

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement Supérieur*  
&  
*de la Recherche Scientifique*

**Université Mentouri de Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la vie**  
**Département des Sciences de la Nature et de la vie**

N° d'ordre : 214/ Mag /2006  
Série : 015/ SN /2006

*Mémoire de Magistère*  
*en*  
*Génétique Moléculaire*

Présenté par :  
*M<sup>elle</sup> GHARZOULI Razika*  
**Thème**

**Influence d'agents mutagènes, les rayons  
Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères  
phénotypiques de quelques  
espèces de *Rhizobium* sp.**

Soutenance le : 18/09/2006

Devant le jury d'Examens :

<b><u>Présidente</u></b> : M <sup>me</sup> . D. NAIMI	Professeur – Université de Constantine
<b><u>Rapporteur</u></b> : Mr. A. BENGUEDOUAR	Professeur – Université de Constantine
<b><u>Examineurs</u></b> : M <sup>me</sup> . D. SATTA.	Professeur – Université de Constantine
Mr. Y. BENHIZIA	Maître de Conférences – Université de Constantine

*Année Universitaire 2005-2006*

## *REMERCIEMENTS*

### **« Après avoir remercié ALLAH le tout puissant »**

Je tiens avant tout, à remercier vivement Mr. A. BENGUEDOUAR Professeur à l'université de Constantine, pour m'avoir accepté de m'encadrer, afin de mener ce travail à terme. Qu'il trouve ici, l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance, pour tous les efforts, sa rigueur, ses critiques constructives, son savoir et son honnêteté, des qualités dont je ne suis pas cessé de m'inspirer pendant toutes les phases de mon travail.

Mes remerciements vont également à Mr. Y. BENHIZIA qui ma régulièrement suivi dans la réalisation pratique de ce travail et surtout pour ces conseils utiles et sa présence continue. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements à Mr Andrea Squartini Professeur à l'université de Padoue (Italie) qui m'envoyé le Calcofluor et pour m'avoir proposé le protocole de sélection des mutants par ce produit.

Je tiens aussi à remercier Mr D. KHLIFI professeur à l'université de Constantine qui ma énormément aidé dans la recherche de profil des protéines totales sur SDS-PAGE.

Mes remerciements aux membres du laboratoire des Biotechnologies : Mr. N. BOURGHOUD et Mr. M. A. HADDI.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement M<sup>me</sup>. H. BENHIZIA pour son encouragement et pour sa contribution dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements à M<sup>me</sup>. D. NAIMI pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury et à M<sup>me</sup>. D. SATTA d'avoir accepté de juger ce travail.

## المخلص

تتضمن هذه الدراسة تطبيق عامل طفري فيزيائي: الأشعة فوق بنفسجية على سلالات من نوع *Rhizobium sullae* المكونة للعقد الجذرية على جذور النبات البقولي *Hedysarum coronarium* وبتواجد نوعين آخرين من نفس الجنس: *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* و كذلك *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* كسلالات شاهدة.

استعمل Calcofluor كعامل انتخاب سمح لنا بعزل سلالات طافرة عاجزة عن إنتاج عديد سكريات خارج خلوية (EPS) ، مكونات خاصة بال *Rhizobium* تلعب دوراً أساسياً في تكوين العقد الجذرية. بهدف دراسة تأثير الطفرة الوراثية على التعايش، تم إجراء اختبار تكوين العقد الجذرية تحت ظروف بكتيريولوجية مرابفة.

السلالات الطافرة تم التعرف عليها مظهرها بمقارنتها مع السلالات الأصلية و ذلك بتحليل أشرطة البروتينات الكلية المتحصل عليها بتقنية الهجرة الكهربائية، مقاومة المضادات الحيوية، العاثيات و المعادن الثقيلة، بناء الحبيبات الدهنية Poly-β-hydroxybutyrate كذلك اختبارات فيزيولوجية بيوكيميائية و تنمائية.

يستعمل التطفر لإظهار دور الجينات في التعايش و كذلك تحسين فهم سلسلة التنظيم كلمات مفتاحية:

Calcofluor Exopolysaccharides Hedysarum Rhizobium

## ABSTRACT

This study consists in applying a physical mutagen agent the ultraviolet rays on the strain of the species *Rhizobium sullae* nodulate legume species *Hedysarum coronarium* and in the presence of two other species belonging to the same genera: *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* et *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*.

The use of Calcofluor like an agent of selection we allowed to locate defective mutants in the production of the exopolysaccharides, components specific to the rhizobia which play an essential role in the formation of the nodules. In the objective studied the influence of the change on the symbiotic process, a test of nodulation under conditions bacteriological controlled is carried out.

The mutants are then characterized phenotypically in comparison with the wild strains by an analysis of a profile of total proteins on SDS-PAGE, intrinsic resistance to antibiotics and the bacteriophages, the tolerance with heavy metals, the synthesis of the granules of PHB as well as physiological, biochemical and nutritional tests.

The mutagenesis is used to reveal the function of genes involved in the symbiotic process and to improve comprehension of the steps of regulation.

**Key words:** *Rhizobium*, *Hedysarum*, Mutation, Calcofluor, Exopolysaccharide

## RESUME

Cette étude consiste à appliquer un agent mutagène physique les rayons Ultra-violet, sur des souches de l'espèce *Rhizobium sullae* nodulant la légumineuse *Hedysarum coronarium* et en présence de deux autres espèces appartenant au même genre : *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* et *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*.

L'utilisation du Calcofluor comme agent de sélection nous a permis de repérer des mutants déficients dans la production des exopolysaccharides (EPS), constituants propres aux rhizobia qui jouent un rôle essentiel dans la formation des nodules. Dans l'objectif d'étudier l'influence de la mutation sur le processus symbiotique, un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées est réalisé.

Les mutants sont ensuite caractérisés phénotypiquement en comparaison avec les souches sauvages par une analyse d'un profil des protéines totales sur SDS-PAGE, la résistance intrinsèque aux antibiotiques et aux bactériophages, la tolérance aux métaux lourds, la synthèse des granules de Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate ainsi que des tests physiologiques, biochimiques et nutritionnels.

La mutagenèse est utilisée pour révéler la fonction des gènes impliqués dans le processus symbiotique et d'améliorer la compréhension des cascades de régulation.

**Mots clés : *Rhizobium*, *Hedysarum*, Mutation, Calcofluor, Exopolysaccharides.**

# SOMMAIRE

Introduction .....	1
CHAPITRE UN – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
Première partie : La symbiose <i>Hedysarum – Rhizobium</i>	
1- Le cycle de l'azote .....	3
1-1 L'importance de l'azote dans la nutrition des plantes.....	3
1-2 La fixation biologique de l'azote.....	3
2- la symbiose : <i>Rhizobium – Hedysarum</i> .....	4
2-1 Le microsymbiant : Le <i>Rhizobium</i> .....	4
2-1-1 Caractères généraux .....	4
2-1-2 Caractères biochimiques et physiologiques.....	5
2-1-3 Caractères génétiques.....	5
2-1-4 La taxonomie du <i>Rhizobium</i> .....	6
2-2 Le macrosymbiant : <i>Hedysarum coronarium</i> L .....	10
2-2-1 Présentation des légumineuses .....	10
2-2-2 Présentation de la plante: <i>Hedysarum coronarium</i> L .....	10
2-3 La relation entre la plante <i>Sulla</i> et son microsymbiant .....	11
3- La génétique de la nodulation.....	11
3-1 La génétique du <i>Rhizobium</i> .....	11
3-1-1 Les gènes de la nodulation <i>nod</i> .....	11
3-1-2 Les gènes de la fixation de l'azote <i>nif</i> et <i>fix</i> .....	13
3-2 La génétique de la plante.....	13
3-3 Interaction moléculaire plante- <i>Rhizobium</i> .....	14
3-4 Les étapes de la nodulation .....	16
3-5- Les exopolysaccharides facteurs de nodulation .....	18
4- Métabolisme de l'azote .....	19
4- 1 La structure de la nitrogénase.....	19
4-2 Mécanisme de la réduction de l'azote .....	20
Deuxième partie : Les mutations génétiques.	
1- Définition d'une mutation.....	22
2- Caractères de la mutation bactérienne .....	22
3- Les agents mutagènes .....	23
3-1- Les agents chimiques .....	23
3-1-1- Les analogues de bases .....	23
3-1-2- Agents désaminant ou agents modifiant l'ADN .....	23
3-1-3- Agents intercalents.....	23
3-1-4- Agents alkylant .....	24
3-2- Les agents physiques .....	25
2-2-1- Les radiations ionisantes .....	25
3-2-2- Les radiations non ionisantes : la lumière ultraviolette .....	25
4- Les systèmes de réparations de l'ADN .....	26
4-1- La restauration de la zone endommagée .....	27
4-2- La suppression de la zone endommagée .....	28
4-3- La tolérance de la zone endommagée .....	

5- Les phénotypes mutants .....	28
6- Criblage et détection des mutants .....	29
7- Les types de la mutagenèse .....	29
7-1- La mutagenèse classique .....	31
7-2- La mutagenèse insertionnelle .....	31
7-3- La mutagenèse dirigée .....	31
<b>CHAPITRE DEUX - MATERIELS ET METHODES</b>	
1- Matériels biologiques .....	
1-1 Milieux utilisés .....	33
1-2-Conservation des souches .....	33
1-3-Caractères cultureux .....	34
2- Irradiation des souches sauvages et réparation des mutants .....	34
3- Coloration de Gram .....	34
4- Test de nodulation .....	36
5- Tests nutritionnels .....	37
5-1- Utilisation de la source de carbone .....	39
5-2- Utilisation de la source d'azote .....	39
5-3- Besoin en vitamines .....	39
6- Tests biochimiques .....	39
6-1- Réduction des nitrates .....	40
6-2- Hydrolyse de l'urée .....	40
6-3- Activité cellulosique .....	40
6-4- Activité pectinasique .....	40
7- Tests physiologiques .....	40
7-1- Tolérance au chlorure de sodium .....	41
7-2- Effet de la température .....	41
7-3- Croissance à différents pH .....	41
7-4- Résistance aux métaux lourds .....	41
7-5- Résistance aux antibiotiques .....	41
8- Sensibilité aux phages .....	41
9- Détermination des profils protéiques sur SDS-PAGE .....	42
9-1- Principe .....	43
9-2- Protocole .....	43
10- La coloration du noir Soudan .....	43
<b>CHAPITRE TROIS - RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
1- Caractères cultureux .....	
2- Sélection et isolement des mutants .....	45
3- Examen microscopique .....	46
4- Test de nodulation .....	52
5-Tests nutritionnels .....	53
5-1-Utilisation de la source de carbone .....	
5-2- Utilisation de la source d'azote .....	

5-3-Besoin en vitamines .....	57
6-Tests biochimiques .....	57
6-1-Réduction des nitrates .....	59
6-2-Hydrolyse de l'urée .....	61
6-3- Activité cellulosique .....	63
6-4-Activité pectinasique .....	63
7-Tests physiologiques .....	65
7-1Tolérance au chlorure de sodium .....	65
7-2- Effet de la température .....	65
7-3Croissance à différents pH .....	67
7-4- Résistance aux métaux lourds .....	67
7-5- Résistance aux antibiotiques .....	69
8- Sensibilité aux phages .....	70
9- Détermination des profils protéiques sur SDS-PAGE .....	72
10- La coloration de noir Soudan .....	75
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION .....	77
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	78
ANNEXES .....	81
	83
	89
	100



## CHAPITRE UN

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## Introduction

Les légumineuses jouent un rôle important dans le maintien de la productivité en agriculture. Elles sont étudiées parce qu'elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique par l'intermédiaire de partenaires symbiotiques : les rhizobia.

La famille des légumineuses renferme trois sous familles: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae*. Le genre *Hedysarum* fait partie des légumineuses, il est composé d'un grand nombre d'espèces avec une répartition très étendue dans le monde.

Parmi les espèces de ce dernier groupe, *Hedysarum coronarium* (légumineuse *Fabaceae*), appelée couramment Sulla ou Sainfoin d'Espagne, est la seule espèce cultivée dans le Bassin Méditerranéen pour la production de fourrage (Marghali et coll., 2002). Cette légumineuse se caractérise par ses propriétés agronomiques, notamment sa tolérance à la sécheresse, la salinité et le sol alcalin ainsi que sa haute productivité et sa qualité fourragère, font d'elle un meilleur choix pour la fertilisation des sols argileux et les régions semi arides (Abedelguerfi-Berrekia et coll., 1988).

Le deuxième partenaire de la relation symbiotique est le *Rhizobium*, appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* qui comporte aussi les genres, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* et *Bradyrhizobium*. L'espèce *Rhizobium sullae* appartient au genre *Rhizobium*, nodulant spécifiquement la légumineuse *Hedysarum coronarium* (Sulla) (Squartini et coll., 2002)

En effet la fixation symbiotique de l'azote entre la plante Sulla et son hôte hautement spécifique, *Rhizobium sullae*, a reçu récemment une grande attention (Benguedouar, 2000).

L'association symbiotique *Rhizobium*-Légumineuse présente un haut niveau de spécificité basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires. Cette relation se manifeste par la formation des structures racinaires, les nodules qui sont le siège de la fixation d'azote atmosphérique.

Les rhizobia, durant l'infection de la plante hôte, forment un cordon d'infection. Ce cordon s'allonge du fait de la division de la majorité des bactéries. Cependant, certaines d'entre elles arrêtent de se diviser et se différencient en bactéroïdes capables de fixer spécifiquement l'azote atmosphérique et de le réduire en ammoniac sous l'action de la nitrogénase. En échange de celui-ci la plante fournit aux rhizobia les nutriments nécessaires à leur développement (Gage, 2004).

L'une des premières approches mises en place pour étudier la symbiose a été de créer des mutants par mutagenèse par insertion de transposons. Cependant, la compréhension du mécanisme au niveau génétique s'est accentuée avec le développement de la génomique et notamment grâce aux séquençages complets des génomes de symbiotes tels que *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium etli* et *Rhizobium leguminosarum* (Yann, 2006).

L'objectif principal de notre étude est de mettre en évidence l'apport de la mutation génétique à la compréhension de l'interaction symbiotique bactéries-légumineuse.

Ce travail consiste d'abord à irradier des souches de *Rhizobium sulae* nodulant la légumineuse *Hedysarum coronarium* et deux autres espèces du même genre, *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* et *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* par un agent mutagène physique, les rayons Ultra-Violets. L'irradiation est effectuée sous hotte à flux laminaire muni d'une lampe à U.V ( $\lambda_{320}$ ).

La sélection des mutants par le Calcofluor, colorant fluorescent sous U.V, permet de révéler les cellules bactériennes mutantes qui sont déficientes dans la production d'exopolysaccharides (EPS), constituants des rhizobia qui joue un rôle important dans le processus symbiotique.

Un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées est réalisé avant et après l'action de l'agent mutagène. Une analyse des protéines cellulaires totales des sauvages et des mutants est effectuée sur SDS-PAGE. En fin, les souches mutantes sélectionnées subiront une caractérisation phénotypique comparative avec les sauvages par la réalisation des tests suivants : biochimiques, physiologiques, nutritionnels, la résistance intrinsèque aux antibiotiques, tolérance aux métaux lourds, résistance aux rhizobiophages et la recherche des granules lipidiques de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB).

## Première partie : **La symbiose *Hedysarum* – *Rhizobium***

Avant d'aborder le processus symbiotique, il est indispensable de présenter le cycle d'azote et l'importance de cet élément pour la croissance des plantes ainsi de définir les deux partenaires symbiotiques (*Rhizobium* – légumineuses).

### **1- Le cycle de l'azote**

#### **1-1 L'importance de l'azote dans la nutrition des plantes**

L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes. C'est un constituant important dans l'élaboration de nombreuses molécules tels que : les protéines les acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et divers composés primaires et secondaires des plantes (Hopkins, 2003)

L'azote favorise l'utilisation des hydrates de carbone, stimule le développement et l'activité racinaire, facilitant ainsi l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes. Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse. Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Vincent, 2002).

#### **1-2 La fixation biologique de l'azote**

On appelle fixation de l'azote le processus de transformation d'azote atmosphérique en ammoniac (Tortora ,2003). La fixation biologique de l'azote est le processus biochimique le plus important après l'assimilation du  $\text{CO}_2$ . Elle est très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible (Vincent, 2002).

Il existe trois processus naturels différents, permettent la transformation de l'azote gazeux en azote assimilable par les plantes (Hopkins, 2003) :

- **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.
- **Les bactéries et cyanobactéries fixatrices d'azote du sol** : Le sol contient de nombreuses espèces de bactéries (*Clostridium*, *Klebsiella*, *Chromatium*) et de cyanobactéries « appelées aussi *algues bleues* » (*Anabaena*, *Nostoc*) pouvant transformer l'azote atmosphérique en ammoniac.
- **Les bactéries des nodules de légumineuses** : Les bactéries symbiotiques (*Rhizobium*) fixent  $\text{N}_2$  des pores du sol et provoque la formation sur les racines (ou par fois sur les

tiges) de la plante hôte des structures multicellulaires hypertrophiées, nommées **nodules**.

L'azote fixé peut être (Tortora ,2003) :

- Utilisé par la plante hôte, après avoir subi une nitrification de l'ammoniac en nitrites puis en nitrates, assimilable par la plante.
- Excrété vers le sol à partir des nodules des racines.
- Libéré dans le sol quand les nodules meurent ou quand les résidus des plantes se décomposent après la récolte dans le sol.

## **2- la symbiose : *Rhizobium* - *Hedysarum***

### **2-1 Le microsymbiont : Le *Rhizobium***

Les rhizobia furent isolés par Beijerinck en 1888 et identifiés comme agents de la fixation d'azote, c'est Franck 1889 le premier a proposé le nom de *Rhizobium*.

#### **2-1-1 Caractères généraux**

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatives, strictement aérobies, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3 µm de longueur et non sporulant (Jordan, 1984). Phylogénétiquement, ils appartiennent à la subdivision d'*Alpha-Proteobacteria*. (Zakhia et de Lajudie, 2001; Laranjo et coll., 2002)

Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992).

Les espèces de *Rhizobium* en culture ont besoin d'un milieu de culture qui renferme une source de carbone et une source d'azote plus des sels minéraux (Somasegaran et Hoben ,1994). En comparaison avec d'autres bactéries de sol, les rhizobia et le *Bradyrhizobium* ont une grande exigence pour le  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  et  $Co^{2+}$ , leurs besoins en vitamines sont très variables, le genre *Bradyrhizobium* est généralement stimulé par la biotine, alors que le *Rhizobium* a besoin conjointement de thiamine et de pantothénate (Werner, 1992).

### **2-1-2 Caractères biochimiques et physiologiques**

Le *Rhizobium* possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobic; alors que dans les conditions d'anaérobic, les espèces de *Rhizobium* peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons (Werner, 1992 et Benguedouar 2000).

La voie de Enter-Doudoroff est le mécanisme principal du métabolisme des carbohydrates. (Werner, 1992)

Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH 6,0 à pH 7,0 (Somasegaran et Hoben ,1994). Les températures extrêmes sont de 4°C et 42,5°C. Les souches de *Rhizobium* peuvent se développer à pH compris entre 4,5 et 9,5 (Jordan, 1984).

### **2-1-3 Caractères génétiques**

La génétique du *Rhizobium* n'est pas chose simple, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Pelmont, 1995). Les souches de *Rhizobium* nodulant les légumineuses sont considérées particulièrement sensibles en raison de leurs caractéristiques génétiques (Patrícia et coll., 1998; Raposeiras et coll., 2002).

Le génome du *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un mégaplasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieur à 1 Mb, selon les espèces (Laranjo et coll., 2002).

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasmide (P<sub>sym</sub>) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti*. Les gènes responsables de la nodulation (Nod) et de la fixation de l'azote (Fix, Nif) dans les souches de *Rhizobium* sont situés sur ce simple réplicon symbiotique, des gènes codent pour des bactériocines et de la production des pigments sont aussi présents (Werner, 1992, Pelmont, 1995, Patrícia et coll, 1998).

La spécificité de l'hôte est codée par les gènes du plasmide sym, un échange dans ce plasmide signifie un échange dans la spécificité de l'hôte (Pelmont, 1995).

L'analyse de 45 souches de *R. sulae* provenant de diverses régions d'Espagne a montré la présence dans chaque souche d'un plasmide de dimension comprise entre 187 et 349M Da (Benguedouar, 2000).

L'existence de séquences répétitives d'ADN est une caractéristique du génome de *Rhizobium*. Elles peuvent fournir des emplacements pour la recombinaison et des réarrangements génomiques ainsi des délétions d'ADN, ayant pour résultat la perte ou des changements des propriétés symbiotiques. En conséquence, cette instabilité génétique compromet l'utilisation des souches de *Rhizobium* dans la production commerciale d'inoculum (Patrícia et coll., 1998; Raposeiras et coll., 2002).

#### **2-1-4 La taxonomie du *Rhizobium***

Les membres de la famille de la plante *Fabaceae* ont la capacité de former une symbiose avec des bactéries du sol (*Rhizobiaceae*) des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ou *Azorhizobium*. (Corbière, 2002)

Suite à l'adoption de la taxonomie polyphasique comme critère de caractérisation, leur classification a subi de nombreux remaniements ces dernières années (Zakhia et de Lajudie, 2001).

La capacité de certains rhizobia à infecter et noduler un groupe particulier des espèces de légumineuses est très importante dans la classification du *Rhizobium* (Somasegaran et Hoben, 1994).

Les premières classifications se basent sur les tests d'inoculation croisées entre les rhizobia et les plantes hôtes pour leur identification, la plante hôte n'était pas le critère unique tenu en compte pour la classification de *Rhizobium*, les espèces du *Rhizobium* ont été classifiées en deux genres : le *Rhizobium* et le *Bradyrhizobium* (Vincent, 1970).

- Le genre *Rhizobium*: regroupait les espèces à croissance rapide, *R. leguminosarum* avec les trois biovars (*viciae*, *trifolii*, *phaseoli*), *R. meliloti* et *R. loti*, *R. galegae*, *R. tropici*, *R. itli*; *R. huakuii*, *R. cicer*, *R. sulae*.
- Le genre *Bradyrhizobium* : regroupe les bactéries à croissance lente avec les espèces *B. japonicum*, *B. lupini*, *B. elkani* (Zakhia et de Lajudie, 2001).

Normalement le premier isolement des souches de *Rhizobium* est à partir de nodules des légumineuses, ce qui a donné des difficultés de définir les relations phylogénétiques avec d'autres bactéries du sol. Les gènes de nodulation, de la fixation de l'azote et de la spécificité de l'hôte sont généralement localisés sur le plasmide symbiotique (P sym). Ce dernier peut être perdu ou transféré d'une souche à l'autre sous certaines conditions environnementales, ce qui conduit à la perte de la capacité de nodulation. C'est la raison pour laquelle la classification basée sur la spécificité de l'ôte a été abandonnée. (Fenton, 1994)

La classification du *Rhizobium* devrait être définie sur la base des résultats des analyses d'hybridation DNA-DNA ou rRNA-DNA. L'arbre de 16SrDNA est un autre outil qui peut être utilisé pour identifier les souches de *Rhizobium*. La PCR et RFLP sont considérées comme des méthodes rapides pour l'identification des isolats des nodules et les nouveaux taxons ainsi que les profils des compositions des acides gras. (Zakhia et de Lajudie, 2001)

Cet ensemble des techniques de biologie moléculaire est appelé approches taxonomiques polyphasiques. La mise en considération des tests distinctifs particuliers des rhizobia (performance symbiotiques, sérologie, sensibilité au phage) qui sont secondaires pour la taxonomie mais essentielles pour les études pratiques et l'utilisation des souches (Fenton, 1994).

Grâce à cette approche polyphasique, la classification des rhizobia a progressé d'un seul genre et 6 espèces en 1982, à 6 genres et 28 espèces en 2001 et n'est pas encore définitive (tableau 1) (Zakhia et de Lajudie, 2001).



**Tableau 01** : Classification courante des rhizobia (Zakhia et de Lajudie, 2001, Weir ,2005)

Genre	Espèce	Plante hôte	
<b>Rhizobium</b> <b>Famille: Rhizobiaceae</b>	<i>R. leguminosarum</i> biovar viciae	<i>Pisum sativum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>	
	biovar trifolii	<i>Trifolium pratense</i>	
	biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>R. tropici</i> Type II A	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala</i>	
	Type II B	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala</i>	
	<i>R. etli</i> biovar phaseoli biovar mimosae	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Mimosa affinis, Leucaena leucocephala, Phaseolus vulgaris L.</i>	
	<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum &amp; other plants of arid regions</i>	
	<i>R. gallicum</i> biovar gallicum biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	
	<i>R. galegae</i> biovar orientalis biovar officinalis	<i>Galega orientalis</i> <i>Galega officinalis</i>	
	<i>R. giardinii</i> biovar giardinii biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>R. huautlense</i> <i>Rhizobium sullae</i> <i>Rhizobium arachis</i> <i>Rhizobium daejeonense</i> <i>Rhizobium hainanense</i> <i>Rhizobium indigoferae</i> <i>Rhizobium loessense</i> <i>Rhizobium lupine</i> <i>Rhizobium mongolense</i> <i>Rhizobium undicola</i> <i>Rhizobium yangligense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	
	<b>Mesorhizobium</b> <b>Famille:</b> <b>Phyllobacteriaceae</b>	<i>M. loti</i> <i>M. huakuui</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. tianshanense</i>	<i>Lotus corniculatus</i> <i>Astragalus sinicus, Acacia</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Glycyrrhiza pallidiflora &amp; other tropical plants</i>

	<p><i>M. mediterraneum</i>  <i>M. plurifarium</i>  <i>M. amorphae</i>  <i>M. chacoense</i>  <i>M. septentrionale</i>  <i>M. temperatum</i></p>	<p><i>Cicer arietinum</i>  Acacia, <i>Prosopis</i>  <i>Amorpha fruticosa</i></p>
<p><b>Sinorhizobium</b>   <b>Famille: Rhizobiaceae</b></p>	<p><i>S. meliloti</i>   <i>S. fredii</i>  chemovar <i>fredii</i>  chemovar <i>siensis</i>  <i>S. sahelense</i>  biovar <i>acaciae</i>  biovar <i>sesbaniae</i>  <i>S. terangaie</i>  biovar <i>acaciae</i>  biovar <i>sesbaniae</i>  <i>S. medicae</i>  <i>S. kostiense</i>  <i>S. arboris</i>  <i>S. abri</i>  <i>S. americanus</i>  <i>S. indiaensis</i>  <i>S. kostiense</i>  <i>S. kummerowiae</i>  <i>S. saheli</i>  <i>S. xinjiangense</i>  <i>S. adhaerens</i></p>	<p><i>Medicago</i>, <i>Melilotus</i>, <i>Trigonella</i>   <i>Glycine max</i>  <i>Glycine max</i>  <i>Sesbania spp.</i>  <i>Acacia spp.</i>  <i>Sesbania spp.</i>   <i>Acacia spp.</i>  <i>Sesbania spp.</i>  <i>Medicago</i>  <i>Acacia</i>, <i>Prosopis</i>  <i>Acacia</i>, <i>Prosopis</i></p>
<b>Allorhizobium</b>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
Autres	<p><i>Methylobacterium nodulans</i>   <i>Burkholderia tuberum</i> (STM678)   <i>Burkholderia phymatum</i> (STM815)   <i>Ralstonia taiwanensis</i>   <i>Devosia neptuniae</i>   <i>Blastobacter denitrificans</i>   <i>Ochrobactrum lupine</i></p>	<p>Sy <i>et al.</i> 2000. Jourand <i>et al.</i> 2004   Moulin <i>et al.</i> 2001, Vandamme <i>et al.</i> 2002   Vandamme <i>et al.</i> 2002   Chen <i>et al.</i> 2001, Chen <i>et al.</i> 2003  Rivas <i>et al.</i> 2003   Van Berkum &amp; Eardly 2002  Trujillo <i>et al.</i> 2005</p>

## **2-2 Le macrosymbiont : *Hedysarum coronarium* L.**

### **2-2-1 Présentation des légumineuses**

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, avec plus de 17 000 espèces. Cette famille comprend aussi bien des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses ; elles colonisent aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre (Dreyfus, 1997).

La famille des légumineuses renferme 3 sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papillioideae*. Environ 3400 espèces (20% de toutes les légumineuses), ont été examinées pour la nodulation par le *Rhizobium*. Dans les 3 sous familles le pourcentage des espèces nodulantes est largement différent, 97% d'espèces de la sous-famille des *Papillioideae* sont nodulées, 90% dans *Mimosoideae* et seulement 23% des espèces de *Caesalpinioideae* (Werner, 1992).

Les légumineuses sont des plantes dont les fruits sont presque constamment des gousses, le gynécée est formé d'un seul carpelle excentrique, libre avec un ovaire uniloculaire. La placentation est classiquement marginale. Le feuillage est de type composé, penné, et originellement stipulé. Les inflorescences sont des grappes (Lannoy, 1999).

### **2-2-2 La légumineuse *Hedysarum coronarium* L**

La plante *Hedysarum coronarium* est également appelée Sulla ou Sainfoin d'Espagne. C'est une plante, Herbaceae, annuelle, ou pérenne, droite ou rampante peut atteindre jusqu'à 0,3 à 1,5 m (et Frame, 2000).

C'est une espèce diploïde ( $2n = 16$  chromosomes) et allogame, elle est fortement enracinée, possède une racine de 2 m de longueur et de nombreuses racines secondaires. La floraison commence au début de l'été, où les fleurs sont réunies en racème jusqu'à 35 fleurs; s'étendant de la rose à la violette mais généralement cramoisi. Les tiges sont épaisses, boisées, simples ou ramifiées et généralement creuses (Quezel et Santa, 1962 et Frame, 2000).

Les feuilles caduques sont alternées disposées dans 7 à 15 paires de feuillets ovales ou arrondis et un feuillet terminal, ces feuilles se caractérisent par une surface lisse et une phase inférieure poilue (Frame, 2000). Les gousses épineuses ont de 3 à 8 segments, chaque segment contient une semence crème, à brun clair de 3 mm de diamètre, aplati avec un profil presque circulaire (Terril, 1992 et Frame, 2000)

La température de croissance varie de 4 à 30°C, mais elle est incapable de pousser à des températures beaucoup au-dessous de zéro. C'est une plante florissante sur des sols avec

un pH variant entre pH 6 et pH 8,5, en présence des formes libres du  $\text{Ca}^{2+}$ , une quantité suffisante de phosphore est nécessaire pour sa croissance (Terril, 1992 et Frame, 2000).

En raison de leur polymorphisme morphologique et leur variabilité génétique, plusieurs espèces du genre *Hedysarum* sont étudiées (Terril, 1992, Frame, 2000).

Cette plante joue un rôle dans l'amélioration et la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique, dans l'apiculture (les fleurs du *Sulla* sont pollinisées principalement par les abeilles), ainsi la protection des sols contre l'érosion (Frame, 2000 et Hannachi-Salhi, 2004).

### **2-3 La relation entre la plante *Sulla* et son microsymbiont**

La bactérie fixatrice d'azote, nodulant la plante *Sulla* a été isolée et référée à *Rhizobium sullae*. La souche a été caractérisée, comme bactérie à croissance rapide et hautement spécifique pour l'espèce *Hedysarum coronarium* qui est incapable de noduler *Trifolium repens*, *T. subterraneum*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Glycine max*, *Vigna unguiculata* et *Cicer arietinum*. (Casella et coll., 1984, Struffi et coll., 1998)

Dans l'association *Hedysarum coronarium-Rhizobium sullae*, il existe une spécificité nette entre l'écotype de la plante et la souche de *Rhizobium*. Plusieurs travaux ont été consacrés pour vérifier cette spécificité. Il a été observé que le microsymbiont de la plante *Sulla* peut noduler la plante *Hedysarum fluxuosum* mais il est incapable de fixer l'azote atmosphérique. Alors que la bactérie isolée des nodules de *H. fluxuosum* ne peut pas noduler *H. coronarium*. Ils ont trouvé que le *Rhizobium sullae* nodule la quasi-totalité des autres espèces du genre *Hedysarum*, mais l'activité *azofixatrice* est absente. D'autre part, le symbiont de *Onobrichys viciifolia* est incapable de noduler la plante *Sulla*, ce qui confirme la grande spécificité qui existe entre les 2 partenaires symbiotiques (Struffi et coll., 1998 et Benguedouar, 2000).

## **3- La génétique de la nodulation**

### **3-1 La génétique du *Rhizobium***

#### **3-1-1 Les gènes de la nodulation *nod***

Les gènes *nod* portés par le *Rhizobium* et le *Bradyrhizobium*, sont les gènes de symbiose les plus spécifiques pour le microsymbiont, permettant la communication avec la plante hôte pour former les nodules. (Zhang et coll., 2000).

