement, est aujourd'hui parfaitement bien connu. Les étapes sont :

#### I-1-3-1-Attraction

L'attraction des bactéries par les racines des plantes hôte semble d'abord impliquer un chimiotactisme positif, autrement dit les bactéries sont attirées chimiquement par des composés phénoliques flavonoïdes (*flavon*, *flavone*, *isoflavone* et *flavonol*, *chalcones*....). (Basdeviveise et al., 2008. Hopkins, 2003. Heller et al., 2004).

La capacité de ces flavonoïdes à attirer les bactéries varie selon le type de flavonoïdes et selon les rhizobies. Certains flavonoïdes peuvent même inhiber l'expression des gènes *nod* impliqué dans le processus de la nodulation. (Vernié, 2008).

D'autres molécules sont également requises pour l'attraction, comme les *bêtaïnes* et *érythronique* et les *acides Tetric*, qui peut également agir comme des inducteurs. (Basdeviveise et al., 2008 ; Hopkins, 2003 ; Heller et al., 2004).

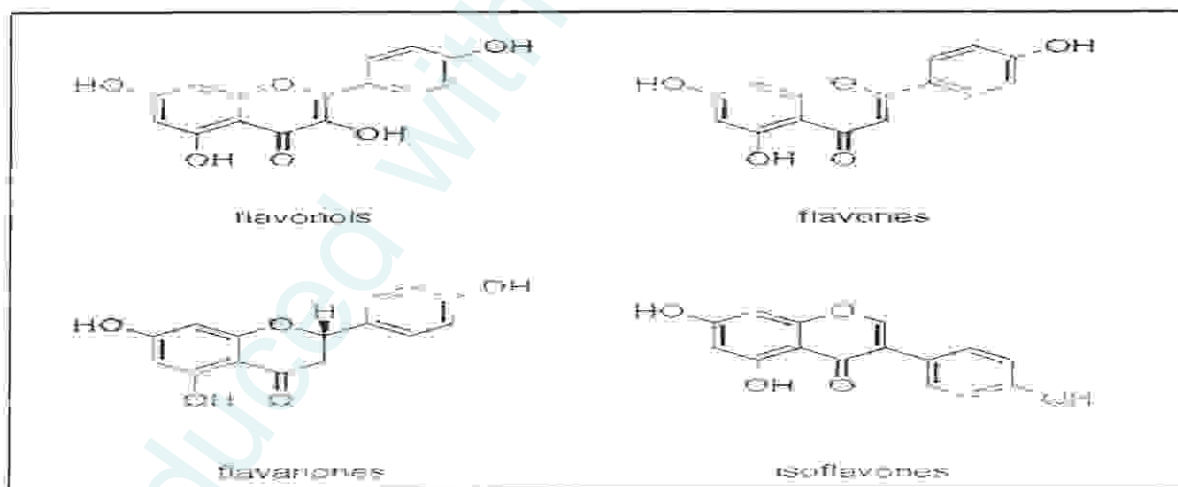


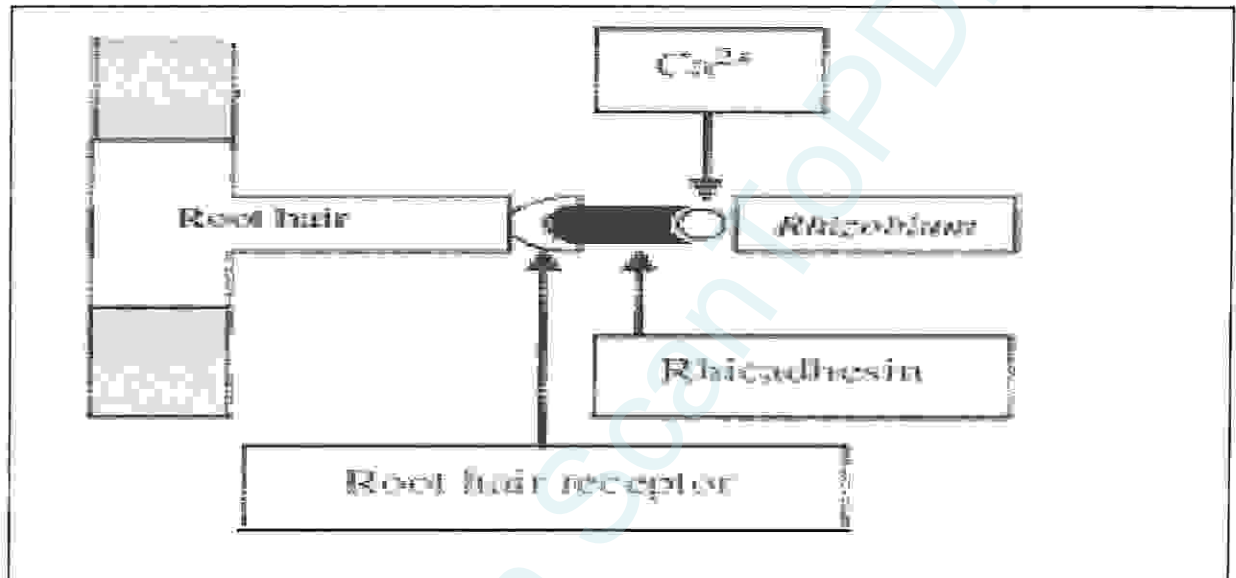
Figure 4 : Exemples de structures chimiques de flavonoïdes (Godfroy . 2008)

#### I-1-3-2-Reconnaissance et attachement

La première étape dans l'installation de la symbiose consiste en la reconnaissance et l'attachement des bactéries sur la plante.

• **Attachement via la rhicadhésine :** Dans les conditions alcalines, une protéine d'adhésion spécifique, la rhicadhésine, est présente à la surface des cellules des espèces des *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium*. La rhicadhésine est une protéine affime pour le calcium et opère en se liant à

un récepteur présent sur la surface bactérienne, et un autre domaine à une molécule présente sur la surface du poil absorbant, par l'intervention des ions calcium impliqués dans l'ancrage de la rhicadhésine à la surface rhizobienne. (Modigan et Martinko ,2007) (Gobat et al.,2003). (Vernié ,2008).

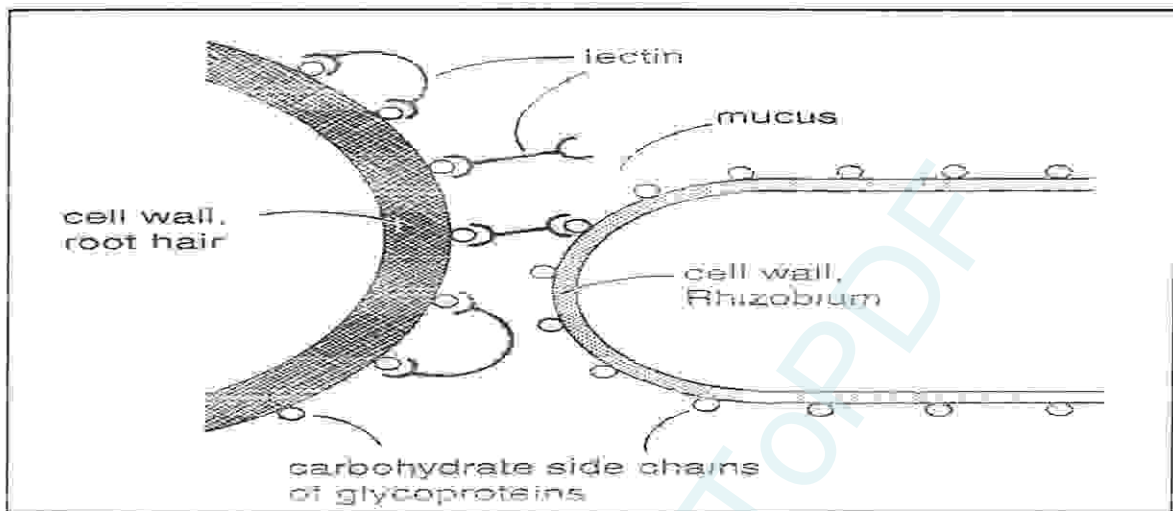


**Figure 5 :** Attachement des *Rhizobium* au poil absorbant par l'intermédiaire de la rhicadhésine (Vernié,2008)

- **Attachement via les lécitines :** Dans des conditions acides ,D'autres, substances comme les lécitines qui interviennent , elles sont des glycoprotéines végétales , ainsi que des récepteurs spécifiques présents au niveaux de la paroi des cellules végétales et qui ont une particularité de reconnaître et de se lier spécifiquement avec différents glucides ,elle paraissent reconnaître des polysaccharides complexes localisées à la surface des bactéries( symbionte). (Hopkins,2003).

en plus des récadhésines ,lécitines et d'exopolysaccharides, d'autres facteurs physicochimiques pourraient également jouer un rôle dans l'attachement. (Hopkins,2003)





**Figure 6 :** Le lien entre le *Rhizobium* et le poil racinaire par le biais de la lectine exopolysaccharides (Vernié,2008)

### I-1-3-3-Formation de pré-nodule ( primordium nodulaire )

Avant d'envahir leur hôte, les *Rhizobiums* émettent des signaux mitogènes qui stimulent la division de cellules du cortex, ces cellules en division forment le méristème primaire du nodule(primordium) , délimitant ainsi la région dans laquelle le nodule se développera , un second centre de division apparaît dans le péricycle.ces deux masses de cellules en division pourront éventuellement fusionner pour former le nodule complet. (Hopkins,2003).

### I-1-3-4-Invasion du poil absorbant et formation d'un cordon d'infection

Les bactéries pénètrent le poil absorbant par son extrémité à la suite de leur attachement , extrémité du poil absorbant se courbe en forme de cross (crosse de berger) dénommé Hac (« root hair curling » courbement des poils) sous l' action des substances excrétées par les bactéries (facteurs nod) les cellules bactériennes peuvent alors pénétrer dans le poil ainsi altérés où elles induisent la formation par la plant d'un cylindre de cellulose et hémicellulose ( une chaîne linéaire de cellules bactérienne) qui court au travers du poil grâce à l'apport de nouveaux matériaux membranaires véhiculés par des vésicules golgiennes qui fusionnent avec le cordon d'infection)vers le cortex racinaire où il se ramifie au niveau de la nodule en formation.(Modigan et Martinko ,2007 ; Hopkins,2003).

La façon dont les bactéries percent la paroi cellulaire comporte une dégradation partielle de la paroi cellulaire il a été montré que les bactéries libèrent des enzymes telles que *pectinases*, *hémicellulases*, et *cellulases* qui toutes dégradent le matériel pariétal. (Hopkins, 2003).

### I-1-3-5- Libération et transformation des cellules bactériennes en bactéroïdes

Quelques bactéries sont libérées à l'extrémité du cordon d'infection par un processus d'endocytose dans des cellules du primordium nodulaire. ces bactéries qui dans le cordon ne s'étaient pas divisées, se mettent à proliférer et continuent d'envahir le nodule qui croit de plus en plus et se charge d'un pigment rose la *légghémoglobine*. A ce stade ont pris des formes plus ou moins globuleuses devenant ainsi des *bactéroïdes* doués des propriétés nouvelles et capables de fixer l'azote atmosphérique. Ils se sont pas épars dans le cytoplasme, mais enfermés dans des vésicules limitées par une membrane *péribactéroïdienne* d'origine végétale. (Hellert al.,1998) le tout forme *le symbiosome*. La membrane *péribactéroïdienne* contient des composés différents de ceux de la membrane cellulaire végétale, à fonction d'échange entre la bactérie et le cytoplasme de la cellule-hôte.(Gobat et al,2003).

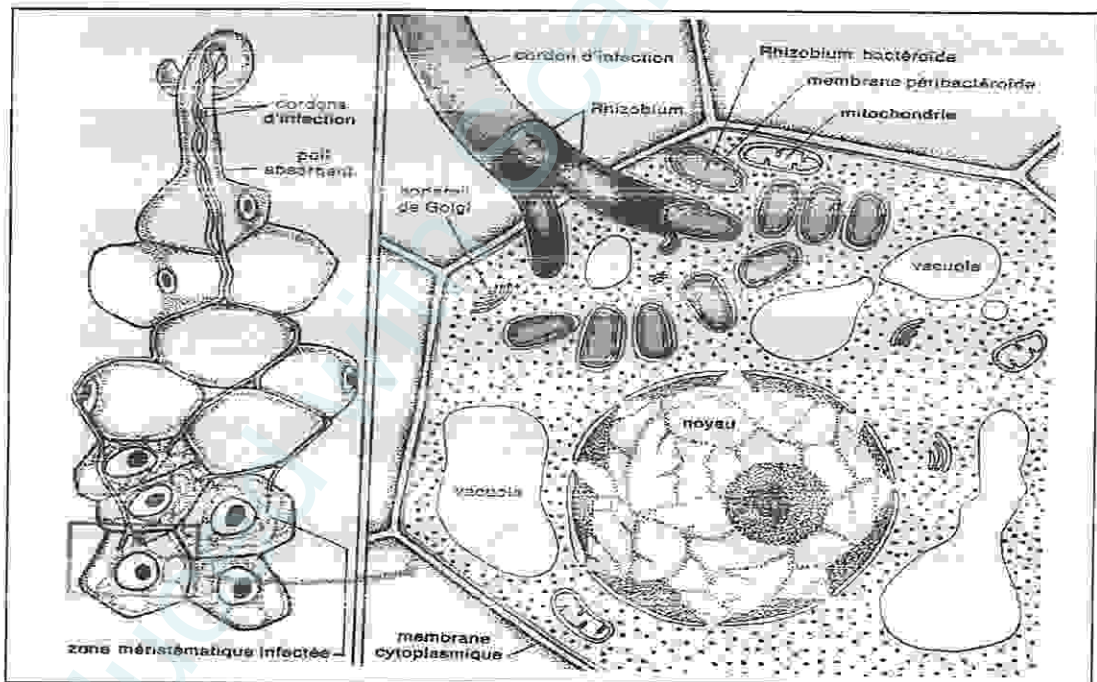


Figure 7:Stade d'endocytose des bactéries (Duhoux et Nicol,2004).

Des connexions vasculaires s'établissent avec le système vasculaire de la racine, le rôle de ces connexions est d'importer dans le nodule le carbone issu de la photosynthèse et d'exporter l'azote fixé vers les autres parties de la plante.(Hopkins,2003).

### I-1-3-6-Sénéissance du nodule

Les nodosités âgées d'environ deux mois se détachent spontanément et se détériorent en libérant leur contenu portélique dans le sol. il en va de même après la mort des végétaux, les

acides aminés et les protéines s'accumulent dans le sol où ils sont reminéralisés. (Dupuy Y et al ,2005.Mođigan et Martinko ,2007).

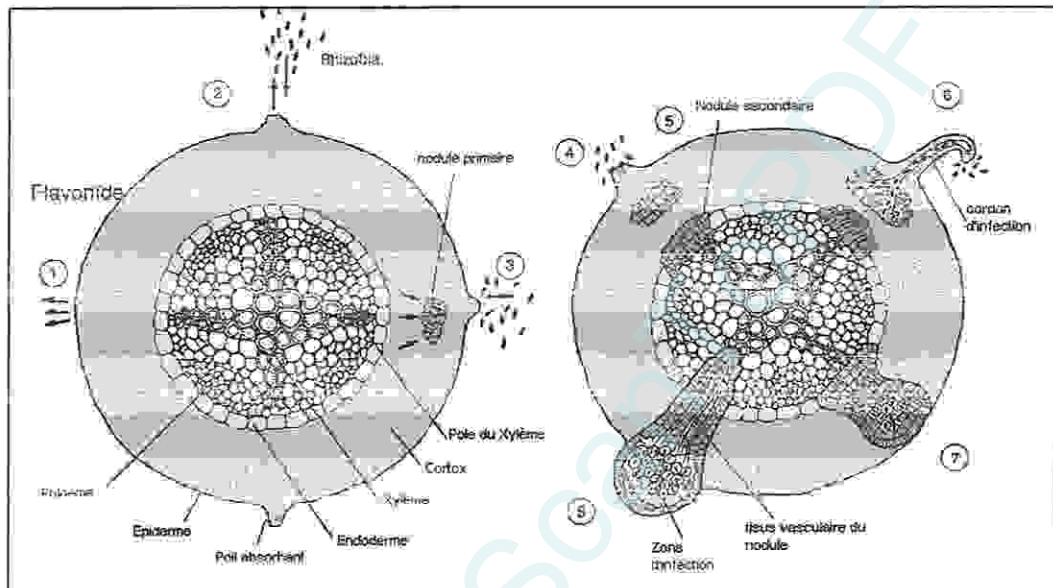


Figure 8: Etapes de la formation d'un nodule dans une racine (Chataigne, 2007) .

## I-2-Biochimie de la nodulation et de la fixation de l'azote

### I-2-1-Les protéines impliqués

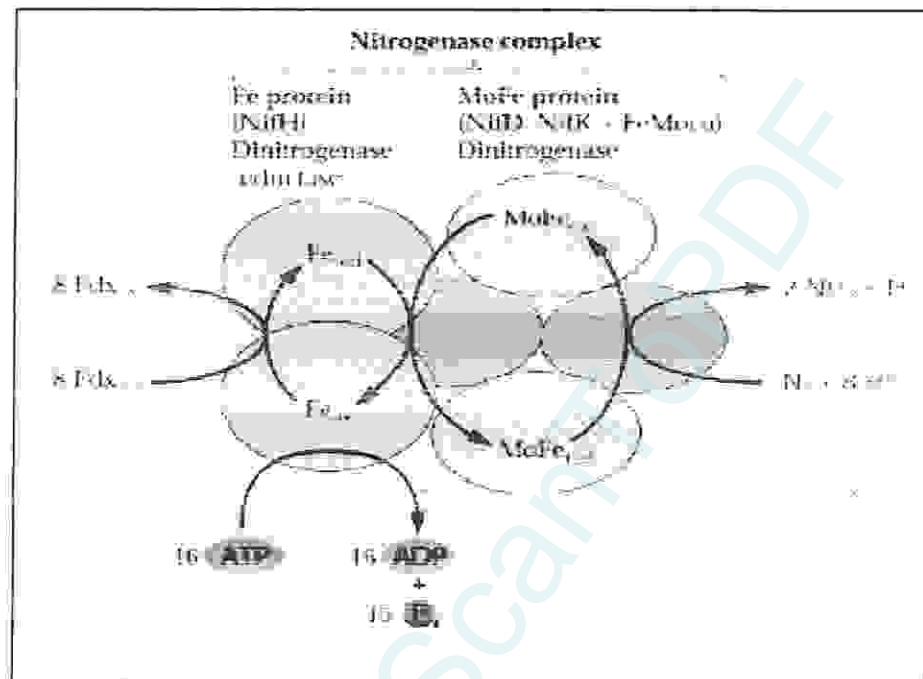
#### I-2-1-1-Nitrogénase

Est un complexe protéique multimérique bactérien composé de deux protéines de taille différente. La protéine la plus petite est un dimère de deux sous unités polypeptidiques identiques. La masse moléculaire de chaque sous unités varie de 24 à 36 KD, selon l'espèce bactérienne. Elle est appelée *protéine à fer* (ou *dinitrogénase réductase*) car le dimère contient un cluster unique de quatre ions fer liés à quatre groupements sulfures ( $Fe_4S_4$ ). (Hopkins,2003).