- **Les gènes *nod D***

Les gènes *nod D* ont été suggérés jouer un rôle dans la spécificité de l'hôte. Il existe 3 copies du gènes *nod D* (*nod D1*, *nod D2*, *nod D3*) ce qui constitue un avantage pour l'augmentation de l'interaction avec la plante hôte. (Lucinda, 1998).

Les gènes *nod D* sont activés par des différents flavonoïdes et flavones, les protéines Nod D activent l'expression des gènes de nodulation du *Rhizobium*, en se fixant sur leurs promoteurs spécifique appelé "nod box" (Pelmont, 1995, Debellé et coll., 2001)

- **Les gènes *nod ABC*:**

Appelés aussi les gènes communs présents chez tous les rhizobia, sont des gènes interchangeables, nécessaires pour la formation du "curling" et pour déclencher une série de divisions des cellules végétales (Sharma et coll., 1993 et Gage, 2004).

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)

*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).

- **Les gènes *nod* de la spécificité de la plante**

Un grand nombre de gènes *nod* détermine la spécificité de la plante hôte. Ces gènes sont appelés aussi les *hns* (host specificity of nodulation), sont des gènes non interchangeables entre les souches; exemples: *nod H*, *nod EGF*, *nod PO* et *nod C*. Une mutation au niveau de ces gènes a pour effet de provoquer un changement de la spécificité de la souche à son hôte; exemple : la mutation au niveau des gènes *nod E* et *nod F* peut réduire ou retarder la nodulation de *Rhizobium leguminosarum*. (Pelmont, 1995)

Nod Rm1 (un type de facteurs Nod) est un oligosaccharide spécial à base de N acétyl glucosaminé contenant un acide gras insaturé en C16 et un groupe sulfate, synthétisé par les produits des gènes *nod ABC* (Pelmont, 1995 et Werner, 1992).

Nod Rm1 est sécrété par les rhizobia sous l'influence d'un flavonoïde la lutéoline, à condition que les gènes *nod* communs et le gène de spécificité *nod H* soient fonctionnels. Les trois premiers (*nod ABC*) servent à constituer le polysaccharide qui comportera selon le cas 4 à 5 unités glucidiques, les gènes *nod H* et *nod Q* servent à diriger le griffage du sulfate sur le polysaccharide (Zhang et coll., 2000, Debellé et coll., 2001).

- **Les gènes *nod O***

Le gène *nod O* n'est pas localisé sur le plasmide Sym, code pour une protéine sécrétée par la souche de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* qui joue un rôle dans la signalisation durant la nodulation des légumineuses et la détermination de la spécificité de l'hôte avec les facteurs hsn. Elle est également essentielle pour la synthèse d'autres facteurs de nodulation (Werner, 1992, Finnie, 1997, Gage, 2000).

### **3-1-2 Les gènes de la fixation de l'azote *nif* et *fix***

Les gènes de la nitrogénase sont décrits chez *Klebsiella*. Les gènes *nif* sont 21 et sont portés par le chromosome circulaire bactérien, ils codent pour la régulation et la fixation de l'azote. (Leclerc, 1995 et Pelmont, 1995)

Les gènes *nif K*, *nif D*, *nif H* sont les gènes de structure de la dinitrogénase réductase et la dinitrogénase. Le produit des gènes *nif K* et *nif D* forme la dinitrogénase, appelée la protéine MoFe. (Hopkins, 2003)

Les 5 gènes *nif Q*, *B*, *V*, *N* et *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 *nif F* et *J* sert au transport des électrons synthétisés par le flavodoxine et le pyruvate-flavodoxine-oxidoréductase. Le produit des gènes *nif S* et *U* prend une place dans le processus de la dinitrogénase et celle de *nif M* dans le processus de la dinitrogénase réductase (Werner, 1992).

Le produit du gène *nif A* est une protéine thermolabile, jouant un rôle d'un activateur de transcription des opérons *nif* en dehors de celle de l'opéron *nif L* et *nif A*.

L'opéron *nif C* code pour un répresseur de transcription inactive la protéine Nif A, en présence de l'oxygène et de l'azote fixé. La fonction de *nif C*, *W*, *X*, *Y* et *Z* est non connue. (Werner, 1992).

Les 21 gènes *nif* sont organisés en 8 opérons, le séquençage de ces derniers montre que les régions promotrices de ces opérons sont très conservées (Werner, 1992 et Leclerc, 1995)

Les genres : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Azorhizobium* ont en plus des gènes *nif* qui ont une fonction similaire à celle de *Klebsiella*, un nombre de gènes *fix* qui sont importants pour la fixation symbiotique de l'azote, où la fonction est inconnue, sont présents et ont été identifiés. (Sharma et coll., 1993)

Le gène *fix X* encode la protéine ferrédoxine, essentielle pendant l'étape de la fixation symbiotique de l'azote. Comme elle est importante pour la vie des cellules bactérienne à l'état libre sous des conditions microaérobies (Werner, 1992).

### **3-2 La génétique de la plante:**

Les facteurs Nod secrétés par les bactéries à la suite d'une reconnaissance mutuelle des flavones, induisent une voie de signalisation déclenchant différentes réponses sur la racine de la plante hôte, parmi lesquelles des oscillations périodiques de la concentration en calcium au niveau des poils absorbants (Dénarié et coll., 2004).

Les gènes DMI1 et DMI 2 sont nécessaires pour l'induction de cette réponse calcique.

- DMI 2 codant pour une récepteur-kinase qui pourrait être impliquée dans la perception des deux types de signaux symbiotiques, bactériens et fongiques (Dénarié, 2004).
- DMI 1 code pour une protéine largement répandue dans le règne végétale 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 (Dénarié et coll., 2004, Dénarié, 2004).
- 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 des DMI1 dans la voie de signalisation (Dénarié et coll., 2004, Dénarié, 2004).

### **3-3 Interaction moléculaire plante-*Rhizobium***

Les légumineuses établissent une relation symbiotique avec les bactéries du sol, le *Rhizobium*, cette association se manifeste par la formation sur les racines des légumineuses hôtes des organes spécialisés, les nodosités. Au sein desquels, les rhizobia réduisent l'azote atmosphérique en ammonium, assimilable par les plantes (Lindström et coll., 2002 et Dénarié et coll., 2004).

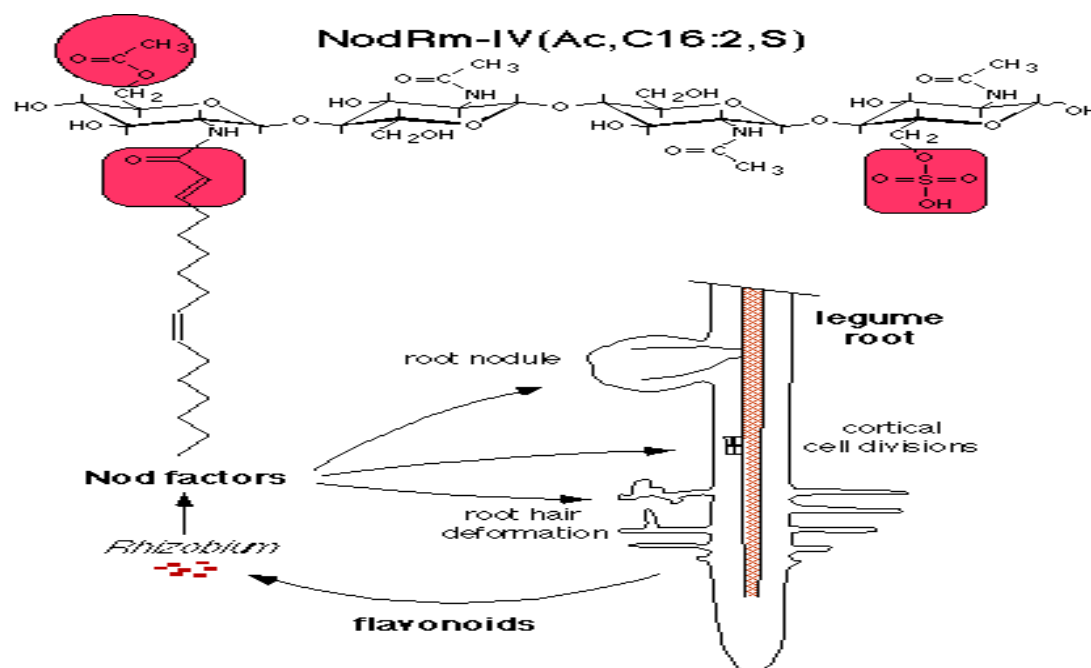
L'interaction plante – *Rhizobium* est hautement spécifique ; une espèce bactérienne n'affecte et nodule qu'un nombre défini d'espèce végétale, néanmoins le degré de spécificité est variable selon la souche bactérienne et la plante hôte (Debellé et coll., 2001).

L'association entre les rhizobia et les légumineuses est facilitée par l'interférence moléculaire qui a lieu dans la rhizosphère (Terefework, 2002). Divers composés déterminant une chimiotaxie positive sont émis par la racine, tel que : les hydrates de carbone, des acides aminés, des acides organiques, des vitamines et des dérivés phénoliques, dont la plupart augmentent la croissance des microorganismes dans la rhizosphère (Pelmont, 1995 et Terefework, 2002). Parmi ces composés, les flavonoïdes sont importants dans la perspective

symbiotique, car ils induisent les gènes *nod* contrôlant la synthèse des facteurs Nod, responsables de la spécificité et de la reconnaissance entre les symbiotes et le déclenchement de l'organogénèse nodulaire. Donc le développement nodulaire est programmé par la plante et déclenché par la bactérie (fig. 1) (Terefework, 2002).

Les gènes *nod D* qui reconnaissent les flavonoïdes inducteurs, activent la transcription des opérons porteurs d'autres gènes notamment l'opéron *nod ABC nod EF* et la *nod M*. (Pelmont, 1995).

Les facteurs Nod produits par des rhizobia différents partagent une structure chimique commune d'un lipochitooligosaccharide (LCO) (fig.1), un type de molécule qui a été détecté jusqu'à présent exclusivement chez les rhizobia (Debellé et coll., 2001).



**Figure 1:** Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique les facteurs Nod. (Deléglise, 2001)

Les facteurs Nod induisent de profondes transformations dans les racines de l'hôte pour préparer l'infection symbiotique et induire l'organogénèse des nodosités: réorganisation du cytosquelette, activation de la transcription de gènes symbiotiques précoces (nodulines), une dépolarisation de la membrane plasmique et un flux des ions, induction de divisions cellulaires (Pingret et coll., 1998, Dénarié, 2004, Corbière, 2002).



Les LCO exercent une action hormonale sur la racine et provoquent l'incurvation de l'extrémité des poils absorbants en crochet caractéristique ainsi que la formation de pré-nodules par stimulation de la mitose des cellules corticales (Pingret et coll., 1998).

### 3-4 Les étapes de la nodulation

L'établissement de la symbiose est un phénomène complexe, qui se développe à travers une série d'événements et de transformations complexes et ordonnés (Fig 2).

Les racines rejettent par leur métabolisme normal, des substances qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol. Certaines d'entre elles appartiennent aux groupes des flavonoïdes tels que les flavones, isoflavones, flavonone (Rasanen, 2002). A la suite de leur sécrétion, il y a accumulation de bactéries autour des poils absorbants (Andriankaja, 2002).

Le développement des nodosités racinaires chez les légumineuses est déclenché par des signaux diffusibles : les LCO, qui sont produits par le *Rhizobium* dans la rhizosphère des plantes hôtes (Grosjean et Huguet, 1997).

Les cellules bactériennes s'attachent aux poils absorbants de la plante hôte. C'est une étape hautement spécifique et irréversible. Deux substances sont essentielles pour la **reconnaissance** et **l'adhésion** (Gage, 2004) :

- Les léctines : protéines formées par la plante, se liant spécifiquement à des glucides particuliers sur le *Rhizobium*
- Les polysaccharides de surface : portés par les souches bactériennes.

Les cellules du *Rhizobium* sont piégées dans une poche formée par la paroi des crochets. Les bactéries pénètrent au niveau des poils absorbants et provoquent une déformation caractéristique appelé "**curling**" (ou recourbement des poils racinaires) l'induction de cette étape implique l'intervention des gènes *nodD* et *nodABC* (Pelmont, 1995, Gage, 2004).

L'infection peut avoir lieu à travers les poils absorbants ou des blessures ou à travers l'espace intercellulaire (Rasanen, 2002). Il y a une digestion de la paroi des cellules du poil racinaire, causée par l'interaction entre la plante et le *Rhizobium*. Cette digestion peut impliquer des enzymes pectiques, alors que d'autres plantes produisent des enzymes de digestion. Une fois que les parois des cellules de poils sont digérées, une structure tubulaire appelée le **fil d'infection** est formée. Elle se compose des cellules de la paroi nouvellement synthétisées qui seront un matériel entourant le *Rhizobium*. Le centre du tube est une glycoprotéine contenant quelques produits bactériens et quelques glycoprotéines de la plante hôte (Gage, 2004).

Ces changements majeurs dans la forme des cellules et la croissance dirigée sont probablement causées par des altérations significatives dans le cytosquelette de la plante. La dépolymérisation de l'actine est l'un des effets observés dans les poils absorbants suite à l'exposition au facteur Nod (Gage, 2000).

Les bactéries prolifèrent à l'intérieur du cordon et vont se libérer dans le cytoplasme des cellules corticales, via ce cordon, provoquant ainsi l'apparition du **méristème**, qui est d'une zone de multiplication cellulaire dont l'activité est à l'origine de la formation du **nodule**, dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en **bactéroïdes** ou **endosymbiose** (Lindström et coll., 2002). Ces dernières, de forme irrégulière, ont un volume supérieur à celui des formes libres. Ils ne se divisent plus et ne synthétisent plus de protéines Nod, par contre les bactéroïdes se concentrent dans la production des nitrogénases indispensables à la fixation de l'azote atmosphérique.

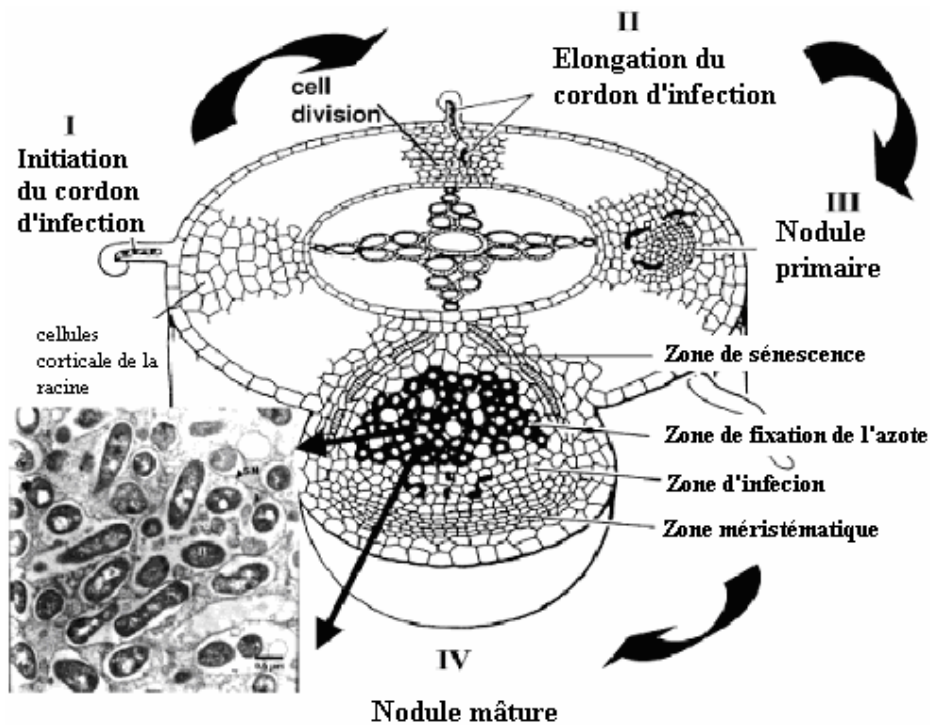


Figure 2 : Etapes du développement du nodule (Djordjevic, 2004)

Les bactéroïdes sont séparés du cytoplasme végétal par une membrane spéciale "péri bactéroïde" ou membrane de séquestration servant de plaque d'échange entre les bactéries et les cellules de la plante hôte. Dans cette membrane les bactéries différenciées forment les bactéroïdes de fixation de l'azote (Pelmont, 1995 et Corbière, 2002).

Le nodule prend forme avec la multiplication des cellules du cortex. Il se charge de pigments appelés «leghémoglobine», synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (Andriankaja, 2002). Les gènes de leghémoglobine sont d'activés chez le soja, 7 à 8 jours après l'infection. La première augmentation réelle de la transcription commence dans les 4 jours apparents plus tard. L'activation des gènes de leghémoglobine est dans l'ordre: *Lbc3*, *Lbc2*, *Lbc* et *Lba*. La leghémoglobine est localisé dans le cytoplasme des cellules hôte. La biosynthèse de l'hème est stimulée par le *Rhizobium* sous ces conditions microaérobie (Werner, 1992).

L'action de leghémoglobine est de maintenir l'oxygène à faible concentration dans l'environnement de l'enzyme, compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote. (Rasanen, 2002 et Simms et Taylor, 2002).

La leghémoglobine semble être en faible concentration dans plusieurs plantes mais la nodulation augmente nettement sa concentration dans les légumineuses (Gage, 2004).

Des protéines spécifiques se produisent durant la formation et le fonctionnement des nodules sont appelées nodulines, et ont été classifiées comme des nodulines précoces et des nodulines tardives selon leurs temps d'expression. Les nodulines précoces (*ENODs*) sont associées avec l'organogenèse et l'invasion bactérienne des nodules racinaires. Généralement, les gènes des nodulines tardives (*NOD*) sont suggérés jouer un rôle dans la fonction des nodules, induirent les transporteurs de l'oxygène leghémoglobine (Corbière, 2002).

### **3-5- Les exopolysaccharides facteurs de nodulation**

Les polysaccharides extracellulaires (EPS) produits par les rhizobia sont essentiels pour l'établissement d'une fixation symbiotique d'azote avec les légumineuses. (ChuangYien Lee, 2000)

Les EPS consistent, au moins en partie, en un grand hétéropolymère formé par les unités structurales répétées. L'unité de répétition du succinoglycane ou EPS I se compose d'un galactose et sept résidus du glucose avec le pyruvate, acétyl et des motifs du succinyl. EPS II a une unité de répétition du galactoglucane porte des parties d'acétyl et pyruvate. L'unité de répétition pour l'antigène K est un disaccharide contenant un acide glucuronique et l'acide diamino- tetradeoxynonulosonique (Pellock et coll., 2002, Spaink, 2000).

La plupart des gènes codant pour les EPS ont été séquencés et caractérisés, ces gènes sont associés avec l'un des deux types d'EPS principaux le succinoglycane (EPS I) et le galactoglycane (EPS II) (Kaufusi et coll., 2004).

La biosynthèse d'EPS I est dirigée par le produit des gènes *exo*, par contre l'EPS II est produit par les enzymes encodés par les gènes *exp*. La régulation de la production d'EPS I chez les rhizobia est complexe et peut impliquer plusieurs protéines régulatrices inclus : Mnc R, ExoR, ExoS, ExoX et SyrA (Kaufusi et coll., 2004).

Mnc R est une protéine à doigts du zinc qui a une régulation positive de la production d'EPS I. Une altération au niveau de Mnc R résulte une mutation de la souche bactérienne qui

produire l'EPS II à la place d'EPS I, mais ceci n'affecte pas l'invasion des nodules (Kaufusi et coll., 2004).

Exo S, code pour une protéine qui régule négativement l'expression des gènes *exo*. Des mutants d'Exo S ne produisent plus d'EPS I. Le type sauvage forme des nodules, mais varie dans leur capacité de produire des nodules fixant l'azote (Kaufusi et coll., 2004).

Le succinoglycane est un déterminant nécessaire pour la formation du cordon infectieux dans les poils racinaires. La fonction réelle des trois types d'EPS dans la symbiose n'est encore élucidée, mais il y a plusieurs données qui indiquent que les EPS fonctionnent comme molécules de signalisation biologique active. Les légumineuses qui forment des nodules de types indéterminés révèlent des exigences structurales pour les EPS des rhizobia (Gallego, 2006).

#### **4- Métabolisme de l'azote :**

##### **4- 1 La structure de la nitrogénase**

La nitrogénase est une enzyme complexe, constituée de deux protéines associées, l'une est appelée la dinitrogénase (ou la nitrogénase II ou MoFe protéine) et l'autre est une réductase appelée la dinitrogénase réductase (la nitrogénase I ou Fe protéine) (Leclerc, 1995 et Rasanen, 2002).

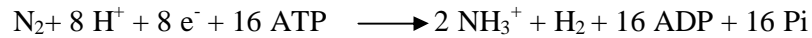
- **La dinitrogénase :** appelée aussi molybdoprotéine (MoFe protéine) c'est la composante principale du système enzymatique formée de quatre sous unités (tétramérique)  $\alpha_2 \beta_2$  de 220 k Da (2 x 51 k Da et 2 x 59 k Da), chaque monomère contient un centre [4 Fe - 4 S] reliés entre eux deux par deux, connus sous le nom centres P. Ce tétramère est associé à un cofacteur protéique qui contient 8 Fe et 2 atomes de molybdène (Mo) (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003).

- **La dinitrogénase réductase :** (la nitrogénase I) renferme deux sous unités identiques, elle contient du Fe et se comporte comme une réductase de 64 KDa. Elle se caractérise par la présence d'un seul centre P [4 Fe - 4 S], alimenté en électrons par une ferrédoxine ou flavodoxine, elle se couple à sa partenaire à molybdène, en lui cédant un électron et hydrolyse de l'ATP (Leclerc, 1995 et Hopkins, 2003).

La caractéristique principale de la nitrogénase est sa sensibilité et son inhibition rapide en présence de l'O<sub>2</sub>, donc la fixation de l'azote est un processus anaérobie.

#### 4-2 Mécanisme de la réduction de l'azote (Fig. 3)

La fixation biologique de l'azote peut être représentée par l'équation suivante, dans laquelle deux moles d'ammoniac sont produites à partir d'une mole d'azote gazeux :



La réaction réalisée par les fixateurs biologiques exige:

- 8 électrons et 8 protons pour la réduction,
- 16 ATP pour la fourniture de l'énergie d'activation.

La fixation de l'azote s'accompagne toujours de celle de l'hydrogénase : les électrons proviennent de  $\text{NADH}^+$  ou/et  $\text{FADH}_2$  fourni par les processus métaboliques (cycle de Krebs, dégradation des acides gras).

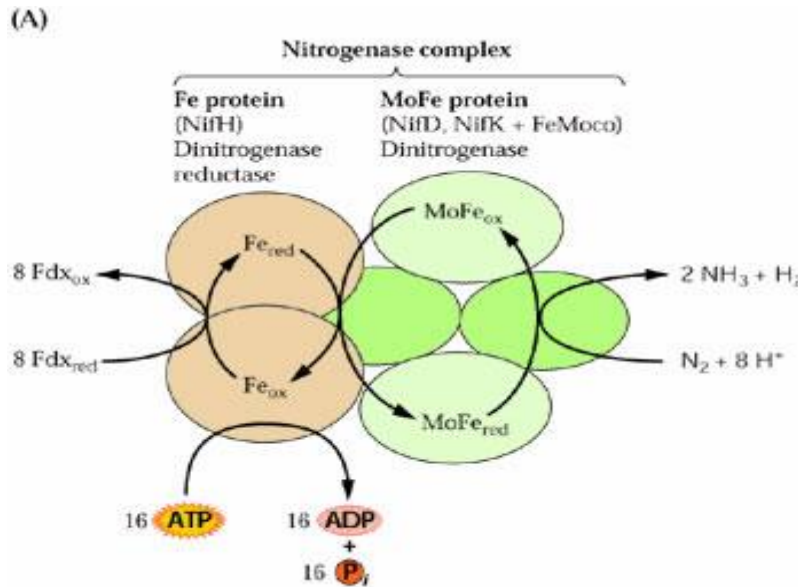
- De la ferridoxine ou/et  $\text{NADH}^+$  formée au cours de la phosphorylation acyclique. (Rasanen, 2002).

La réaction a lieu lorsque l'azote est attaché au complexe enzymatique de la nitrogénase.

La protéine réductase (Fe protéine) est réduite en premier par l'électron donné par la ferrédoxine, ceci lié à une molécule de l'ATP et réduire la nitrogénase qui transfère l'électron à la molécule d'azote et produire donc  $\text{NH}=\text{NH}$ .

Dans une deuxième étape du cycle de ce processus (qui requière des électrons par la ferrédoxine) le  $\text{NH}=\text{NH}$  est réduit en  $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ , ce dernier est réduit en  $\text{NH}_3$  dans une troisième étape (Rasanen, 2002).

Il est remarquable que la nitrogénase soit énormément consommatrice d'énergie, pour chaque électron fourni par l'intermédiaire de la réductase à la nitrogénase pour la réduction de l'azote il y a consommation de 2 liaisons phosphate riches en énergie (2 ATP) donc 16 ATP pour la réduction d'une molécule d'azote. Une molécule de  $\text{H}_2$  est formée en même temps que celle de l'ammoniac (Hopkins, 2003).



**Figure 3:** Mécanisme d'action de la nitrogénase (Yann, 2006).

## Deuxième partie : Les mutations génétiques

### 1- Définition d'une mutation

La mutation est une modification héréditaire du matériel génétique d'un individu en absence de confrontation avec un matériel génétique étranger (Guiraud, 1993). Cette altération peut être induite par divers agents chimiques et physiques sur l'ADN et peut être due à des erreurs rares dans la réplication de l'ADN (Winter, 2000).

La position de la mutation sur les gènes est importante. Le changement se traduit par une variation phénotypique de la cellule, mais qui peut être inaperçue, si elle survient sur une partie non codante du génome (Nicklin, 2000).

On distingue : la mutation ponctuelle, la plus fréquente. Il s'agit de la plus simple mutation correspondant à la substitution d'un nucléotide par un autre, mettant en jeu l'altération d'une unique base, ce qui modifie un codon de telle sorte que l'acide aminé soit aussi modifié. Cette mutation est dite faux sens. Alors que, si le nouveau codon code pour un codon stop, la mutation est dite non sens (Winter, 2000).

La délétion, l'insertion, la duplication ou la translocation, concernent des modifications portant sur des chromosomes entiers par modification de leur nombre ou de leurs structures.

### 2- Caractères de la mutation bactérienne

- Une mutation naturelle est un phénomène **rare** (Guiraud, 1993). Il n'affecte qu'une faible fraction de l'ensemble des cellules bactériennes d'une large population ( $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  par génération). La mutation est mesurable par le taux de mutations qui est la probabilité pour une bactérie de muter pendant une unité de temps défini souvent par le temps de génération (Dupont, 2001).
- La mutation naturelle est **spontanée**, ne dépend pas des conditions du milieu, la présence par exemple d'un antibiotique dans le milieu ne favorise pas l'apparition des formes résistantes à tel antibiotique.
- La mutation n'affecte habituellement qu'un seul caractère en respectant les autres. La mutation d'un caractère donné ne modifie pas la probabilité de mutation d'un autre caractère. La probabilité pour une bactérie de subir simultanément deux mutations distinctes est le produit des probabilités individuelles de ces deux mutations, ce qui indique que le caractère mutation est **indépendant** (Guiraud, 1993).
- Les modifications apportées par la mutation sont rendues permanentes par la réplication de l'ADN et elles sont transmises aux cellules filles à l'issue de la division cellulaire. Le caractère acquis est alors transmissible à la descendance, la mutation est donc **héréditaire** (Winter, 2000).
- La mutation **discontinue** « **brusque** » ; ne s'effectue pas à la suite d'une longue période d'adaptation progressive, avec des formes intermédiaires mais habituellement en une seule étape, donc elle apparaît selon la loi de tout ou rien.

### 3- Les agents mutagènes

Un mutagène est un agent naturel ou résultant de l'activité humaine, physique ou chimique qui peut altérer la structure de l'ADN (Dupont, 2001).

#### 3-1 Les agents chimiques

Une grande variété de produits chimiques est en mesure de causer des mutations de l'ADN (Winter, 2000). On distingue 4 groupes d'agents chimiques (Boucher, 2002) : les analogues de bases, agents désaminant (ou modifiant l'ADN), les agents alkylants et agents intercalants.

##### 3-1-1 Les analogues de bases

Il s'agit des molécules qui ressemblent par leurs structures aux bases azotées ordinaires, mais qui affichent des propriétés légèrement différentes en ce qui concerne l'appariement des bases (Tortora, 2003). Ces produits exigent des conditions d'utilisation précises et ne sont bien efficaces que sur des cellules en multiplication (Guiraud, 1993 et Dupont, 2001).



Lorsqu'ils sont incorporés, ils subissent des modifications tautomériques similaires aux bases normales mais à des fréquences plus élevées ce qui aboutit à une mutation (Nicklin, 2000 et Griffiths, 2001).

### 3-1-2 Agents désaminant ou agents modifiant l'ADN

Ces agents donnent des mutations ponctuelles mais également des mutations plus étendues et inactivantes (Guiraud, 1993). Son mode d'action est de modifier chimiquement des bases d'ADN (généralement au repos). Certaines sont à l'origine de l'addition de groupement alkyl ou oryl (Winter, 2000).

### 3-1-3 Agents intercalants

Ce sont des composants plats, à 3 anneaux, similaires en structure à une paire de bases. Ils peuvent s'insérer dans l'ADN provoquant une distorsion de l'hélice et donc un glissement durant la réplication, l'insertion et la délétion de bases (Nicklin, 2000; Winter, 2000; Griffiths, 2001).

Les agents intercalants peuvent également s'empiler entre les bases, dans l'ADN simple brin. De cette façon, ils peuvent stabiliser les bases, qui ont formé des boucles lors du décalage du cadre de lecture (Griffiths, 2001).

### 3-1-4 Agents alkylants

Ce sont des réactifs capables d'entraîner des méthylations, éthylations ou alkylations supérieures au niveau des bases mais aussi à celui des groupements phosphate. Ils sont actifs sur l'ADN au repos. L'alkylation s'effectue en N ou O avec une efficacité variable selon la base, la position et le microorganisme utilisé (Guiraud, 1993).

L'action de quelques agents chimiques sur l'ADN est résumée dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Mode d'action de quelques agents chimique (Guiraud, 1993 ; Galzy, 1993 ; Winter, 2000 ; Griffiths, 2001; Tortora, 2003).

Classe	Exemple	Mode d'action
Analogues de bases	5- bromouracile	Analogue de la Thymine Provoque des transitions de AT en GC
	2- aminopurine	Analogue de l'acridine S'apparie avec la thymine ou avec la cytosine, engendre des transitions AT en GC et des transitions de GC en AT lorsqu'elle s'apparie avec l'adénine.
Produits chimiques modifiant l'ADN	Acide nitreux	Agit sur l'ADN au repos. Désamine l'adénine en hypoxantine, la cytosine en uracile et la guanine en xanthine. Crée des transitions de AT en GC et probablement quelques transversions.

	Les ions bisulfites	Désamine la cytosine en uracile Provoque des transitions de GC en AT
Agents intercalants	Bromure d'éthyle	S'intercale dans la double hélice, et provoque un glissement de paires de bases adjacent, ce qui résulte des mutations de framshift.
	Acridine orange proflavine	S'intercale entre les bases empilées de la double hélice de l'ADN, ce qui induit l'addition ou la délétion d'une paire de base et donc une mutation framshift.
Agents alkylants	Ethyl-methane sulfonate	Ajout de groupes méthyles en différentes positions de bases. N'est pas incorporé dans l'ADN mais altère une base en une forme qui provoque le mauvais appariement. Provoque des transitions de GC en AT, des transversions et des microdélétions

### 3-2 Les agents physiques

#### 3-2-1 Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes hautement énergétiques, comme les rayons X ou gamma provoquent dans la molécule d'ADN des altérations étendues qui provoquent des coupures dans les brins et la destruction de sucres et de bases (Winter, 2000). Ils induisent aussi la formation des radicaux libres.

#### 3-2-2 Les radiations non ionisantes : la lumière ultraviolette

La lumière UV est fréquemment utilisée au laboratoire pour induire des mutations et son mécanisme d'action est le plus connu (Nicklin, 2000). Les conséquences les plus graves de l'exposition à la lumière UV, sont les modifications de l'ADN, molécule qui porte toutes les informations nécessaires à la vie des cellules et des individus (Angulo, 2004).

Les rayons UV provoquent des transitions GC en AT, des mutations décalées et des délétions (Guiraud, 1993).

L'exposition directe de l'ADN aux rayonnements UV, se traduit par la formation de liaisons covalentes indésirables entre certaines bases. Les Thymines adjacentes dans un brin d'ADN peuvent se lier deux à deux pour former des dimères de thymine (fig.4).

S'ils ne sont pas extirpés, ces dimères peuvent occasionner des dommages graves à la cellule, généralement létale. Parce qu'ils empêchent ces dimères de répliquer l'ADN touchée ou de se transcrire correctement (Totora, 2003 et Angulo, 2004). Cette structure de dimérisation des bases pyrimidiques, appelée **dimère cyclobutyle** conduit à empiler les bases et peut mener à des délétions après répllication de l'ADN. Elle provoque aussi une distorsion de l'hélice de l'ADN (Winter, 2000 et Nicklin, 2000).

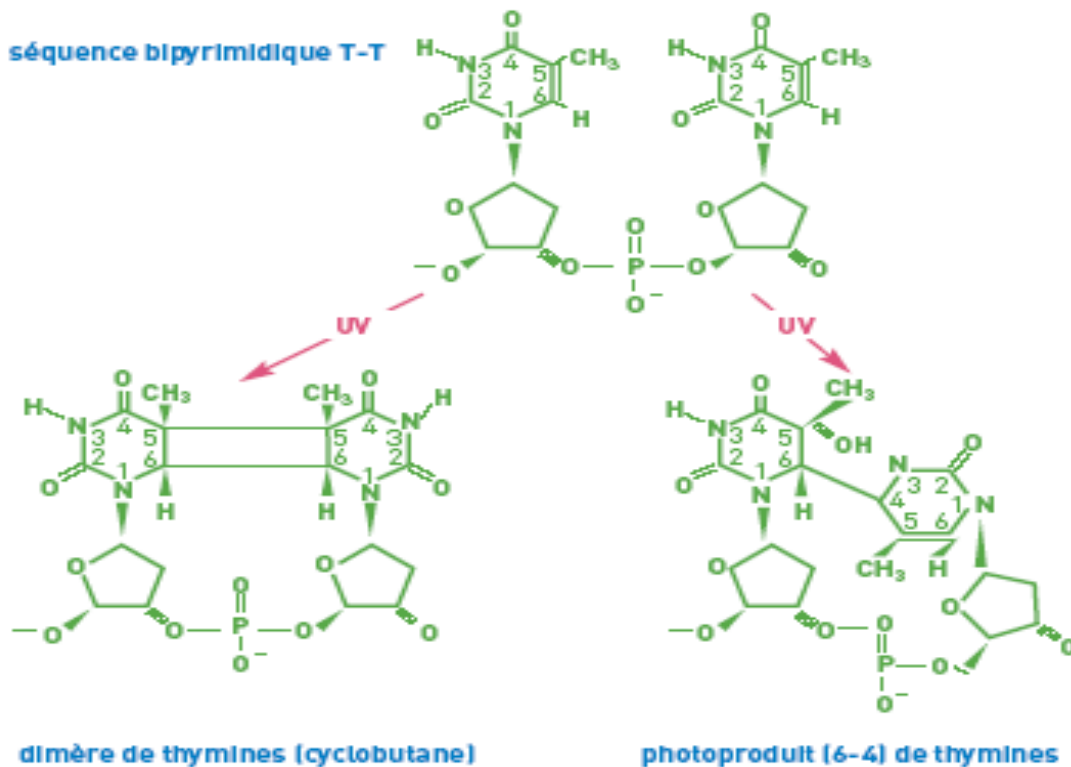
La lumière UV agit en induisant la formation des radicaux, qui provoquent la formation des dommages oxydatifs de l'ADN (Borel et coll, 1999).

Les radiations ultraviolettes sont classées en trois groupes en fonction de la longueur d'onde : les UVC (190 à 280 nm), les UVB (280 à 320 nm) et les UVA (320 à 400 nm) (Borel et coll, 1999).

Les radiations UV les plus efficaces sont celles de longueur d'onde comprise entre 200 et 300 nm, et qui correspondent au maximum d'absorption des acides nucléiques. Les lampes germicides à faible pression de mercure sont efficaces ( $\lambda = 245$  nm) (Guiraud, 1993).

En raison de la faible pénétration du rayonnement UV, le volume de la suspension microbienne traité doit être limité, exposé sous une faible épaisseur (pas plus de 1cm) et légèrement agité (Guiraud, 1993).

Les cellules sont étalées à la surface d'une boîte de Pétri et mises à l'action des rayons ultraviolets, le temps d'irradiation est déterminé expérimentalement (Galzy, 1993).



**Figure 04:** Exemples de structures de dimères de thymine générés par les rayonnements solaires (Angulo, 2004).

#### 4- Les systèmes de réparations de l'ADN

L'ADN est la seule macromolécule à être réparée par les cellules (Dupont, 2001). Le taux faible de mutations spontanées donne une idée de l'efficacité du système de réparation.

La déficience de l'un de ces systèmes peut conduire à un taux de mutation plus élevé que la moyenne (Griffiths, 2001).

Selon Dupont (2001), les mécanismes de réparation sont de trois types :

- La restauration de la zone endommagée,
- La suppression de la zone endommagée,
- La tolérance de la zone endommagée.

#### **4-1 La restauration de la zone endommagée**

- **La photoréactivation**

Les bactéries et d'autres organismes possèdent des enzymes qui peuvent réparer les dégâts des rayonnements ultraviolets. Des enzymes de photo réactivation appelées **photolyases**, utilisent la lumière visible (la lumière bleue : 300 à 600nm) pour séparer les thymines et redonner aux thymines leur forme originale (Guiraud, 1993 et Tortora, 2003).

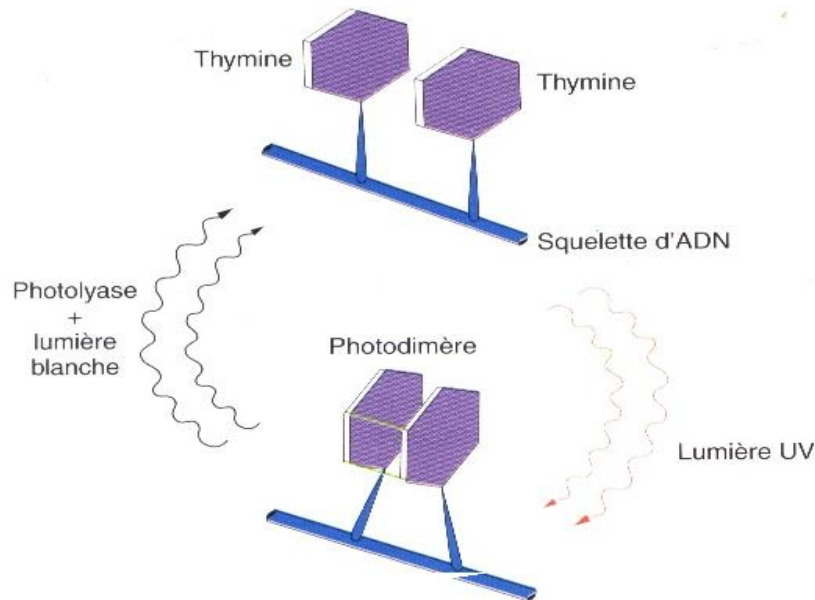
La photolyase de l'ADN est une enzyme qui utilise l'énergie lumineuse pour réparer le dimère sans exciser la base via une photoréduction à un électron (fig. 5). Elle existe chez de nombreuses bactéries, les eucaryotes inférieurs, les insectes et les plantes. Elle semble absente chez les mammifères (Dupont, 2001).

- **Les alkyltransférases**

Ces enzymes enlèvent les groupements alkyles qui ont été ajoutés en position O-6 de la guanine par des mutagènes telle que la nitrosoguanine et l'éthyl méthaneusulfonate. La méthyltransférase de *E. coli*, transfère le groupement méthyle de O-6 méthylguanine à un résidu cystéine de la protéine (Griffiths, 2001).

- **La réparation des ruptures sur un seul brin**

Les rayons X et quelques produits chimiques comme les peroxydes peuvent causer des ruptures dans le squelette de l'ADN. Les ruptures sur un seul brin sont rapidement réparées par une ligase. Les microbes mutants n'ayant pas cette ligase ont tendance à avoir des taux de recombinaison élevé puisque les extrémités de l'ADN sont très recombinantes (Dupont, 2001)



**Figure 05** : la réparation d'un photodimère de pyrimidine induit par des UV par une enzyme photoréactive ou photolyase (Griffiths, 2001)

#### 4-2 La suppression de la zone endommagée

- **La réparation par excision de bases**

Ces réparations sont permises par la structure bicaténaire de l'ADN. La chaîne intacte sert de matrice pour la réparation de la chaîne altérée (Guiraud, 1993).

La base inappropriée est détachée de sa liaison avec le sucre et remplacée. Ce sont des **glycosylases** qui rompent la liaison. Par exemple l'uracile-glycosylase sépare l'uracile de l'ADN. L'enzyme reconnaît l'uracile et coupe la liaison glycosyl avec le désoxyribose. La base est alors excisée et une nouvelle base est insérée par la polymérase en utilisant le deuxième brin comme matrice (Dupont, 2001 et Griffiths, 2001).

- **La réparation des mauvais appariements**

Ce système corrige les erreurs introduites durant la réplication de l'ADN en identifiant les nucléotides mal appariés (Winter, 2000).

Il est réalisé par un groupe de protéines qui peuvent détecter les paires de bases incorrectes ou mal appariées. Le nucléotide incorrect est supprimé et l'ADN-polymérase opère un deuxième passage pour rétablir la séquence convenable (Dupont, 2001).

- **La réparation par excision de nucléotides**

Ce mécanisme intervient sur les dommages importants de l'ADN créant des blocages de la réplication et de la transcription. C'est un clivage du brin d'ADN de chaque côté de la liaison par des endonucléases. La polymérase complète ensuite la zone manquante (Dupont, 2001).

### **4-3 La tolérance de la zone endommagée**

- **La réparation par recombinaison**

Ce système permet des réparations en l'absence de matrice ou des réparations de lésions très étendues (Guiraud, 1993). Ce mécanisme induit une recombinaison pour résoudre une interruption sur l'une des molécules filles et traiter une lésion non codante sur l'ADN. Il requiert une chromatide sœur ou homologue (Dupont, 2001).

La réparation n'est pas complète : le dommage se dilue au fil des générations mais persiste. Le mécanisme de recombinaison permet la réparation des coupures de la double chaîne. Ces coupures peuvent être aussi réparées directement par des ligases : en l'absence de modèle, il peut y avoir formation d'un chromosome remanié, ce qui entraîne une mutation (Guiraud, 1993).

### **5- Les phénotypes mutants**

Dans toute analyse à l'aide de mutation, la question essentielle est : quel phénotype mutant doit-on rechercher ? C'est la raison pour laquelle il est important de connaître la nature de la mutation et de la biologie du processus étudié.

- **Gain de fonction**

Les mutations entraînant un gain de fonction qui produisent de nouveaux phénotypes, seront probablement dominantes et devraient être exprimées chez les hétérozygotes pour les allèles mutants et sauvages (Griffiths, 2001).

- **Les mutations morphologiques**

Ce type de mutation modifie les propriétés visibles d'un organisme, telles que la forme, la couleur ou la taille (Griffiths, 2001).

- **Les mutations létales**

Il existe plusieurs gènes dans la cellule dont le produit est essentiel à la croissance cellulaire comme les protéines nécessaires à la réplication d'ADN. Il est ainsi impossible d'isoler des mutations dans ces gènes, car elles inactivent totalement la fonction du gène et provoquent la mort cellulaire (Nicklin, 2000).

- **Les mutations biochimiques**

Les mutants de type auxotrophe ne disposent pas de produits génétiques impliqués dans la synthèse d'un métabolite essentiel, comme certains acides aminés. On ne peut les isoler qu'en les cultivant sur un milieu enrichi dans le métabolite, sans qu'ils ne survivent (Winter, 2000).

- **Les mutations conditionnelles**

Un allèle mutant **conditionnel** conduit à un phénotype mutant seulement dans certaines conditions dites **restrictives**, mais produit un phénotype sauvage dans d'autres conditions dites **permissives** (Griffiths, 2001). Il existe des mutations qui s'expriment seulement sous certaines circonstances, la plus fréquente étant la croissance à haute température. Ces mutants, thermosensibles ont un phénotype sauvage à basse température mais, à haute température, la mutation se manifeste et peut alors être étudiée (Nicklin, 2000).

## **6- Criblage et détection des mutants**

Le but des expériences de mutagenèse est d'obtenir des mutants ayant un phénotype voulu, afin d'étudier certains processus. Ceci passe par la mise au point de systèmes astucieux permettant de récupérer les mutants d'intérêt. Il faut mettre au point ce que l'on appelle un crible de sélection.

- **Le crible de sélection positif (direct)**

Cette sélection comprend la détection des cellules mutantes par rejet des cellules parentales normales. Supposons que les mutants d'intérêt recherché sont des souches résistantes à la pénicilline. Quand les cellules bactériennes sont mises en culture sur un milieu contenant de la pénicilline, on peut identifier les mutants directement. Les cellules qui sont résistantes (mutantes) se multiplient et forment des colonies, alors que les cellules parentales normales et sensibles à la pénicilline ne poussent pas (Tortora, 2003).

- **Le crible de sélection négatif (indirect)**

Ce processus isole les cellules qui sont incapables d'accomplir une certaine fonction au moyen de la technique de réplique sur boîte (Tortora, 2003). La technique du replica-plating est très utilisée pour la recherche des mutants auxotrophes et de façon plus générale pour la recherche des mutants présentant une déficience (Galzy, 1993).

- **Le crible de sélection en utilisant la présentation par des phages ou des plasmides**

Il s'agit d'une technique extrêmement puissante pour sélectionner et créer des polypeptides dotés de **fonctions nouvelles**. La technique fut d'abord mise au point pour être utilisée avec le phage M13 d'*E.coli*, mais elle a depuis été adaptée à d'autres phages tels que T4 et  $\lambda$ . Les particules de phage **M13** consistent à une molécule d'ADN simple brin, entourée d'une enveloppe composée de plusieurs milliers d'exemplaires de la protéine principale du manteau, **P8** (Primrose, 2004).

L'une des extrémités de la particule contient 5 exemplaires de chacune des protéines mineures du manteau P9 et P7, alors que sur l'autre extrémité se trouve 5 exemplaires de la protéine P3 et P6. Une séquence d'ADN étrangère était insérée dans le gène P3 ou P8, à la

jonction entre la séquence signal et le peptide natif. Les cellules de *E. coli* transfectées par les molécules d'ADN recombinant sécrètent des particules de phages qui présentent à leur surface les acides aminés codés par l'ADN étranger.

Les phages présentant des motifs peptidiques particuliers, avec par exemple, la propriété de lier des anticorps, étaient isolés par chromatographie d'affinité. De cette manière des millions de peptides aléatoires ont été criblés pour leur capacité de se lier spécifiquement à un anticorps anti-peptides (Primrose, 2004). Le phage peut être remplacé par un plasmide ; dans ce système, le point de départ est un plasmide porteur d'une copie unique du gène P3 ou P8 et de la séquence *ori* de M13 (Primrose, 2004).

## **7- Les types de la mutagenèse**

### **7-1 La mutagenèse classique**

La fréquence à laquelle les mutations spontanées apparaissent est faible. Si un grand nombre de mutants sont nécessaires pour une analyse génétique, les mutations doivent être induites. L'induction des mutations se fait en traitant les cellules par des mutagènes. Les mutagènes les plus couramment utilisés sont les radiations à haute énergie ou certains produits chimiques spécifiques (Griffiths, 2001). Ce type d'induction est appelé classique.

La mutagenèse classique permet de produire toute une palette de mutations ayant des effets divers sur les gènes allant de leurs inactivation jusqu'à leurs dérégulation en passant par des modifications du fonctionnement des protéines qu'ils codent.

Cette méthode de mutagenèse a fourni des résultats remarquables, comme en témoigne le développement de la biologie moléculaire, mais elle présente un certain nombre d'inconvénients. D'abord, tous les gènes de l'organisme étudié peuvent être mutés et la fréquence d'apparition des mutants dans le gène auquel on s'intéresse peut être très faible. Cela implique la mise au point de stratégies de sélection (Primrose, 2004).

### **7-2 La mutagenèse insertionnelle**

Elle présente sur la mutagenèse classique l'avantage d'étiqueter le gène cible au niveau moléculaire rendant ainsi plus aisée sa récupération ultérieure (Granier et Bouchez, 2001). Cette technique consiste à introduire une mutation dans une séquence ADN clonée ou non par insertion d'un fragment d'ADN étranger. La génétique inverse à grande échelle a ainsi pu se développer grâce à l'utilisation de la technique de la PCR qui permet de détecter un événement d'insertion dans des lots d'ADN à l'aide d'une amorce spécifique du gène d'intérêt d'une part, et d'une amorce spécifique de l'élément d'insertion d'autre part. La présence d'un produit d'amplification traduit la présence dans le mélange d'une lignée présentant une insertion dans le gène.



Le paramètre clé dans la mutagenèse insertionnelle est le niveau de saturation c'est-à-dire la probabilité de trouver au moins une insertion dans un gène quelconque. La saturation dépend de la taille du gène (séquence d'ADN génomique) de la taille et de l'organisation du génome de la plante utilisée et du nombre d'insertions dans la population (Granier et Bouchez, 2001).

### **7-3 La mutagenèse dirigée**

Le développement des techniques de biologie moléculaire offre la possibilité de modifier la séquence des gènes. Ainsi, on peut effectuer une modification contrôlée de la séquence nucléotidique d'une molécule d'ADN : on parle de **mutation dirigée**. Cette technique de laboratoire consiste à remplacer de courts enchaînements nucléotidiques (oligonucléotides) par un segment homologue dans lequel un ou plusieurs nucléotides ont été changés.

Trois méthodes différentes de mutagenèse dirigée ont été inventées : la mutagenèse par cassettes, le prolongement d'amorce et les méthodes basées sur la PCR (Primrose, 2004).

- **Mutagenèse par cassettes**

Dans cette technique, un fragment d'ADN synthétique contenant la séquence mutante désirée est substitué à la séquence correspondante du gène sauvage. Il s'agit d'une méthode simple avec une efficacité de mutagenèse proche de 100%.

- **Mutagenèse par prolongement d'amorces**

Cette méthode consiste à amorcer la synthèse d'ADN « in vitro » avec un oligonucléotide synthétisé chimiquement qui contient une base mésappariée avec la séquence complémentaire. La technique nécessite que l'ADN à muter soit disponible sous forme simple brin, ce qui obtient facilement par clonage du gène dans des vecteurs dérivés de M13.

L'oligonucléotide synthétique sert d'amorce à la synthèse d'ADN et se retrouve incorporé dans la molécule hétéroduplex qui est produite. Pour détecter les mutants, les clones peuvent être criblés par hybridation, en utilisant comme sonde d'oligonucléotide mutagène marqué au  $^{32}\text{P}$ .

Dans des conditions contrôlées de la température et de la concentration cationique, un signal positif ne sera obtenu que pour les clones mutants. Ceci permet de repérer facilement le mutant cherché.

- **Mutagenèse basée sur la PCR**

Les premiers développements de la méthode d'amplification de gènes par la PCR ont montré son potentiel pour la mutagenèse. Des bases de l'amorce, mal appariées avec la matrice initiale, sont incorporées dans la séquence qui sert de matrice pour le cycle suivant. Les deux

réactions primaires produisent deux fragments qui se chevauchent et qui contiennent la même mutation dans la région commune. Le chevauchement des séquences permet aux fragments d'être hybridés. Un des deux hybrides formés est prolongé par l'ADN polymérase pour donner un fragment duplex. L'autre hybride contient des extrémités 5' en retrait et comme il ne peut servir de substrat pour la polymérase, il est éliminé du mélange réactionnel.

## CHAPITRE DEUX

### MATERIELS ET METHODES

## 1- Matériels biologiques

Les souches utilisées dans ce travail sont isolées à partir des nodosités prélevées sur des légumineuses, provenant d'une collection du laboratoire des biotechnologies, de l'institut de biologie.

Notre échantillon comprend des souches de *Rhizobium sullae* nodulant l'espèce *Hedysarum coronarium* dont les variétés sont :

- *Rhizobium sullae* A6
- *Rhizobium sullae* HCNT 1
- *Rhizobium sullae* RH44
- *Rhizobium sullae* RH19
- *Rhizobium sullae* RHF
- *Rhizobium sullae* IS123

En plus deux autres espèces appartiennent au même genre :

- *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*
- *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*

**Tableau 3 :** Origine des souches utilisées (Struffi., et coll., 1998 ; Benguedouar, 2000)

Souches	Origine Géographique	Source	Code
<i>R. sullae</i> IS123	Cadix, Espagne	F.J.Ollero- Seville	GI
<i>R. sullae</i> HCNT-1	Volterra, Italie	S. Casella- Pise	GH
<i>R. sullae</i> RHF	Pise, Italie	S. Casella- Pise	GF
<i>R. sullae</i> RH19	Sicile, Italie	S. Casella- Pise	G19
<i>R. sullae</i> RH44	Espagne méridionale	A. Toffanin- Madrid	G4
<i>R. sullae</i> A6	Constantine, Algérie	A. Benguedouar-Cne	GA6
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 1003		Rothamstead Collection	GV
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 843		B.J.Rolfe, Camberra	GT

### 1-1 Milieux utilisés

Le milieu de base utilisé pour la culture des rhizobia est le YMA « Yeast-extract Mannitol Agar » ou bouillon (YMB) (Vincent, 1970).

La composition des milieux de culture utilisés est exprimée en gramme par litre d'eau distillée. L'autoclavage des milieux se fait à 120°C pendant 20 minutes (**Annexe 1**).

### **1-2 Conservation des souches**

Les souches sont conservées par deux méthodes différentes :

- Sur le milieu YMA additionné de 3g/l de  $\text{CaCO}_3$ , autoclavé et réparti en tubes à essais inclinés. Les bactéries sont repiquées sous forme de stries régulières, réalisées sur la surface de la gélose inclinée. Après incubation à 28°C pendant 48 heures, les tubes sont conservés à 4°C. Le  $\text{CaCO}_3$  est utilisé pour neutraliser l'acidité durant la longue conservation de 2 à 3 mois (Beck, 1993).
- Les souches sont stockées à - 20°C sur le YMA additionné du glycérol 20% (p/v), dans des ependorf, inoculés par piqûre centrale, incubés à 28°C pendant 24 heures. (Krasova-Wade, 2003)

### **1-3 Caractères cultureux**

Les caractères cultureux des souches sont mis en évidence à partir de colonies développées d'une culture de 24h - 48h à 30°C sur le milieu YMA. On s'intéresse à l'observation de la taille, la couleur, la forme et l'élévation des colonies.

## **2- Irradiation des souches sauvages et sélection des mutants**

Dans ce travail nous avons utilisé un mutagène physique : **les rayons ultraviolets**, à une longueur d'onde égale à 320 nm, sous une hotte à flux laminaire dotée d'une lampe à UV. (Kottermann 8511, Tu V, Norddeutschaland (GS) geprüfte Sicherheit). L'irradiation est effectuée pendant différent temps et à une distance constante de 73 cm.

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par (Heyde, 2004)

- **Préculture de la souche à mutagéniser**

Les souches sontensemencées dans des tubes à essai contenant 2 ml du YMB. Incuber à 28°C avec agitation pendant 24h (les bactéries seront en phase exponentielle de croissance).

- **Culture de la souche à mutagéniser**

Ensemencer 25 ml du bouillon YMB avec 0,5 ml de la préculture. Incuber dans un bain marie agitateur à 28°C pendant une heure à une heure 30 minutes (les bactéries seront en phase exponentielle de croissance).

- **Mutagenèse**

- transférer la suspension bactérienne dans un tube de centrifugation.
- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 8000 g. (Centrifugeuse : Biofuge 22R ; Heraeus SEPATECH)
- vider délicatement le surnageant.
- ajouter 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 0,1 M (stérile)
- remettre le culot en suspension à l'aide d'un vortex.
- ajouter environ 23 ml de Mg SO<sub>4</sub> 0,1 M (stérile).
- incuber à 4°C pendant 10 minutes.
- transférer 5 ml de suspension dans des boites de pétri petit format (les boites irradiées seront notées différemment que les témoins).

### **La courbe de survie**

Les radiations UV donnent une courbe de survie d'allure exponentielle, a partir de laquelle on détermine la dose sublétales (correspond à 1% de survivant) du mutagène qu'on veut utiliser (Guiraud, 1993 et Galzy, 1993)

La courbe de survie de chaque souche :

- ✓ Les boites de Pétri petit format contenant 5 ml de suspension, sont irradiées, ouvertes, sous la hotte pendant différent temps (10s, 15s, 20s, 25s, 30s, 35s, 40s, 45s, 50s, 60s, 70s, 75s, 85s, 100s) à une distance fixe de 73 cm de la source des rayons ultraviolets et gardé une boite de chaque souche non irradiée comme témoin.
- ✓ A partir de chaque suspension (irradiée et témoin) réaliser des dilutions en cascade de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-5</sup> (selon la charge de la suspension de chaque souche) dans des tubes à essai contenant 9 ml de l'eau physiologique stérile. Agiter le tube avant chaque prélèvement. Eviter l'exposition des suspensions et des dilutions à la lumière.
- ✓ Prélever à partir de chaque dilution 0,1 ml de la suspension et étaler délicatement sur la surface des boites contenant le milieu YMA. Aussitôt l'étalement réalisé, envelopper les boites dans du papier aluminium.
- ✓ Les boites sont incubées à 30°C pendant 24h. Après l'incubation, on détermine le nombre de colonies dans chacune des boites puis on calcule le pourcentage de survivant et on trace la courbe de survie pour chaque souche.

De la même manière, on procède pour obtenir des mutants, seulement que, les boîtes seront exposées aux UV à une distance constante de 73cm et pendant des temps allant de 25 à 60 secondes. Dans ces conditions la survie des souches est estimée de 45 à 1% (**Annexe 2**). Les boîtes témoins ne seront pas irradiées.

- **Étalement des suspensions irradiés et témoin**

La détermination et l'identification des mutants nécessite la réalisation de l'étalement suivant : prélever à partir de la dilution 0,1 ml de la suspension et étaler délicatement sur la surface des boîtes contenant le YMA plus **0,02% de Calcofluor**.

Couvrir les boîtes par le papier aluminium. Incuber les boîtes à 30°C pendant 24h.

- **Identification des mutants**

Le Calcofluor est un colorant de la cellulose et les structures capsulaires. Il est fluorescent sous la lumière ultraviolette (UV). Les colonies altérées au niveau des gènes des polysaccharides capsulaire ne seront pas fluorescentes (sèche ou mois visqueuse par rapport aux souches sauvages).

Les colonies qui apparaissent sombre sous la lumière UV, sont repiquées sur le YMA puis conservées à 4°C.

Afin de caractériser et d'identifier les souches mutantes repérées, nous avons établi une étude phénotypique comparative avec les souches sauvages par la réalisation d'ensemble de tests nutritionnels, biochimiques, physiologiques, la recherche d'un profil de protéines totales sur SDS-PAGE et la coloration de PHB. Dans l'objectif d'étudier l'influence de la mutation sur la formation des nodules racinaires, un test de nodulation est réalisé.

### **3- Coloration de Gram**

Cette technique est l'une des méthodes de coloration les plus utilisées, car elle permet de diviser les bactéries en deux groupes Gram positif et Gram négatif (Tortora, 2003).

- Un frottis fixé à la chaleur sous la hotte à flux laminaire, est recouvert par un colorant basique le violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 min.
- Chasser le violet avec le lugol ensuite recouvrir la lame avec le lugol pendant 30 secondes.
- Laver à l'alcool-acétone et le surplus de la solution décolorante est chassé par un lavage à l'eau.
- Recouvrir la préparation par la Fuchine, laisser agir durant 1 min. Un nouveau lavage à l'eau, puis on égoutte la lame sur du papier absorbant puis observer à immersion.

#### 4- Test de nodulation

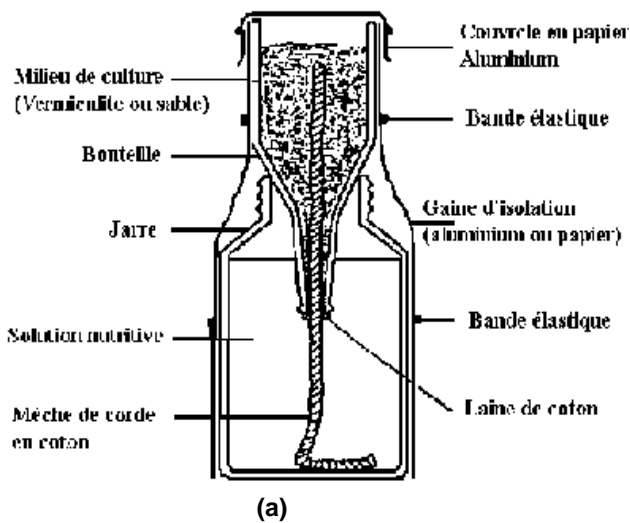
- **Préparation des jarres**

Des bouteilles d'eau minérale en plastique sont choisies et coupées horizontalement en deux parties. Ces jarres sont désinfectées sous la hotte à flux laminaire par un détergent courant hypochlorite de sodium puis, sont exposées aux radiations ultraviolettes (UV) pendant 15 minutes. Les bouchons ont été percés au milieu à l'aide d'une pince passée au bec benzène. Les deux parties de la bouteille sont reliées par un cordon de compresse correspondant au diamètre des trous. Les bouchons sont stérilisés dans un bêcher à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn.

- **Préparation du mélange : sable-vermiculite**

Le sable de rivière et la vermiculite sont lavés séparément jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis séchés dans l'étuve. Après séchage la vermiculite moulué dans un mixer et mélangé avec le sable à une proportion de 2/3. Le mélange de vermiculite-sable (2/3) est humidifié avec la solution nutritive de fahraeus (Fâhreus, 1957) (**Annexe 1**) puis stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn. Le tout étant préparé, les jarres sont remplies (fig. 6).

La partie inférieure contient la solution nutritive alors que la partie supérieure contient le mélange vermiculite-sable. Le cordon de compresse lié aux deux parties permet d'humidifier le mélange supérieur par la solution nutritive.



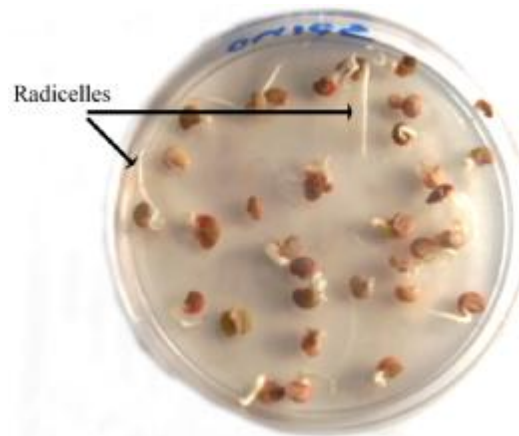
**Figure 6 :** (a) Assemblage de la Jarre de Leonard (Vincent, 1970).

(b) Type de Jarre utilisé dans notre étude.

- **Stérilisation des graines**

Des graines de la plante *Sulla* (*H. coronarium*) de taille identique, sont stérilisées à l'éthanol 95 % pendant 10 secondes, dans un tube à essai stérile, ensuite la solution d'éthanol est remplacée par une solution d'acide sulfurique concentré pendant 3 mn. Les graines sont ensuite rincées 10 fois avec l'eau distillée stérile. On les laisse gonfler durant une heure lors du dernier rinçage.

Les graines stériles sont mises en germination sur des boîtes de TYA (Tryptone Yeast Agar) (Beringer, 1974) (**Annexe1**) enveloppées à l'aide du papier aluminium et incubées à température ambiante pendant 4 à 5 jours (Fig. 7).



**Figure 7:** Germination des graines sur milieu TYA (Beringer, 1974).

- **Inoculation des jarres**

Après germination, les graines ayant donné des racines droites de 1 à 2 cm de longueur, sont plantées dans le mélange sable-vermiculite à 2 cm de profondeur à raison de trois graines par jarre, puis sont inoculées immédiatement avec 2 ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance ( $DO \sim 1$ ) à partir d'une culture sur YMB à 28°C.

Enfin les jarres, sont couvertes du papier aluminium pendant les premières 24 heures d'inoculation et placées dans une chambre de croissance à température ambiante pendant 2 à 3 mois.

- **La chambre de croissance**

Afin d'obtenir une bonne croissance des plantes, plusieurs conditions ont été contrôlées. La semence est réalisée à la fin de l'automne, où la température varie entre 16 et 21°C le jour et entre le 8 à 17°C la nuit, doté d'un système de luminosité qui assure un éclairage pendant 16 heures. La partie supérieure des jarres est couverte d'un plastique noir pour éviter l'exposition des racines à la lumière.