La plus grande protéine du complexe nitrogénase est appelée *protéine MoFe* (*protéine à molybdène-fer* ou bien *la dinitrogénase*), c'est un tétramère formé de deux sous- unités  $\alpha$  et deux sous- unités  $\beta$  dont la masse moléculaire total est de 220KD. Chaque *protéine MoFe* contient deux ions molybdène sous la forme d'un cofacteur fer- molybdène-soufre. La protéine MoFe contient également des clusters  $Fe_4S_4$  mais dont on ne connaît pas le nombre exacte. Il varie en fonction de l'espèce et sa condition biologique. (Hopkins,2003).



C'est au niveau de la *dinitrogénase* que l'azote moléculaire est réduit en ammoniac tandis que la *dinitrogénase réductase* assure le transfert des électrons. (Duhoux et Nicol ,2004).



**Figure 9:** Structure moléculaire de nitrogénase (Basdeviveise, 2008).

#### 1-2-1-2-Leghémoglobine

Protéine très proche, par sa structure et sa fonction, de l'hémoglobine des vertébrés. Transporteuse d'oxygène, elle colore en rose ou rouge les nodosités fonctionnelles. elle possède un groupement prosthétique (l'hème) synthétisé par les bactéroïdes, et une partie protéique fabriquée par la plante ( Gobat et al,2003). C'est lié à la Leghémoglobine que l'oxygène est amené à l'oxydase terminale de la chaîne respiratoire bactérienne. La Leghémoglobine est un produit, une propriété émergente du système symbiotique. ( Gobat et al,2003)



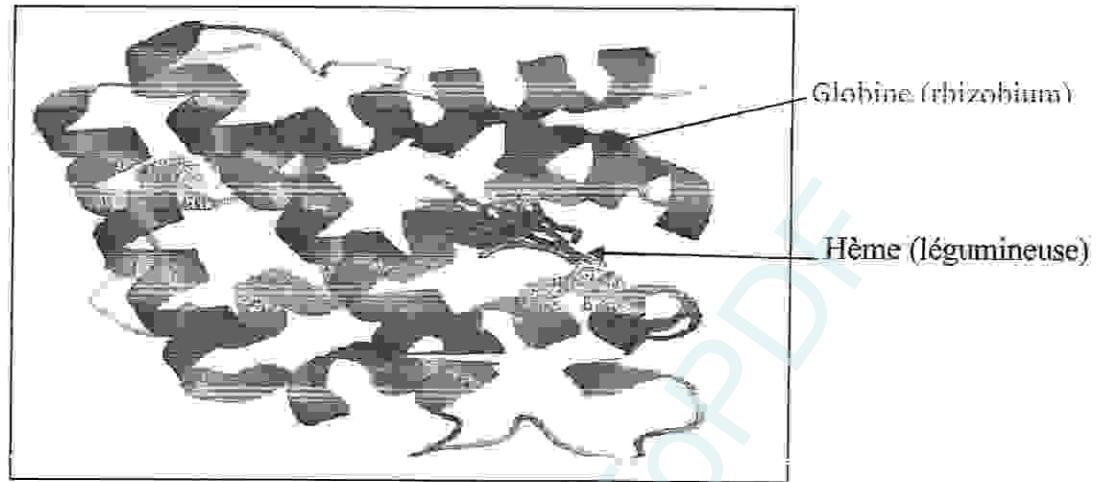


Figure10 : Structure tertiaire de la Leghémoglobine (Duhoux et Nicol ,2004)

**I-2-1-3-Protéine NOD (facteur NOD)**

Les facteurs Nod sont des lipooligosaccharides composés de 3 à 5  $\beta$ 1-4N-Acetylglucosamines portant sur leur sucre non réducteur un groupement acyle et sur leurs deux extrémités des substituants divers (fucose, sulfate, acétyle, carbanoyle) dépendant de la souche bactérienne (Chataigne,2007). Ces lipochitooligomères sont sécrétés dans le milieu externe et vont déclencher une série de modifications chez la plante. Ils sont impliqués dans les stades les plus précoces de la reconnaissance entre les deux partenaires et induisent les modifications du poil absorbant, débutant ainsi l'organogenèse du nodule. ( Chataigne, 2007)

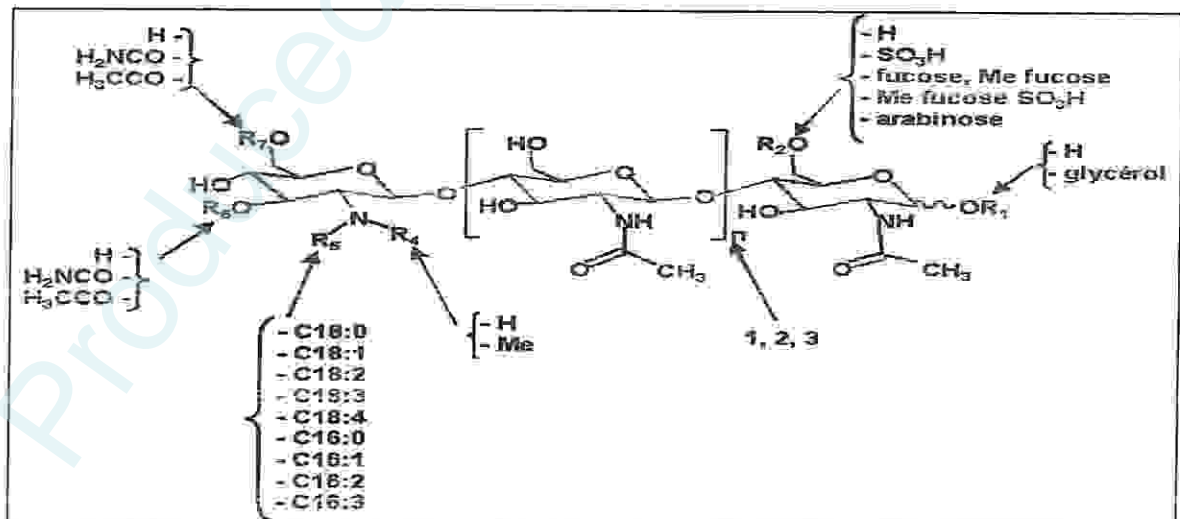


Figure11: Schéma structural d'un facteur Nod (Chataigne, 2007).

### I-2-1-4-Ferredoxine

La ferrédoxine chez les bactéries symbiotiques est une protéine de 11 kDa faiblement liée à la membrane qui contient un centre [Fe-S]. C'est la protéine transporteuse des électrons du fer vers le molybdène. (14)

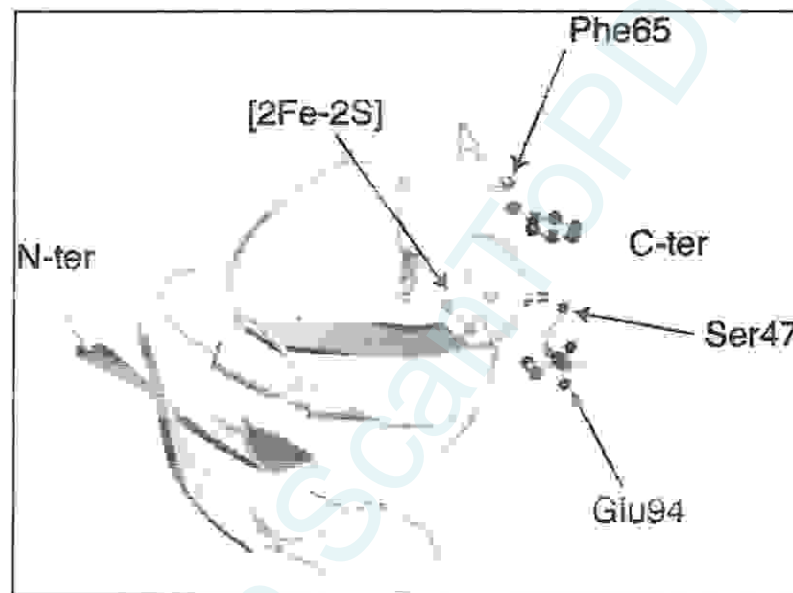
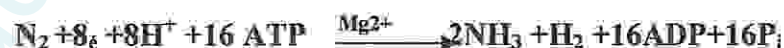


Figure 12: Structure tertiaire de la ferrédoxine (15)

### I-2-2-Mécanisme biochimique

#### I-2-2-1-Réduction de l'azote (N<sub>2</sub>) en ammoniac (NH<sub>3</sub>)

Le processus de fixation d'azote moléculaire de l'air a lieu dans la nodule, mais cette propriété est limitée à la seule bactérie. La conversion de l'azote moléculaire en ammonium est réalisée grâce à un complexe enzymatique nommé nitrogénase. La réaction globale de fixation de l'azote moléculaire est la suivante : (Duhoux et Nicol, 2004).



La réduction de diazote se déroule en deux étapes :

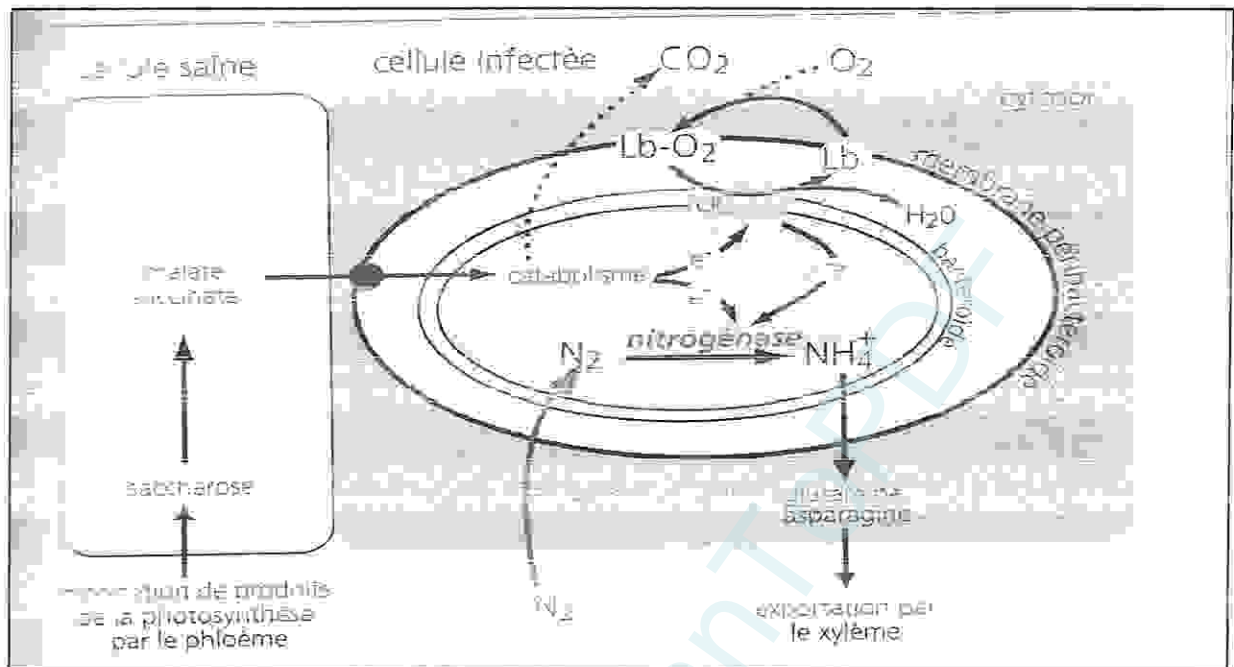
- **La première étape :** La protéine Fe est réduite par un donneur primaire d'électron, habituellement la ferrédoxine (une petite protéine de 14 kDa contenant un groupement fer-soufre). Les électrons sont transportés par le fer, qui peut se trouver soit à l'état de fer ferreux réduit (Fe<sup>2+</sup>) soit à l'état de fer ferrique, oxydé (Fe<sup>3+</sup>). (Hopkins, 2003). Il est intéressant de noter que la ferrédoxine participe non seulement à la fixation de l'azote, mais qu'elle est aussi un transporteur d'électrons important dans la photosynthèse. (Hopkins, 2003).

- **La seconde étape:** La protéine Fe réduite transfère les électrons à la protéine MoFe, qui catalyse à la fois la réduction du diazote gazeux et la production d'hydrogène. Le rôle précis de l'ATP est de réagir avec la protéine Fe réduite est d'intervenir dans le transfert des électrons entre la protéine Fe et la protéine MoFe. (Hopkins, 2003). L'ammoniac libéré s'approprie un autre proton pour donner de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), que les végétaux peuvent absorber (Campbell N.A et al,2004)

L'ATP, les électrons et les protons utilisés proviennent de l'oxydation des acides organiques (malate, succinate, fumarate) issus de la conversion de saccharose produit par la photosynthèse du végétale qui est apporté par le phloème jusqu'à la nodosité. (Basdeviveise,2008).

#### I-2-2-2-Assimilation de ammonium

L' ammonium est transformé en glutamine puis en acide glutamique suivis de l'alanine et de l'aspartate (Basdeviveise,2008). en se combinant à l'acide cétonique dérivé du métabolisme des glucides produits par la photosynthèse. Cela nécessite deux enzymes :GS la *glutamine synthétase* et GoGAT la *glutamine-2-cétoglutarate aminotransférase* ou *glutamate synthétase* chez les nodule indéterminés les acides aminés formés sont exportés du nodule vers la plante sous la forme asparagine et glutamine et sont utilisés pour la synthèse protéique. (Dupuy Y ,2005) et sous forme d'uréides dans les nodules déterminés. (Vernié,2008).



**Figure13** :La division de travail entre bactéroïdes et racine de fabacées pour la fixation de  $N_2$  (Basdeviveise, 2008)

### I-2-2-3-Nitrogénase et l'oxygène

La nitrogénase est inhibé par l'oxygène, mais le métabolisme des bactéroïdes, comme celui de la cellule hôte, est aérobie. Un compromis entre ces deux exigences existe grâce à trois processus appelés *protection conformationnelle* : (Modigan et Martinko, 2007).

- **La diffusion de l' $O_2$**  : Par les espaces intercellulaires jusqu'aux bactéroïdes est limitée, car les tissus corticaux de la nodosité sont compacts et peu perméables à l'oxygène. (Basdeviveise, 2008).
- **Les respirations des bactéroïdes** : Les bactéroïdes dans les cellules hôte sont très nombreux (800 bactéroïdes par cellule chez le soja) consomment la majeure partie de l' $O_2$ . (Basdeviveise, 2008).
- **La synthèse d'une hémoprotéine fixant réversiblement l' $O_2$**  : La leghémoglobine, protéine qui facilite le transport de l'oxygène aux bactéroïdes, à une faible pression partielle, sans endommager le complexe nitrogénase. (Duhoux et Nicol, 2004).



## chapitre III

# Génétique de la nodulation

Produced with ScantOPDF

## I - Les principales groupes des gènes

Plusieurs groupes de gènes bactériens et végétaux contribuent à la nodulation et à la fixation biologique de l'azote.

### I-1-Premiers stades de nodulation : Avant l'infection de la racine

#### I-1-1-Chez la bactérie

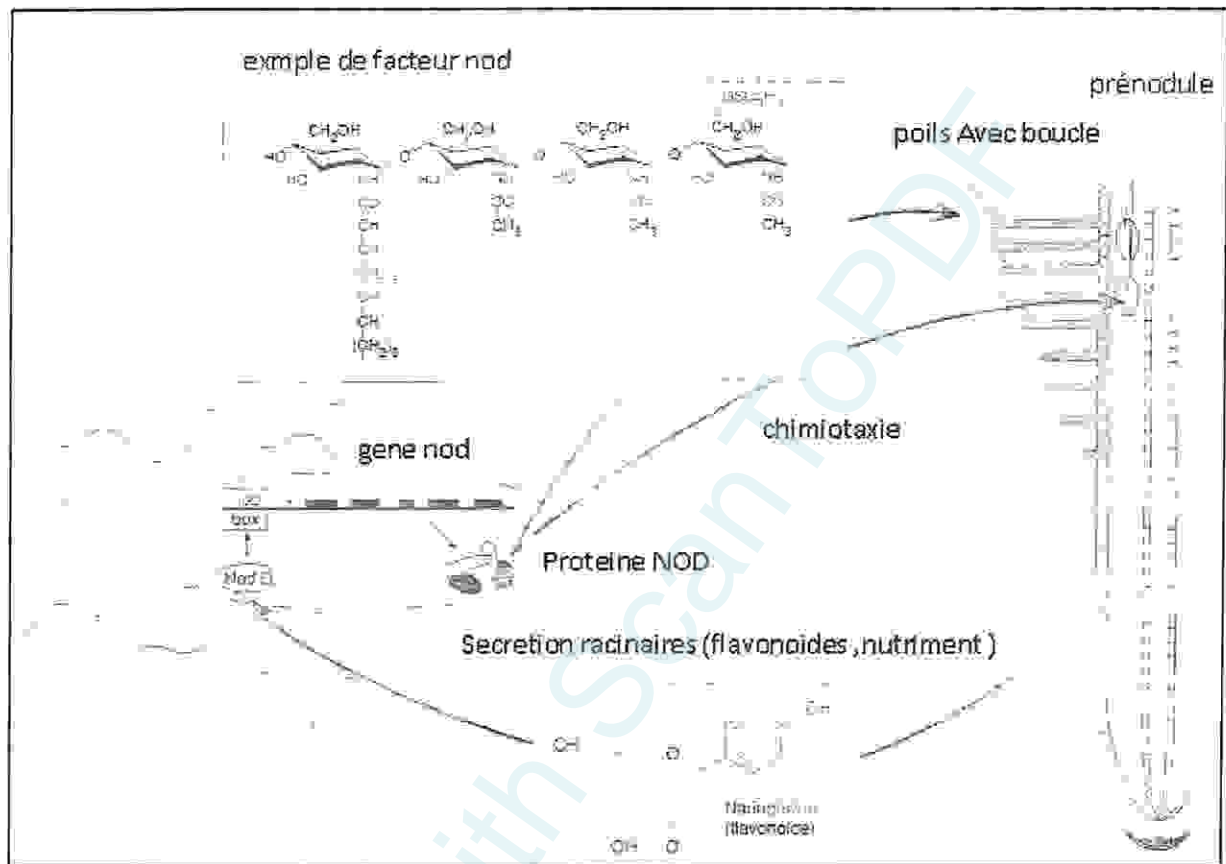
Les gènes *nod* ou gènes de la nodulation ( contrôlent l'infection) sont activés par les flavonoïdes des exsudats racinaires émis par l'hôte . Ils sont au nombre de 20 à 30 , localisés sur un plasmide géant appelé plasmide *Sym*( pour symbiose)et chez d'autres espèce sur le chromosome .Les gènes sont les suivants,(Hopkins,2003.Dupuy Y ,2005).