L'addition de la solution nutritive est réalisée dans des conditions stériles et d'une façon régulière. Après 10 semaines, les plantes sont récupérées, les racines sont rincées et la présence ou l'absence des nodules sur les racines peut être observée à l'œil nu.

## **5- Tests nutritionnels**

### **5-1 Utilisation de la source de carbone**

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB où le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D-Arabinose, D-Fructose, D-Galactose, D-Saccharose D- Glucose, DXylose, Sorbitol, Citrate de sodium, Lactose, Maltose, Raffinose, Rhamnose.

On utilise un témoin avec le mannitol.

Les tubes sont inoculés et incubés à 28°C pendant 24 heures, l'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'estimation de la croissance en mesurant la densité optique à 600 nm ( $D.O.\lambda_{600}$ ).

### **5-2 Utilisation de la source d'azote**

Le milieu de base utilisé pour ce test est le milieu Défini 8 (Vincent, 1970) (**Annexe 1**) où le glutamate de sodium (la source d'azote) est remplacé par l'un des acides aminés suivants : Valine, Tyrosine, Leucine, Proline, Thréonine, Isoleucine, Lysine, Glycine, Sérine, Histidine, Arginine, Phénylalanine, Alanine, Cystéine, Méthionine, Asparagine, Tryptophane.

Les tubes sontensemencés puis incubés à 28 °C. Le degré de croissance des souches est évalué par la mesure de la densité optique à 600 nm.

### **5-3 Besoin en vitamines**

Afin d'étudier les besoins des souches en vitamines, les bactéries sont cultivés sur le milieu BIII complet et sur le milieu BIII (Dazzo, 1984) (**Annexe 1**) sans vitamines additionné de l'une des vitamines suivants : Riboflavine, Thiamine-HCl, Biotine, Acide *p*-aminobenzoïque, Pyridoxine- HCl, Panthoténate de calcium, Acide Nicotinique.

## **6- Tests biochimiques**

### **6-1 Réduction des nitrates**

La nitrate réductase est mis en évidence après culture sur le milieu TY contenant 0,1 % de  $\text{KNO}_3$  (p/v). Le milieu estensemencé et incubé dans un bain marie agitateur à 28°C pendant 4 jours.

La réduction des nitrates est recherchée par adjonction successive de 3 à 4 gouttes de chacun des réactifs de la nitrate-réductase (**Annexe 1**). La réaction positive se manifeste par une coloration rouge ou rose qui traduit la réduction des nitrates (Guiraud, 1998).

## **6-2 Hydrolyse de l'urée**

L'enzyme de l'uréase est cherchée, en cultivant les souches sur le milieu YMA contenant 2% (p/v) d'urée et 0,012 g de rouge de phénol comme indicateur de pH à 30 °C pendant 48 heures. La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0,20 $\mu\text{m}$ ) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C.

## **6-3 Activité cellulosique**

Les souches sont mises en culture sur le milieu YMA contenant 0,25 % (p/v) de carboxyméthyl cellulose (CMC) pendant 5 jours. Après incubation à 30°C, les boîtes sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo et incubées pendant 30 mn dans l'étuve à 30°C.

La solution de rouge Congo est remplacée par une solution de NaCl 1 M, les boîtes sont laissées à température ambiante ; puis vidées.

## **6-4 Activité pectinasique**

Les souches sont cultivées sur le milieu YMA où le mannitol est remplacé par l'inositol 0,1% et 0,2% de pectine, à 30°C pendant 7 jours. Après incubation, les boîtes sont rincées délicatement avec l'eau courante puis avec une solution de rouge de ruthénium 0,05% pendant 30 mn.

## **7- Tests physiologiques**

### **7-1 Tolérance au chlorure de sodium**

La tolérance des souches au sel NaCl est testée sur le milieu de GLOUX et

LE RUDULIER (1989) (**Annexe1**). On ajoute dans chaque cas la concentration de NaCl voulu.

Les concentrations de NaCl utilisées sont : 0,5% ; 1,0% ; 2,0% ; 3,0% ; 5% et 10% (p/v). La tolérance au NaCl est étudiée par l'estimation de la croissance en mesurant la densité optique à 600 nm.

### **7-2 Effet de la température**

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont mises en culture sur le milieu YMA et incubées à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 30°C, 37°C, 45°C et 50°C.

### **7-3 Croissance à différents pH**

Les souches sont cultivées sur le milieu YMB à différents pH : 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, en présence des témoins à pH 6.8. La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 600 nm après 24 heures d'incubation.

### **7-4 Résistance aux métaux lourds**

La concentration minimale inhibitrice est déterminée en cultivant les différentes souches sur le milieu TYA contenant différentes concentrations en :  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_2\text{COO})_2$  et l'antimoine ( $\text{SbO}_3$ ) de 0,5 jusqu'à 6000  $\mu\text{g/ml}$  de TYA. L'incubation dure jusqu'à 7 jours.

### **7-5 Résistance aux antibiotiques**

Afin d'étudier la résistance des souches vis-à-vis de certains antibiotiques, elles sont cultivées sur le milieu TYA contenant : Kanamycine, Acide Nalidixique, Erythromycine, Spectinomycine, Chloramphénicol, Streptomycine, Rifampicine, Gentamycine (de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  jusqu'à 5000  $\mu\text{g/ml}$  de TYA).

## **8- Sensibilité aux phages**

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994), elle consiste d'abord à isoler les phages à partir du sol, on procède de la manière suivante :

- Collecter des échantillons de sol provenant des sites de la culture de la plante Sulla et les stocker à 4°C.
- Préparer des flacons contenant 150 ml de MNB stérile (Vincent, 1970) (**Annexe 1**).
- Inoculer un flacon avec une souche de *Rhizobium*, la culture est prise à la phase exponentielle de croissance.
- Incuber à 28°C dans un bain marie agitateur.
- A la phase exponentielle de la culture de MNB, 1g du sol est ajouté. La culture est incubée à nouveau à 28°C avec agitation pendant 18-20 h.
- Afin, de séparer les cellules et le sol, centrifuger pendant 15 min à 10000 tours/min.
- Filtrer le surnageant à travers une membrane filtre (diamètre du pore égal à 0,22 µm).
- 10 ml du filtrat qui contient le rhizophage, sont ajoutés à une culture fraîche de la même souche du premier flacon. Incuber à 28°C pendant 18-20h, centrifuger et filtrer. Répéter cette opération encore deux fois.
- Le dernier filtrat est la suspension des phages qui pourrait contenir  $10^6$ - $10^8$  particules de phages par ml.

Après l'isolement, on passe à l'analyse des phages:

- Chaque souche est incubée dans un flacon de MNB pendant 3 jours à 30°C.
- Dans des conditions stériles, 0,1 ml de la culture a été étalé sur un milieu solide de MNA dans une boîte de pétri.
- Une anse de platine de chaque suspension de phage est déposée sur la couche bactérienne. La localisation des dépôts est marquée sur le dos de la boîte, laisser sécher pendant 10-15 min, couvrir et retourner les boîtes, puis incuber à 30°C pendant 24-48h.
- L'apparition d'une plaque de lyse (zone claire), où chaque phage est déposé, indique une sensibilité des souches des rhizobia aux phages.

## **9- Détermination des profils protéiques sur SDS-PAGE**

### **9-1 Principe**

L'électrophorèse est la migration des molécules chargées en solution, en réponse à un champ électrique. La vitesse de migration dépend de la charge, la taille et la dimension des molécules.

Le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) est un détergent anionique qui dénature les protéines, il se fixe aux protéines spécifiquement dans un rapport de masse 1,4/1. En effet, le SDS confère une charge négative au polypeptide proportionnellement à sa dimension : qui détermine le sens de migration vers l'anode, sous l'effet d'un champ électrique. Donc dans ces conditions de séparation dénaturante de SDS-PAGE la migration n'est pas déterminée par la charge électrique intrinsèque du polypeptides, mais plutôt par le poids moléculaire (Coyne et coll., 2002)

La séparation des protéines d'une souche bactérienne par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) donne un profil ou électrophorégramme caractéristique de la souche et reproductible si les techniques employées sont standardisées (Ndiaye et coll., 2002).

## **9-2- Protocole**

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Laemmli (1970). La quantité d'une anse de platine remplie de bactéries, estensemencée sur un milieu de TY et incubée à 28°C pendant 18h. En phase de croissance exponentielle, une aliquote de 100 µl de chaque culture bactérienne est centrifugée à une vitesse de 7000 tours/min pendant 15 min. La lyse des cellules s'effectue après traitement du culot bactérien obtenu par l'addition de 50 µl de tampon de lyse et ébullition des échantillons pendant 3 min à 100°C.

Les extraits protéiques obtenus des souches sauvages ainsi que les souches mutantes sont stockés à -20°C pour usage ultérieur. 25 µl de chaque échantillon protéique est déposé dans un puits contenant la solution du tampon d'électrophorèse, sur un gel de polyacrylamide de 12 % (p/v) (**Annexe 4**).

Après migration et démoulage, le gel est mis dans une solution de coloration contenant le bleu de Comassie et l'acide trichloracétique (60%) pendant une nuit sous une faible agitation. Finalement le gel est décoloré dans l'eau distillée sous faible agitation jusqu'à l'apparition des bandes polypeptidiques.

Afin de déterminer les poids moléculaires des bandes polypeptidiques obtenus, nous avons utilisé un Kit (Low Molecular Weight « LMW ») constitué d'un mélange de protéines

de poids moléculaire connus : Phosphorylase b (97KDa), Albumine (66KDa), Ovalbumine (45KDa), Anhydrase carbonique (30KDa), Inhibiteur de trypsine (20KDa),  $\alpha$ -Lactalbumine (14,4KDa).

### **10- La coloration du noir Soudan**

Cette technique appelée aussi la coloration PHB, met en évidence les granules de Poly- $\beta$  Hydroxybutyrate (PHB), constituant lipidique de réserve.

La méthode utilisée est celle décrite dans la revue de : Practical Biotechnology « Plastic From Bacteria » proposé par : National Centre for Biotechnology Education (NCBE), (1995).

- Technique de préparation

1- Une goutte de la culture bactérienne est prélevée à la pipette et déposée au centre d'une lame propre.

2- Un étalement est préparé.

3- La coloration est effectuée après séchage de l'étalement.

- Technique de coloration

1- Coloration au noir Soudan, on dépose quelques gouttes, laisser agir pendant 10 minutes. Le noir Soudan est séché à température ambiante.

2- Immerger la lame dans une solution de xylène, pendant 10 secondes. La lame est complètement décolorée, laisser séché.

3- Coloration à la safranine pendant 15 secondes.

4- Laver à l'eau courante, égoutte la lame sur du papier absorbant puis observer à immersion à l'objectif 100 X.

Le PHB peut être observé comme des granules noirs à l'intérieur des cellules coloré en rose.

Le noir soudan est préparé à une concentration de 0,3% dilué dans l'éthanol à 70% ainsi la safranine est préparé à 0,5% dilué dans l'eau distillé.

# CHAPITRE TROIS

## RESULTATS ET DISCUSSION

### **1- Caractères cultureux**

La culture des souches sauvages sur le milieu YMA a permis d'obtenir des colonies de forme circulaire, convexe, légèrement relevées de texture crémeuse. Elles sont translucides, transparentes ou opaques et mucilagineuses. Les colonies apparaissent au bout de 24h à 48h, ce qui indique que sont de croissance rapide (fig. 8).

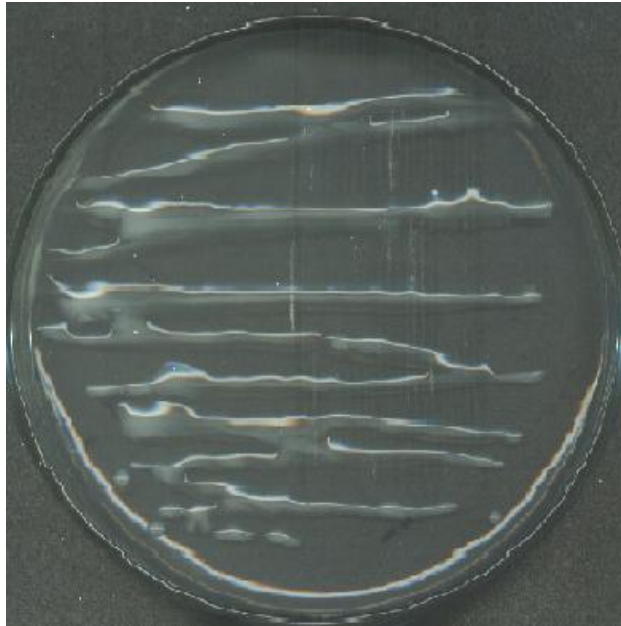


Figure 8 : L'aspect de la souche G19 sur le milieu YMA

## **2- Sélection et isolement des mutants**

L'agent sélectif utilisé pour repérer des mutants déficients dans la production des polysaccharides extracellulaire (EPS) est le « calcofluor wite ».

Montrer visuellement la production des EPS (particulièrement le succinoglycane ou EPS1), les souches sont cultivés sur un milieu contenant le calcofluor (Chuang-Yien Lee, 2000). Le calcofluor wite est un colorant fluorescent chargé négativement, utile pour détecter les mutants de la paroi cellulaire (Clare et King, 2001).

La fluorescence sous une lumière UV en présence du calcofluor, est utilisée pour isoler les mutants déficients dans la sécrétion des EPS. Les colonies des souches productrices



d'EPS sont fluorescentes sur un milieu d'agar contenant le calcofluor, tandis que les colonies qui ne secrètent pas des EPS (succinoglycane) sont non fluorescentes (Leigh et Lee, 1988).

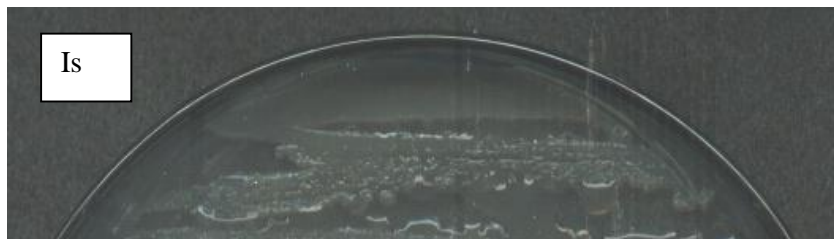
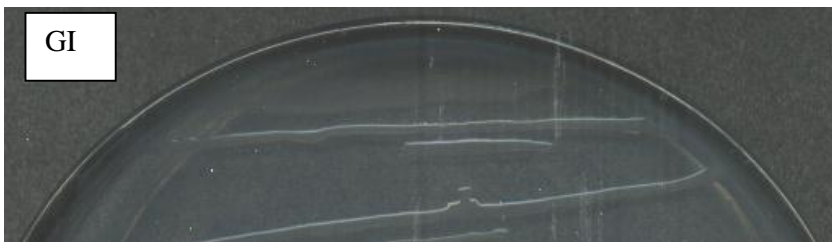
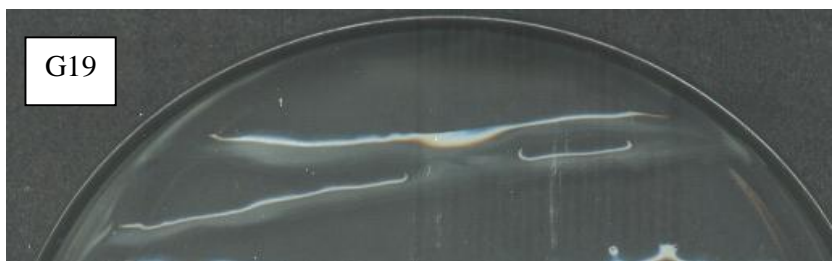
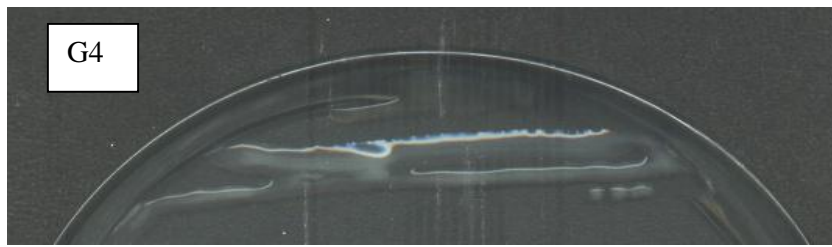
On se basant sur ce critère morphologique et après expositions des souches examinées aux rayons ultraviolets, on a pu isoler 16 souches mutantes (tableau 4). Dans des conditions d'obscurité et en présence du calcofluor, les mutants montrent une faible fluorescence sous la lumière UV, en revanche de la fluorescence élevée des souches normales.

Un tel phénotype indique une mutation au niveau de la production de succinoglycane (EPS1) (Kaufusi et coll., 2004)

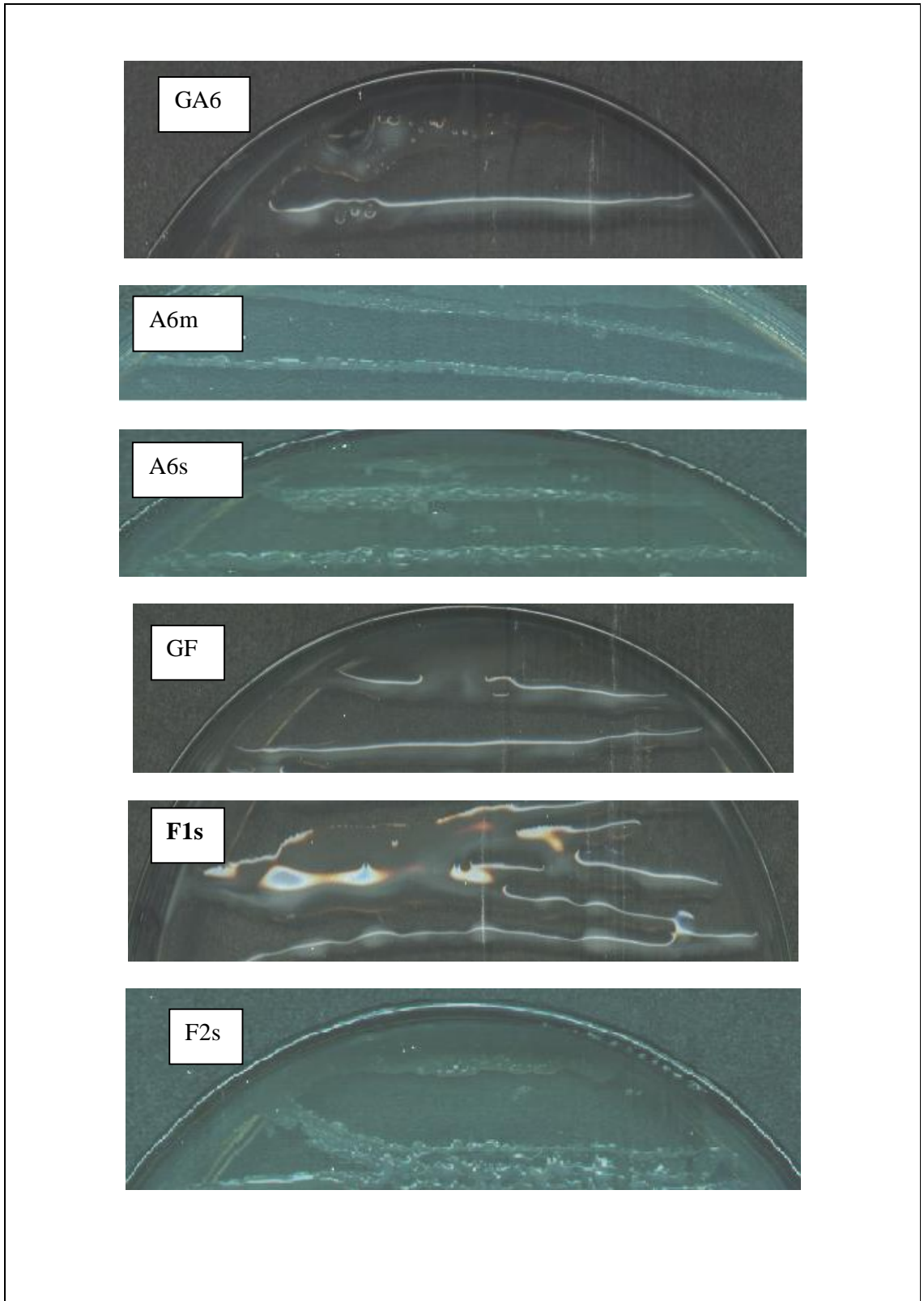
Parmi les 16 souches isolés, 15 souches apparaissent moins lumineuses sous UV sur le milieu YMA additionné de calcofluor par rapport à la luminosité des souches sauvages, alors qu'une souche montre une luminosité très importante que sa souches parentale (Planches 1, 2,3,4).

**Tableau 4:** Les souches mutantes isolés.

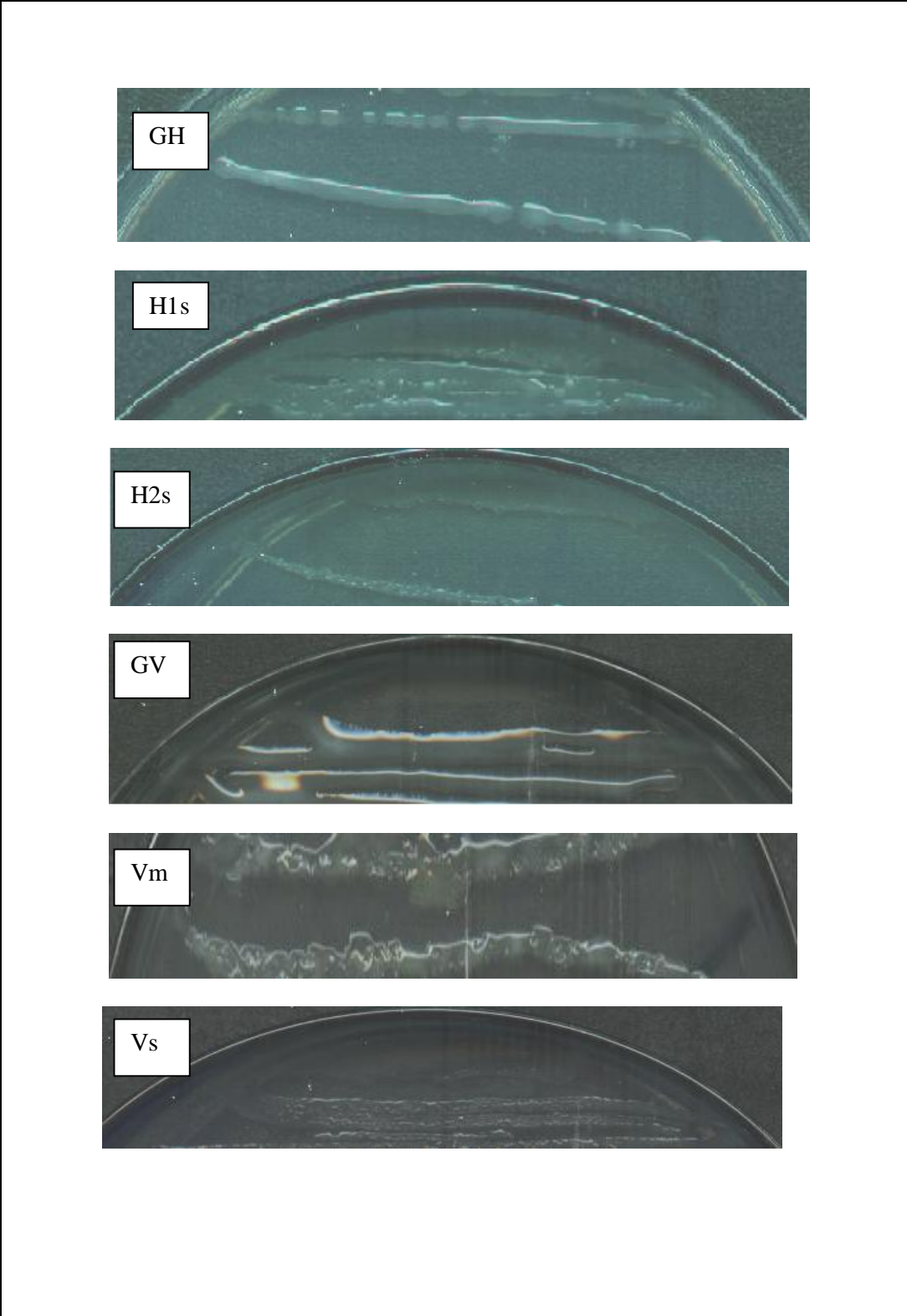
Souches sauvages	Souches mutantes obtenues
G4	4s
G19	19s
GI	Is
GA6	A6m, A6s
GF	F1s (plus lumineuse que GF), F2s
GH	H1s, H2s
GV	Vm, Vs
GT	Tr, Tr1, Tr2, Tr3, Ts



**Planche 1** : Aspect d'un groupe de souches sauvages et mutantes sur le YMA contenant le **Calcofluor 0,02%**.



**Planche 2:** Aspect d'un 2<sup>ème</sup> groupe de souches sauvages et mutantes sur le YMA contenant le **Calcofluor 0,02%**.



**Planche 3:** Aspect d'un 3<sup>ème</sup> groupe de souches sauvages et mutantes sur le YMA contenant le Calcofluor 0,02%.

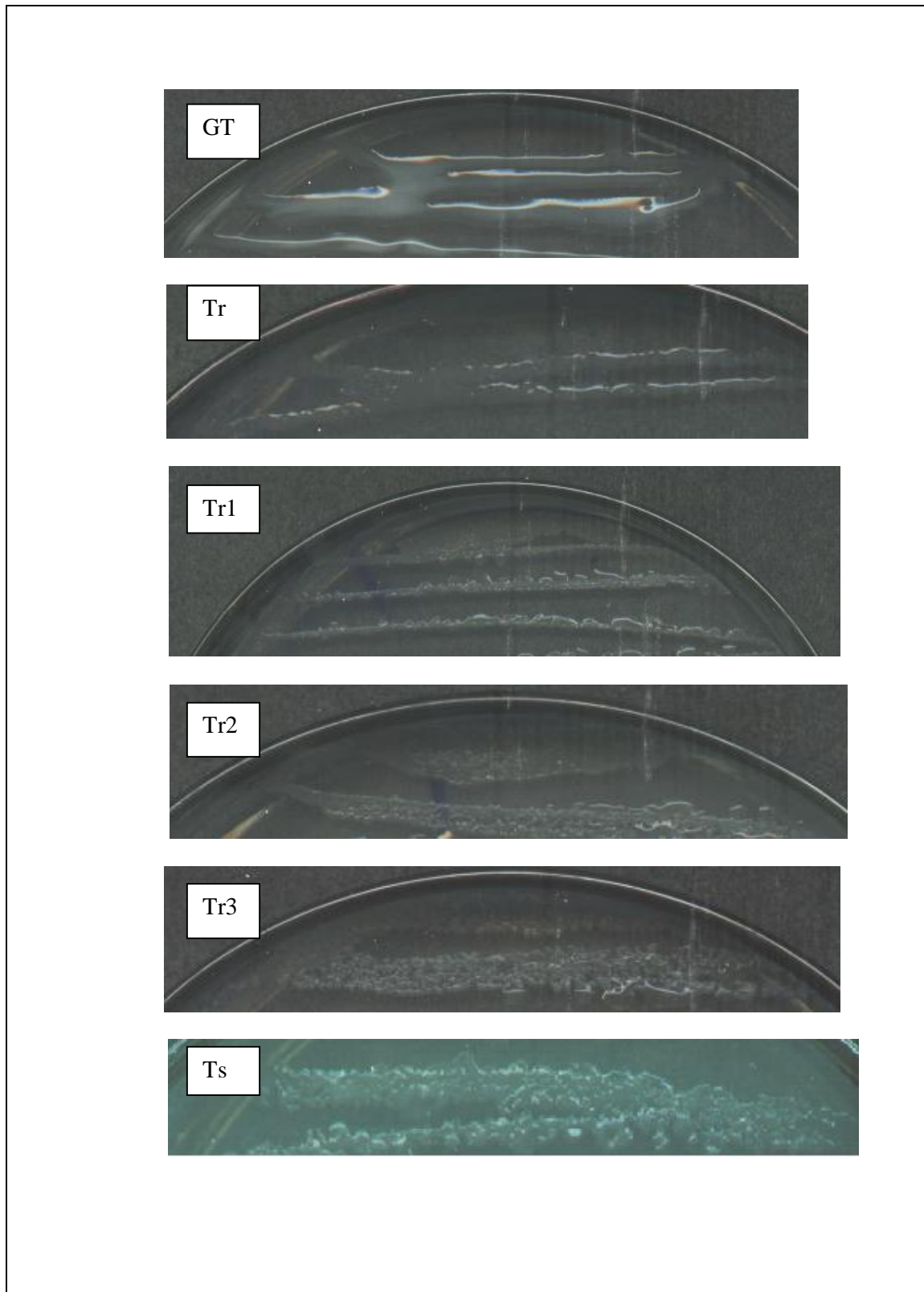
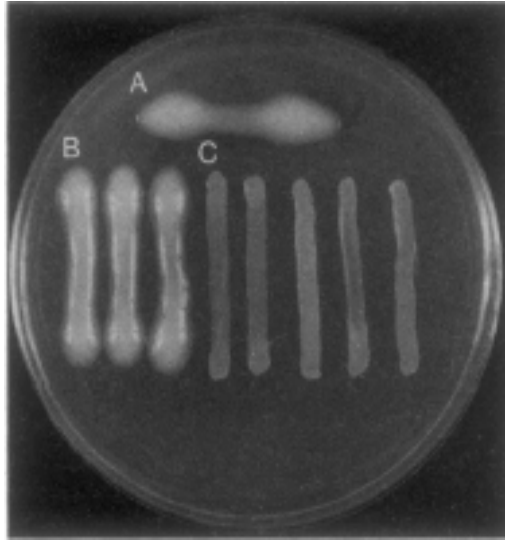


Planche 4: Aspect d'un 4<sup>ème</sup> groupe de souches sauvages et mutantes sur le YMA contenant le **Calcofluor 0,02%**.

L'aspect sec et rugueux des colonies mutantes repérées est similaire et comparable à celle isolées par HOTTER et SCOTT (1990) (fig.9), dont l'objectif est d'obtenir des mutants

du *Rhizobium loti* déficients dans la production des EPS sur in milieu d'agar contenant le calcofluor.



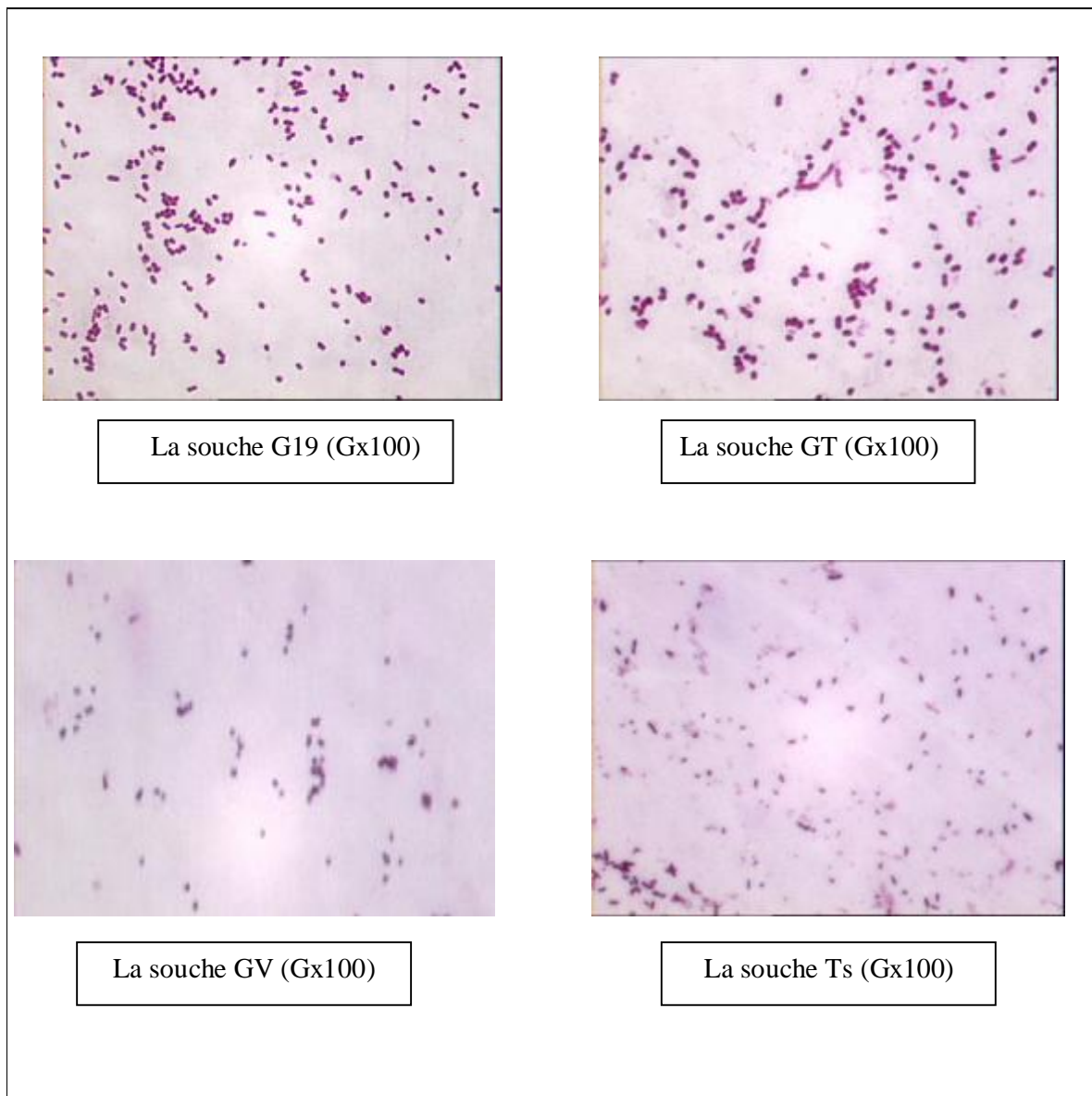
**Figure 9:** Phénotype des colonies parentales (A), les mutants d'EPS lisse (B) et les mutants d'EPS rugueux (C) sur le milieu YMA (Hotter et Scott, 1990).