- **Gènes communs (*nod ABC*)** : Ils codent pour le squelette chitino-oligosaccharidique des facteurs de nodulation (facteur NOD) reconnu par des kinases végétales (Hopkins,2003).Des mutations au niveau de ces gènes codant au phénotype *nod*-(les bactéries n'arrivent pas à déclencher la formation d'un nodule) (Sharma et al. ,1993.,Gage,2004 cité in Gharzouli, 2006). *nodC* code pour une protéine qui s'incorpore sur la membrane de la surface bactérienne et peut intervenir dans le déplacement de la bactérie vers la plante.*nodA* et *nodB* peuvent produire des composants à faible poids moléculaire favorisant la croissance des plantes, en stimulant la division cellulaire (Gage,2004 cité in Gharzouli, 2006).

- **Gène régulateur (*nod D*)** : Est transcrit de manière constitutive , son produit est la protéine NodD qui est influencée par les exsudats racinaires (les flavonoides ), ainsi son produit (protéine NodD) se lie aux sites régulateur *les(nod-box)* opéron porteurs des autres gènes *nod* en activant leur transcription .( Gobat et al.,2003.Hopkins,2003).

- **Gènes de spécificité (*nod EFGHOP*)** : Ces gènes de spécificité d'hôte appelés aussi les *hns* (host specificity of nodulation) , codent des enzymes, catalysant la décoration du squelette oligochitinique à l'aide de substitutions particulières (sulfate, acétate, méthyle...)qui confèrent aux facteurs Nod leur spécificité.(Hopkins,2003). Une mutation au niveau de ces gènes a pour effet de provoquer un changement de la spécificité de la souche à son hôte ; exemples : la mutation au niveau des gènes *nodE* et *nodF* peut réduire ou retarder la nodulation de *Rhizobium leguminosarum* (Pelmont,1995 cité in Gharzouli, 2006).

Il existe d'autres types de gènes impliqués dans la mise en place des décorations qui sont les gènes *nol* et *noe* (*noeE*, ou *nolL*.....), (Godfroy\_O. 2008),(10),(11)



**Figure 14:** Dialogue moléculaire entre la racine et les *Rhizobiums* ( Gobat et al. ,2003)

### I-1-2-Chez la plante

- **Genes codant des récepteurs pour les facteurs NOD :** Ce sont des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs kinases LysM-RLKs (LysM- Receptors Like Kinases) possédant un domaine kinase coté intracellulaire C-terminal (RLK, Receptor like kinase) un domaine sérine/thréonine kinase, un domaine central transmembranaire et des motifs riches en LysM (interaction avec les facteurs NOD) coté extracellulaire N-terminal. Il pourrait y avoir deux types de récepteurs, un contrôlant l'infection de la racine par la bactérie, l'autre autorisant la courbure des poils absorbants et l'activation des cellules corticales . ( Godfroy.2008). Chez *Lotus japonicus* ce sont les gènes *LjNFR5* et *LjNFR1* (NFR1 et NFR5) (Nod Factor Receptor) alors que chez *Medicago truncatula* ce sont les gènes *MtLYK3*, (*LYSM domain containing receptor like Kinase 3*) *MtNFP* (nod factor perception) ( Godfroy.2008).

- **Les gènes DM12 :** codant pour une récepteurs-Kinase qui pourrait être impliqué dans la perception des deux types de signaux symbiotique bactérien et fongique (Denarié et al .,2004,cité in Gharzouli ).

- **Les gènes DMI1** : codant pour une protéine largement répandue dans le règne végétal mais absente chez les animaux, cette protéine est indispensable pour générer les oscillations périodiques de la concentration en calcium, il s'agit d'un canal ionique. (Denarié et al 2004, cité in Gharzouli)

- **Les gènes DMI3** : code pour une protéine -kinase, calcium et calmoduline dépendante dont la fonction est vraisemblablement d'interpréter des signatures calciques, cette protéine intervient en aval que DMI1 et DMI2 dans la voie de signalisation (Denarié et al., 2004, cité in Gharzouli).

## I-2-Stade tardif de nodulation

Le développement d'un nodule fonctionnel nécessite l'intervention d'un autre groupe de gènes.

### I-2-1-Chez la bactérie

- **Gènes *nif* ou gène de la nitrogénase (responsable du pouvoir fixateur)**

Ils sont au nombre de 20, organisés en 8 unités de transcription découvertes également sur des plasmides bactériens sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation de l'azote. Il intervient seulement après la formation du nodule la transcription des opérons *nif* étant elle-même sous le contrôle d'un gène *nif* régulateur (Dupuy Y. 2005). Ces gènes sont décrits chez *Klebsiella*. Elles sont constituées de gènes *nifD* qui code les deux sous-unités  $\alpha$  et les gènes *nifK* qui code les autres deux sous-unités  $\beta$ . (William, 2003 cité in Gharzouli, 2006). Les gènes *nifH* qui codent la dinitrogénase réductase formée de deux sous-unités identiques *Y*. (Modigan et Martinko, 2007). Les 5 gènes *nifQ*, *B*, *V*, *Net*, *E* codent pour des protéines dont le produit est impliqué dans la biosynthèse et l'assemblage du cofacteur Fe-Mo. Alors que le produit des gènes *nifF* et *J* sert au transport des électrons synthétisés par la flavodoxine et le pyruvate flavodoxine oxydoréductase. Le produit des gènes *nifS* et *U* prend une place dans le processus de la dinitrogénase et celle de *nifM* dans le processus de la dinitrogénase réductase (Werner, 1992 cité in Gharzouli, 2006).

Le gène *nifA* code une protéine régulatrice positive qui active la transcription des autres gènes *nif*. (Modigan et Martinko, 2007).

*NifL* est un régulateur négatif de l'expression des gènes *nif* (Modigan et Martinko, 2007)

La fonction de *nifW*, *X*, *Y* et *Z* est non connue. (Werner, 1992 cité in Gharzouli, 2006).



- **Gènes *fix***

Ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques code pour une ferrédoxine impliqué dans transport des électrons dans le transport vers la nitrogénases. (Hopkins,2003).

Il existe d'autres gènes sont également nécessaires en particulier des gènes impliqués dans la synthèse des composants de la paroi bactérienne comme des exopolysaccharides (gène *exo. exs.pss*), lipopolysaccharides (gène *lps*) ou  $\beta$ -glucane (gène *ndv*). (Heller et al, 2004).

### I-2-2-Chez la plante

Les nodulines sont des protéines exprimées dans les plantes hôtes en réponse à des stimuli provenant des bactéries symbiotiques. on distingue des nodulines précoces, et des nodulines tardives :

- **Gènes de noduline précoce (ENOD : early nodulins)**

sont exprimés pendant le processus d'infection et le développement de nodule (Vernié,2008) leur rôle n'est pas clairement établi. Ils semblent impliqués dans la production de la membrane plasmique qui délimite le cordon d'infection ainsi que dans la formation du méristème nodulaire. (Hopkins, 2003).

- **Gènes de noduline tardive**

L'expression des nodulines tardives coïncide plus ou moins avec le début de la fixation d'azote et la maturation du nodule (Vernié,2008) , elles semblent impliquées dans le fonctionnement et la maintenance de la nodule. La *leghémoglobine* est la noduline tardive la plus abondante. D'autres nodulines tardives comprennent des enzymes qui comme *l'uricase* ou *la glutamine synthétase* interviennent dans le métabolisme de l'azote fixé. (Hopkins, 2003).

## II- La voie de perception et de transduction de facteur NOD

### II-1-Structure et localisation des protéines impliquées

#### II-1-1-Les protéines de la famille des LysM-RLK

Ces protéines, se localisent au niveau de la membrane plasmique des cellules et de la membrane des cordons d'infection .qui présentent toutes un peptide signal, trois domaines LysM, un domaine transmembranaire et un domaine sérine/thréonine kinase, peuvent être classées en quatre groupes sur la base de leurs séquences :

- **Type NFP et LYR1** : dont le domaine kinase ne présente aucun des trois domaines fonctionnels caractéristiques ( Arrighi et al.,2006)
- **Type LYR2, 3 et 4** : dont le domaine kinase présente la boucle d'activation ( Arrighi et al.,2006).
- **Type LYK** : dont le domaine kinase qui présente les trois domaines fonctionnels semble posséder une activité enzymatique (Arrighi et al.,2006)
- **Type LYR5 et 6** : qui présente la même structure que le type LYK, mais qui est phylogénétiquement éloigné des protéines LYK et des autres LYR ( Arrighi et al.,2006)

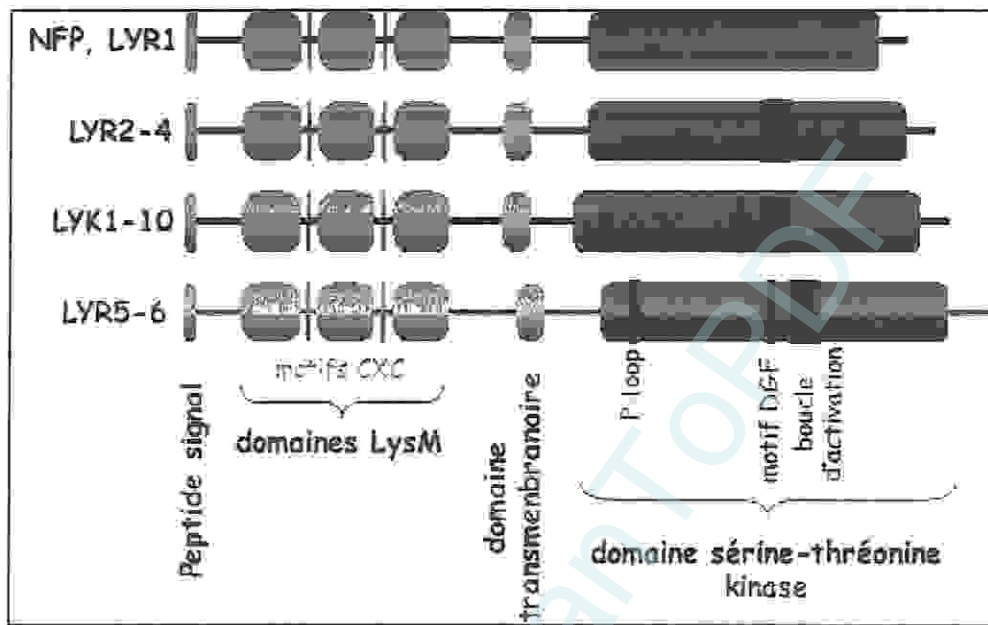


Figure15 : Structure de la protéine de la famille des LysM-RLK ( Arrighi et al.,2006)

### II-1-2-La protéine DMI2

Présent au niveau de la membrane plasmique des cellules et de la membrane des cordons d'infection se compose, du côté N-terminal au C-terminal, d'un peptide signal qui permet l'adressage de la protéine à la membrane plasmique, d'un domaine prédit pour être extracellulaire et présentant trois répétitions de type « leucine rich repeat » (LRR), d'un domaine transmembranaire (TM), et d'un domaine, prédit pour être intracellulaire, de type sérine/thréonine kinase ( Limpens et al., 2005)

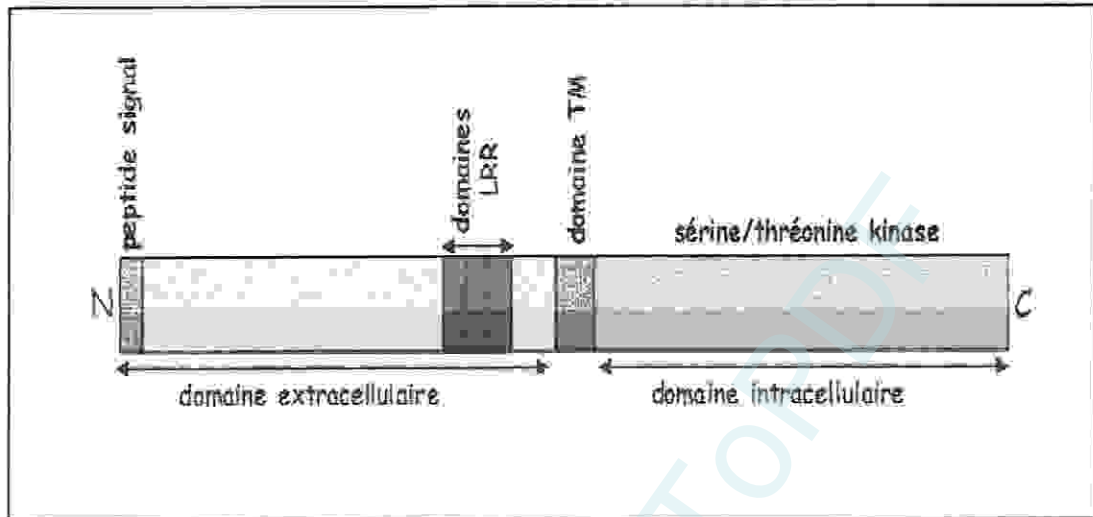


Figure16 : Structure de la protéine DMI2 ( Limpens et al., 2005).

### II-1-3-la protéine DMI1

DMI1 est localisé au niveau de l'enveloppe nucléaire des poils absorbants. Le réticulum endoplasmique qui est en continuité avec l'enveloppe nucléaire constitue une réserve intracellulaire en calcium importante. Ceci suggère que DMI1 pourrait être impliqué directement dans la génération du calcium spiking. (Kelly-Skupek et Irving, 2006).

La séquence déduite de la protéine DMI1 présente une homologie faible mais significative avec des canaux ioniques bactérien. Un domaine riche en proline et un domaine de type « leucine zipper » du côté N-terminal suggèrent des interactions protéine-protéine. Quatre domaines transmembranaires permettent d'ancrer la protéine dans la membrane nucléaire. Du côté C-terminal deux domaines TrkA-N et TrkA-C présentent une homologie significative avec le domaine RCK de la protéine MthK (*Methanobacterium thermoautotrophicum* potassium channel) qui régule le passage des ions potassium dans le canal. (Kelly-Skupek et Irving, 2000).



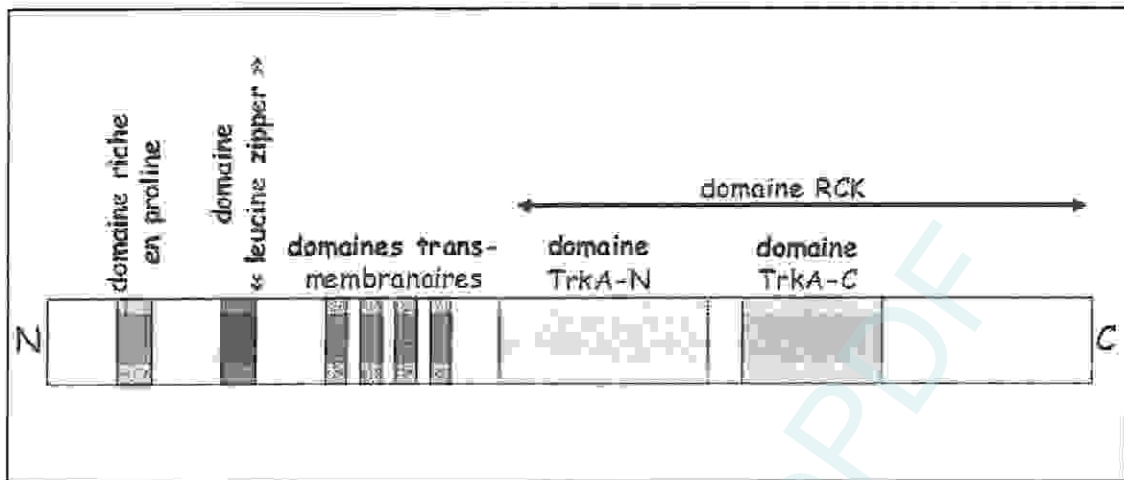


Figure 17 : Structure de la protéine DMII (Kelly-Skupek and Irving, 2006).

#### II-1-4-Proteine de DMI3

une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CCaMK) La protéine DMI3 se localise de façon très stricte dans le noyau des cellules racinaire (Smit, et al., 2005), présente une double sensibilité au calcium de par son domaine carboxy-terminal de type visinine présentant 3 mains-EF et de par son domaine central auto-inhibiteur pouvant lier la calmoduline. Ces deux domaines de sensibilité au calcium permettent le fonctionnement du domaine N-terminal : une sérine/thréonine kinase précédée d'une séquence d'adressage au noyau (NLS). (Vernie, 2008)

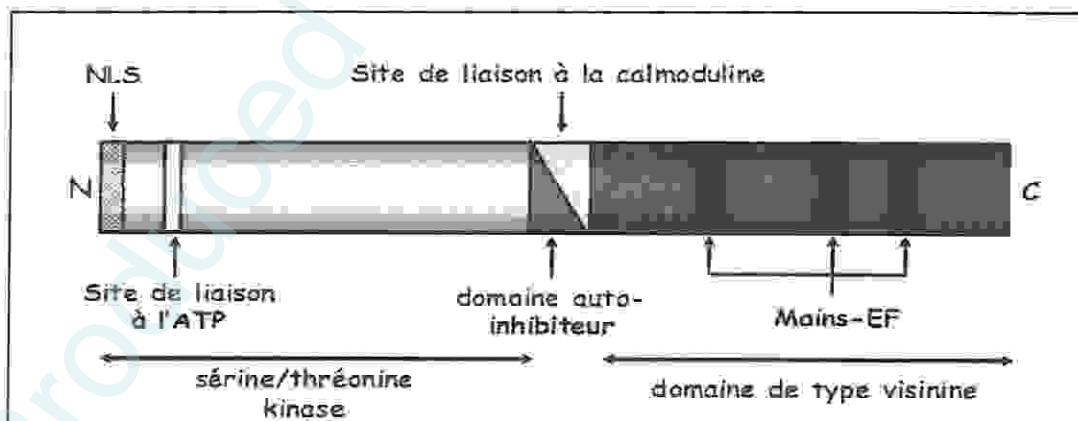


Figure 18 : Structure de la protéine DMI3. (Vernie, 2008)

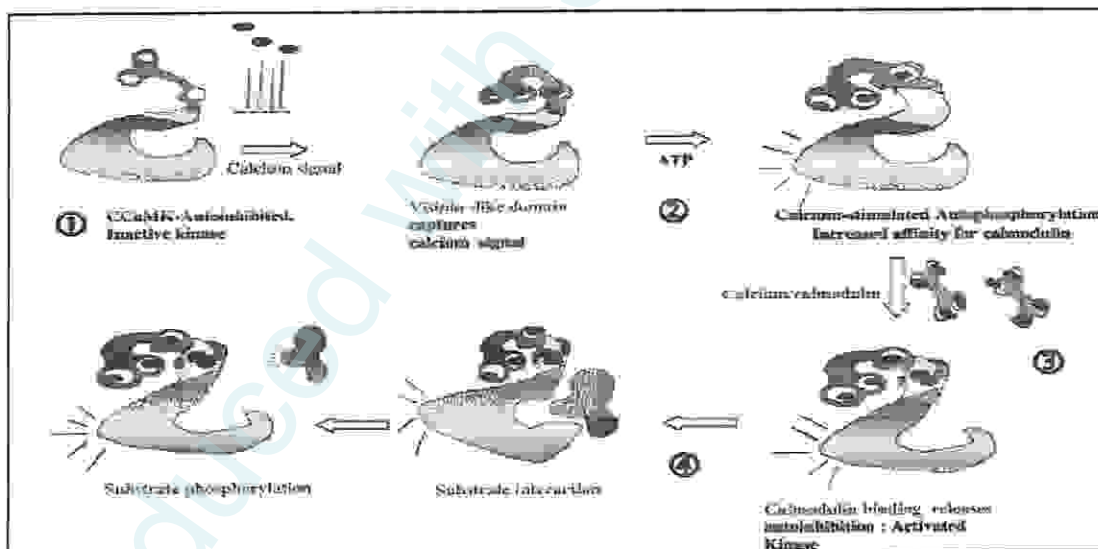
#### • processus d'activation d'une CCaMK

DMI3 possède une structure unique présentant une double sensibilité au calcium. L'activité du domaine sérine-thréonine kinase N-terminal de la protéine est en effet régulée d'une part par un domaine central d'autoinhibition qui peut lier la calmoduline, et d'autre part

par un domaine de type visinine C-terminal, présentant trois mains EF capables de lier chacune un ion calcium (Sathyanarayanan, et al. 2000).

Ce type de protéine, nommé CCaMK en anglais pour « Calcium and CalModulin dependent protein Kinase », a été identifié pour la première fois chez le lis. Les analyses biochimiques de cette protéine ont permis de proposer un mode d'activation. (Vernie, 2008).

Les ions calcium libérés au cours du signal calcique se fixent sur les mains EF du domaine de type visinine, ce qui induit une autophosphorylation de la protéine. (Sathyanarayanan, et al., 2000) (Sathyanarayanan, et al., 2000). Cette autophosphorylation déclenche une modification de conformation qui augmente l'affinité du domaine central pour la calmoduline. Cette protéine, qui a elle-même fixé des ions calcium, vient alors se fixer à la calmoduline au niveau du domaine central et lève ainsi l'inhibition que ce domaine exerce sur la kinase, permettant ainsi la phosphorylation des cibles et la transduction du signal calcique (Sathyanarayanan, et al., 2000).



**Figure 19 :** Processus d'activation d'une CCaMK (Sathyanarayanan, et al., 2000)

### II-1-5- Autres protéines

Les protéines G, sont associée avec les changements dynamiques du cytosquelette microtubulaire et d'actine, elle est formées de trois sous unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) fixées à la face interne de la membrane plasmique sont activées par un récepteur membranaire (Kelly-Skupek et Irving, 2006).



NSP1 protéines régulatrices de la famille GRAS (Giberellin-insensitive, Repressor of Giberellic Acid, Scarecrow-like) (554 Acides Aminés), à localisation nucléaire de. (Smit, et al., 2005).

NSP2 protéines régulatrices de la famille GRAS (Giberellin-insensitive, Repressor of Giberellic Acid, Scarecrow-like) (508 Acides Aminés) localisé dans l'enveloppe nucléaire, avant traitement aux facteurs Nod et relocalisation de NSP2 dans les noyaux des poils absorbants après ajout de facteurs Nod. (Smit, et al., 2005).

## II-2-Modèle de perception et de transduction de facteur nod chez *M.*

### *truncatula*

Le modèle est proposé avec les protéines précédemment citées (de la voie de perception et de transduction de facteur nod) découvertes chez *m. truncatula*, le « récepteur d'entrée » constitué des récepteurs-like kinases, LYK3 et d'une autre protéine qui pourrait être NFP mais n'interviendrait pas dans la voie de signalisation menant à l'expression des nodulines précoces. (Oldroyd et Downie, 2006).

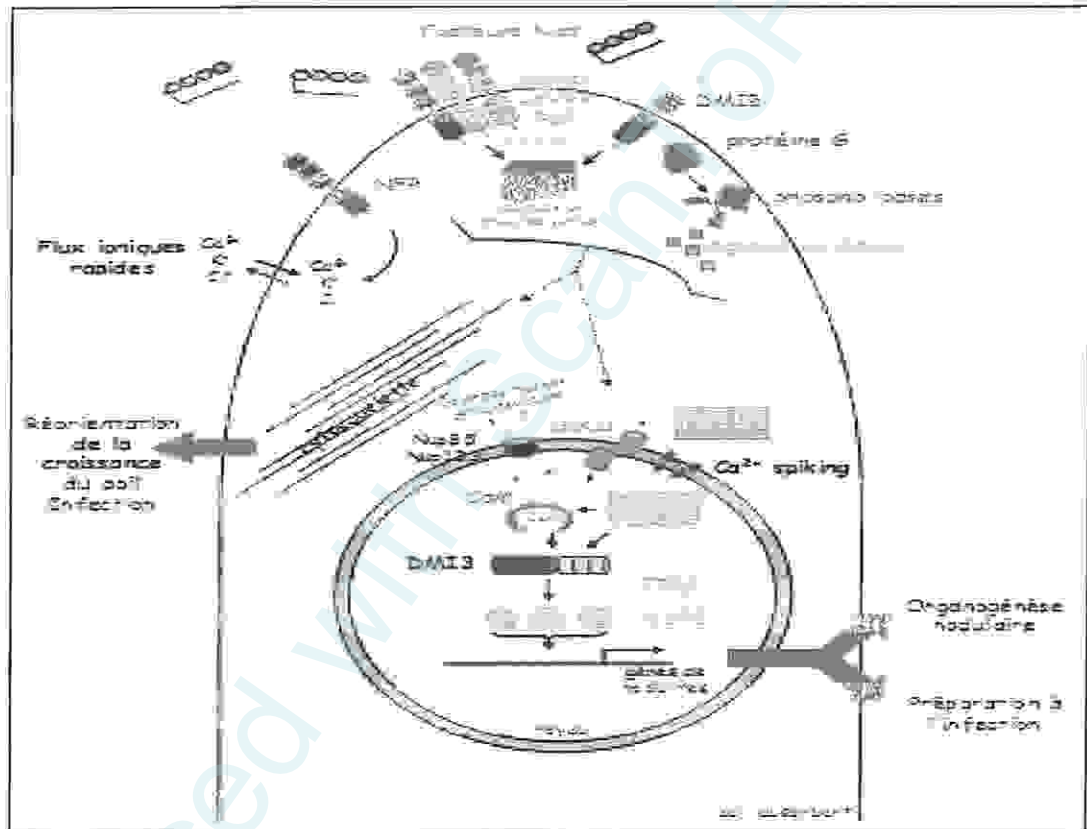
Le « récepteur de signalisation » serait constitué de deux récepteurs-like kinases possédant chacun trois domaines LYSM : NFP et une deuxième protéine de type LYK. Un autre récepteur-like kinase, DMI2, interviendrait lors de la transduction du signal. La cascade de phosphorylation suivant la perception des facteurs Nod impliquerait la production d'un second messager via les phospholipase. (Oldroyd et Downie, 2006)

Les nucléoporines nécessaires aux oscillations calciques, pourraient être impliquées dans le passage du second messager vers le noyau. DMI1, un canal à cation serait activé et contrôlerait la libération du calcium via des canaux calciques de l'enveloppe nucléaire. Associé à des pompes calciques utilisant de l'ATP et permettant de reconstituer le stock de calcium, il contrôlerait les oscillations calciques. Ces oscillations calciques nucléaires activeraient DMI3, une protéine kinase calcium calmoduline dépendante. (Oldroyd et Downie, 2006)

DMI3, peut-être, régulerait l'expression des nodulines précoces via les protéines de type GRAS, NSP1 et NSP2 ainsi que les facteurs de transcription ERN. Un complexe formé d'homodimères de NSP1 et NSP2, interagirait via NSP2 avec DMI3 et se lierait sur le promoteur de la noduline *ENOD11* via NSP1. régulerait l'expression de la noduline précoce *ENOD11* (Oldroyd et Downie, 2006).



Les données pharmacologiques nous indiquent que dans les secondes qui suivent la perception des facteurs Nod par la plante il se produit un influx d'ions calcium accompagné par un efflux de chlore et de potassium, quelques minutes après, des protéines-G et une signalisation lipidique sont probablement mises en jeu pour générer les oscillations calciques, après quelques heures une réorganisation du cytosquelette qui conduit à la déformation des poils absorbants et à la réorientation de leur croissance apicale. (Godfroy,2008).



**Figure 20.**Modèle proposé pour la voie de perception/transduction du signal «facteurs Nod » au niveau du poil absorbant (Oldroyd et Downie, 2006).

### III-Régulation de la fixation azotée

Chez *klebsiella pneumoniae* Le gène *nifA* code une protéine régulatrice positive qui active la transcription des autres gènes structurels *nif*, alors que *nifL* est un régulateur négatif de l'expression des gènes *nif*. *nifL* contient une molécule de FAD (*FAD* est un enzyme rédox des flavoprotéines), qui est impliqué dans la détection d' $O_2$  par la protéine.

Lorsque l'oxygène est en quantité suffisante, *nifL* fonctionne en arrêtant la transcription des gènes *nif* afin d'empêcher la synthèse de la nitrogénase sensible à l'oxygène.



L'ammoniac réprime la fixation de  $N_2$  par l'intermédiaire d'une seconde protéine, nommée *Ntrc*, dont l'activité est régulée par la teneur en azote de la cellule. Lorsque l'ammoniac est limitant, *Ntrc* est active, et promeut la transcription de *nifA*. La protéine d'activation de la fixation d'azote, *nifA* est alors produite, et la transcription de *nif* commence.

L'ammoniac produit par la nitrogénase ne réprime pas la synthèse d'enzyme, car aussitôt formé, il est incorporé dans des formes organiques de l'azote et utilisé pour la biosynthèse. Mais lorsque l'ammoniac est en excès (comme dans les milieux naturels ou les milieux de culture), la synthèse de la nitrogénase est rapidement réprimée. de cette façon, l'ATP n'est pas gaspillé en fabriquant un produit déjà disponible en grandes quantités. (Modigan et Martinko, 2007).

Chez certaines bactéries fixatrices d'azote, l'activité de la nitrogénase est aussi régulée par l'ammoniac, dans un phénomène nommé *ammonia switch-off effect*. Dans ce cas, l'excès d'ammoniac produit une modification covalente de la dinitrogénase réductase, ce qui se traduit par une perte d'activité de l'enzyme. Lorsque l'ammonium devient à nouveau limitant, cette protéine modifiée est reconvertie en sa forme active, et la fixation de  $N_2$  répond. (Modigan et Martinko, 2007).

#### IV-Surface cellulaire rhizobienne

Les bactéries de la famille des *Rhizobia* sont de type  $\alpha$ -proteobacter, et possèdent une physiologie classique de Gram négatif. Ainsi, leur paroi est composée de trois parties : une bicouche phospholipidique, la frontière entre le milieu externe et le cytoplasme, puis une couche de peptidoglycane séparée par un espace périplasmique de la membrane externe. Cette membrane externe asymétrique est constituée sur sa face interne de phospholipides et de lipoprotéines et, sur sa couche externe, de lipopolysaccharides. (Chataigné, 2007).

Au voisinage proche de la membrane externe, une couche supplémentaire composée de polysaccharides capsulaires entoure la bactérie. (Chataigné, 2007) Une troisième catégorie de polysaccharides se trouve encore plus en surface des bactéries : les exopolysaccharides. Ils sont continuellement secrétés dans la rhizosphère ou dans le canal d'infection, mais leur production est stoppée une fois le nodule atteint. Dans les conditions de stress hydrique, ces polysaccharides transforment leur environnement en gel afin de maintenir une couronne humide autour de bactérie. (Chataigné, 2007).

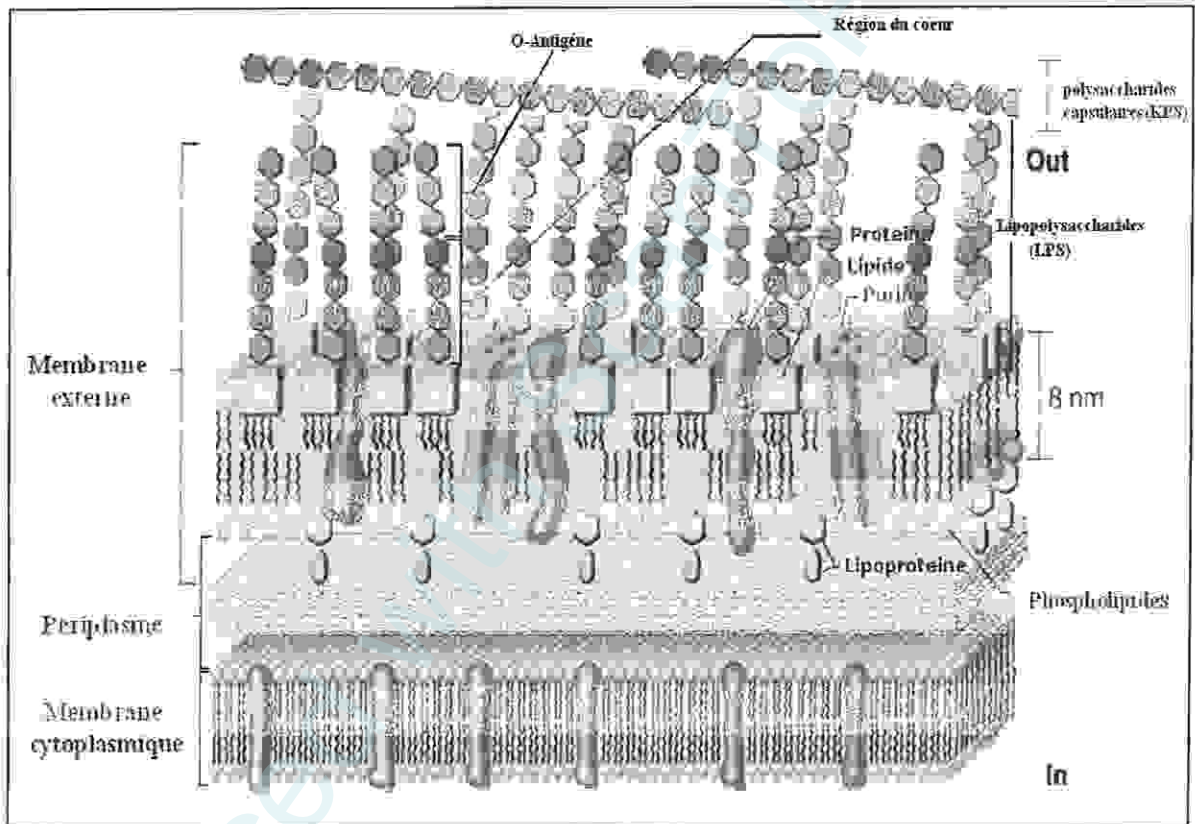


Figure 21: Structure de la Surface cellulaire Rhizobienne (Chataigné, 2007)

#### IV-1-Polysaccharides de surface

##### IV-1-1-Les exopolysaccharides (EPS)

Ce sont des composés extracellulaires abondants accumulés sur la surface cellulaire et secrétés dans l'environnement de la cellule. Deux types d'EPS sont attachés à la membrane externe des bactéries : les  $\beta$ -glucanes cycliques, généralement situés dans l'espace périplasmique, mais pouvant aussi être secrétés et les EPS acides, hétéropolymères complexes, avec des unités répétées d'hexoses (7 à 9) et souvent des substitués non carbohydrate comme les groupements succinates, pyruvates ou acétates (Frayssé et al., 2003)

#### IV-1-2- Les polysaccharides capsulaires (KPS) : l'Antigène K (CPS)

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.. Ces polysaccharides ont une structure analogue à celle de l'antigène KR5 d'*E. coli*, c'est pour cela que les initiales KPS leur ont été attribuées. Un motif consensus a pu être établi : il s'agit d'un polymère de disaccharide composé d'un Kdx et d'un hexose ou d'un acide uronique. (Chataigne, 2007) Ces polymères peuvent atteindre 30 kDa (pour Sm41) mais leur masse molaire est en moyenne de 7 à 12 kDa. (Chataigne, 2007).