NB : Les souches mutantes obtenues, après isolement et purification apparaissent sec et rugueux directement sur le milieux YMA sans calcofluor.

### 3- Examen microscopique

La coloration de Gram révèle des petits bâtonnets, Gram négatif (Planche 5).

Toutes les espèces du *Rhizobium* montrent une couleur rose et sont donc Gram négative (Beck, 1993).



**Planche 5** : Coloration de Gram des cellules bactériennes sauvages et mutantes.

#### **4-Test de nodulation**

La capacité des souches (sauvages et irradiées) à former des nodules avec la plante hôte (*Hedysarum coronarium*) in vitro constitue le test de base pour confirmer la purification et l'appartenance de nos souches au genre *Rhizobium*.



La réussite de ce test nécessite le contrôle de plusieurs facteurs telle que : l'humidité, la lumière, et surtout l'élimination de tout type de contaminants au niveau des graines, la solution nutritive, les jarres et les milieux de cultures des souches.

Il est important de tester la capacités des souches isolées à produire des nodules avec la plante d'origine à partir de la quelle ont été isolées (Beck, 1993).

La capacité des rhizobia à produire une infection sur les racines des légumes et induire la formation des nodules est appelée l'infectivité. Cette propriété est limitée à un groupe spécifique de *Rhizobium* et l'hôte sur lequel l'infection est induite (Beck, 1993).

Parmi les 6 souches sauvages de *Rhizobium sullae* étudiées, 5 seulement ont pu former des nodules avec la plante hôte (*Hedysarum coronarium*) (Planche 6).

**Tableau 5:** Résultat du test de nodulation avec les souches sauvages

Souches	G4	G19	GF	GH	GI
Résultats	3P (2n, 2n, 1n)	1P (1pa, 2n)	3P (3n, 1n,0)	2P (1n, 3n)	3P (0, 1n,3n)

**P** : Pied, **n** : nodule, **pa** : palette

Parmi les 16 souches mutantes repérées, 5 seulement ont pu former des nodules avec *Hedysarum coronarium* (Planche 7). Le reste des souches ont montré uniquement la formation des palettes, alors que la souche **Is** n'a présenté ni la formation des nodules, ni celle des palettes.

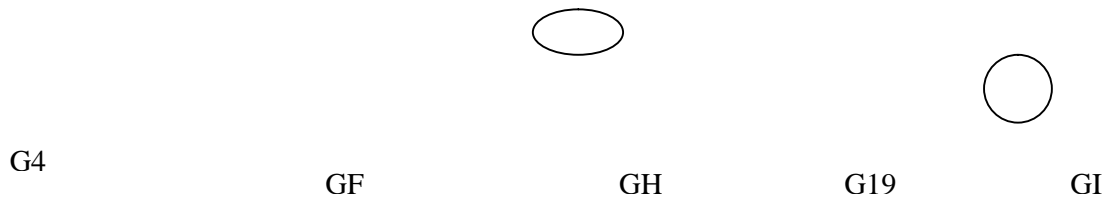
**Tableau 6 :** Résultat du test de nodulation avec les souches **mutantes**.

Souche	4s	A6m	A6s	<b>F1s</b>	H2s
Résultats	3P (4n, 1pa, 1n1pa)	3P (0, 1n, 1n1pa)	3P (1n, 2pa, 1pa)	1P (1n, 2pa)	2P (2pa, 1n1pa)

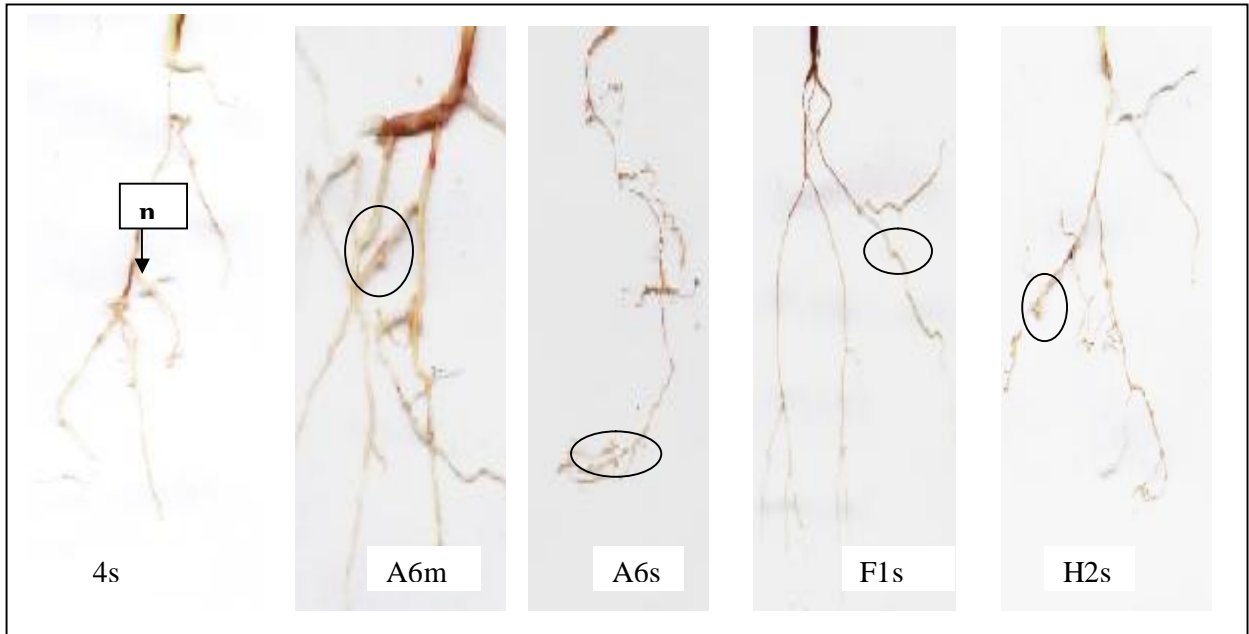
**P** : Pied, **n** : nodule, **pa** : palette







**Planche 6 :** Résultats du test de nodulation avec les souches **sauvages**.



**Planche 7 :** Résultats du test de nodulation avec les souches **mutantes**.

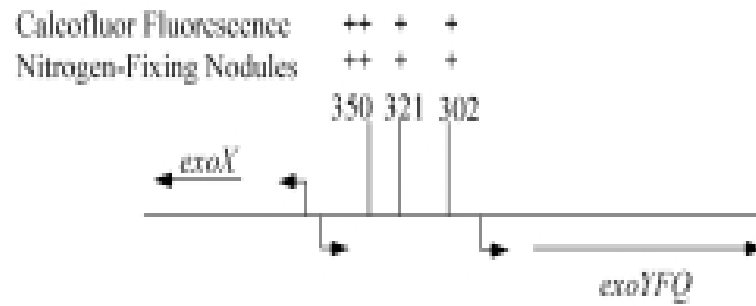
Les rhizobia à croissance rapide sont divisés en deux larges groupes, se différenciant par leurs capacités de former des nodules **efficaces** ou **inefficaces**. L'examen microscopique des nodules inefficaces montre une absence d'invasion, alors que celle des nodules efficaces mis en évidence une invasion ainsi qu'une présence de bactéroïdes à l'intérieur de chaque nodule. La relation entre les polysaccharides de surface bactérienne et la formation des nodules efficace est mal connue (Hotter et Scott, 1990).

Le phénotype symbiotique des mutants déficients en Lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) dépend du type de nodule déterminé par le génome de l'hôte (Kereszt et coll., 1998).

Les mutants du *Rhizobium sp.* déficients dans la synthèse des EPS (Exo<sup>-</sup>) induit la formation des nodules vides et inefficaces avec un nombre réduit des bactéries intracellulaires (Leigh et Lee, 1988; Caetano-Anolles et coll., 1990). Cette structure est désignée sous le nom de pseudonodule, se caractérisant par un fil d'infection non étendu. Cependant, ces pseudonodules bien organisés en méristème possèdent des éléments vasculaires périphériques normaux et une couche bien définie de cortex comme nodule (Caetano-Anolles et coll., 1990).

La production des EPS de type I par les rhizobia joue un rôle important dans le développement du fil d'infection et du processus d'invasion. Les espèces du *R. meliloti* sont capables de produire le deuxième type d'EPS appelé EPS II, des mutants déficients dans la synthèse des EPS I peuvent induire une invasion, cela suggère que les EPS II peuvent remplacer les EPS I dans le processus infectieux. Des travaux ont montré que l'EPS II et le KPS (exopolysaccharides capsulaire) sont capables de remplacer l'EPS I dans le processus d'invasion chez plusieurs types de légumineuses (Kereszt et coll., 1998).

Certaines mutations au niveau de la région *exoYFQ* (région promotrice des gènes codant pour le EPS1) peuvent affecter la production d'EPS I ainsi la capacité de former de nodules efficaces. La figure (10) : présente une mutation suggérée induite par insertion du transposon Tn 5 au niveau de la région promotrice de l'opéron *exoYFQ*, elle met en évidence la relation entre la production de succinoglycane et la capacité de former des nodules efficace ainsi que le degré de fluorescence des colonies en présence du calcofluor (Chuang-Yien Lee, 2000).



**Figure 10:** Schéma de l'opéron *exoYFQ* avec certaines mutations par insertion du transposon Tn5. Le résultat phénotypique de l'insertion au niveau du promoteur est décrit sur la base de facteurs : le degré de la fluorescence du calcofluor (++ ; indique une fluorescence de type sauvage, + ; signifie une faible fluorescence) et la capacité de former des nodules fixateurs d'azote (++ ; indique une fixation d'azote au niveau de nodules, + ; signifie une fixation inefficace). L'insertion de 350pb apparaît comme un type sauvage, cependant, celle de 321pb et 302pb donne une faible fluorescence des colonies une efficacité réduite de nodulation (Chuang-Yien Lee, 2000).

## 5-Tests nutritionnels

### 5-1-Utilisation de la source de carbone

La mesure de la densité optique (DO) est réalisée à une longueur d'onde égale 600 nm ( $\lambda_{600}$ ), après 24 heures d'incubation à 28°C, les solutions de culture apparaissent blanc châtre (un taux de turbidité important)

Les valeurs de la DO (**Annexe 3**) obtenues indiquent que le *Rhizobium* peut utiliser une large gamme de carbohydrates comme une source de carbone, avec un optimum de croissance en présence du mannitol.

Les résultats obtenus (Planche 8) montrent une croissance importante des souches sauvages en présence du **sorbitol**, alors qu'elle est moyenne chez les souches mutantes. Par contre, en présence du **xylose** la croissance des souches mutantes est importante, par rapport aux souches sauvages où la croissance est faible.

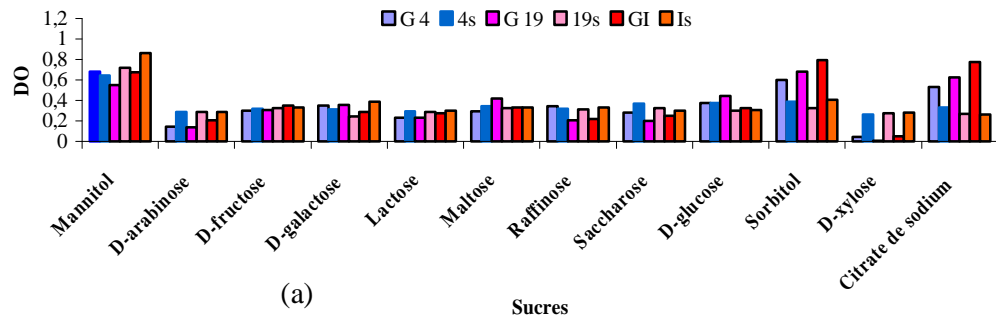
Les souches sauvages présentent un avantage dans l'utilisation du **citrate de sodium** par rapport aux souches mutées isolées, cette caractéristique n'apparaît pas chez la souche **GH** et ses souches mutantes (**H1s** et **H2**) (Planche 8 (c)).

Le D-arabinose est mieux utilisé par les deux souches mutantes : **4s** et **19s** par rapport à leurs souches sauvages originales **G4** et **G19** respectivement (Planche 8 (a)). Ainsi il est faiblement utilisé par la souche mutée **H1s** en comparaison avec les souches **GH** et **H2s** (Planche 8 (c)).

Les résultats obtenus pour les souches sauvages sont comparables à ceux indiqués dans la revue de Struffi et al (1998).

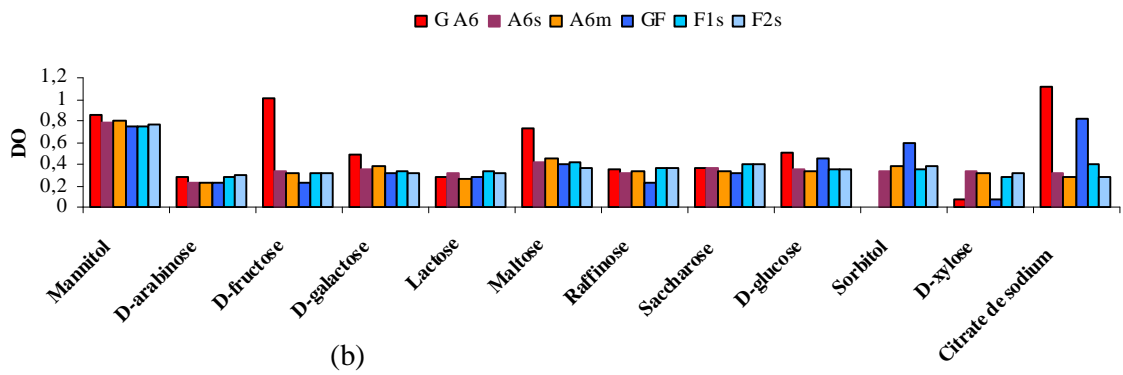
Le genre *Rhizobium* se caractérise par la capacité de la majorité des souches à utiliser le mannitol, le glucose, l'arabinose, le fructose et le saccharose comme source de carbone. (Vincent, 1970 et Werner, 1992).

Il a été montré par Fulchieri (1997) que la majorité des espèces à croissance rapide, et même lente, de la famille de *Rhizobiaceae*, peuvent utiliser une large variété de disaccharides.



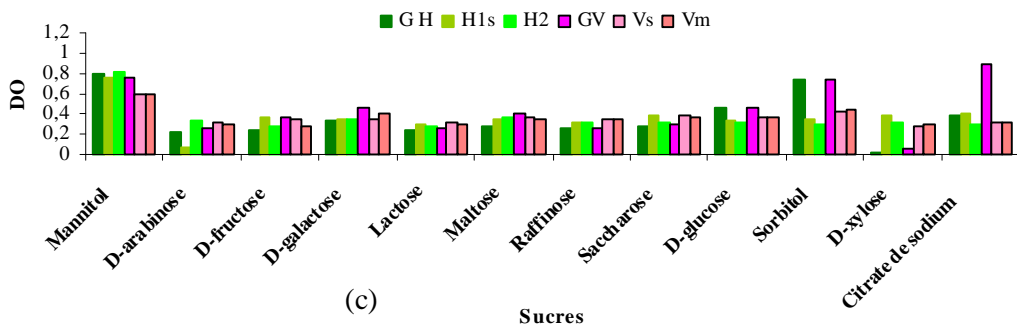
(a)

Sucres



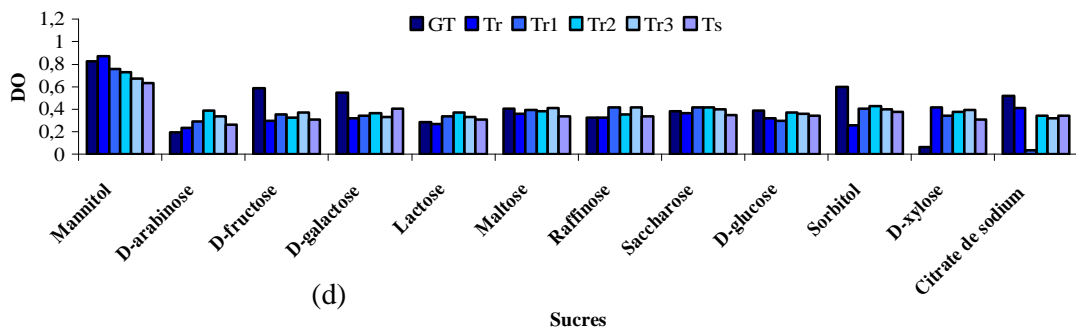
(b)

Sucres



(c)

Sucres



(d)

Sucres

**Planche 8** : Utilisation des sucres comme source de carbone chez les souches de rhizobia sauvages et mutantes. (a,b,c,d) : Groupes de souches sauvages et mutantes.

## 5-2 Utilisation de la source d'azote

Les souches montrent une variabilité de croissance sur le milieu Défini 8 selon la source d'azote. La plus part des souches présentent un optimum de croissance en présence du glutamate de sodium comme source d'azote à l'exception des deux souches mutantes A6s et F2s (Planche 9)

La glycine, la sérine, la phénylalanine, la méthionine, l'arginine, ainsi que la thréonine sont faiblement utilisées par la plupart des souches sauvages et mutantes à l'exception de quelques cas : par exemple la souche **Tr2** présente une utilisation importante de la méthionine, de même pour la souche **Vm** et **Tr3** avec l'arginine et la souche **GT** avec la phénylalanine.

Une croissance faible est remarquable chez la plupart des souches mutantes isolées en présence de l'alanine, l'asparagine et la cystéine sauf pour la souche **4s** et A6s et la **Tr1** avec l'asparagine.

Chaque souche mutante montre un comportement différent au moins pour deux acides aminés en comparaison avec sa souche parentale normale.

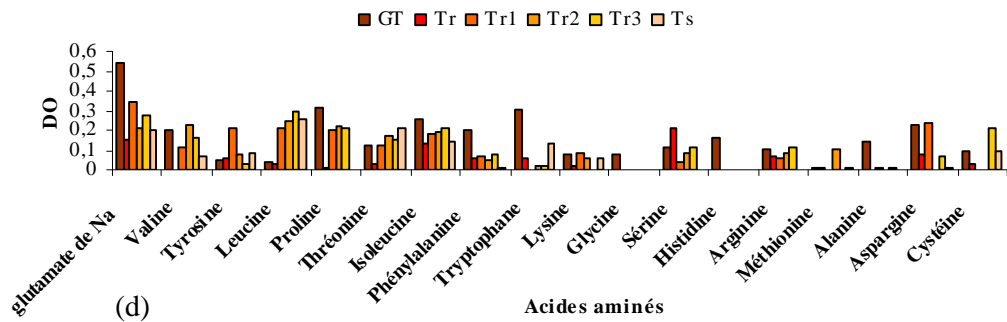
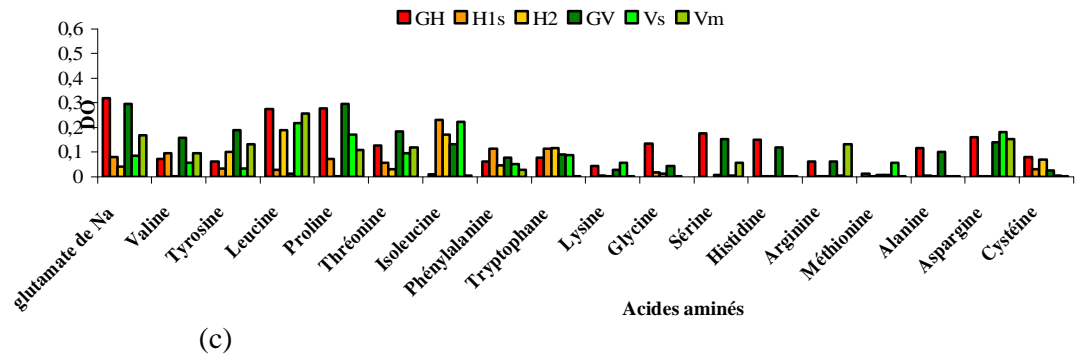
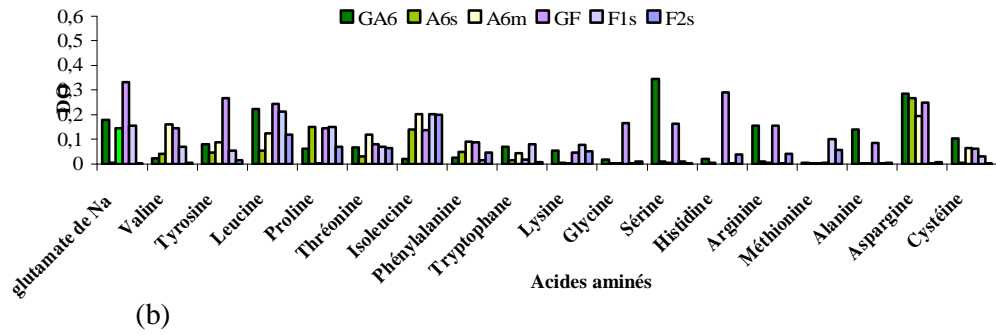
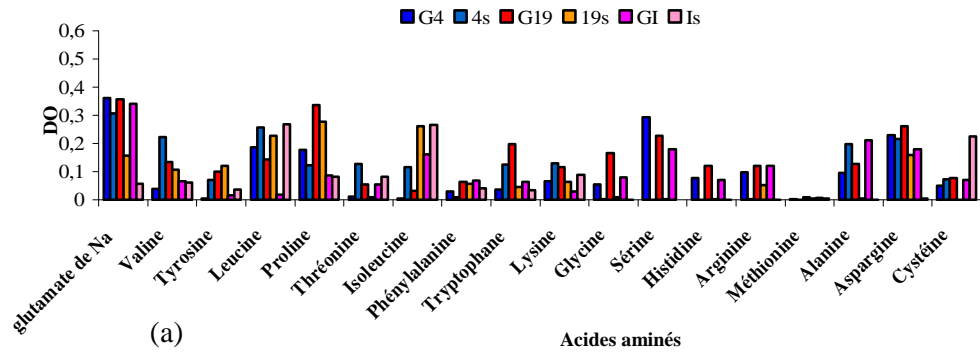
La souche **4s** présente un avantage dans l'utilisation des acides aminés sur la souche **G4**, surtout pour la valine, la tyrosine, la thréonine et le tryptophane. Par contre la souche **19s** présente une utilisation faible de la plupart des acides aminés par rapport à la souche **G19** (Planche 9 (a)).

Allen (1950) a rapporté qu'un nombre important de 32 à 39 acides aminés a été trouvé aisément assimilé par le *Rhizobium leguminosarum*, alors que d'autres résultats montrent que les acides aminés peuvent stimuler la consommation de l'oxygène et ne peuvent pas être une bonne source d'azote pour la croissance des rhizobia.

Struffi et al (1998) ont trouvé que la thréonine ne peut être utilisée par les souches du *Rhizobium sllae*.

Squartini et al (2002), dans la description du *Rhizobium sllae*, déclare que le glutamate, la valine, la proline, l'isoleucine, l'arginine et l'asparagine sont tous utilisés comme source d'azote.







**Planche 9** : Utilisation des acides aminés comme source d'azote chez les souches de rhizobia sauvages et mutantes. (a,b,c,d) : Groupes de souches sauvages et mutantes.

### 5-3-Besoin en vitamines

Toutes les souches sauvages et mutantes présentent une croissance optimum sur le milieu **B III** complet qui regroupe toute les vitamines.

Il existe une très grande variabilité entre le comportement des souches sauvages et mutantes (Planche 10).

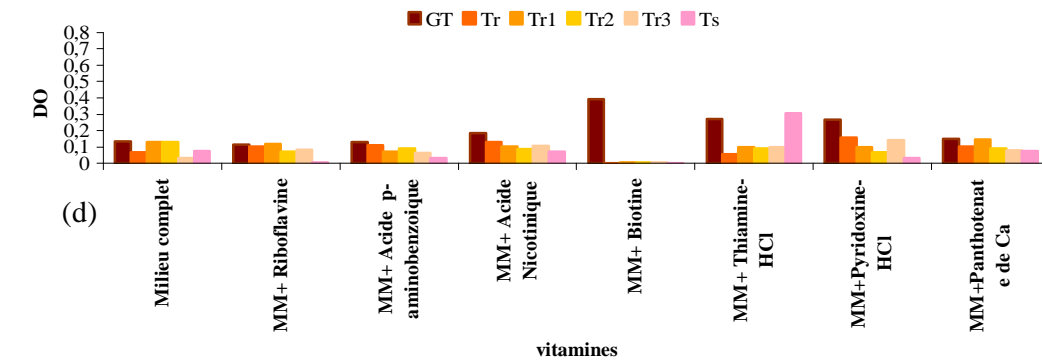
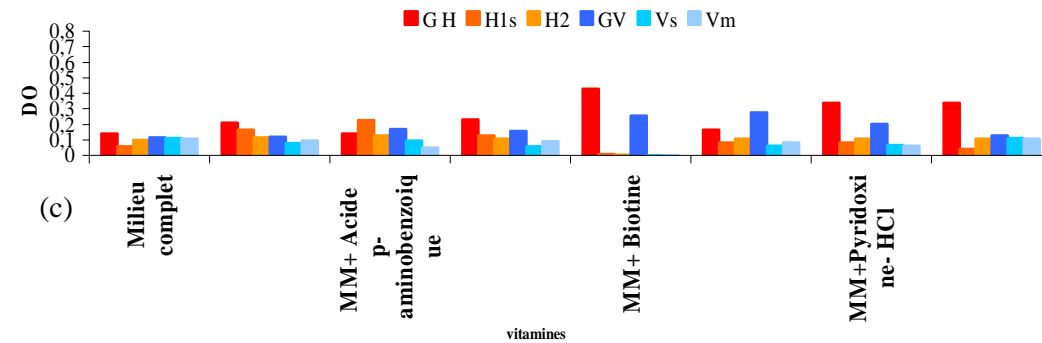
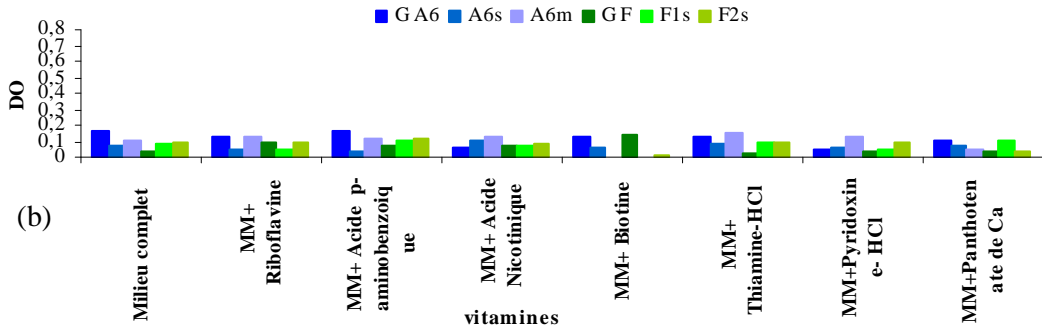
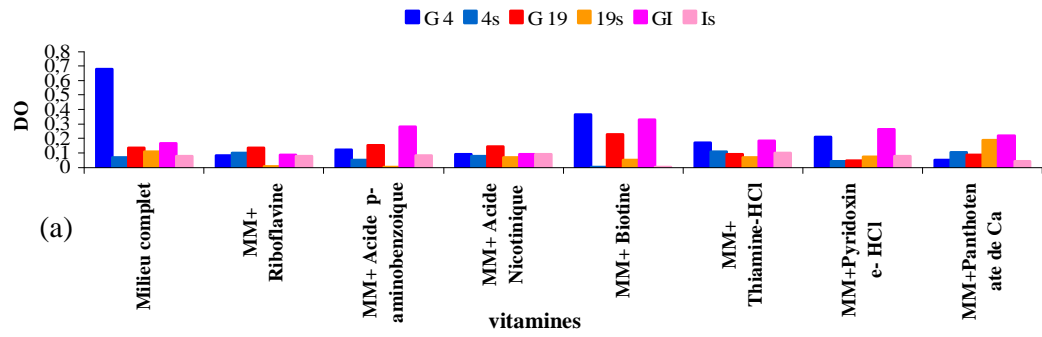
La biotine n'est pas utilisée par tous les mutants isolés, par comparaison avec les souches sauvages qui présentent une croissance importante en présence de la biotine.

Les deux souches mutantes **4s** et **19s** présentent une croissance faible par rapport aux **G4** et **G19**, sauf pour la panthotenate de Ca où les mutants présentent un avantage de croissance sur les sauvages. De même pour les deux souches mutantes **F1s** et **F2s** qui sont avantageuses sur la souche sauvage GF à l'exception du cas de la biotine.

Selon Allen (1950), les rhizobia à croissance rapide répondent habituellement à l'addition de la biotine, alors que les rhizobia à croissance lente ne sont pas stimulés.

Le *Rhizobium* est habituellement stimulé par la présence de la thiamine et de la panthotenate de Ca (Vincent, 1970 et Werner, 1992).

Généralement, l'addition de l'acide nicotinique, la pyridoxine, l'acide folique, l'acide *p*-aminobenzoïque, la riboflavine et cyanocobalamine ne sont pas nécessaires à la croissance des rhizobia, bien que des mutants exigeants ces métabolites soient connus (Werner, 1992).



## **6-Tests biochimiques**

### **6-1-Réduction des nitrates**

Après l'addition des réactifs I et II du nitrate réductase, les souches donnent une couleur rougeâtre, résultant de la réduction des nitrates en nitrites. Donc toutes les souches sauvages et mutantes ont du nitrate réductase.

Il est bien connu que le nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses (Luciński et coll., 2002). En outre, les mutants déficients du nitrate réductase (NR) de l'espèce *R. japonicum* sont capables de former des nodules et de fixer l'azote en symbiose avec la plante de soja (Stephens et Neyra, 1982).

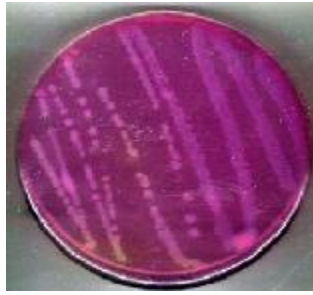
Plusieurs publications démontrent que le perfectionnement de la fixation d'azote est dû à la présence du nitrate réductase dans le bactéroïdes. D'ailleurs, 97% de l'activité du nitrate réductase dans les nodules est localisée dans les bactéroïdes (Luciński et coll., 2002).

### **6-2-Hydrolyse de l'urée**

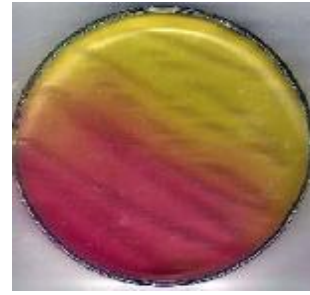
Hydrolyse de l'urée se traduit par une alcalinisation du milieu et l'apparition des colonies rouge après incubation pendant 48 heures à 30°C.

Les microorganismes possèdent une uréase très active transforme l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium, c'est une transformation très importante dans le monde agricole (Mobey, 1992 et Guiraud, 1998). L'activité de l'uréase est largement distribuée dans le sol et l'environnement aquatique, où elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme d'azote des plantes, algues, quelques invertébrés, des mycètes ainsi que des procaryotes (bactéries) (Palinska et coll, 2000).

Certaines souches mutantes présentent une coloration partielle par rapport aux souches parentales (Planche 11).