Ils sont en général facilement identifiables sur un gel de polyacrylamide car ils se colorent au bleu d'alcan (colorant cationique formant une paire d'ions avec les Kdx). La nature particulière des Kdx les rend sensibles à l'hydrolyse acide. C'est cette propriété chimique qui induit une grande disparité dans la taille observée des KPS, qui n'est pas obligatoirement représentative des formes synthétisées *in vivo*. (Chataigne, 2007)

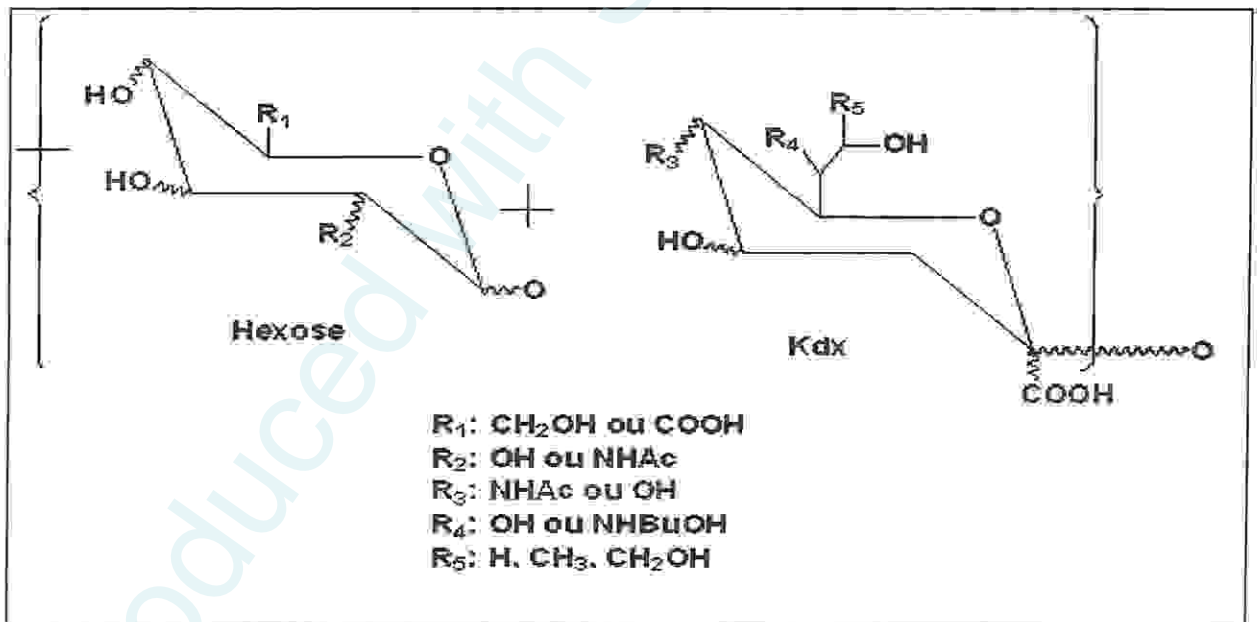


Figure 22: Modèle consensus structural des KPS établi

par Reuhs *et al.* en 1998 (Chataigné, 2007)



**Tableau 2:** Composition des unités répétitive des KPS en fonction de la souche  
(Chataign,2007)

| Souche                                 | Structure complète ou partielle   |
|--|---|
| <i>S. fredii</i> USDA205               | $[-\beta-1,4-D-Galp-(1 \rightarrow 5)-\beta-D-Kdo-(2 \rightarrow)]_n$                   |
| <i>S. fredii</i> USDA257               | $[-2-O-MeMmp \rightarrow \beta-Kdo-]_n$   |
| <i>S. meliloti</i> AK631               | $[-\beta-D-Mmp-(1 \rightarrow 5)-\beta-D-Kdo-(2 \rightarrow)]_n$                        |
| <i>S. meliloti</i> NGR247              | $[-\beta-D-Mmp-(1 \rightarrow 5)-\beta-D-Kdo-(2 \rightarrow)]_n$                        |
| <i>S. meliloti</i> NGR185              | $[-\beta-GlcA \rightarrow Pse5N(\beta-OH-But)7NAc-]_n$                                  |
| <i>S. fredii</i> USDA208               | $[-\beta-GlcNAc \rightarrow \beta-Kdo-]_n$  |
| <i>S. fredii</i> USDA201               | $[-\alpha-Gal \rightarrow \beta-Kdo-]_n$  |
| <i>Sinorhizobium</i> sp. strain NGR234 | $[-\alpha-Gal \rightarrow \beta-Kdo \rightarrow 11-2-O-MeHex \rightarrow \beta-Kdo-]_n$ |
| <i>S. fredii</i> HH303                 | $[-\beta-Glc \rightarrow 4-Pse5NAc7NAc-]_n$   |
| unité répétitive consensus             | $[-\text{Sugar} \rightarrow \text{Kdo}-]_n$   |

#### IV-1-3-Les lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont composés de trois parties : i) le lipide A qui permet d'ancrer la molécule dans la bicouche phospholipidique, ii) un oligosaccharide de coeur, iii) un antigène O. Les LPS se distinguent en deux classes suivant leurs tailles. Leur nom provient de la forme qu'ils donnent aux colonies bactériennes, Lorsque les colonies présentent un contour irrégulier, ils sont appelés r-LPS : r pour « rough ». Lorsque les colonies présentent des contours réguliers les LPS sont dits s-LPS, s pour « smooth ». (Chataigne\_2007).

Les r- LPS ne sont constitués que d'un lipide A et d'un oligosaccharide de coeur. Les sLPS sont quant à eux composés d'un lipide A, d'un oligosaccharide de coeur et des unités répétitives formant l'antigène de type O.

Une analyse sur gel d'acrylamide permet de les identifier. La coloration en jaune, après traitement au nitrate d'argent, est caractéristique de ces composés en partie lipidiques. Sur un gel de polyacrylamide, les r-LPS, de petites tailles, migrent le plus rapidement que les s-LPS. (Chataigne\_2007).



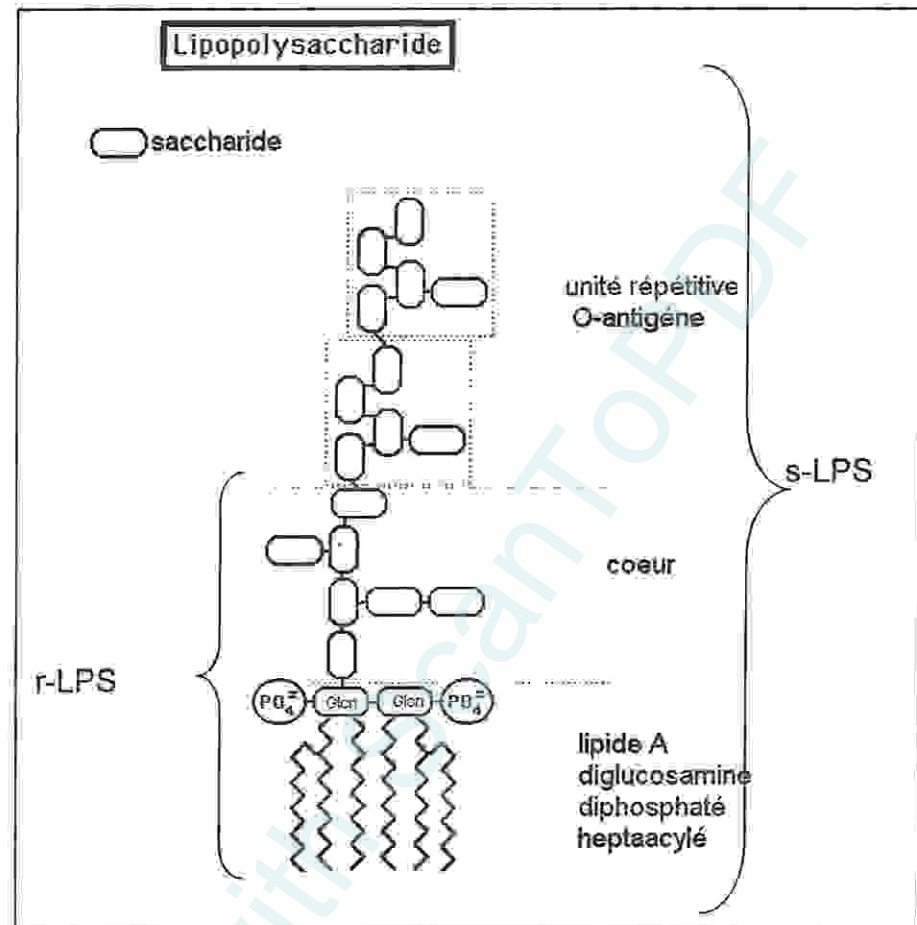


Figure 23: Schéma structural des LPS. (Chataigne\_2007).

## IV-2-Rôle dans la nodulation

### IV-2-1-Les exopolysaccharides (EPS)

Ils ont des fonctions non spécifiques comme la protection contre des stress environnementaux, l'attachement aux surfaces ou l'approvisionnement en nutriments, mais aussi des rôles spécifiques lors de l'interaction symbiotique Rhizobium -Légumineuses en inhibant la défenses des plantes (Vernie2008).

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 (Chataigne, 2007).

#### IV-2-2-Les polysaccharides capsulaires (KPS)

Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote est à ce jour inconnu. 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. (Chataigne, 2007)

#### IV-2-3-Les lipopolysaccharides (LPS)

Des mutants de rhizobia altérés pour la synthèse des LPS sont incapables de maintenir la propagation des cordons d'infection alors qu'un ajout de LPS purifiés peut stimuler la formation des cordons d'infection. Ces mutants sont aussi altérés pour la libération puis la différenciation des bactéries en bactéroïdes (Vernie, 2008).

Les LPS sont capables d'inhiber des réactions de défenses de la plante dans les étapes plus tardives de l'infection, lorsque les EPS ne sont synthétisés, en empêchant la mise en place du choc oxydant (Scheidle *et al.* 2005).

En influant sur l'hydrophobicité des membranes, les LPS pourraient avoir deux rôles : faciliter la pénétration des cordons d'infection en contrant les défenses de la plante et obtenir des nodules fixateurs en jouant sur l'hydrophobicité de la membrane bactérienne. L'augmentation de l'hydrophobicité des membranes bactériennes pourrait créer un rapprochement avec la membrane pér bactéroïdienne et ainsi faciliter les échanges des composés. Les LPS pourraient aussi faciliter la différenciation des bactéroïdes en conférant plus de plasticité à leur membrane (Chataigne, 2007).

### V-Génétique de la nodulation chez *Sinorhizobium meliloti*

#### V-1-Définition

*Sinorhizobium meliloti* (anciennement *Rhizobium meliloti*) est une bactérie un  $\alpha$ -proteobacterium, gram négative du sol qui forme des nodules fixateurs d'azote sur les racines de certains genres de plantes légumineuses, notamment *Medicago* (*Medicago sativa*, *truncatula*), *Melilotus* et *Trigonella*. (16)

## V-2-Géome

Comme de nombreux *Rhizobium*, *S. meliloti* possède un génome relativement grand en trois parties : un chromosome deux mégaplasmides, pSyma et pSymB.

### V-2-1-Chromosome

Le chromosome de 3,7 Mb comporte des gènes impliqués dans le métabolisme des acides nucléique, toutes les enzymes impliquées dans la glycolyse et la gluconéogenèse, excepté le fructose-1 gluconeogenic, le biphosphatase 6 (cbbF), trouvé sur le pSymB, les régulateurs correspondants à la synthèse des EPS, y compris MucR, ExoR, ChvIG, et PhoB, ainsi que des gènes codant des enzymes de la biosynthèse des LPS (LpxABCDK, LpsABCDE, KdsAB, KdtA) et des CPS (*rkpAGHIJ* and *rkpK-lpsL*). Ce réplicon diffuse également l'information génétique pour des processus de mobilité et de chimiotactisme, interaction d'hôte (gènes putatifs de virulence), aussi bien que des réponses de stress. (Capela et al., 2001)

Le chromosome de *S. meliloti* contient au moins 57 gènes impliqués dans le métabolisme et la réplication d'ADN, y compris le *polA* et les gènes de gène de l'ADN polymérase I codant le  $\alpha$ , le  $\beta$ , le  $\delta'$ , le  $\epsilon$ , le  $\gamma$ , et les sous-unités de  $\tau$  de l'ADN polymérase III. (Capela et al., 2001)

Le chromosome soutient également les gènes nécessaires pour le transport d'ammonium (*amtB*) et assimilation, y compris deux des trois synthétases de glutamine, de *glnA*, de *glnT* (la troisième copie, *glnII*, est située sur le pSymB), et des deux sous-unités de synthèse de glutamate (*gltBD*). Les régulateurs chromosomiques incluent : (i) neuf facteurs de  $\sigma$  ; (ii) 166 régulateurs de transcription avec un grand nombre (31 membres) appartenant à la famille de *LysR* ; (iii) 11 systèmes de normalisation de deux-composant complet plus huit kinases d'isolement additionnelles d'histidine ; et (iv) un LuxIR-type système de quorum-détection (Capela et al., 2001)

### V-2-2-Mégaplasmide pSymA

Le pSymA contient des gènes probablement à impliquer dans le métabolisme d'azote et de carbone, les transporte, les soumet à une contrainte, et des réponses de résistance, et d'autres fonctions qui donnent à *S. meliloti* un avantage dans sa place spécialisée. (Barnetta et al., 2001)

La taille de pSymA appelé pNod-Nif, ou pRmeSU47 s'est étendue de 1.325 à 1.42Mb qui est comparable à la taille de quelques génomes bactériens entiers. Groupé dans une région de 275 kb, ceux-ci incluent des gènes nod exigés pour la synthèse du facteur NOD aussi bien que les gènes de *nodI* et de *nodE*, qui sont codés dans six operons sur le *pSymA*. *nodD1*, *nodD2*, et *nodD3* codent le *LysR*-type régulateurs transcriptional qui activent l'expression de ces operons



en réponse aux signaux d'hôte ou en tant qu'élément des circuits de normalisation signal-indépendants. (Barnetta et al., 2001).

SyrM et SyrB sont des régulateurs codés sur pSymA qui fonctionnent également dans ce circuit de régulation. Les gènes *nif* et *fix* se trouvent également en dessous de la région de 275 kb, de même que faire des gènes codant la réductase de protoxyde et gènes requis pour le catabolisme des bêtaïnes. Cependant, excepté le *syrB* et un lieu qui influence l'efficacité symbiotique, peu a été connu en dehors de cette région de 275 kb.

Récemment, une déshydrogénase d'alcool (*adhA*) et le regulon de rhizobactin (*rhbF*) ont été physiquement tracés au pSymA. (Barnetta et al., 2001)

### V-2-3-Mégaplasmide pSymB

Le megaplasmide de 1.683 kb, désigné sous le nom du pSymB, pExo, ou pRmeSU47b, est connu pour porter de diverses cluster de gènes impliquées dans la synthèse d'exopolysaccharide (EPS) : *exo/exs*, *exp* ou *pss*, le transport de C4-dicarboxylate (*dctA*), de phosphate (*phoCDET*) et le métabolisme de lactose qui sont exigés pour la formation des nodules de racine. (Turlough et al., 2001)

D'autres cluster de gènes sont également présentes sont impliquées dans des activités cataboliques telles que l'utilisation de protocatechuate et la dégradation de phosphonate sont également présentes. Les fonctions de ces gènes sont compatibles à la notion que le pSymB joue un rôle important dans la compétence saprophytique des bactéries dans l'environnement de sol. Presque 20% de pSymB porte des gènes codant des systèmes de prise de corps dissous, plus dont étaient de la famille des ATP-binding cassettes. (Turlough et al., 2001)







EPS I et II sont sécrétées dans deux fractions importantes reflétant différents degrés de polymérisation de sous-unité : HMW - Poids, se composant des centaines aux milliers d'unités de répétition (polymères de 106 - 107 DA) et des LMW - de faible poids moléculaire qui représentent des monomères, des dimères et des trimères dans une cas d'EPS I et d'oligomères (15-20) dans un cas d'EPS II (Skorupska ,2006) , mais seulement les formes de LMW soit succinoglycane ou EPS II sont actives dans l'invasion des nodules. (Chataigné ,2007)

#### V-4- Biosynthèse des EPS

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides (*exo/exs* ou *pss*) .

Les protéines synthétisées par ce groupe de gènes sont de quatre types : les enzymes impliquées dans la biosynthèse des précurseurs de sucre, les transférases responsables de l'assemblage de l'unité répétitive, les enzymes responsables des substitutions non-sacharidiques et enfin celles permettant la polymérisation des unités répétitives entre elles et l'export des EPS. (Chataigné ,2007).

La biosynthèse des EPS représente un processus multi-étape et dépend d'un complexe protéique localisé à la fois sur les membranes interne et externe. Elle débute par la formation d'un précurseur, nucléotide de sucre diphosphorylé (par exemple UDP-glucose), transféré sur un accepteur le undecaprenyldiphosphate (UndP :pp- prenol). L'unité répétitive est formée dans le cytoplasme et sera ensuite transférée vers le périplasma dans lequel se déroule la polymérisation. Le polysaccharide est acheminé vers la membrane externe par des transporteurs de type ABC (Glucksmann *et al.* 1993).

##### V-4- 1-Succinoglycane

la biosynthèse de succinoglycan est dirigée par 21 *exo* et gènes *d'exs*, situés dans un cluster de gènes de 30 kb sur le megaplasmid symbiotique pSymB dont quelques gènes importants pour la biosynthèse succinoglycan et son règlement (*exoC*, *exoR*, *exoS*, *mucR*, *exoD*) qui ont été tracés sur le chromosome (Skorupska ,2006)

##### V-4-1-1-Biosynthèse d'un nucléotide de sucre

*exoC* code pour une phosphoglucomutase qui transforme le glucose- 6-phosphate en glucose-1-phosphate qui est le précurseur de UDP-glucose ( Skorupska ,2006). Intervient ensuite le gène *exoB* qui code pour une UDP-glucose-4-épimérase qui convertit UDP-glucose en UDP-galactose qui est le donateur des résidus de galactose (Canter Cremers *et al.*, 1991). les précurseurs, diphaspho-sucres de nucléotide (UDP-glucose), sont séquentiellement transférés à la chaîne croissante de polysaccharide attachée à un accepteur (UndP :pp-prenol) pour donner les résidus de glucose (Alexandra G M *et al.* ,1993)





La mutation des gènes *exoB* ou *exoC* induit la non-production des EPS, mais affecte aussi la biosynthèse d'autres polysaccharides tels que les LPS et les glycanes cycliques.

#### V-4-1-2- Biosynthèse d'unité répétitive

**ExoY** :est une galactosyltransférase qui initie l'assemblage des unités répétitives de EPS par l'addition galactose, qui est ajouté au transporteur de lipides (undecaprenol-diphosphate : PP-prenol) (Skorupska *et al.*, 2006).

**exoF** : est le gène codant pour la protéine permettant la liaison entre le galactose et l'undecaprenyl-diphosphate (transporteur de lipides) (Skorupska *et al.*, 2006).

**ExoA, ExoL, ExoM, ExoO, ExoU et ExoW** : sont les glycosyltransférases qui vont ajouter séquentiellement les sucres de l'unité répétitive.

**ExoZ, ExoH, et ExoV** : vont introduire les motifs non-saccharidiques (Skorupska *et al.*, 2006).

#### V-4-1-3-Polymérisation des unités répétitives et l'export des EPS

Les fractions de LMW succinoglycane peuvent être produites soit par polymérisation partielle ou par dépolymérisation des produits HMW par l'action d'endoglycanases spécifiques. (Glenn *et al.*, 2007)

- **Polymérisation partielle du LMW de succinoglycane**

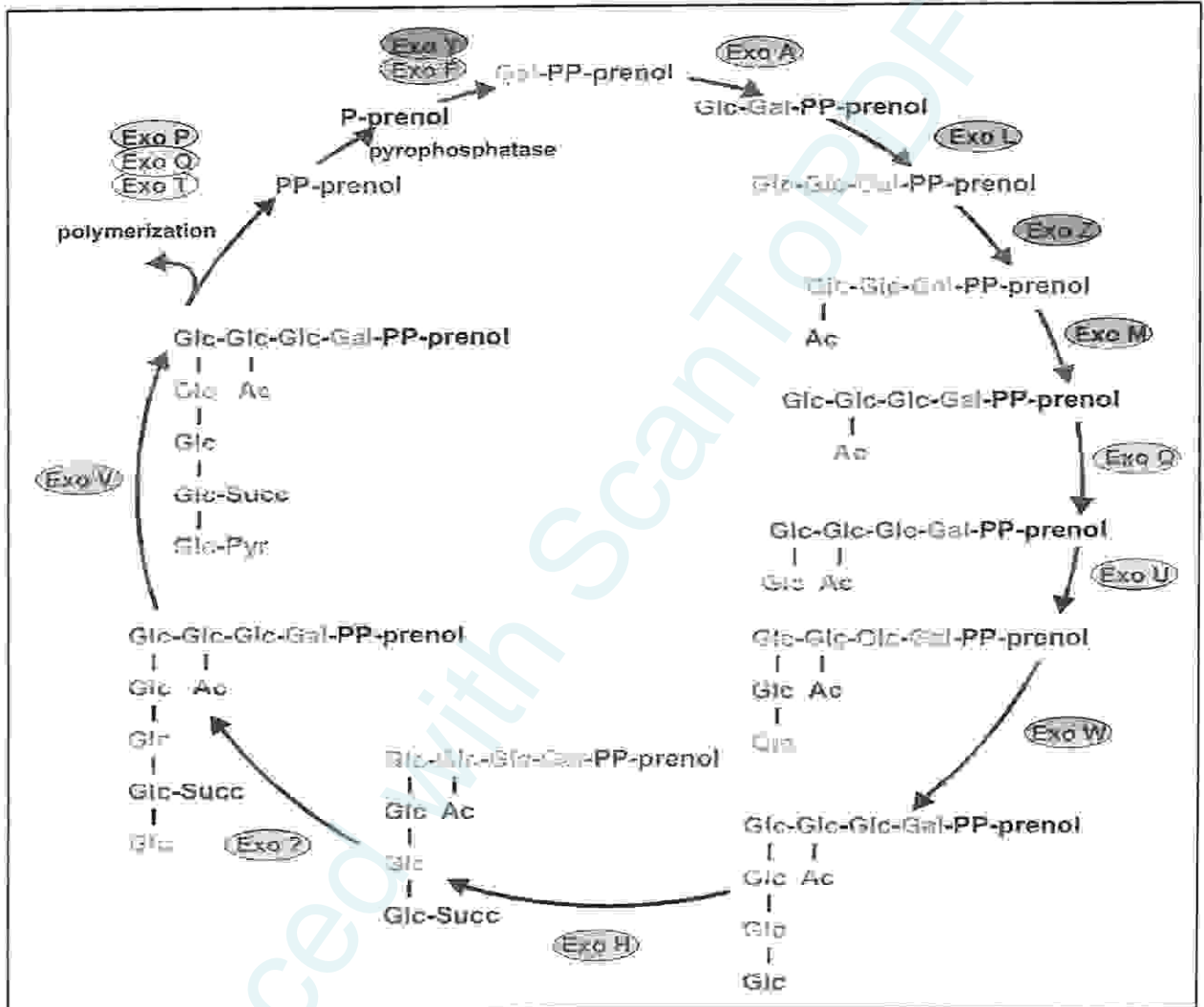
Les produits des gènes de *exoP*, *Exot*, et *exoQ* .*ExoP* est proposé de participer à la détermination de la longueur de la chaîne du polymère .Le *ExoP* et des protéines *Exot* sont impliqués dans la biosynthèse du dimère succinoglycane et les molécules qui forment le trimère fraction LMW. Le *ExoP* et des protéines *ExoQ* agir de concert pour produire la fraction succinoglycane HMW (Glenn *et al.*,2007) .

- **Dépolymérisation des produits HMW de succinoglycane**

Est médiée par un fendage de HMW succinoglycan par des endoglycanases : **ExoK** ( $\beta$ -1, 3-1, glucanase 4) et **ExsH** (depolymerase succinoglycan). (Sarah, 2007)



**ExsA** : sont des homologues aux transporteurs d'ABC et sont importante pour le transport et l'acheminement vers le milieu externe des EPS entiers. (Chataigné ,2007.Skorupska et al., 2006)



**Figure 26:** Biosynthèse de l'unité répétitive des EPS I de *S. meliloti* (Skorupska ,2006).

#### V-4-2- Galactoglucane

Les gènes de biosynthèse de galactoglucane sont situés dans un faisceau de gènes de 32-kb sur pSymB qui est composé de 21 gènes organisés en cinq opérons putatifs. La nomenclature de ces gènes, précédemment nommé le groupe exp, a été récemment révisée. Les cinq opérons putatifs sont comme suit: WGA (expa) (neuf gènes), SGAC (expC) (un seul gène), wggR (expG) (un seul gène), WGD (expD) (deux gènes), et GTE (huit gènes). (Marketon et al., 2003). Cependant la voie de leur biosynthèse n'a pas encore été élucidé dans le détail. (Glenn et al., 2007).

## VI-Génétique de la nodulation chez *Rhizobium léguminsarum*

### VI-1-Définition

*R.leguminosarum* est un symbiote  $\alpha$ -protéobactéries Gram négatif fixatrice d'azote elle est divisé en trois biovar

- *biovars trifolii*, forme des nodules chez Trèfles (*trifolium*)
- *biovar phaseoli* forme des nodules chez l'haricot (*phaseolus*)
- *biovar viciae* forme des nodules chez pois (*Pisum*espèces), lentilles et vesces (*vicia*,*Lathyrus*.) (Young et al ,2006)

### VI-2-Génome

Toutes les souches de *R. leguminosarum* avoir plusieurs plasmides de grande taille, mais le nombre et la taille des plasmides varient selon les souches. Ce grand nombre de plasmides distingue *R. leguminosarum* des autres rhizobiums pour lesquels des séquences génomiques complètes ont été déterminés. (Young et al ,2006)

Prenons l'exemple de *R. leguminosarum biovar viciae* (RLV) la souche 3841 qui possède un génome de 7.751.309 de paires de bases, dont 65% se trouve dans un chromosome circulaire et les autres sont dans six plasmides circulaires pRL12 ,pRL11,pRL10 pRL9 , pRL7 et pRL8 .(17)

Un de ces plasmides (pRL10) porte les gènes de la nodulation et la fixation de l'azote, mais la fonction de la grande majorité des gènes d'origine plasmidique est inconnue à l'heure actuelle (Young et al ,2006)

**Tableau 3** : Statistiques de génome pour les *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841  
(Young et al. ,2006)

| Replicon   | Base pairs | %G+C  | Protein-coding genes | Mean protein length (a.a.) | rRNA operons | tRNA genes |
|------------|------------|-------|----------------------|----------------------------|--------------|------------|
| Chromosome | 5057142    | 61.1  | 4736                 | 309                        | 3            | 52         |
| pRL12      | 870021     | 61.0  | 790                  | 335                        |              |            |
| pRL11      | 684202     | 61.0  | 635                  | 318                        |              |            |
| pRL10      | 488135     | 59.6  | 461                  | 304                        |              |            |
| pRL9       | 352782     | 61.0  | 313                  | 337                        |              |            |
| pRL8       | 147463     | 58.7  | 141                  | 306                        |              |            |
| pRL7       | 151546     | 57.6  | 189                  | 224                        |              |            |
| Overall    | 7751309    | 60.86 | 7265                 | 309                        | 3            | 52         |

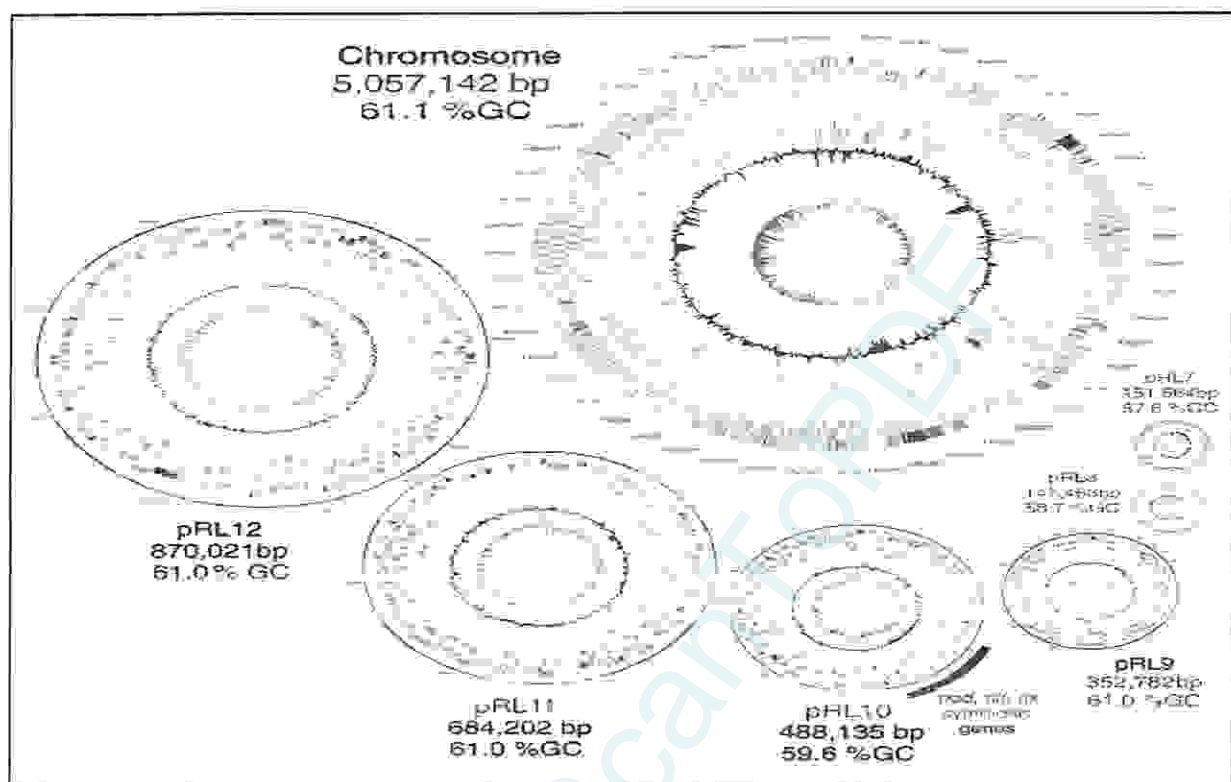


Figure 27: Les sept réplicons du génome chez *R. leguminosarum*

(Young et al., 2006)

### VI-3-Expolysaccharides *R. leguminosarum*

#### VI-3-1- Définition

La même unité de répétition conservée d'octasaccharide de l'EPS, composée de glucose, d'acide glucuronique et de galactose. Cependant, certaines contraintes de *R. leguminosarum* sécrètent EPS, dont l'unité de répétition diffère dans la teneur en sucre et la longueur de la chaîne latérale. Dans *R. leguminosarum* bv trifolii la sous-unité d'EPS composée de sept sucres, supplémenté d'un galactose terminal de la chaîne latérale, a été décrite. D'une part, dans le *rhizobium leguminosarum* bv viciae 248 l'unité de répétition avec de l'acide glucuronique additionnel dans la chaîne latérale ont été rapportés. (Skorupska, 2006). Le modèle de la décoration autre que du sucre avec des résidus d'acétyle, de pyruvyl et de hydroxybutanoyl s'est avéré différent pour plusieurs contraintes de *R leguminosarum*. (Skorupska, 2006).



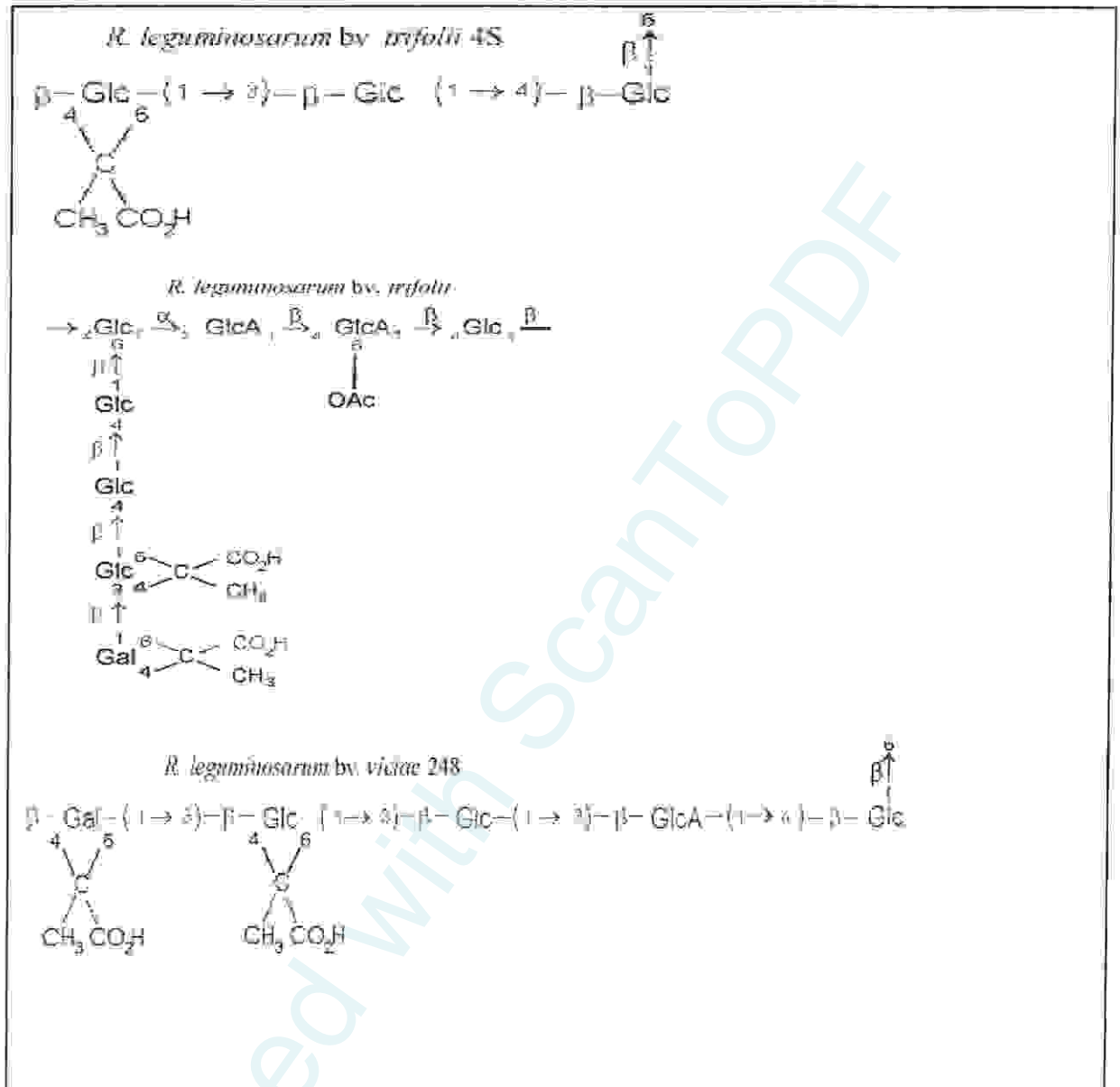


Figure 28: Structure de différents exopolysaccharides chez *R. leguminosarum*

(Chataigne,2007)

### VI-3-2- Biosynthèse des exopolysaccharides

#### VI-3-2- 1-Biosynthèse d'un nucléotide de sucre

**pssA** : La biosynthèse de l'EPS dans le *R leguminosarum* est lancée par le transfert d'un UDP-glucose au porteur de lipide fixé à la membrane cytoplasmique. L'enzyme impliquée dans ce processus, glucosylque-IP-transférase, est codée par le gène conservé de pssA. (Skorupska, 2006)

### VI-3-2- 2-Biosynthèse d'unités répétitive

**pssD de pssE** : Dans l'étape suivante, un glucuronosyl- ( $\beta$ -1,4) - transférase glucosylique codé par pssD et de pssE catalyse l'addition d'un résidu acide glucuronique. (Skorupska, 2006).