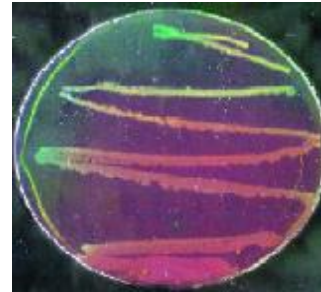
Hydrolyse de l'urée chez  
la souche G4



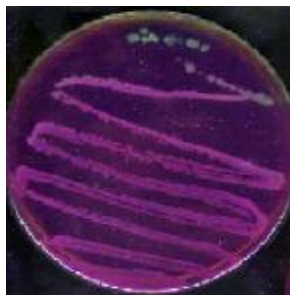
Hydrolyse de l'urée chez  
la souche 4s



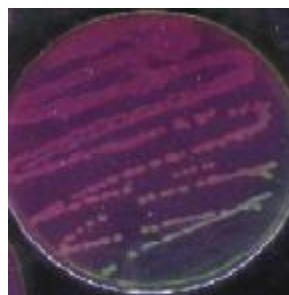
Hydrolyse de l'urée chez  
la souche GH



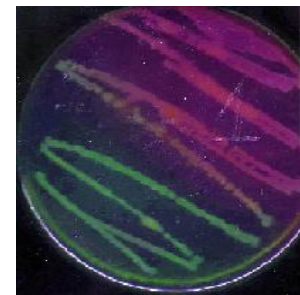
Hydrolyse de l'urée chez  
la souche H1s



Hydrolyse de l'urée  
chez la souche GA6



Hydrolyse de l'urée  
chez la souche A6m



Hydrolyse de l'urée  
chez la souche A6s

**Planche11:** Hydrolyse de l'urée chez certaines souches sauvages et mutantes.

### 6-3- Activité cellulosique

Une fois la solution de NaCl rejetée, les colonies apparaissent sur un fond rouge avec un halo jaune orangé mettant en évidence l'activité endoglucanase.

La souche mutante **Tr** montre un aspect différent de la souche sauvage **GT**, et un halo jaune orange qui n'entoure pas toutes les colonies (Planche 12).

### 6-4-Activité pectinasique

Après rinçage à l'eau et l'addition du rouge de ruthénium (0,05%), l'halo décoloré autour des colonies indique une activité pectinasique.

La décoloration des colonies apparaît partielle chez la souche **Tr** par comparaison avec la souche sauvage **GT** (Planche 12).

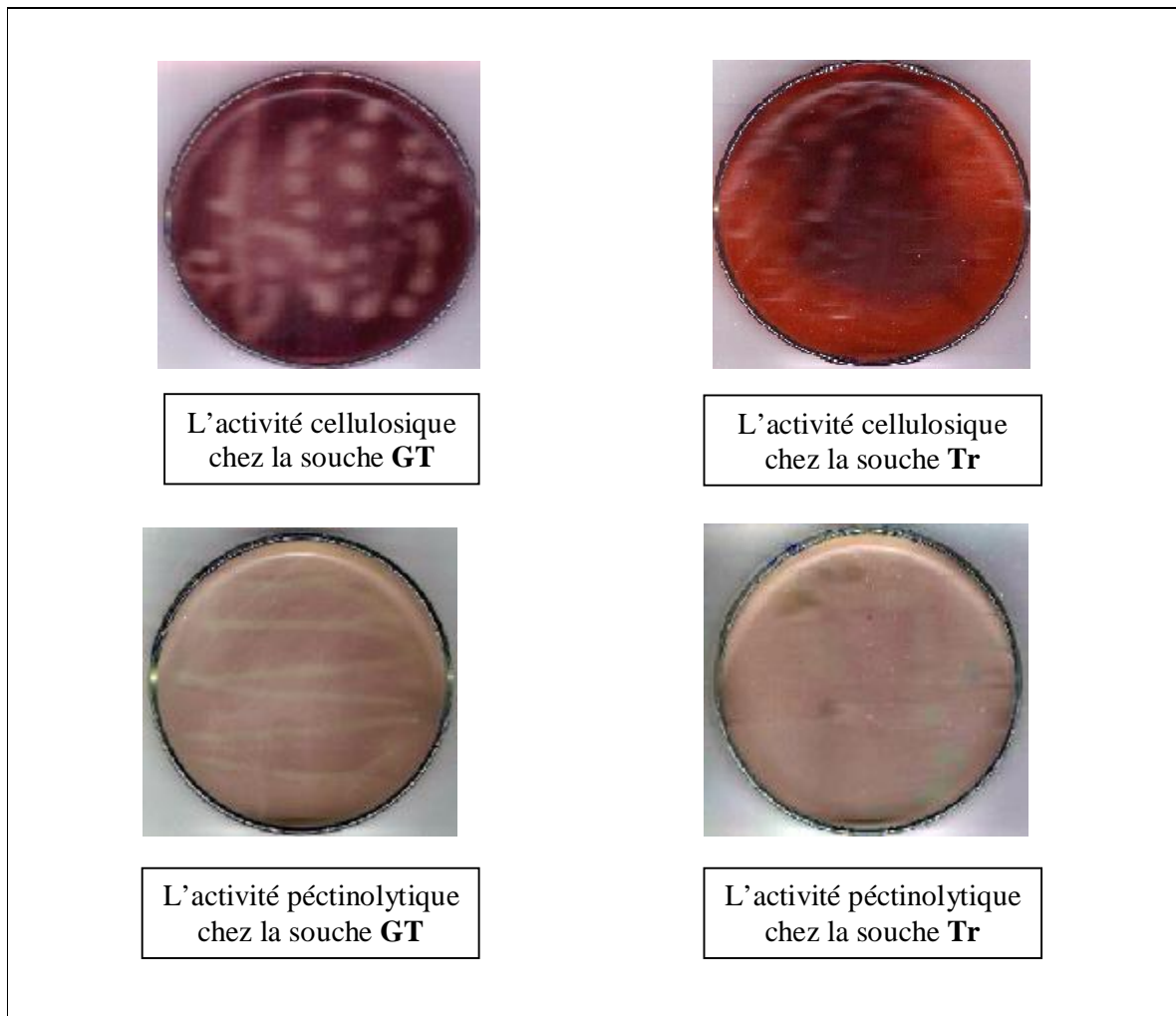


Planche 12 : L'activité cellulosique et pectinolytique chez les souches GT et Tr.

Des doubles mutants au niveau de l'activité péctinasique et cellulosiques sont détectés dans les extraits cellulaires de l'espèce *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Baumberger et coll., 2002).

Un événement central dans le processus infectieux de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse est la modification de la paroi cellulaire de la cellule-hôte formant une porte d'entrée assez large pour la pénétration bactérienne (Mateos et coll., 2001 et Baumberger et coll., 2002).

L'assemblage rigide des polysaccharides et des glycoprotéines de la plante constitue une barrière contre l'hôte bactérien spécifique. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer comment le processus de la pénétration pourrait-il avoir lieu ? (Mateos et coll., 1992).

Nutman (1956) a proposé que les rhizobia réorientent la croissance de la paroi des cellules de poils racinaires au bout où se localise le site d'infection. Ceci conduit à l'invagination et la pénétration de la paroi des cellules de poils racinaires, en formant une structure tubulaire du fil d'infection (cité par Molina et coll., 1979 et Mateos et coll., 1992).

Ljunggren et Fahraeus (1961) ont proposé que les rhizobia stimulent les plantes à produire des polygalacturonases, qui vont dégrader la paroi au site d'infection facilitant la pénétration du *Rhizobium* entre les microfibrilles de la membrane cellulaire (cité par Molina et coll., 1979 et Mateos et coll., 1992).

Un troisième modèle propose que les enzymes dégradant la paroi produisent une dégradation localisée qui traverse complètement la paroi des poils racinaires permettant une pénétration directe des bactéries (Mateos et coll., 1992).

Baker et al (1989) ont trouvé que plusieurs cellules du *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* attachées à la surface des racines du trèfle produisent des érosions dans les parois épidermiques, cela suit la découpe de la bactérie, ce qui suggère que les enzymes dégradant la paroi sont associés à la surface cellulaire bactérienne elle-même (cité par Mateos et coll., 1992).

Des études réalisées à l'aide du microscope électronique, apportent l'hypothèse qui suggère que des enzymes hydrolytiques sont impliquées dans diverses étapes du processus d'infection, incluant l'entrée des rhizobia dans les poils racinaires, à travers la paroi des cellules corticales des racines, qui sont produites par les cellules rhizobiales (Mateos et coll., 1992).

Des études subséquentes utilisant la microscopie à contraste de phase et à lumière polarisée ont indiqué que la capacité des parois des racines de trèfle à être dégradées par les enzymes rhizobiales dégradant les polysaccharides est augmentée par des modifications induites durant la croissance en présence de facteurs chitolipooligosaccharides Nod de trèfle rhizobial de type sauvage (Mateos et coll., 2001).

Actuellement l'activité de la cellulase est trouvée chez plusieurs espèces rhizobiales : *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *B. japonicum*, et les différentes souches du *R. leguminosarum*. (Baumberger et coll., 2002).

Les souches examinées dans notre étude (sauvages et mutantes) sont pourvues d'une cellulase et pectinase, sauf la souche mutante Tr.

Struffi et al (1998) ont prouvé la production des deux enzymes : endoglucanase et polygalactoranase, dégradant les ponts glucidiques de la paroi cellulaire par les espèces du *Rhizobium sulae*.

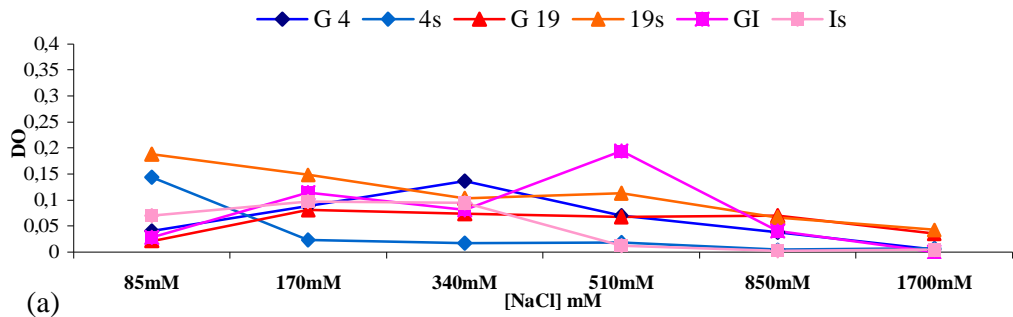
## **7-Tests physiologiques**

### **7-1 Tolérance au chlorure de sodium**

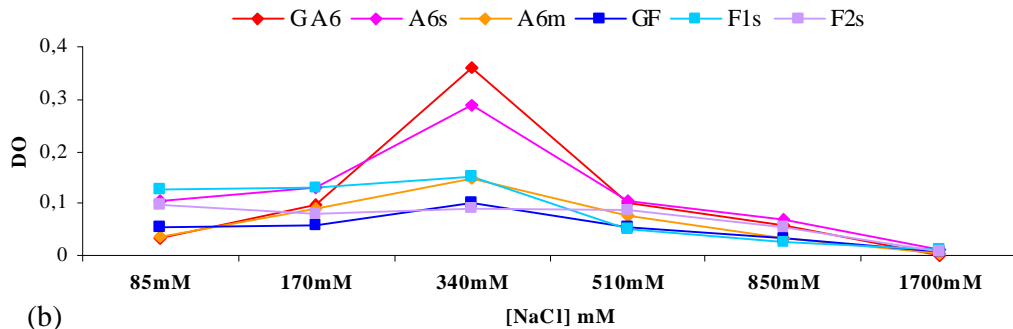
Il existe une très grande variabilité dans la tolérance des souches aux différentes concentrations de NaCl testées (Planche 13).

Toutes les souches sauvages tolèrent des concentrations entre : 340mM (2%) et 510mM (3%). Cependant, leur croissance est inhibée à des concentrations au-delà de 510 mM.

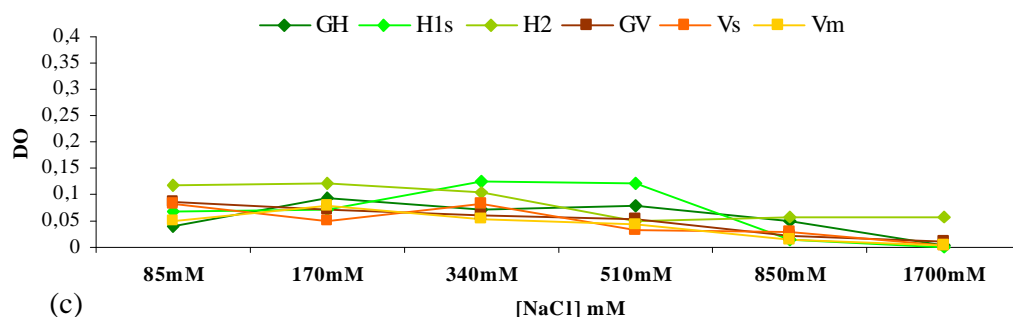
La souche **4s** montre une sensibilité vis-à-vis aux concentrations de NaCl testés, elle présente une croissance à une concentration égale 85mM (0,5%) (Planche 13 (a)).



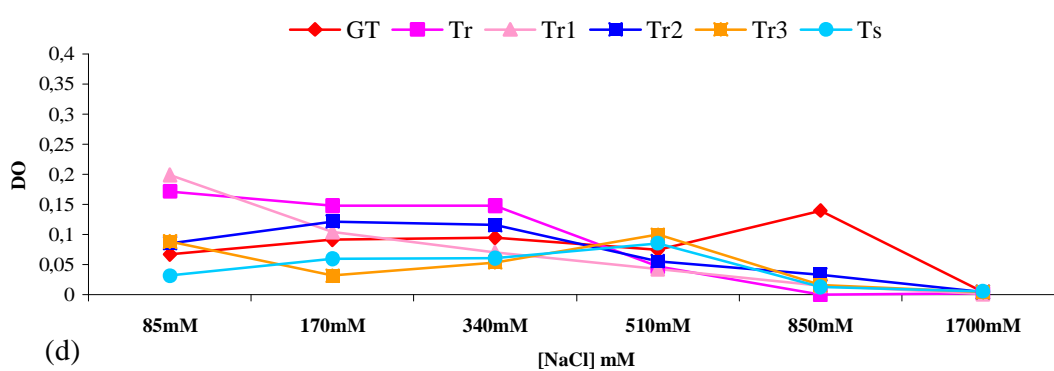
(a)



(b)



(c)



(d)



Planche 13 : Effet du NaCl sur la croissance des souches sauvages et mutantes. (a,b,c,d) : Groupes de souches sauvages et mutantes.

Les souches **GI** et **GH** tolèrent mieux le sel que leurs souches mutantes **Is** et **H1s** respectivement.

Les résultats obtenus sont comparables à celles trouvés par Struffi et al ,1998.

En marque qu'une variation dans la tolérance des sels, auparavant été trouvée chez la plus parts des souches de *Rhizobium* (Raza et coll., 2001).

La salinité diminue la survie des rhizobia et inhibe l'expansion et la courbure des poils absorbants ainsi que la fixation des rhizobia sur les poils semble sensible au stress salin, ce qui entraîne une réduction du nombre de ces organes symbiotiques (Saadallah, et coll., 2001, Benkhalel, 2003).

La salinité n'affecte pas seulement les multiplications des rhizobia dans la rhizosphère, mais affecte également le processus de nodulation on retardant l'initiation ou la croissance de nouveau nodule ainsi que la fixation symbiotique de l'azote. (Roa et coll., 2002).

## 7-2- Effet de la température

Après 48 heures d'incubation sur le milieu YMA la température optimale pour les souches varie entre 28°C à 30°C, alors qu'à une température de 4°C, il apparaisse quelque colonies séparées après le sixième jour d'incubation, sauf pour les deux souches mutantes F2s et Vm la croissance est inhibée à une telle température.

**Tableau 7** : Culture des souches **sauvages** sur le YMA incubées à différentes températures

	<b>G 4</b>	<b>G 19</b>	<b>G A6</b>	<b>GF</b>	<b>G H</b>	<b>GI</b>	<b>GT</b>	<b>GV</b>
<b>4 °C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>20 °C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>28 °C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>37 °C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>45 °C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>50 °C</b>	-	+	+	+	+	+	+	+

+ : croissance, - : pas de croissance

La température maximale est de 50°C pour tous les souches de rhizobia sauvages examinées, sauf pour la souche G4 elle est de 45°C.

**Tableau 8:** Culture des souches **mutantes** sur le YMA incubées à différentes températures.

	4s	19s	A6s	A6m	F1s	F2s	H1s	H2s	Is	Tr	Tr1	Tr2	Tr3	Ts	Vs	Vm
4 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

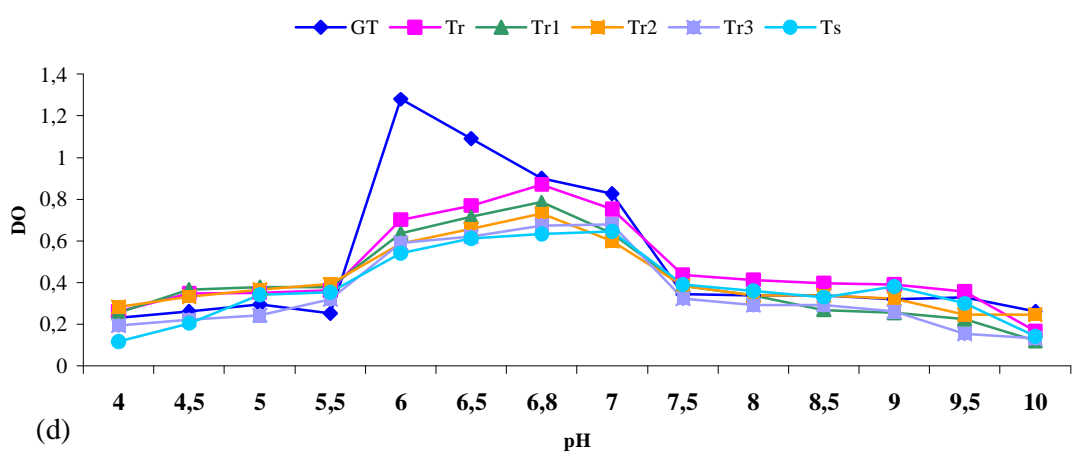
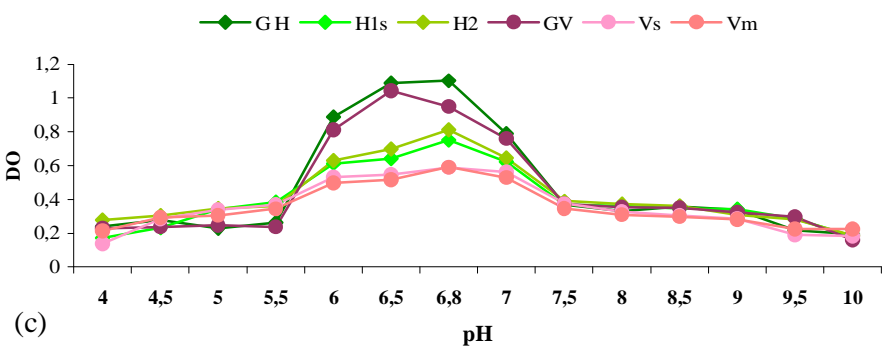
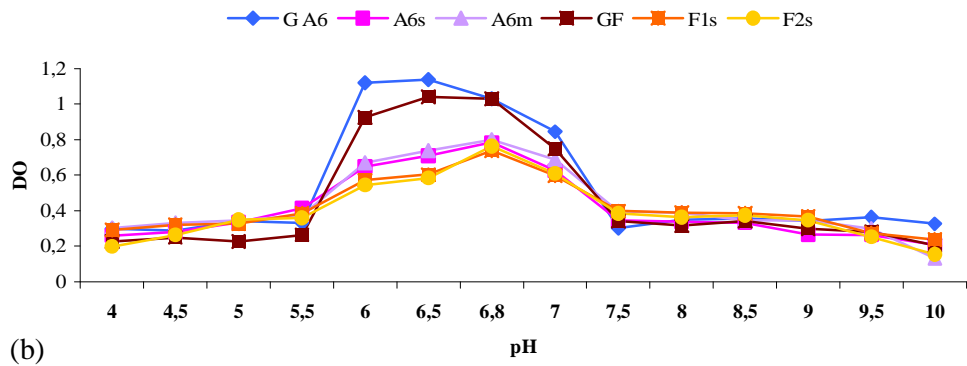
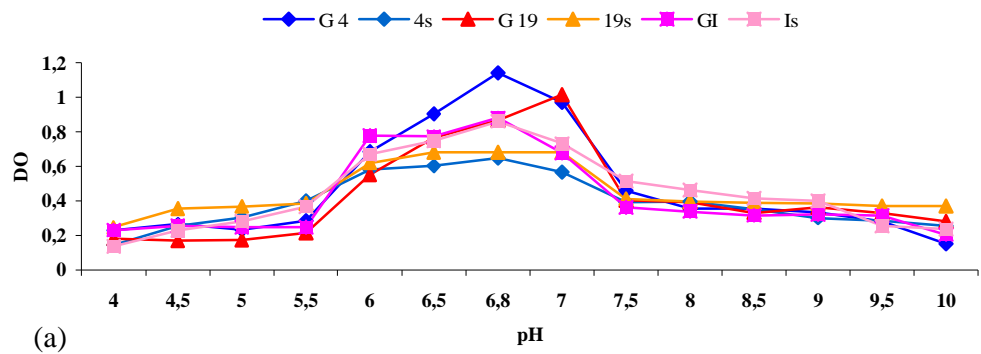
+ : croissance, - : pas de croissance

La température maximale est de 45 °C pour toutes les souches mutantes isolées, cette température est inhibitrice pour la souche **H2s**. Aucune colonie n'apparaît à une température de 50°C, c'est une température inhibitrice pour les bactéries mutantes.

La température optimale de croissance des souches de *Rhizobium* est de l'ordre de 25 à 30°C sont considérées comme des souches mésophile (Somasegaran et Hoben, 1994). Certaines espèces de *Rhizobium* peuvent supporter des températures élevées c'est le cas des légumineuses *mililoti* qui peuvent supporter des températures de 40,5 à 42°C (Werner, 1992).

### 7-3- Croissance à différents pH

Les résultats indiquent que les souches sont tolérantes le long de l'intervalle des valeurs de pH testés. Ils poussent sur une gamme de pH égale du 4 à 10, avec un optimum situé entre pH 6,0 à pH 7,0 (Planche 14).



**Planche 14** : Effet du pH sur la croissance des souches sauvages et mutantes. (a,b,c,d) :Groupes des souches sauvages et mutantes.

Les souches sauvages et mutantes se comportent de la même manière vis-à-vis les variations du pH du milieu.

Plusieurs travaux montrent que le *Rhizobium* se caractérise par une grande différence dans la tolérance de pH; une tolérance de l'alcalinisation a été observée sur quelques souches de *Rhizobium* qui peuvent tolérer jusqu'à une valeur égale 9,5, alors qu'elle peut atteindre une valeur de 11 chez l'espèce *Sasbania procumbens*. Une tolérance des conditions d'acidité, a été reportée par quelques souches de *R. loti* et *R. tropici*, ils montrent une croissance dans des sols à pH inférieur à 6 (Raza et coll., 2001).

#### **7-4- Résistance aux métaux lourds**

Les concentrations inhibitrices sont déterminées après incubation sur TYA en présence des métaux lourds pendant 7 jours à 30°C.

La tolérance des souches aux métaux lourds est variable. La concentration la plus élevée est enregistrée avec l'antimoine (6000 µg/ml) pour toutes les souches sauvages, ainsi que les mutantes.

Toutes les souches examinées possèdent la même concentration inhibitrice pour le plomb (2250µg/ml).

Les tableaux des résultats (9 et 10) montrent que toutes les souches mutantes repérées, tolèrent le cuivre mieux que les souches sauvages, par contre leur tolérance au mercure est plus faible par comparaison avec leurs souches d'origines sauvages.

Les mutants sont plus sensibles au zinc, à l'exception de la souche **Tr** qui montre une résistance ainsi que les deux souches **F1s** et **F2s** qui possèdent la même concentration inhibitrice que leur souche sauvage.

Struffi et al. 1998 ont montré la résistance du *Rhizobium sllae* au plomb et au cuivre, alors qu'il est sensible en présence du mercure.

De façon générale les effets toxiques des métaux lourds sur les microorganismes du sol dépendent de leur disponibilité biologique. Les microorganismes ont développés plusieurs mécanismes pour immobiliser, mobiliser ou transformer les effets des métaux lourds (Gremion, 2003)

Ces mécanismes de résistances sont codés par des gènes du plasmide et des transposons et probablement par le transfert des gènes ou des mutations spontanées qui permettent aux bactéries d'acquérir une résistance aux métaux lourds. (Gremion, 2003)

La résistance des bactéries du sol aux métaux lourds est très importante pour la croissance des plantes en particulier les légumineuses. Abbas et Kamal (2004) ont prouvé que sur un sol traité par des différentes concentrations de métaux lourds et en présence du *Rhizobium* de la plante *Pisum sativum* est capable de se développer. Alors que, en absence du *Rhizobium* et en présence des mêmes concentrations la croissance de *Pisum sativum* est inhibée.

**Tableau 9 :** Les concentrations inhibitrices (CI) ( $\mu\text{g/ml}$ ) des souches **sauvages** cultivées sur TY en présences de différents métaux lourds.

	<b>G 4</b>	<b>G 19</b>	<b>G A6</b>	<b>GF</b>	<b>G H</b>	<b>GI</b>	<b>GT</b>	<b>GV</b>
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	750	500	500	750	750	500	500	500
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	2750	2750	2750	3000	3000	2250	2750	3000
<b>Pb(CH<sub>2</sub>COOH)</b>	2250	2250	2250	2250	2250	2250	2250	2250
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
<b>Antimoine Sb</b>	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000

**Tableau 10:** Les concentrations inhibitrices (CI) ( $\mu\text{g/ml}$ ) des souches **mutantes** cultivées sur TY en présences de différents métaux lourds.

	<b>HgCl<sub>2</sub></b>	<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	<b>Pb(CH<sub>2</sub>COOH)</b>	<b>CuCl<sub>2</sub></b>	<b>Antimoine Sb</b>
<b>4s</b>	<b>250</b>	2000	2250	<b>1750</b>	6000
<b>19s</b>	<b>250</b>	2500	2250	<b>2000</b>	6000
<b>A6s</b>	<b>250</b>	2500	2250	<b>2000</b>	6000
<b>A6m</b>	<b>250</b>	2500	2250	<b>1750</b>	6000
<b>F1s</b>	<b>250</b>	3000	2250	<b>2000</b>	6000
<b>F2s</b>	<b>250</b>	3000	2250	<b>1750</b>	6000
<b>H1s</b>	<b>250</b>	2500	2250	<b>2000</b>	6000
<b>H2</b>	<b>250</b>	1500	2250	<b>1750</b>	6000
<b>Is</b>	<b>250</b>	1500	2250	<b>2000</b>	6000
<b>Tr</b>	<b>250</b>	3000	2250	<b>2000</b>	6000
<b>Tr1</b>	<b>250</b>	1500	2250	<b>1750</b>	6000
<b>Tr2</b>	<b>100</b>	1500	2250	<b>1750</b>	6000
<b>Tr3</b>	<b>250</b>	1500	2250	<b>1750</b>	6000
<b>Ts</b>	<b>250</b>	1500	2250	<b>1750</b>	6000
<b>Vs</b>	<b>100</b>	1500	2250	<b>1750</b>	6000
<b>Vm</b>	<b>250</b>	1500	2250	<b>1750</b>	6000

## 7-5- Résistance aux antibiotiques

Nous avons utilisé la méthode de dilution pour déterminer les concentrations inhibitrices des antibiotiques ( $\mu\text{g/ml}$ ). Cette méthode consiste à mettre un inoculum bactérien au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

L'étude de la résistance, sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques, a montré l'existence d'une homogénéité dans leurs comportements (tableaux 11 et 12).

Toutes les souches montrent une résistance élevée en présence de l'érythromycine, la spéctinomycine et l'acide nalidixique et une sensibilité pour la rifampicine, le chloramphénicol et la kanamycine.

Chaque souche mutante présente au moins un comportement diffère de celui de sa souche d'origine sauvage. Cela suggère que des gènes de résistance aux antibiotiques sont probablement altérés lors de l'exposition des souches à la lumière ultraviolette.

Les résultats obtenus sont en accord avec celles rapportés par Struffi et al. 1998 et Benguedouar (2000) qui ont trouvés que *Rhizobium sllae* tolère l'acide nalidixique par rapport aux autres antibiotiques et montre une sensibilité à la rifampicine. Alors que pour l'érythromycine et la spéctinomycine, les souches présentent des tolérances très élevées par rapport aux résultats de Struffi et al. 1998 et Benguedouar (2000).

Maatallah et al. 2001 dans leur évaluation de la résistance intrinsèque aux antibiotiques du *Rhizobium* de pois chiche, ont montré que la plus part des souches examinés présentent une forte résistance à la kanamycine, l'acide nalidixique et l'érythromycine. Par contre, en présence du chloramphénicol et la rifampicine, seulement un nombre réduit des isolats qui peuvent résisté.

La résistance des antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude du *Rhizobium*, en tant que moyens d'identification des souches d'inoculum et des souches issues du sol (Beck, 1993).

**Tableau 11:** Les concentrations inhibitrices des antibiotiques ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches sauvages.

	<b>G 4</b>	<b>G 19</b>	<b>G A6</b>	<b>GF</b>	<b>G H</b>	<b>GI</b>	<b>GT</b>	<b>GV</b>
<b>Kanamycine</b>	20	20	600	20	500	20	100	500
<b>Acide Nalidixique</b>	3000	3000	5000	5000	3000	1500	3000	3000
<b>Erythromycine</b>	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
<b>Spectinomycine</b>	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
<b>Chloramphénicol</b>	300	100	500	300	500	300	100	400
<b>Rifampicine</b>	200	50	200	50	100	50	50	100
<b>Streptomycine</b>	500	1250	1250	1000	1250	1000	400	600
<b>Gentamycine</b>	100	1250	1250	100	1250	600	300	600

**Tableau 12:** Les concentrations inhibitrices des antibiotiques ( $\mu\text{g/ml}$ ) pour les souches mutantes.

	<b>Kanamycine</b>	<b>A.Nalidixique</b>	<b>Erythromycine</b>	<b>Spectinomycine</b>	<b>Chloramphénicol</b>	<b>Rifampicine</b>	<b>Streptomycine</b>	<b>Gentamycine</b>
<b>4s</b>	500	3000	5000	3000	200	50	1250	1000
<b>19s</b>	500	2000	5000	3000	200	100	1250	1250
<b>A6s</b>	500	3000	5000	3000	500	50	1250	1000
<b>A6m</b>	500	2000	5000	3000	500	50	1250	1000
<b>F1s</b>	500	1500	5000	3000	200	50	1250	1500
<b>F2s</b>	300	1500	5000	5000	200	50	1250	1250
<b>H1s</b>	500	2000	5000	3000	500	100	1250	1500
<b>H2</b>	500	2000	5000	3000	500	50	1250	1000
<b>Is</b>	500	3000	5000	5000	300	100	1250	1250
<b>Tr</b>	500	3000	4000	5000	100	100	500	1000
<b>Tr1</b>	200	2000	4000	5000	100	100	400	1000
<b>Tr2</b>	500	2000	4000	5000	100	100	400	1250
<b>Tr3</b>	200	2000	4000	3000	200	100	400	1250
<b>Ts</b>	200	3000	5000	3000	100	100	500	1000
<b>Vs</b>	500	2000	5000	5000	200	50	500	1000
<b>Vm</b>	500	2000	5000	5000	200	50	500	1000



## 8- Sensibilité aux phages

Après isolement des particules phagiques, et leur analyse en contact avec une culture bactérienne fraîche a donné un résultat négatif. Aucune zone de lyse ou zone d'inhibition de croissance n'a été apparaît. Toutes les souches sauvages et mutantes ont montré une résistance aux rhizobiophages. Cela suggère que soit : on a pas pu isolé des phages a partir du sol, soit l'échantillon du sol choisi est dépourvu de rhizobiophages spécifiques aux souches ou vraiment nos souches ont développé une résistance vis-à-vis des rhizobiophages.

Struffi et al. 1998 a prouvé la spécificité de la réaction lytique *R. sultae* - phage.