**pssC** : L'addition du deuxième résidu acide glucuronique dépend de l'activité du produit de gène de pssC, un glucuronosyl- $\beta$ -1,4-le glucuronosyltransferase .( Skorupska,2006).

Des étapes suivantes de la synthèse acide d'EPS ont été mal étudiées, bien que de gènes pssF de, le pssG, le pssH, le pssI, le pssJ et le pssS codant les glycosyltransférases et le pssR putatifs et les gènes de pssM prévus pour coder les enzymes de modification d'EPS aient été identifiés dans le *R. leguminosarum BV viciae*. (Skorupska, 2006).

**exoB** du *R. leguminosarum BV trifolii* est l'enzyme impliquée dans la biosynthèse d'un UDP-galactose, qui est le donateur des résidus de galactose (Skorupska, 2006).

### VI-3-2- 3- Polymérisation des unités répétitives et l'export des EPS

**pssT, de pssN et de pssP** codent les protéines qui forment le système de sécrétion et de polymérisation impliqué dans l'ensemble et l'exportation de l'EPS dans le *R.leguminosarum bv trifolii*. (Skorupska, 2006).

**pssL** code une protéine agissant dans la translocation de l'unité répétitive de l'intérieur au feuillet externe de la membrane cytoplasmique. (Skorupska, 2006).

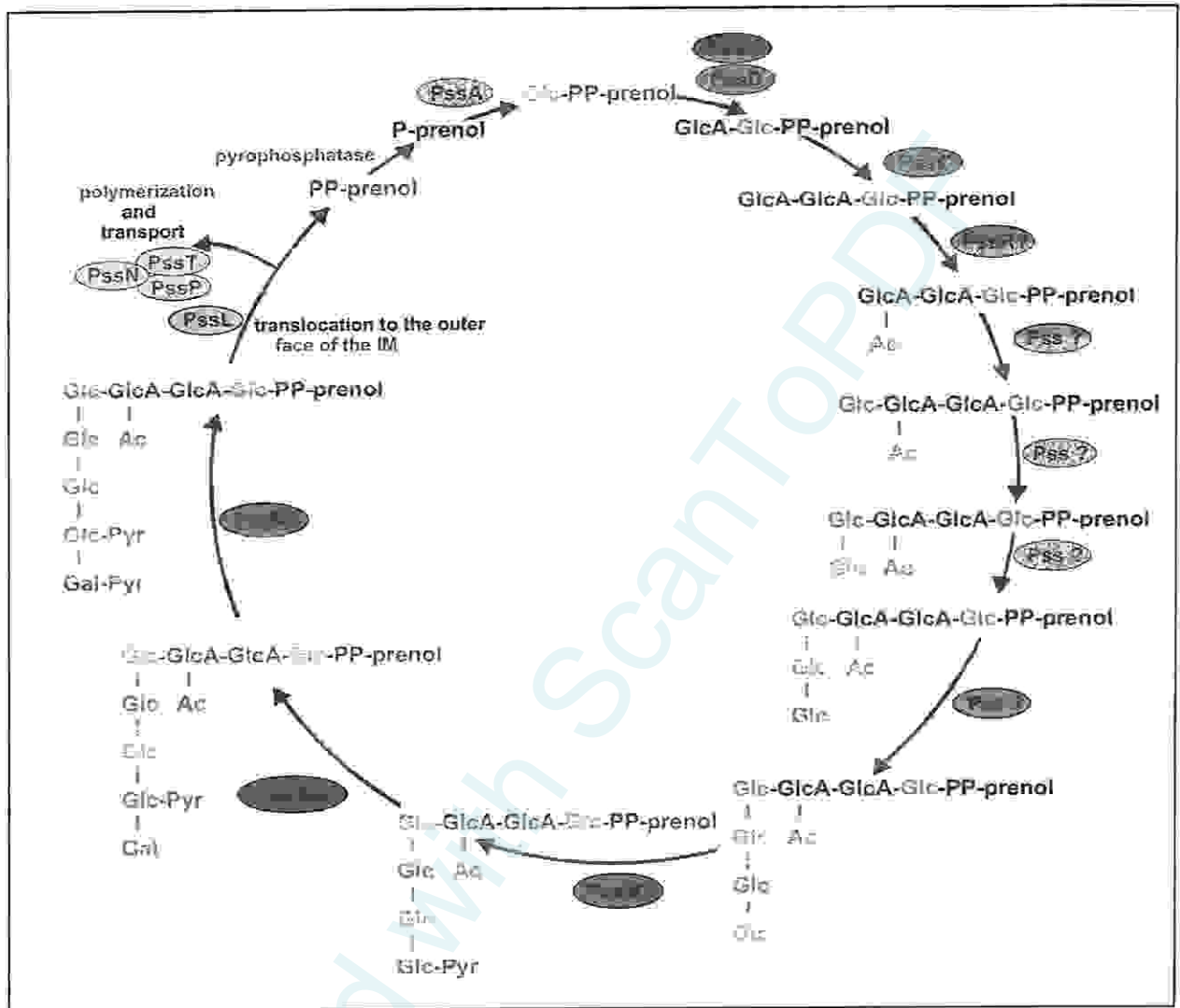


Figure 29 : Biosynthèse de l'unité répétitive des EPS de *R. Leguminosarum* (Skorupska, 2006).

## VI-4-Lipopolysaccharides

### VI-4-1-Biosynthèse des lipopolysaccharides

#### VI-4-1-1-Kdo2-lipide IV<sub>A</sub>

Price et ses collaborateurs en 1994 ont démontré que *R. leguminosarum* et *R. etli* possèdent une activité enzymatique se recoupant avec celle des enzymes de *E. coli* impliquées dans la synthèse du précurseur. Ainsi, sur le précurseur UDP-*N*-acetylglucosamine deux acides gras sont liés en position 2 et 3 par LpxACD. LpxH substitue la position 1 de l'entité obtenue précédemment. (Chataigne, 2007)

LpxB va permettre la liaison entre une glucosamine diacylée et la glucosamine diacylée et phosphatée. La position 4 de la glucosamine non réductrice est alors substituée par un

phosphate et KdtA ajoute enfin les deux Kdo sur la position 6 de celle-ci (Raetz et al., 2002). C'est à ce stade qu'intervient la substitution alcoxy-acyl, par un acide gras normal chez les bactéries usuelles mais à très longue chaîne chez *Rhizobiaceae* ce qui représente la plus grande spécificité de leurs lipides A. L'enzyme responsable de cette modification est LpxXL qui associé à un donneur d'acide gras AcpXL permet de modifier par une chaîne grasse en C28 ou C30 l'hydroxyle de l'acide gras porté par l'azote de la glucosamine. (Chataigne, 2007)



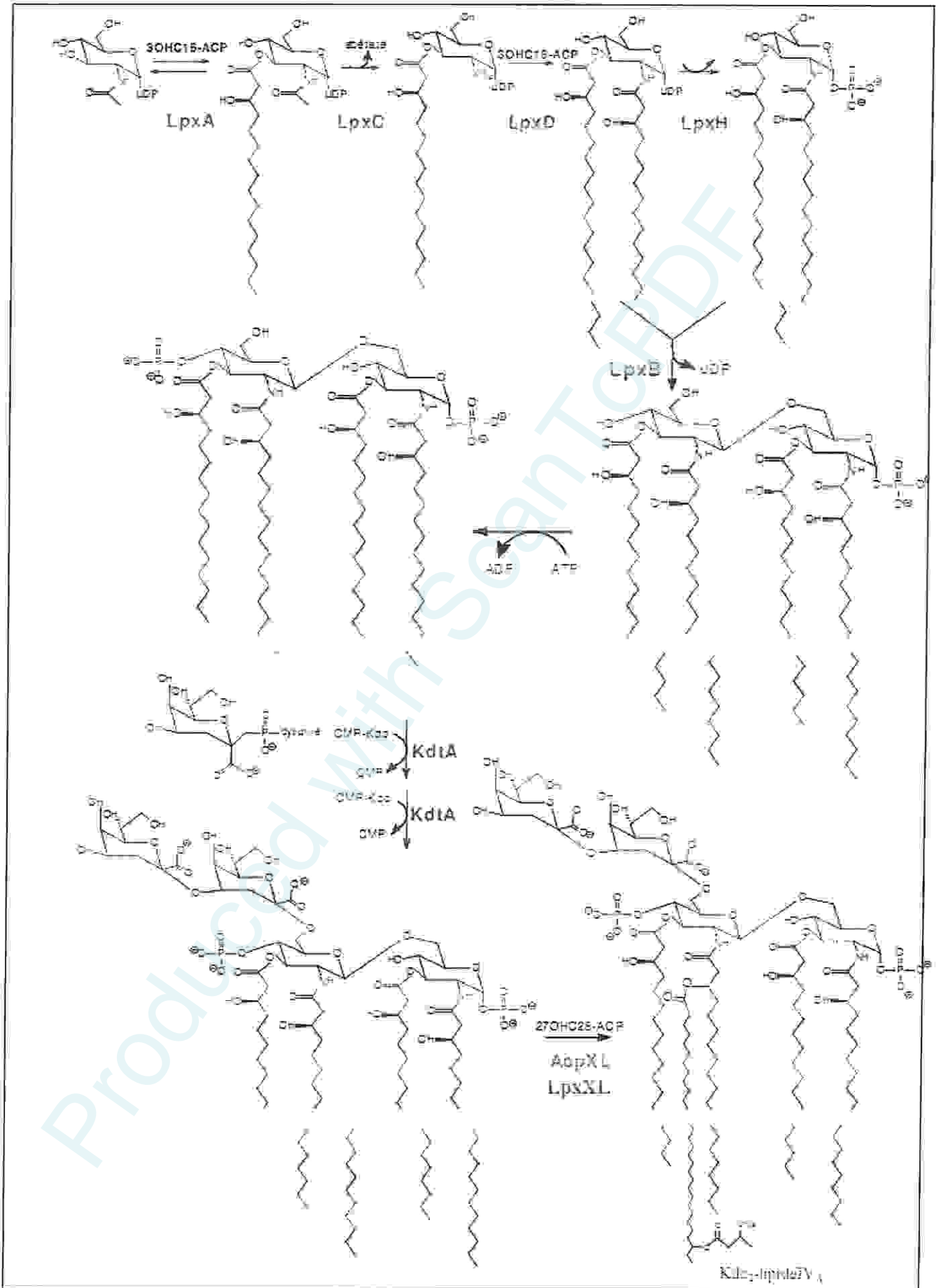
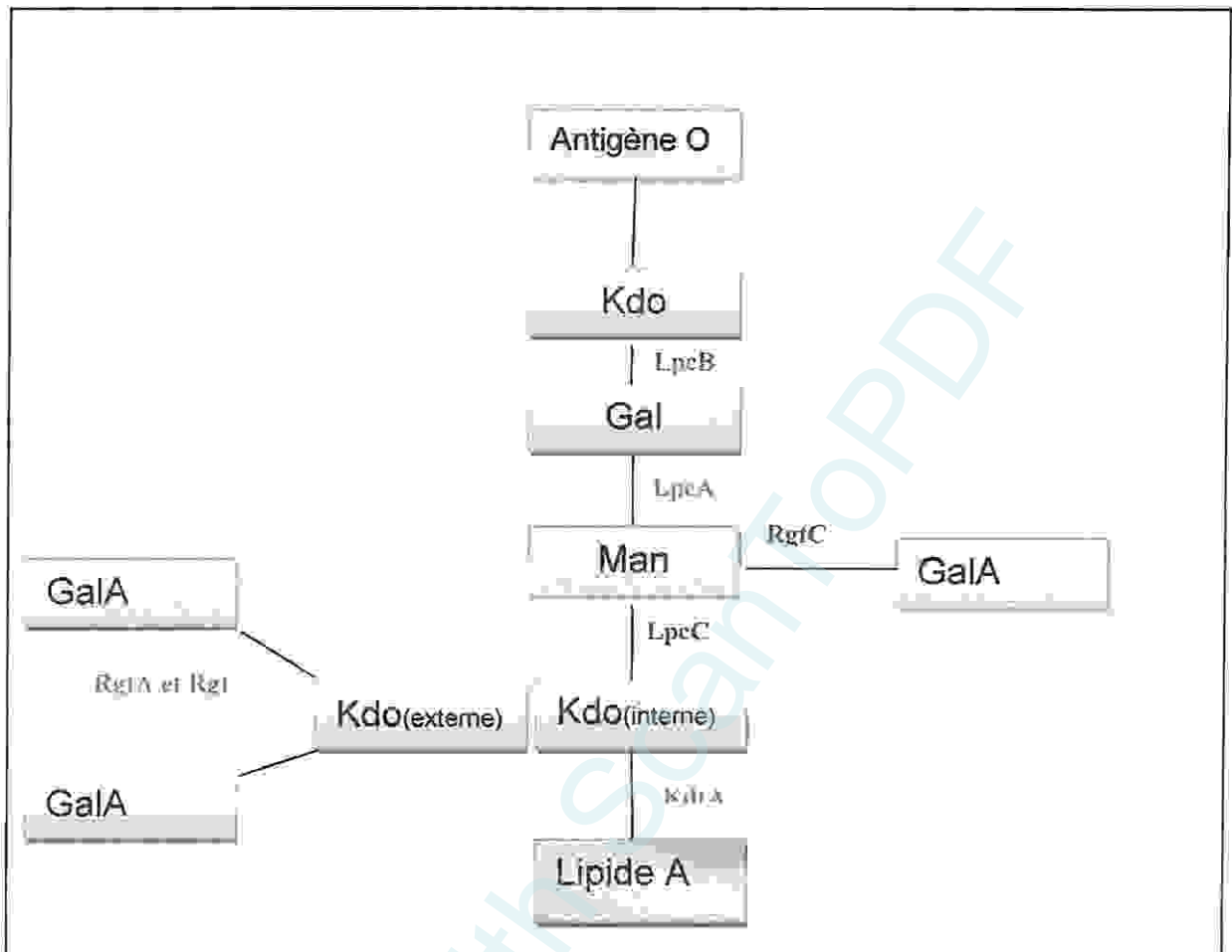


Figure 30: Biosynthèse du Kdo<sub>2</sub>-lipide A chez *R. leguminosarum* (Chataigne, 2007)

#### VI-4-1-2-Oligosaccharide de coeur

Une fois l'ancre lipidique du LPS synthétisée, la biosynthèse de l'oligosaccharide de coeur peut débuter. Une seule étude a été réalisée pour déterminer les enzymes responsables de la biosynthèse de l'oligosaccharide de coeur pour la famille des *Rhizobiceae*. Cette étude porte sur la souche *R. leguminosarum*. Pour cette souche, le Kdo2-lipide IVA sert alors d'accepteur pour la biosynthèse du coeur. Un mannose est fixé sur le Kdo interne grâce à la protéine LpcC. Des glycosyltransférases (LpcA et LpcB) permettent ensuite l'élongation de l'oligosaccharide de coeur (Kadmas et al., 1998)

Une fois l'oligosaccharide de coeur synthétisé l'entité coeur lipide A est alors transféré vers le périplasme. Chez *R. leg.*, le lipide A va alors perdre les deux phosphates (en 1 et 4') grâce aux enzymes LpxE et LpxF. Après cette déphosphorylation, LpxQ va oxyder la position 1 pour donner le gluconate. La position 4', le mannose ainsi que le Kdo externe du Kdo2-lipide IVA que du coeur vont être substitués par les acides galacturoniques par les enzymes RgtABCD (Kanjilal-Kolar et al., 2006)



**Figure 31 :** Biosynthèse de l'oligosaccharide de coeur de *R. leguminosarum* (Chataigne, 2007)

#### VI-4-1-3-Antigène O

Contrairement à l'oligosaccharide de coeur, la partie antigène O est synthétisée séparément. Mais comme pour les autres constituants du LPS ils s'agit d'un processus séquentiel qui se déroule en trois étapes :

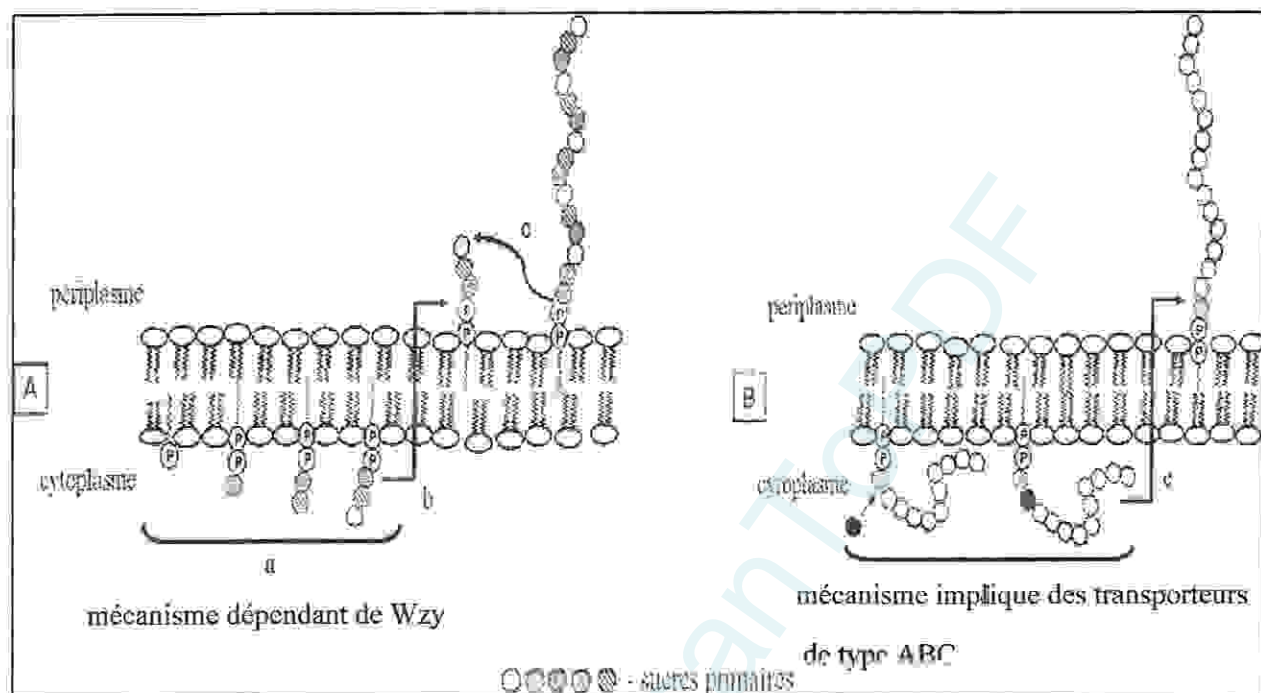
- synthèse de l'unité répétitive
- polymérisation de la chaîne
- transport à travers les membranes plasmiques et liaison au complexe lipide coeur (Raetz et al., 2002).