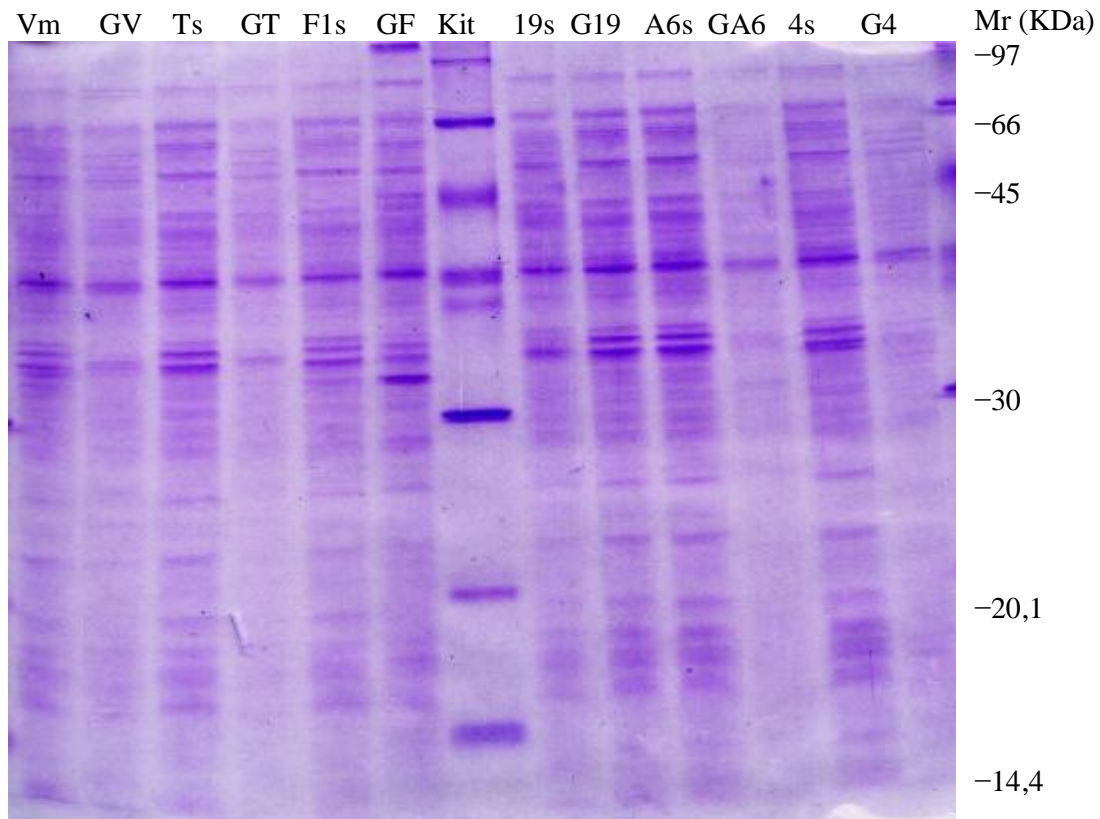
L'existence des phages dans les sols a été mise en évidence dès 1935 par Demelon et Dunez (Werquin et coll., 1988).

Puisque, les interactions entre les rhizobiophages et leurs hôtes sont hautement spécifiques, ils peuvent être des outils valables dans les recherches écologiques avec les rhizobia (Somasegaran et Hoben, 1994).

Des expériences in vitro ont montré que les bactériophages capables de réduire la densité d'une population des souches susceptibles du *Rhizobium trifolii* au niveau de la surface des racines et dans la nodulation, et aussi sont capables de favoriser la résistance totale ou partielle des souches (Werquin et coll., 1988).

Nasir et Wolfgang (1988) ont prouvé que l'inoculation de soja par une suspension des phages et des souches de *Bradyrhizobium japonicum* résistant les phages a donné une fréquence de nodulation très importante, en comparaison par celle qui a été inoculé par des phages et des souches sensibles aux phages. Grâce à leur effet lytique les rhizobiophages peuvent agit négativement sur la culture des légumineuses.

## 9- Détermination des profils protéiques sur SDS-PAGE

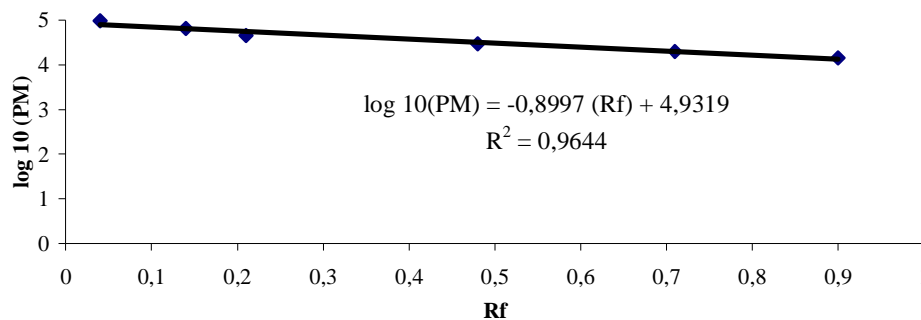


**Figure 11:** Profils électrophorétiques sur gel de polyacrilamide (12%) des protéines totales.

L'analyse numérique des profils protéiques, consiste de calculer les rapports frontaux (Rf) donnés par la formule suivante (Coyne et coll., 2002) :

**Rf** = distance parcourue par la bande polypeptidique/ la distance parcourue par le marqueur

La courbe d'étalonnage du Kit (fig. 12) met en évidence la relation entre le logarithme décimal des poids moléculaires des protéines et leur mobilité électrophorétique relative (Coyne et coll., 2002).



**Figure 12:** Courbe d'étalonnage du Kit.



22703	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22237	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
21335	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
20049	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
19236	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
18455	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
18076	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
17343	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
16987	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
16298	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
15964	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
15636	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15002	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14694	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
13248	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12976	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12710	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
12195	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11944	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
11460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Coefficient de similitude	<b>57%</b>		<b>66%</b>		<b>66%</b>		<b>79%</b>		<b>66%</b>		<b>79%</b>	

1 : Bande présente, 0 : Bande absente

Les profils des protéines totales des souches sauvages et mutantes obtenus par SDS-PAGE semblent très différents. Le nombre de bandes polypeptidiques varie de 16 à 28 selon la souche considérée. Certaines bandes sont communes pour les sauvages et les mutants.

Le calcul du coefficient de similitude nous a permis d'évaluer le degré de ressemblance et de différence qui existe entre les souches sauvages et mutantes.

Formule du Coefficient de similitude (Jana et coll., 1992) :

$$\text{Coefficient de similitude} = \frac{\text{Le nombre de bandes communes entre les 2 souches} \times 100}{\text{le nombre total des bandes.}}$$

La différence entre la souche **G4** et **4s** est importante, la première met en évidence la présence de 16 bandes polypeptidiques tandis que la deuxième présente 24 polypeptides. Les profils protéiques de ces deux souches révèlent un coefficient de similitude de 57%. On remarque que les polypeptides de 30KDa à 12KDa sont portés par la souche **4s** alors qu'ils sont absentes chez la **G4**.

Les mutants **A6s** et **Ts** synthétisent un nombre important de polypeptides, 27 bandes sont portées par le profil protéique de la souche **A6s** et 23 par la souche **Ts**, alors que 16

seulement présentent chez **GA6** et 12 uniquement par **GT**, avec un coefficient de similitude égale 66% dans les deux cas.

La souche mutante **19s** montre la présence d'un nombre réduit de polypeptides par comparaison avec la souche **G19**.

Une différence moins importante est met en évidence entre **F1s**, **Vm** et leurs souches sauvages.

On peut conclure que probablement la mutation a altéré la synthèse protéique des souches mutantes à l'échelle quantitative ainsi que qualitative.

Cette technique de séparation électrophorétique en présence de SDS est fiable pour grouper un certain nombre de souches ainsi il existe une grande similitude entre le contenu des protéines cellulaires et l'hybridation ADN : ADN (Benguedouar, 2000).

## **10- La coloration de noir Soudan**

Les frottis préparés à partir d'une culture jeune (24h d'incubation) mettent en évidence des granules noirs à l'intérieur de petits bâtonnets roses. Cette observation est commune pour les souches sauvages et mutantes, mais le pourcentage des cellules portant des granules noirs est important chez les souches sauvages en comparaison avec les cellules mutantes où le nombre des cellules qui possèdent des granules est très réduit.

Les frottis préparés à partir d'une culture vieille (48h d'incubation) mettent en évidence la présence des granules uniquement chez les mutants alors qu'elles sont absentes chez les sauvages (fig.13)

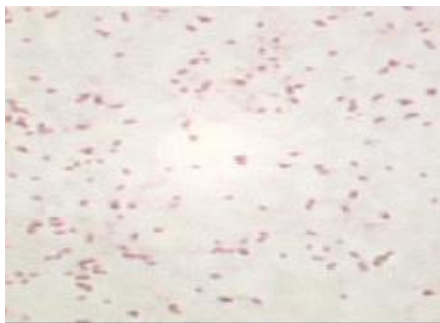
Cela suggère que les souches sauvages synthétisent la réserve lipidique très tôt que les cellules mutantes et la dégradent lorsque la source de carbone et d'azote disponible est épuisée. Ce résultat nous laisse penser que les souches sauvages possèdent une vitesse de croissance assez importante que les mutants.

Le poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) est une réserve d'énergie polyester naturellement accumulé par une large variété de microorganismes. Il constitue une source carbonique en cas de déficience nutritionnelle (Roberts, 2005).

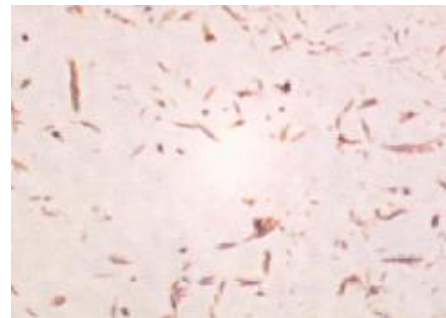
Les rhizobia se caractérisent par la synthèse du PHB qui est mis en évidence par une observation microscopique (Somasegaran et Hoben, 1994).

Cependant, les bactéries dans un milieu riche en nutriments peuvent synthétiser et dégrader le PHB. La biologie de la synthèse et d'utilisation de PHB sous telles conditions est mal élucidée. Plusieurs microorganismes portent des gènes codant pour la synthèse et autres pour la dégradation du PHB, ces voies suggèrent évolué peut être un mécanisme général, pour la survie des cellules bactérienne en période de stress (Tian et coll., 2005).

Des études réalisées sur l'espèce *Wautersia eutropha* montrent que le niveau de synthèse de PHB augmente avec 15 à 23% dans les premières 4 heures d'incubation, tandis qu'à 48 heures le PHB est complètement dégradé. La taille des granules après 4 heures de croissance est beaucoup plus importante que celles des granules portés par les cellules de 24 heures d'incubation, ce qui indique qu'il y a une dégradation à cette période. Généralement, la synthèse de PHB par les microorganismes a lieu sous des conditions limitantes en source d'azote (Tian et coll., 2005).



Frottis de la souche GT  
d'une culture vieille.



Frottis de la souche Tr  
d'une culture vieille.

**Figure 13** : Coloration de PHB chez les souches **GT** et **Tr**.

## Discussion générale et Conclusion

Dans cette étude nous avons essayé d'induire des mutations par un agent mutagène physique ; la lumière ultraviolette, sur des souches bactériennes du genre *Rhizobium* nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*.

Les souches en question sont isolées à partir des nodules de racines de la légumineuse *Hedysarum coronarium*, sont désignés sous le nom de *Rhizobium sulae* et en présence de deux autres espèces appartenant au même genre : *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* et *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Elles sont déjà caractérisées du point de vue phénotypique et phylogénétique.

Les suspensions bactériennes sont exposées à la lumière ultraviolette à une distance constante de 73 cm et pendant des temps allant de 25 à 60 secondes. Le calcofluor est utilisé comme agent sélectif pour repérer des mutants déficients d'exopolysaccharides (EPS).

Le calcofluor est un colorant fluorescent utilisé pour montrer visuellement la production d'EPS. Les colonies des souches parentales sous la lumière ultraviolette sont fluorescentes sur un milieu d'agar (YMA) contenant le calcofluor, alors que les colonies qui ne secrètent pas ou peu d'EPS en particulier du type succinoglycane (EPS I) sont non fluorescentes. On se basant sur ce caractère de fluorescence en présence du calcofluor et avec une appréciation visuelle, on a pu isoler 16 souches mutantes. Ces mutants repérés montrent une fluorescence, une luminosité ainsi que des viscosités faibles sous la lumière UV par comparaison avec la fluorescence, la luminosité et la viscosité élevées des souches normales, tant que l'une des souches met en évidence une luminosité très importante comparativement à sa souche d'origine sauvage.

Kaufusi et al. (2004) déclare que la faible fluorescence sur un milieu de YMA additionné du calcofluor sous UV, indique une mutation au niveau des gènes impliqués dans la production de succinoglycane (EPS I).

Une combinaison de produits de 22 gènes *exo* est impliquée dans la production d'EPS I. 19 gènes *exo* sont localisés sur une région de 24 Kb au niveau de deux mégaplasmides chez *Rhizobium meliloti*. L'opéron *exoYFQ* porte les gènes nécessaires pour les premières et les dernières étapes de la synthèse de succinoglycane (Chuang-Yien Lee, 2000).

Dans l'objectif d'étudier l'influence de la mutation sur le processus symbiotique, un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées est réalisé. Ce test consiste de mettre les deux partenaires symbiotiques (bactérie- plante hôte) en contact direct avant et après l'application d'agent mutagène.

Parmi les 6 souches sauvages de *Rhizobium sulae* étudiées, 5 souches ont montré la capacité de pénétrer dans les tissus racinaires et induire la formation des nodules. Seules 5 souches mutantes ont pu former de très petites structures racinaires, qui semblent être des pseudonodules.

L'association des plantes légumineuses et les bactéries du sol du genre *Rhizobium* est un processus complexe implique un échange coordonné des signaux. Les exopolysaccharides ont montrés leur implication dans cette association. Les mutants déficients d'EPS de diverse espèce de *Rhizobium* s'étendent de la formation des pseudonodules à une nodulation efficace (Kaufusi, et coll., 2004).

Des études montrent que le succinoglycane est nécessaire pour l'initiation et l'élongation du fil d'infection durant le processus d'invasion. Cependant un excès du succinoglycane gêne la capacité des rhizobia de coloniser la courbure du fil des poils racinaires (Chuang-Yien Lee, 2000).

L'identification des souches mutantes déficientes dans la production d'exopolysaccharides est portée par une étude phénotypique comparative avec les souches sauvages.

Les tests nutritionnels montrent la capacité des souches examinées d'utiliser une large gamme de carbohydrates comme source de carbone. Cependant le degré et la façon



d'assimilation des sucres chez les mutants semblent différents par rapport aux sauvages. Les souches mutantes présentent un comportement différent de celui des sauvages vis-à-vis des acides aminés utilisés comme source d'azote. Les besoins en vitamines des souches mutantes se différencient de celles des souches sauvages. Ces résultats indiquent que l'exposition des souches à la lumière ultraviolette peut engendrer une altération des voies métaboliques.

Les souches présentent une tolérance au stress salin jusqu'à une concentration de 10% de NaCl. Tant que le degré de tolérance-sensibilité vis-à-vis de la salinité du milieu est variable entre les sauvages et les mutants.

Toutes les souches présentent un optimum de croissance à une température de 28°C. La température maximale est de 50°C pour les souches sauvages, alors qu'elle est de 45°C chez les mutants. Au-delà de 45°C aucune croissance n'a été enregistrée pour les mutants.

L'étude de la variation du pH montre la capacité des souches à pousser sur une gamme de pH variant de 4 à 10, avec un optimum de croissance situé entre pH 6.0 à pH 7.0, ceci confirme les travaux de plusieurs auteurs qui ont prouvé la variabilité de tolérance de pH chez les rhizobies (Werner, 1992, Raza et coll., 2001).

Les tests biochimiques montrent la disponibilité des enzymes nécessaires pour la symbiose chez les souches examinées. Elles possèdent de la nitrate-réductase, enzyme qui contribue à l'assimilation de l'azote minérale. Les souches pourvues d'une uréase ainsi qu'une pectinase et une cellulase, ces deux enzymes sont impliqués dans le processus infectieux de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses, elles facilitent la pénétration des rhizobies à travers les fibres par une dégradation des ponts glucidiques de la paroi cellulaire. Seule la souche mutante Tr qui est dépourvue d'une pectinase et cellulase. Des doubles mutants de l'activité pectinasiqne et cellulolique sont détectés dans les extraits cellulaires de l'espèce *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (Baumberger et coll., 2002)

La tolérance des souches aux métaux lourds est variable, elles présentent une tolérance importante pour l'antimoine et le plomb. Toutes les souches mutantes repérées mettent en évidence une tolérance au cuivre et une sensibilité au mercure. A l'exception des souches Tr, F1s, F2s, le reste des souches mutantes présentent une sensibilité au zinc. La résistance des bactéries du sol aux métaux lourds est très importante pour la croissance des plantes en

particulier les légumineuses. Généralement les gènes de résistance aux métaux lourds sont portés par des plasmides et des transposons, l'acquisition d'une résistance ou d'une sensibilité vis-à-vis des métaux lourds est due à une mutation au niveau de ces gènes.

La résistance intrinsèque aux antibiotiques a été fréquemment utilisée dans l'étude du *Rhizobium*. Les souches étudiées montrent une résistance à l'érythromycine, la spéctinomycine et l'acide nalidixique et une sensibilité pour la rifampicine, le chloramphénicol et la kanamycine. Chaque souche mutante présente au moins un comportement différent de celui de sa souche d'origine sauvage. Ce qui suggère que des altérations aux niveaux des gènes de résistances aux antibiotiques pourrait avoir lieu lors de l'exposition des cellules bactériennes à la lumière ultraviolette.

Toutes les souches sauvages et mutantes ont montré une résistance aux rhizobiophages. Vu la spécificité des interactions entre les rhizobiophages et leurs hôtes, cette caractéristique constitue un outil valable dans la recherche écologique avec les rhizobia (Somasegaran et Hoben, 1994).

L'analyse des protéines totales cellulaires sur électrophorèse de gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) présente des différences importantes entre les profils des sauvages et des mutants. Ce qui indique que l'irradiation des souches par les rayons ultraviolets a provoqué des mutations au niveau des gènes codant pour les protéines de la cellule bactérienne. La technique de séparation électrophorétique en présence de SDS est fiable pour comparer et grouper les souches ainsi qu'il existe une grande similitude entre le contenu des protéines cellulaire et l'hybridation ADN :ADN (Benguedouar, 2000).

Les rhizobia se caractérisent par la synthèse de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) qui est mis en évidence par une observation microscopique. La coloration du noir Soudan révèle la présence des granules noirs après 24 heures d'incubation chez les sauvages et avec un degré moindre chez les mutants. Alors qu'après 48 heures d'incubation, les granules sont présentes seulement chez les mutants. Cela suggère que les souches sauvages synthétisent la réserve lipidique très tôt que les cellules mutantes et la dégrade lorsque la source de carbone et d'azote disponible est épuisée. Ceci implique que l'application d'agent mutagène a provoqué

une modification au niveau des gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse et la dégradation de PHB.

En conclusion, la formation des nodules est la conséquence des séries d'interactions contrôlées par des signaux moléculaires entre la plante et son hôte bactérien. Les polysaccharides de la surface bactérienne sont connus pour intervenir dans le processus d'infection, le succinoglycane est un type d'exopolysaccharides produit par les rhizobia nécessaire pour la formation du cordon infectieux dans les poils racinaires.

La technique de la mutagenèse par application de la lumière ultraviolette a mis en évidence des gènes différemment exprimés durant la symbiose et a permis de mieux comprendre ce phénomène. Comme résultat de la liaison de succinoglycane avec le calcofluor est l'apparition des cellules sauvages fluorescentes sous UV, les cellules bactériennes non fluorescentes en présence du calcofluor semblent être des mutants déficients dans la production d'exopolysaccharides.

La caractérisation phénotypique des mutants repérés par comparaison avec les souches sauvages a révélé des différences importantes notamment au niveau des profils des protéines totales obtenus par SDS-PAGE, la synthèse du PHB, résistance intrinsèque aux antibiotiques, tolérance aux métaux lourds ainsi que d'autres caractères physiologiques, biochimiques et nutritionnels.

L'une des premières approches mises en place pour étudier la symbiose a été de créer des mutants par la mutagenèse par insertion des transposons, néanmoins ce type d'approche est restreint. Le développement du séquençage systématique des génomes ainsi que l'avènement de la bioinformatique ont optimisé les techniques d'étude et amélioré les connaissances du processus symbiotique.

Les gènes exo d'exopolysaccharides peuvent être isolés par une analyse génétique des mutants qui donnent un aspect sombre en présence du calcofluor. Cette méthode a joué un rôle essentiel dans l'étude des gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse de la succinoglycane.

La réaction de chaînes polymérase (PCR), méthode de biologie moléculaire qui utilise des marqueurs génétiques, constitue une technique de base pour l'étude des génomes

bactériens et permet de mettre en évidence des délétions et des insertions au niveau des séquences d'ADN.

L'isolement et l'analyse des EPS sont des techniques utilisées pour caractériser le type d'EPS produit et d'évaluer la quantité des EPS synthétisés par les bactéries, comme elles permettent aussi de détecter des mutants d'exopolysaccharides.

La mutagenèse dirigée est une technique moléculaire qui cible directement le gène d'intérêt, permet d'étudier la structure et le fonctionnement des gènes, constitue le meilleur choix récent pour les études génétiques des microorganismes.

Les récents séquençages complets des génomes de certaines espèces du genre *Rhizobium* et l'amélioration des méthodes d'études des génomes des végétaux symbiotiques, permettront probablement de remédier les lacunes de la compréhension de ce processus.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abbas, S.M et Kamel, E.A.** (2004)- *Rhizobium* as a Biological Agent for Preventing Heavy Metal Stress. Asian Journal of Plant Sciences 3 (4): 416-424, Asian Network for Scientific Information. ISSN 1682-3974

**Abdelguerfi-Berrechia, R., A. Abdelguerfi ; N. Bounaga; Guittoneau, G.G.**(1988)- Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. Ann. Inst. Nat. Agr. El Harrach.12: 191-219

**Allen, E.K. et Allen 0.N.** (1950) -Biochemical and symbiotique properties of the Rhizobia. Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, Madison.

**Andriankaja, A.H.** (2002)- Mise en évidence des opportunités de développement de la riziculture adoption du Sri, et évaluation de la fixation biologique de l'azote. Université d'Antananarivo.

**Angulo, J.F.** (2004)- Le Soleil, indispensable mais dangereux ami. CLEFS CEA - N°49.

**Baumberger, IC. ; N. Fraefel ; M. Göttfert ; H. Hennecke** (2002)- New NodW- or NifA-Regulated *Bradyrhizobium japonicum* Genes. The American Phytopathological Society. MPMI Vol. 16, No. 4, 2003, pp. 342–351.

**Beck, D.P; L.A. Materon; F. Afondi.** (1993) - Practical hizobium-Legume Technology Manuala Technical Manual N°19. ICARDA Box 5466, Aleppo, Syria.

**Benguedouar, A.** (2000)- Etude de la symbiose *Rhizobium- Hedysarum coronarium*: essai de caractérisation de l'espèce *Rhizobium "hedysari"*. Thèse de doctorat de l'université de constantine. Algérie.

**Ben Khaled, L; A.M. Gomez; M. Honrubia; A. Oihabi,** (2003)- Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. INRA, EDP Sciences, 2003 DOI: 10.1051/agro:2003030.

**Beringer J. E.** (1974) - R-Factor transfer in rhizobium legume. J. Gen. Microbiol., 84: 188-198.

- Borel, C. C. Goupillon ; T. Pilorge** (1999)- Les effets des rayonnements sur la cellule vivante. CEA, Institut Curie, CNRS.
- Boucher, I.** (2002)- Les modifications génétiques chez les microorganismes. Québec.
- Caetano-Anolles,G ; A. Lagares ; W.D. Bauer** (1990)- Rhizobium meliloti exopolysaccharide Mutants Elicit Feedback Regulation of Nodule Formation in Alfalfa. Plant Physiol. (1990) 91, 368-374 0032-0889/90/91/0368/07/\$01 .00/0.
- Casella, S; R.R. Gault; K.C. Reynolds; J.R. Dyson; J. Brockwell.** (1984) Nodulation studies on legumes exotic to Australia: *Hedysarum coronarium*. FEMS. Microbial.
- Chuang-Yien Lee, J.** (2000) - Expression Studies on the exoYPromoter Region in Rhizobium meliloti. BUG journal *vol. 3*.
- Clare, A; R.D. King** (2001) - Machine learning of functional class from phenotype data.University of Wales Aberystwyth, SY23 3DB, UK.
- Corbière. H.L.F** (2002) -The importance of sucrose synthase for AM symbiosis in maize, in pea and in Medicago . Thèse de doctorat
- Coyne, V.E; M.J. Diane; S.J. Reid; E.P. Rybicki** (2002). Molecular Biology Techniques Manual: SDS POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE). University of Cape Town. Dept Microbiology.
- Dazzo, F.B.** (1984) -Leguminous root nodules. In: Experimental Microbial Ecology. Editors by R. Burns and J. Staler, Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Debellé.F, L. Moulin; B. Mangin; J. Dénarié; C. Boivin** (2001)- nod Genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. Acta Biochimica Polonica. Minireview. Vol. 48 No. 2/2001 359–365.
- Deléglise, A.** (2001)- Vers une diminution de l'utilisation d'engrais azoté?. ouébec science.

**Dénarié, J.** (2004)- Des symbioses d'une grande importance écologique et agronomique. La lettre n° 11 / printemps 2004 de l'Académie des sciences.

**Dénarié, J., F. Debellé, C. Rosenberg** (2004)- Identification de deux gènes de légumineuse contrôlant des symbioses d'intérêt agronomique INRA, CNRS.

**Djordjevic, M.A.** (2004)- *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: a proteomic perspective. *Proteomics*. **4**:1859-1872. Revue

**Dreyfus, B.** (1997)- *Sesbania rostrata* et *Medicago arborea* : des légumineuses fixatrices d'azote. IRD.

**Dupont, J.Y.** (2001)- Mutation, mutagenèse et réparation de l'ADN. A partir d'un article de Beth A. Montelone , Division of Biology, Kansas State University.

**Fähreus, A.** (1957). - The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**: 354-381.

**Fenton, M** (1994) - The expression in soil bacteria of symbiotic genes from *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. Dept of Microbiology and Genetics, Massey University, Palmerston North, New Zealand

**Finnie C, NM. Hartley; K.C. Findlay; Downie JA.** (1997) - The *Rhizobium leguminosarum* prsDE genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification *Mol Microbiol.* 1997 Jul; **25**(1):135-46.

**Frame, D.** (2000) - *Hedysarum coronarium* L, Leguminosae F.A.O

**Fulchieri, M.M ; M.J. Estrella; A.A. Iglesias** (1997)- Characterization of *Rhizobium loti* strains native from the Salado River Basin. Studies on symbiotic potential. Institut de tecnologia de Chascomús. Argentine.

**Gage, D. et W. Margolin** (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology*, **3**(6): 613-7.

**Gage, D. J.** (2004) - Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes" *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**(2): 280-300.

- Gallego, M.** (2006) - Les  $\alpha$ -Protéobactéries : mécanismes communs d'interaction avec la cellule hôte. Master Recherche, Université PAUL SABATIER. Toulouse III.
- Galzy, P.** (1993)- Le génie génétique : obtention et sélection des mutants. In Biotechnologie par René Scriban. 4<sup>ème</sup> édition. technique et documentation, Lavoisier. p : 451-456.
- Granier, F et Bouchez, D.** (2001)- Les collections de mutants. Ecole thématique Biologie végétale. INRA.
- Gloux, K et le Rudulier, D.** (1989) - Transport and catabolism of praline betaine in salt stressed *Rhizobium meliloti*. Arch. Microbial. 151:143-148.
- Gremion, F.** (2003)- Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods. Thèse de doctorat. Lausanne, EPFL.
- Grosjean, C et T. Huguet.** (1997)- Apersistent meristem is formed in nodular structure elicited by Nod facteur or by a *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutant in alfalfa plants which nodulate spontaneously Plant Science 127 (1997) 215-225.
- Griffiths, A. J. F. ; W. M. Gelbart; J. H. Miller; R. C. Lewontin.** (2001)- Analyse génétique moderne. Edition : De Boeck université. p : 197-228.
- Guiraud, J. P.** (1993)- Génétique microbienne : Bases théoriques et introduction aux applications pratiques. Techniques et documentation – Lavoisier. p : 89-111
- Guiraud, J.P.** (1998). Microbiologie alimentaire. DUNOD Edition, Paris, 2<sup>ème</sup> Edition.
- Hannachi-Salhi, A., D. Combes ; H. Baatout ; J. Figier ; M. Boussaid ; M. Marrakchi ; N. Trifi-Farah** (2004) - Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI – FAO, Issue No.130, page 65 to 72.
- Heyde, M** (2004)- Isolement et caractérisation des mutants. Liste de protocoles de travaux pratique. Université Lyon 1.



**Hofer A. V.** (1941) – A characterization of *Bacterium radiobacter* (Beijerinck and Van Delden). J. Bacteriol. 41(2): 193-224.

**Hopkins, W.G.** (2003) - Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck. p 99 - 120

**Hotter, G.S ; Scott, D.P.** (1990) - Exopolysaccharide Mutants of *Rhizobium loti* Are Fully Effective on a Determinate Nodulating Host but Are Ineffective on an Indeterminate Nodulating Host. American Society for Microbiology. Journal of bacteriology. p. 851-859.

**Jana,S.C.; P.K. Chakrabartty; A.K. Mshra** (1992)- Taxonomic relationship of some members of enterobacteriaceae based on their protein profiles. J basic microbial. 32:29-33

**Jordon, D.C.** (1984) – Fammilly III. Rhizobiaceae. 1938. p. 234-254. In: N.R. Kreig and JH Holt (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. The Williams & Wliams Co. Baltimore.

**Kaufusi, P.H ; L.S. Forsberg; P. Tittabutr** (2004) - Regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, rpoH2 Microbiology 150, 3473–3482.DOI 10.1099/mic.0.27092-0.

**Kereszt, A ; E. Kiss ; B.L. Reuhs; R.W. Carlson; A. Kondorost; P. Putnoky** (1998)- Novel *rkp* Gene Clusters of *Sinorhizobium meliloti* Involved in Capsular Polysaccharide Production and Invasion of the Symbiotic Nodule: the *rkpK* Gene Encodes a UDP-Glucose Dehydrogenase. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 0021-9193/98/\$04.0010 Oct. 1998, p. 5426–5431. American Society for Microbiology.

**Krasova-Wade.T, I. Ndoye; S. Braconnier; B. Sarr; P. de Lajudie; M. Neyra** – (2003) Diversity of indigeneous baradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa) .African Journal of Biotechnology Vol. 2 (1), pp.

**Lannoy, D.** (1999). Éléments de Botanique. 123 bio.net.

**Laranjo, M, C. Branco; R. Soares; L. Alho; M.D.E. Carvalho; S. Oliveira** (2002) - Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based

on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. Journal of Applied Microbiology. Volume 92 Issue 6 Page 1043

**Leammli, U.K.** (1970) - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

**Leclerc, H.; J.L. Gaillard; M. Simonet** (1995)- Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien. DOIN EDITEURS.p 412-415

**Leigh, J.A ; Lee, C.C.** (1988)- Characterization of Polysaccharides of *Rhizobium meliloti* exo Mutants That Form Ineffective Nodules. Journal of Bacteriology P. 3327-3332. American Society for Microbiology.

**Lindström K, Z. Terefework; L. Suominen; G. Lortet** (2002)- Signalling and development of *Rhizobium-legume* symbiosis. biology and environment: Royal Irish Academy vol. 102B, NO. 1, 61–64

**Luciński, R. ; W. Polcyn; L. Ratajczak** (2002)- Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* — legumes. Acta Biochimica Polonica. Vol. 49 No. 2/2002.

**Lucinda S. S et R. L. Sharon** (1998)- Requirements for *syrM* and *nodD* Genes in the Nodulation of *Medicago truncatula* by *Rhizobium meliloti* 1021 MPMI Vol. 11, No. 9, 1998, pp. 937–940.

**Maatallah, J, EB. Berraho ; J. Sanjuan; C. Lluch** (2001)- Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. INRA, EDP Sciences, 2002. Agronomie 22 (2002) 321–329.

**Marghali, S ; N. Trifi-Farah; S. Ghariani; M. Marrakchi** (2002)- Etude du polymorphisme moléculaire par AFLP d'accessions d' *H. coronarium* en Tunisie. Grassland Science in Europe volume 7.

**Mateos,P.F, J.I. Jiménez-Zurdo ; J. Chen; A.S. Squartini; S.K. Haack; E.M. Molina; D.H. Hubbell ; F.B. Dazzo**, (1992)- Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. Appl Environ Microbiol. 58(6): 1816–1822.

**Mateos,P.F ; D.L. Baker; M. Petersen; E. Velázquez; J.I. Jiménez-Zurdo; E.M. Molina; A. Squartini; G. Orgambide; D.H. Hubbell; F.B. Dazzo** (2001)- Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Can. J. Microbiol./Rev. can. microbiol.* 47(6): 475-487.