Le début de la synthèse de l'unité répétitive se fait sur un lipide porteur l'undecaprenylphosphate (UndP) déjà utilisé dans la biosynthèse du peptidoglycane et des exopolysaccharides. Cette unité répétitive est synthétisée à la surface interne de la membrane cytoplasmique. Le mode de polymérisation et sa localisation dépendent ensuite du mode de

transfert de la partie antigène O vers le périplasma. Il existe deux mécanismes principaux. (Chataigne,2007)

- Le mécanisme dépendant de Wzy induit le transport des unités "UndP-unité répétitive" vers la face périplasmique de la membrane cytoplasmique. Ce transfert est contrôlé par une flipase (Wzx). Une fois dans le périplasma les unités répétitives vont pouvoir polymériser. Pour cela une unité va être ajoutée à un complexe "UndP-unité répétitive". Ce dimère va ensuite être attaché à un complexe "UndP-unité répétitive" et ainsi de suite jusqu'à atteindre la taille adéquate. Ceci implique que au cours de la polymérisation (l'unité répétitive) n est détaché du lipide porteur pour être lié à un complexe "UndP-unité répétitive" pour obtenir un nouveau complexe UndP-(unité répétitive)<sub>n+1</sub>. Wzy et WaaL permettent ensuite la liaison entre l'antigène O et l'unité lipide A-coeur qui sera ensuite acheminé à la surface de la bactérie
- Le mécanisme implique des transporteurs de type ABC. Dans ce cas l'élongation de la chaîne se situe dans le cytoplasme. La synthèse de l'antigène O ne nécessite dans ce cas que 1 UndP puisque les sucres des unités répétitives sont ajoutés séquentiellement jusqu'à atteindre la taille adéquate. l'antigène O est ensuite transféré vers le périplasma via un complexe de transport de type ABC (ATP Binding Cassette) . (Chataigne,2007)





**Figure 32 :** Biosynthèse de l'antigène O (Szalo *et al.*, 2006)

Il existe peu d'études concernant la biosynthèse des KPS (polysaccharides capsulaires) chez les *Rhizobiaceae* (Chataigne2007).

## Conclusion

La symbiose entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*) est un avantage énorme agronomique, qui permet à la plante à être cultivée sans engrais azoté qui sont couteuse et polluant, c'est un exemple de développement sophistiqués couplés entre les bactéries et les plantes supérieures, aboutissant à l'organogenèse des nodules racinaires.

L'étude de la symbiose Rhizobium-légumineuse pose des difficultés méthodologiques particulières dues au fait que les nodules sont des organes complexes issus de l'interaction de deux organismes : une plante supérieure et une bactérie. Une meilleure compréhension du rôle de chaque partenaire est une condition nécessaire à l'amélioration rationnelle du rendement de cette unité fonctionnelle. L'étude génétique et moléculaire de cette coopération a mis en évidence le rôle de plusieurs gènes et de molécules dans la formation des nodosités, la fixation d'azote, la spécificité vis-à-vis des souches de *Rhizobium* et l'efficacité de la symbiose. Ces études doivent être plus approfondies pour améliorer le rendement de la fixation de l'azote, dans les régions arides surtout, où l'absence d'humus est le principal obstacle au développement normal des cultures. Un objectif très important, pour contribuer au développement d'une agriculture durable à l'avenir, sera d'étendre l'aptitude à fixer l'azote à des plantes de grandes culture autres que les légumineuses, les céréales par exemple.

Les céréales nécessitent un apport d'engrais azotés de 100 à 200 kg par hectare et par an. Sachant qu'il faut environ deux tonnes de fuel pour fabriquer et épandre une tonne d'ammoniac pour cela des stratégies sont abordées qui consistent à :

- Recherche de bactéries nif capables de se multiplier dans la rhizosphère ou à l'intérieur des céréales.
- Transfert de gènes nif bactériens chez les plantes par génie génétique.
- Transfert de l'aptitude à former des nodosités avec *Rhizobium* chez des céréales. Cette stratégie semble ne pas pouvoir permettre une fixation supérieure à quelques kg d'azote par hectare, apport tout à fait insuffisant pour permettre une diminution significative de l'emploi d'engrais. Le transfert des gènes nif chez les plantes est un objectif très ambitieux et qui, dans l'état actuel de nos connaissances devrait demander plusieurs décennies de recherche pour aboutir. En cas de succès, cela pourrait être la solution idéale. Le transfert de l'aptitude à former des nodosités avec *Rhizobium* est également un projet à très long terme et dont la réalisation demandera des décennies de recherches.

- 8) <http://www.intellego/doc/26724>
- 9) <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/field/news/croptalk/2009/ct-0909a1.html>
- 10) <http://www.astrobgs.dyndns.org/astro2/utls1/crdenarie.htm#genes>
- 11) [http://www.edk.fr/reserve/print/e-docs/00/00/0B/10/document\\_article.md](http://www.edk.fr/reserve/print/e-docs/00/00/0B/10/document_article.md)
- 12) <http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-074.htm>
- 13) <http://jb.asm.org/cgi/content/full/185/1/325>
- 14) <http://ead.univangers.fr/~jaspard/Page2/COURS/Zsuite/2Photosynthese>
- 15) <http://ead.univangers.fr/~jaspard/page2/cours/2n2nh3aaecturee/2figures/3ferredoxine>
- 16) <http://cmgm.stanford.edu/~mbarnett/genome.htm>
- 17) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1557990/>

Produced with ScanTOPDF

## *Bibliographie:*

### livres et articles

- **Allen O.N., Allen E.K., 1950.**-Biochemical and Symbiotic Properties of the rhizobia .Bactrial.Rev.14:273-330.
- **Alexandra G M., Lynne R T., AND Walker G. C. -** Genes Needed for the Modification, Polymerization, Export, and Processing of Succinoglycan by *Rhizobium meliloti* a Model for Succinoglycan Biosynthesis .Journal of bacteriology, Nov. 1993, P. 7045-7055
- **Arrighi, J.F.(2006)** Thèse de doctorat:Analyse génétique et moléculaire de deux gènes de *Médicago truncatula* , NFP et RPG , controlant l'infection par *Sinorhizobium meliloti* au cours de la symbiose *Rhizobium* –Légumineuse, Université Paul Sabatier- Toulouse III.
- **Barnetta MJ., Fishera RF., JonesbT.,Komb C.,Barloy-Hublerc F., Bowser L -** Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid,PNAS August 14, 2001 vol. 98 no. 17 9883-9888
- **Basdeviveise R.,Meyer S.,Reeb C.,2008**-Botanique :biologie et physiologie végétales 2<sup>ème</sup> edition .Edition : Maloine.p441
- **Beck D.P,Materon L.A.,Afandi F.,1993.**-Pratical *Rhizobium*-Legume Technology Manual.ICARDA.Syria .
- **Burton J.C.1979.** Microbial technology:*Rhizobium* species . Academie Press,I nc.pp.29-58
- **Campbell N.A et Reen J.B.2004.**-Biologie : adaptation et révision scientifique 2<sup>ème</sup> edition de boeck p :1364
- **Canter-Cremers HCJ, Stevens K, Lugtengberg BJJ, Wijffelman CA, Batley M, Redmond JW, Breedveld M, Zevenhuizen LPTM:** Unusual structure of the exopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain 248. *Carbohydr Res* 1991. 218:185-200.
- **Capela D. , arloy-Hubler FB ,Gouzy J.,Bothe G., Ampe A., Batut J., Boistard J -** Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021,PNAS August 14, 2001 vol. 98 no. 17 9877-9882
- **Chataigné G.2007-** Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université de toulouse
- **Dufresne G,-2004-** valorisation de matières résiduelles pour la production de biofertilisants à base de rhizobium : optimisation du procédé de fermentation avec *sinorhizobium meliloti* .Mémoire présenté Pour l'obtention du grade de Maître en sciences de l'eau Institut National de la Recherche Scientifique. INRS- Eau, Terre et Environnement
- **Duhoux E.,Nicole M.,2004.**-Biologie végétale .Associations et intéarctions chez les plantes . sciences Sup Série Atlas .IRD edition DUNOD , p 166



- **Dupuy Y., Nougier P., 2005** – Les microorganismes du gène à la biosphère  
Edition ellipses. p :256
- **Elsadik A.M et ElSORA E.E., 2000.** - Soil microbiology practical . Université de Khartoum .  
p:78.
- **Frayse N, Couderc F, Poinot V.** "Surface polysaccharide involvement in establishing the  
*rhizobium-legume symbiosis.*" *Eur J Biochem.* 2003 ; 270(7) : 1365.
- **Finan TM., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P.** - The complete sequence of the  
1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti* .  
*PNAS August 14, 2001 vol. 98 no. 17 9889-9894*
- **Gobat J.M., Araguo M, Mathey V., 2003**- Le Sol vivant . base de pedologie biologie de sol  
. 2<sup>ème</sup> edition revu et augmentée p :568.
- **Gharzouli R., 2006** - Influence d'agents mutagènes, les rayons ultra violets sur la nodulation  
des quelques espèces de Rhizobium Sp nodulant les légumineuses du genre Hedysarum  
. Memoire de magister en génétique . Université Mantouri Constantine
- **Glenn S A., Gurich N, Feeney M A. , and González J E.,** - The ExpR/Sin Quorum-Sensing  
System Controls Succinoglycan Production in *Sinorhizobium meliloti* Journal of Bacteriology,  
October 2007, p. 7077-7088, Vol. 189, No. 19
- **Godfroy O. 2008** - Etude génétique et moléculaire de deux gènes  
de *Medicago truncatula*, *DMI3* et *RPG*, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires.  
THESE Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER –  
TOULOUSE III .Discipline : Biosciences végétales
- **Glucksmann MA, Reuber TL, Walker GC:** Genes needed for the modification,  
polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti* : a model for  
succinoglycan biosynthesis.  
*J Bacteriol* 1993, 175:7045-7055
- **Guerrouj K., Benata H., Ourarhi M., Abelmoumen H., Paul R., El Idrissi M M. 2009-**  
Diversité des Rhizobia qui nodulent quelques légumineuses de la région orientale du Maroc.  
Laboratoire de biologie des plantes et des microorganismes, faculté des sciences , Université  
Mohamed Oujda 60000, Maroc.
- **Guillaume D. 2004-** Valorisation de matières résiduelles pour la production de biofertilisants  
avec *sinorhizobium meliloti*: optimisation du procédé de fermentation avec *sinorhizobium*  
*meliloti*
- **Heller R., Esnault R., Lance C., 1998.** Physiologie végétal. nutrition ; Edition dunod p :323.
- **Heller R., Esnault R., lance C., 2004** – Physiologie végétal 6<sup>ème</sup> édition . Edition Dunod . p366
- **Hopkins W .G., 2003.** - Physiologie végétal. université des sciences et technologie de lille .  
Edition boeck p :514.

- **Kadrmaz JL, Allaway D, Studholme RE, Sullivan JT, Ronson CW, Poole PS, Raetz CR.** "Cloning and overexpression of glycosyltransferases that generate the lipopolysaccharide core of *Rhizobium leguminosarum*." *J Biol Chem.* 1998 ; 273(41) : 26432
- **Kanjilal-Kolar S, Basu SS, Kanipes MI, Guan Z, Garrett TA, Raetz CR.** "Expression cloning of three *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide core galacturonosyltransferases." *J Biol Chem.* 2006a ; 281(18) :12865.
- **Limpens,E,Mirabella,R,Fedora,E,Franken ,C,franssen, H., Bisseling T,and Geurts ,R,(2005).**Formation of organelle –like N<sub>2</sub> –fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2 *Proc Natl Acad Sci USA* 102 ,10375-10380.
- **Kelly –Skuek, M.N.and Irving,H.R.(2006)** Pharmacological evidence for activation of phospholipid and small GTP binding protein signalling cascades by Nod factors .*Plant Physiology and Biochemerstry*,44(2-3):132-142.
- **Macheix J.J.,Fleuriet A.,Allemand C .J.,2005**-Les composé phénoliques des végétaux .presses poly techniques et universitaires Romandes,p :192.
- **Marketon M M., Glenn S A., Eberhard A, and González J E.**-Quorum Sensing Controls Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti* *journal of Bacteriology*, January 2003, p. 325-331, Vol. 185, No. 1
- **Modigan M.,Martinko J.,2007** –Biologie des microorganismes 11<sup>eme</sup> .Edition .Ed pearson Education .p1041.
- **Marketon M M., Glenn S A., Eberhard A, and González J E.,** Quorum Sensing Controls Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti* *journal of Bacteriology*, January 2003, p. 325-331, Vol. 185, No. 1
- 
- **Ndoye L,1990,** contribution a l'etude de la symbiose entre *azorhizobium) rhizobium* et *sesbania rostra ta*, Spécialité: microbiologie ,université des sciences et techniques de Lille,pour l'obtention du grade de Docteur de l'ustl.
- **Oldroyd GE,Dowine JA (2004)**Calcium kinases and nodulation signalling in legumes .*Nat Rev Mol Cell Biol* 5:566-576.
- **Oldroyd, G.E. (2007).** Plant science. Nodules and hormones. *Science* 315, 52-53.
- **Raetz CR, Whitfield C.** "Lipopolysaccharide endotoxins."*Annu Rev Biochem.* 2002 ; 71 635.
- **Reuhs BL, Geller DP, Kim JS, Fox JE, Kolli VS, Pueppke SG.** "*Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens." *Appl Environ Microbiol.* 1998 ; 64(12) : 4930.
- **Scheidle H, Gross A, Niehaus K.** "The Lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants." *New Phytol.* 2005 ; 165(2) : 559.



- **Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.**-Handbook for Rhizobia .Springer verlage New York .Inc p :450.
- **Smit ,P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough , C ., Bisseling, T. and Geurts ,R(2005)** NSP1 of The GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor – induced transcription Science , 308(5729):1789-1791.
- **Sathyanarayana, P. V., Cremo , C.R .and Poovaiah, B.W.(2000)**Plant chemeric Ca<sup>2</sup> /Camo dulindependent protein kinase Role of the neural visinin –like domain in regulating autophosphorylation and calmoduline affinity .the Journal of Biological Chemistry ,275(39):30417-30422.
- **Szalo IM, Taminiau B, Mainil J.** " Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles." *Ann. Méd. Vét.* 2006; 150 : 108.
- **Vincent J.M., 1970.**-The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford ,United Kingdom. Plant Physiol 131, 976-984
- **Vernié T. 2008.**-Analyse fonctionnelle d'EFD, Un régulateur transcriptionnel de la nodulation au cours de l'interaction symbiotique entre *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti* ,thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université toulouse III discipline : *biosciences végétales*.
- **Young J PW., Crossman L C ., Johnston AWB . , Thomson N R. ., Ghazoui Z F., Hull KH ., Wexler M., Curson ARJ** ,The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizabale core and accessory compnents genome biology 2006 :34(doi:10.1186/gb-2006-7-4-r34)
- **Yang, W.C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H. and Bisseling, T. (1994)** Rhizobium nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. The Plant Cell, 6 (10): 1415-1426.

### Sites web :

- 1) <http://fr.wikipedia.org/wiki/Azote>
- 2) [http://fr.wikipedia.org/wiki/Cat%C3%A9gorie:M%C3%A9tabolisme\\_de\\_l'azote](http://fr.wikipedia.org/wiki/Cat%C3%A9gorie:M%C3%A9tabolisme_de_l'azote)
- 3) <http://www.cegepstefoy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/botanique/notesnutrition/notesnutrition4.htm&usg>
- 4) <http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-074.htm>
- 5) [http://www.audreco.com/aquario/index.php?article=aquariophilie\\_cycle\\_azote](http://www.audreco.com/aquario/index.php?article=aquariophilie_cycle_azote),
- 6) <http://fr.answers.yahoo.com/question/index?qid=20091112075047AAiZ3odt>
- 7) <http://georges.dolisi.free.fr/Microbio/TP/Rhizobium.htm>

- 8) <http://www.intellego/doc/26724>
- 9) <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/field/news/croptalk/2009/ct-0909a1.html>
- 10) <http://www.astrobgs.dyndns.org/astro2/utls1/crdenarie.htm#genes>
- 11) [http://www.edk.fr/reserve/print/e-docs/00/00/0B/10/document\\_article.md](http://www.edk.fr/reserve/print/e-docs/00/00/0B/10/document_article.md)
- 12) <http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-074.htm>
- 13) <http://jb.asm.org/cgi/content/full/185/1/325>
- 14) <http://ead.univangers.fr/~jaspard/Page2/COURS/Zsuite/2Photosynthese>
- 15) <http://ead.univangers.fr/~jaspard/page2/cours/2n2nh3aacturee/2figures/3ferredoxine>
- 16) <http://cmgm.stanford.edu/~mbarnett/genome.htm>
- 17) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1557990/>

Produced with ScanTOPDF