**Mobley, L.T.H.** (1992)- Urease microbial. p. 327-346 In J. Lederbrgs (ed). *Encyclopaedia of microbiology*. Vol 4. Academic Press. Inc

**Molina,E.M; V.M. Morales; D.H. Hubbell;** (1979)- Hydrolytic Enzyme Production by *Rhizobium* . *Applied and environmental microbiology*. 0099-2240/79/12-1 186/03\$02.00/0.

**Mónica M. Fulchieri; M.J. Estrella ; A.A. Iglesias** (1998)- Characterization of *Rhizobium loti* strains native from the Salado River Basin. *Studies on symbiotic potential*. INTECH-CONICET

**Nasir, D.A.M et Wolfgang, D.B.** (1988) - When Does the Self-Regulatory Response Elicited in Soybean Root after Inoculation Occur? . *Plant Physiol.* 1988 November; 88(3): 537–539.

**Ndiaye, A.A ; S.N. Sylla; M. Gueye ; P. Delajudie; I. Ndoye** (2002) - Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrilamide-SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des rhizobiums d'*Acacia tortilis* (forsk). Hayne subsp. *Raddiana* (savi) brenan. *African journal of Science and technology*. 61. 1. pp. 33-43.

**Nicklin, J; K. Graeme-Cook ; T. Paget; R. Killington.** (2000)- L'essentiel en microbiologie. Port Royal livers. BERTI Editions. p: 113-121.

**Palinska, K.A ; T. Jahns; R Rippka; NT. de Marsac** (2000) - *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511, a picoplanktonic cyanobacterium, synthesizes the smallest urease. *Microbiology* (2000), 146, 3099–3107

**Patrícia P. Pinto, R. Raposeiras; A.M. Macedo; L. Seldin; E. Paiv; Nad M.H.Sá** (1998) - Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains. *Revista de Microbiologie*. Print ISSN 0001-3714

- Pelmont, J.** (1995)- Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Vol 2. p. 541-572. Office des Publications Universitaires.
- Pellock, B.J, M. Teplitski; R.P. Boinay; W.D. Dietz Bauer; G.C. Walker,** (2002)- *A LuxR Homolog Controls Production of Symbiotically Active Extracellular Polysaccharide II by Sinorhizobium melilot.* *Journal of Bacteriology.* p. 5067-5076, Vol. 184, No. 18.
- Pingret, J. L., E.P. Journet; D.G. Barker** (1998) - Rhizobium Nod Factor Signaling: Evidence for a G Protein–Mediated Transduction Mechanism. *Plant Cell*, Vol. 10, 659-672.
- Primrose, S. ; R. Twyman; R. Old.** (2004)- Principe de génie génétique. De Boeck et Larcier. p : 120-138.
- Quezel, P et S. Santa** (1962)- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. p. 462-541. CNRS
- Rao, D.L.N ; K.F. Giller; A.R. Yeo; T.J. Flower** (2002)- The affects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Annals of Botany.* 89. pp. 563-570.
- Raposeiras, R; P. P. Patrícia; V.M. P Raul; S. Lucy ; E. Paiva ; M. R. Scotti; N. M.H. Sá** (2002) – Variability of isolated colonies in bean nodulating Rhizobium strains before and after exposure to high temperature. *Brazilian Journal of Microbiology.* Print ISSN 1517-8382
- Raza,S ; B. Jørnsgård; H. Abou-Taleb; JL. Christiansen** (2001) - Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Letters in Applied Microbiology.*
- Rasanen, L.** (2002)- Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis* thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlan
- Roberts, M.F.** (2005)- Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 2005, 1:5 doi:10.1186/1746-1448-1-5.
- Saadallah, K; J.J. Drevon ; C. Abdelly** (2001)- Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie* 21 (2001) 627–634 627. INRA, EDP Sciences, 2001.

**Sharma.P.K, B.S. Kundu; R.C. Dogra** (1993)- Molecular mechanism of host specificity in legume-Rhizobium symbiosis. *Biotech. Adv.* Vol. 11, pp. 741-779

**Simms.E.L et D.L.Taylor** (2002) - Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia1. *INTEG. Et COMP. BIOL.*, 42:369–380

**Somasegaran. P et Hoben. H.J** (1994)- Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc p.450

**Spaik, H.P.** (2000) - Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annus. Rev. Microbiol.* 54.pp.257-88

**Squartini, A ; P. Struffi; H. Doring; S.S .Pobell; E. Tola ; A. Giacomini; E. Vendramin; E. Velazquez; P.F. Mateos; E.M. Molina; F.B. Dazzo; S. Casella; M.P. Nuti** (2002)- *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 52, 1267–1276

**Stephens, B.R et Neyra, C.A.** (1982) - Nitrate and Nitrite Reduction in Relation to Nitrogenase Activity in Soybean Nodules and *Rhizobium japonicum* Bacteroids. *Plant Physiol.* (1983) 71, 731-735.

**Struffi, P., V. Corich; A. Giacomini; A. Benguedouar; A. Squartini; S. Casella; and M. P. Nuti** (1998). Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1): 81–89.

**Terefework, Z** (2002) - Diversity and Phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium-legume symbiosis. *ACADEMIC DISSERTATION IN MICROBIOLOGY.* University of Helsinki. ISSN 1239-9469

**Terril, T.H., G.B. Douglas; A.G. Foote.** (1992)- Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing Sulla and perennial pasture. *J. Agriscience Cambridge.*, 119:265-276.

**Tian, J ; A. He; A. Lawrence; P. Liu; N. Watson; A.J. Sinskey; J. Stubbe** (2005)- Analysis of Transient Polyhydroxybutyrate Production in *Wautersia eutropha* H16 by Quantitative Western

Analysis and Transmission Electron Microscopy. Journal of bacteriology, June 2005, p. 3825–3832. American Society for Microbiology

**Tortora. G..J; B.R. Funk; C.L. Case.** (2003) - Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Nb de page 945.

**Vincent, J.M.** (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

**Vincent. B. B,** (2002)- Revue de littérature : cycle de l'azote Mémoires et thèses de l'université Laval.

**Weir, B.** (2005). The current taxonomy of rhizobia: [Updated 17th June 2005] ". New Zealand Rhizobia .

**Werquin, M ; H.W. Ackermann; R.C. Levesque** (1988) - A Study of 33 Bacteriophages of *Rhizobium meliloti*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. American Society for Microbiology

**Werner, D.** (1992) - Symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. Acad Sin: 39

**Winter, P. C; G. I. Hickey; H. L. Fletcher** (2000)- L'essentiel en génétique. Port Royal livres. BERTI Editions. p : 101-115.

**Yann Peter.** (2006) - Apport de la génomique dans la compréhension de la symbiose *Rhizobium/légumineuses*. Master Recherche, Université PAUL SABATIER. Toulouse III.

**ZAKHIA Frédéric et Philippe de LAJUDIE** (2001) - Taxonomy of rhizobia *Agronomie* 21 569–576

**Zhang,X, S.L. Turner; X. Wu Guo; H.J. Yang; F. Debellé; G.P. Yang; J. Dénarié; J.P.W. Young; F. Di Li** (2000) -*The Common Nodulation Genes of Astragalus sinicus Rhizobia Are Conserved despite Chromosomal Diversity Applied and Environmental Microbiology. p. 2988-2995, Vol. 66, No. 7*

## ANNEXE 1

### Les milieux de culture

#### Milieu: Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol	10.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extrait de levure	0.5 g
L'eau distillé	1.0 litre

pH 6.8

Autoclave 120°C pendant 20 minutes.

#### Milieu: Yest – Mannitol Agar (YMA)

YMB	1.0 litre
Agar	15 g

Préparation :

Préparer le YMB

Ajouter l'agar, autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

#### Solution nutritive des plantes : (Fåhraeus, 1957)

CaCl <sub>2</sub>	0.100 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.120 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.100 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.150 g
Citrate ferrique	0.005 g
*Solution stock des oligoéléments	1.0 ml

\* Solution stock des oligoéléments : (g/l)

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86 g
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	2.03 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.22 g
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.08 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.14 g

**Milieu: Tryptone-Yeast (TY)** (Beringer, 1974)

Tryptone	5.0 g
Extrait de levure	3.0 g
CaCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	0.87 g
L'eau distillé	1000 ml

pH 6.8 -7.2

Autoclave 120°C pendant 20 minutes

Pour le milieu TY agar, ajouter 12 g d'agar avant autoclavage.

**Milieu défini 8** (Vincent, 1970)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
MgSO <sub>4</sub>	0,21g
CaCl <sub>2</sub>	0,21g
Glutamate de sodium	1 g
Mannitol	1 g
*Solution stock des vitamines	1 ml
**Solution stock des oligoéléments	1 ml
Agar	16 g
* Solution stock des vitamines : (µg/l)	
Acide nicotinique	100
Thiamine	100
Panthotenate Ca	100

Dissoudre dans un tampon de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 M pH 7.

\*\*Solution stock des oligoéléments (mg/l)

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	50
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	35
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	8
MoSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	40
ZnSO <sub>4</sub> 7 <sub>2</sub> O	16

pH 6,9

**Milieu minimum BIII** (Dazzo, 1984) (g/l)



K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.23
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.10
Glutamate de Na	1.10
Solution - stock de vitamine*	1 ml
Solution – stock d’oligoéléments**	1 ml

\*Solution – stock de vitamines (mg/l de tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,005 M, pH 7,0)

Riboflavine	20
Acide p-aminobenaoique	20
Acide nicotinique	20
Biotine	20
Thiamine-HCl	20
Pyridoxine-HCl	20
Panthotenate de Ca	20
Inositol	120

\*\*Solution – stock d’oligoélément (g/l)

CaCl <sub>2</sub>	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.145
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.125
CoSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.070
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.005
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0.0043
ZnSO <sub>2</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.108
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.125
Nitryl triacétate	1.000

Ce dernier n’est ajouté qu’après avoir ajusté le pH à 5.0, évitant ainsi une précipitation.

NB : le stock- vitamine est stérilisé par filtration (0.22µm) et le stock oligoélément par autoclavage.

### Milieu de Gloux et le Rudulier (1989)

- Solution A : g/l

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
NaHPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.05
Eau distillée	1000 ml

- Solution B : mg/l

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
ZnSO <sub>4</sub>	1
CuSO <sub>4</sub>	1
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.5
Eau distillée	1000 ml

- En plus :

Biotine	2 g
Acide aspartique	100 mg
Acide lactique	0.74 g
Agar	10 g
Eau distillée	1000 ml

Prendre 100 ml de la solution A.

Mélanger avec 20 ml de la solution B

Ajouter l'acide lactique et l'acide aspartique, compléter le volume à 1000 ml et ajuster le pH à 7.

Ajouter l'agar, autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

La biotine est stérilisée par filtration est additionnée au milieu.

### Milieu MNA (phage) (Vincent ; 1970)

#### Solution A

Mannitol	10g
	0,45g
	0,06g
	0,60g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

souches	<b>G4</b>	<b>G19</b>	<b>GA6</b>	<b>GF</b>	<b>GH</b>	<b>GI</b>	<b>GT</b>	<b>GV</b>
---------	-----------	------------	------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

$\text{KNO}_3$

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Thiamine HCl

Biotine

Agar

L'eau distillé

### **Solution B**

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1g

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1g

L'eau distillé 100ml

Les deux solutions sont stérilisées séparément et 0,5 ml de la solution B est additionnée dans la boîte de pétri avant d'ajouter 5 ml de la solution A additionné d'agar.

### **Réactifs de la nitrate réductase**

Réactif 1: L'acide sulfanilique

Réactif 2 : L'anaphilamine

## **ANNAXE 2**

**Tableau 14 : Temps d'irradiation et pourcentage de survie des souches étudiées**

Temps (mn)	%	%	%	%	%	%	%	%
00:00,0	100	100	100	100	100	100	100	100
00:10,0	96.71	42.25	66.66	44.44	17,02	45,45	24	36,66
00:15,0	92.10	23.94	40	30.37	12,76	15,15	20	30
00:20,0	49.34	14.08	22.22	24.44	6,38	10,60	14	26,6
00:25,0	44.07	5.63	17.77	22.22	6,38	7,57	10	23,33
00:30,0	41.44	5.63	15.55	17.77	4,25	6,06	8	20
00:35,0	39.47	4.22	13.33	14.81	0	1,51	8	20
00:40,0	36.84	2.81	11.11	12.59	0	0	6	16,66
00:45,0	29.60	2.81	8.88	8.88	0	0	4	13,33
00:50,0	15.78	1.40	6.66	8.14	0	0	2	10
01:00,0	13.81	1.40	4.44	8.14	0	0	2	6,66
01:10,0	8.55	0	0	6.66	0	0	0	0
01:15,0	6,57			4,44				
01:25,0	2,63			2,22				
01:40,0	0			0				

**Tableau 15 : Doses sub-létale (Pourcentage de survivant égale 1%)**

Souche	G4	G19	G A6	GF	GH	GI	GT	GV
Temps (mn)	01:32,5	01:01,5	01:07,5	01:30,0	00:33,5	00:37,5	01:03,5	01:08,0

**Courbes de survie**

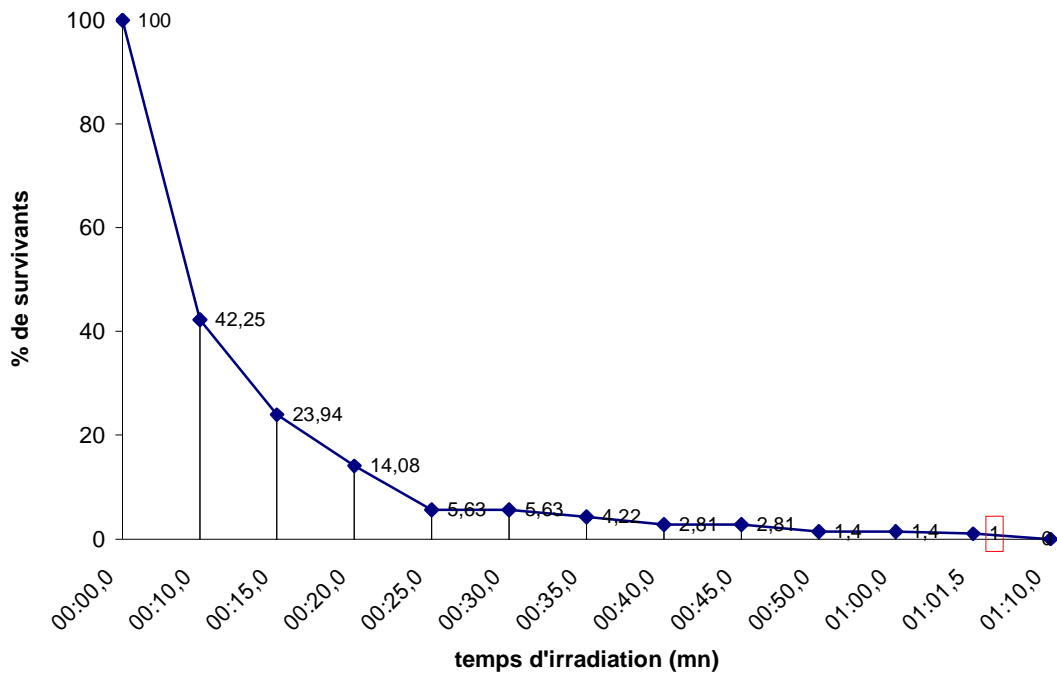


Figure 14 : Courbe de survie de la souche G19

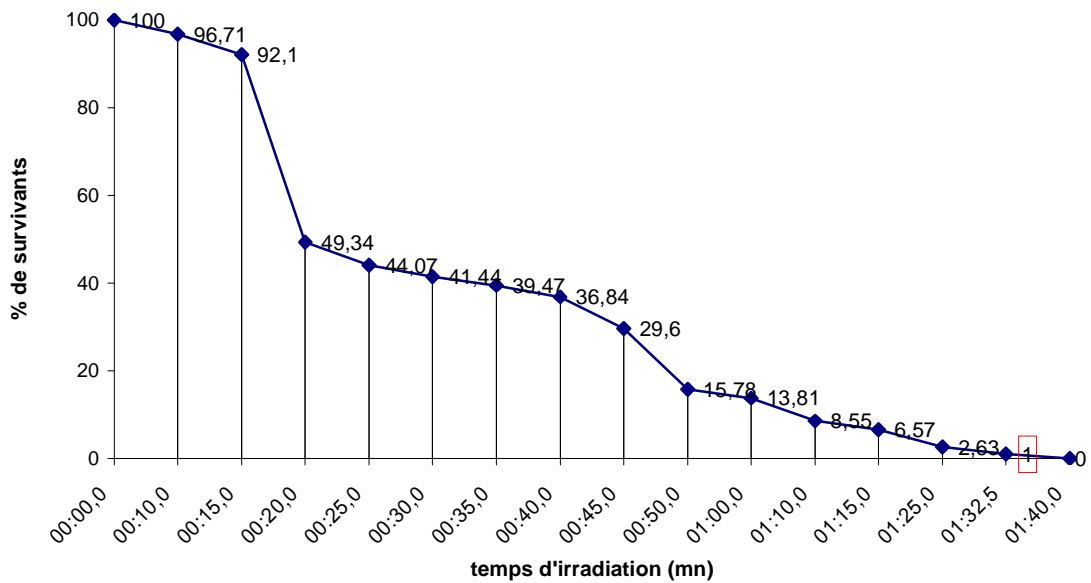
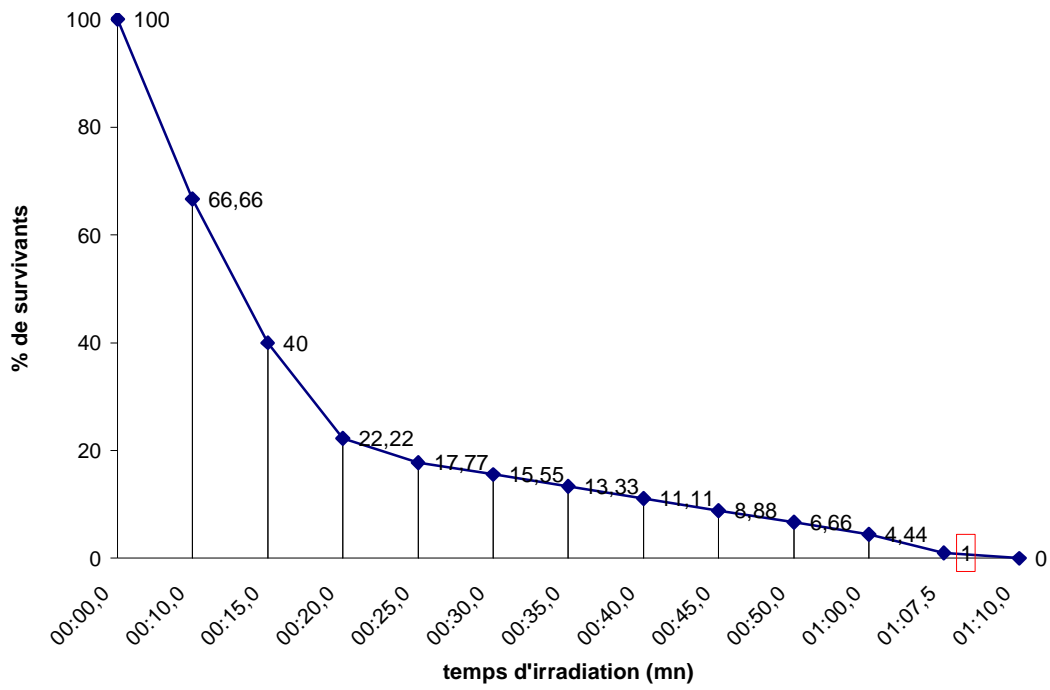
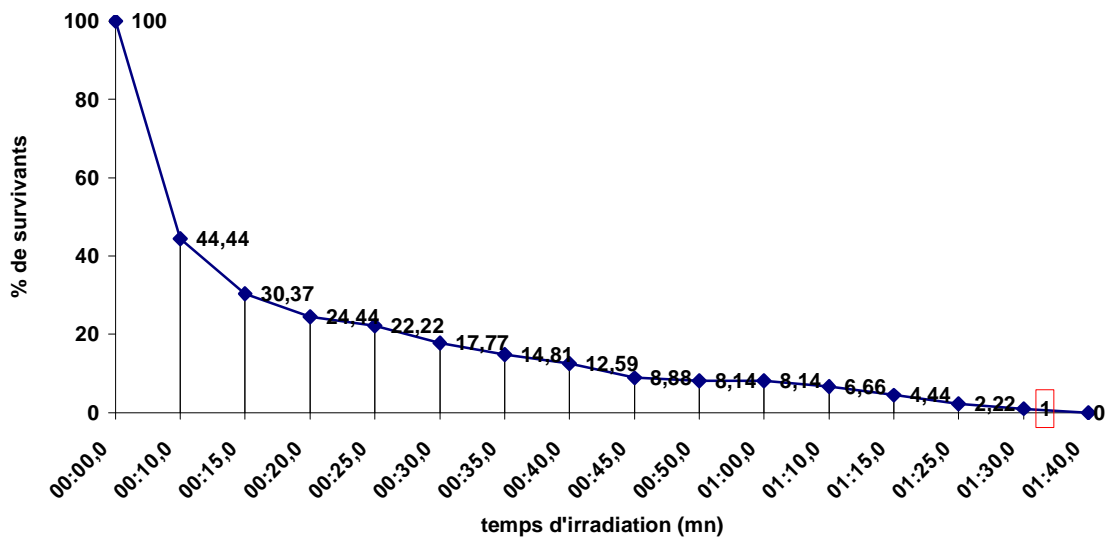


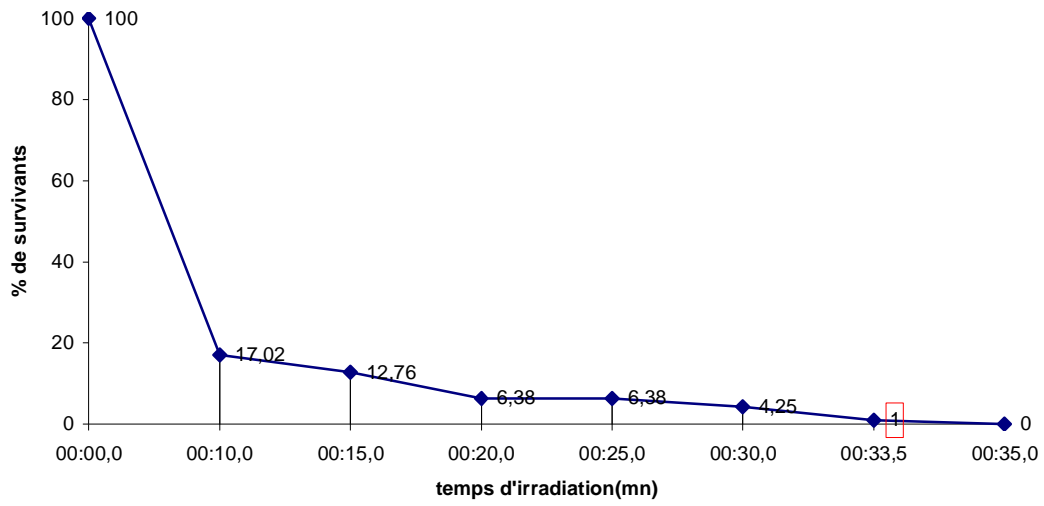
Figure15 : Courbe de survie de la souche G4



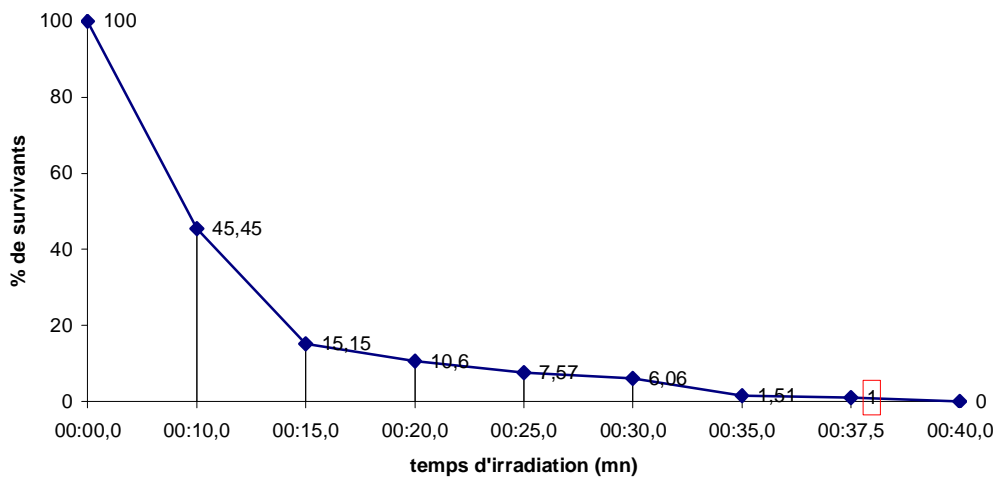
**Figure16:** Courbe de survie de la souche GA6



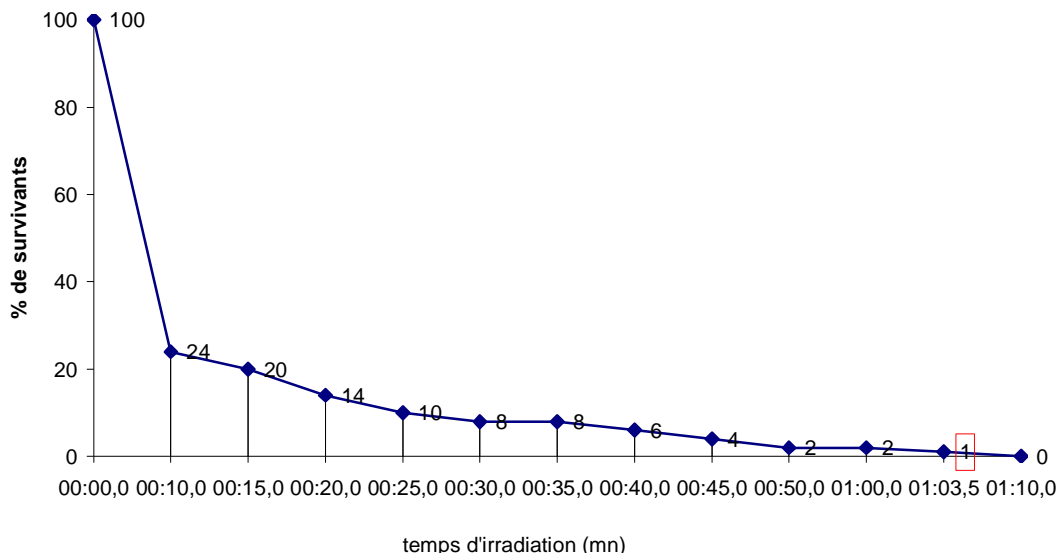
**Figure 17:** Courbe de survie de la souche GF



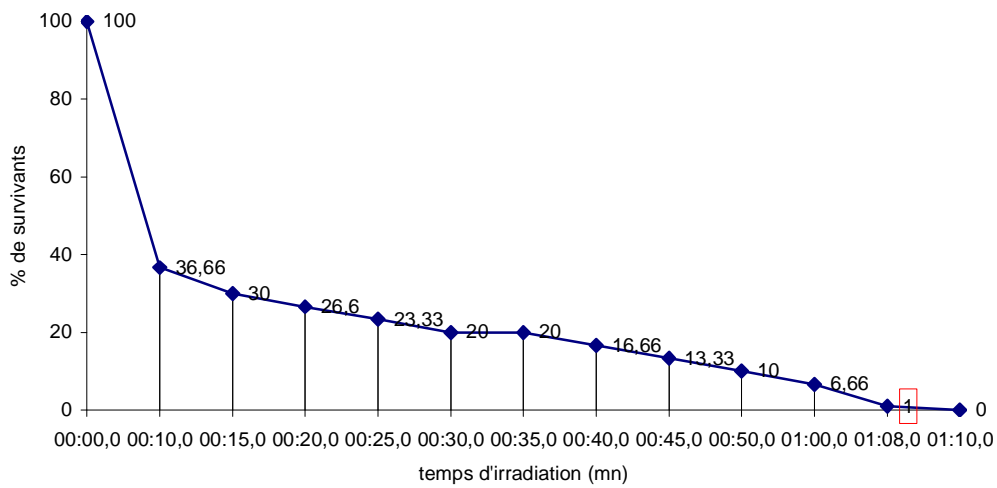
**Figure 18:** Courbe de survie de la souche GH



**Figure 19 :** Courbe de survie de la souche GI



**Figure 20:** Courbe de survie de la souche GT



**Figure 21:** Courbe de survie de la souche GV

**Annexe 3 : Les valeurs de la Densité Optique (DO)**

- **Source de carbone (Sucres)**

**Tableau 16 :** Utilisation des sucres chez les **sauvages**



	G 4	G 19	G A6	GF	G H	GI	GT	GV
Mannitol	0,684	0,552	0,845	0,748	0,790	0,676	0,825	0,760
D-arabinose	0,144	0,139	0,280	0,231	0,223	0,211	0,190	0,251
Citrate de sodium	0,534	0,626	1,120	0,820	0,386	0,778	0,520	0,885
D-fructose	0,300	0,306	1,005	0,225	0,239	0,350	0,586	0,376
D-galactose	0,354	0,358	0,480	0,305	0,331	0,292	0,544	0,460
Lactose	0,235	0,232	0,273	0,276	0,237	0,278	0,287	0,250
Maltose	0,298	0,422	0,734	0,402	0,284	,0336	0,406	0,410
Raffinose	0,347	0,210	0,348	0,227	0,262	0,219	0,323	0,257
Saccharose	0,281	0,205	0,371	0,305	0,273	0,251	0,382	0,296
D-glucose	0,376	0,448	0,496	0,454	0,466	0,325	0,386	0,468
Sorbitol	0,604	0,680	0,540x2	0,586	0,730	0,796	0,600	0,740
D-xylose	0,045	0,010	0,078	0,075	0,015	0,052	0,063	0,049

**Tableau 17 : Utilisation des sucres chez les mutants**

	4s	19s	A6s	A6m	F1s	F2s	H1s	H2	Is	Tr	Tr1	Tr2	Tr3	Ts	Vs	Vm
D-xylose	0,262	0,278	0,330	0,314	0,281	0,307	0,382	0,319	0,280	0,417	0,341	0,376	0,392	0,306	0,274	0,291
D-arabinose	0,290	0,287	0,229	0,232	0,286	0,294	0,070	0,337	0,286	0,231	0,290	0,384	0,333	0,261	0,314	0,304
Saccharose	0,372	0,328	0,362	0,325	0,408	0,402	0,380	0,319	0,300	0,366	0,417	0,415	0,397	0,347	0,381	0,364
D-fructose	0,323	0,247	0,324	0,319	0,313	0,321	0,375	0,281	0,335	0,295	0,355	0,325	0,372	0,306	0,354	0,280
D-galactose	0,317	0,316	0,344	0,377	0,324	0,310	0,344	0,343	0,390	0,318	0,343	0,361	0,331	0,404	0,358	0,402
Sorbitol	0,387	0,325	0,336	0,385	0,350	0,379	0,355	0,304	0,410	0,257	0,402	0,427	0,397	0,375	0,431	0,450
Citrate de Na	0,331	0,270	0,305	0,283	0,394	0,282	0,398	0,291	0,264	0,409	,0322	0,342	0,319	0,342	0,312	0,321
Raffinose	0,322	0,314	0,317	0,332	0,372	0,369	0,317	0,314	0,333	0,322	0,414	0,353	0,418	0,333	0,356	0,360
Lactose	0,299	0,293	0,312	0,264	0,322	0,306	0,297	0,275	0,303	0,269	0,335	0,370	0,331	0,310	0,317	0,296
Maltose	0,343	0,330	0,426	0,446	0,413	0,370	0,358	0,369	0,336	0,359	0,393	0,382	0,411	0,333	0,372	0,355
D-glucose	0,375	0,301	0,346	0,338	0,343	0,355	0,338	0,314	0,309	0,316	0,294	0,372	0,357	0,340	0,363	0,367
Mannitol	0,646	0,720	0,784	0,801	0,740	0,764	0,750	0,813	0,861	0,870	0,755	0,730	0,672	0,632	0,590	0,591

**Source d'azote (Acides Aminés)**

**Tableau 18 : Utilisation acides aminés chez les sauvages**

	G4	G19	GA6	GF	GH	GI	GT	GV
glutamate de sodium	0,362	0,356	0,179	0,332	0,320	0,340	0,539	0,296
Valine	0,039	0,133	0,024	0,144	0,072	0,066	0,200	0,158
Tyrosine	0,005	0,101	0,079	0,266	0,061	0,016	0,047	0,190
Leucine	0,187	0,144	0,223	0,245	0,276	0,018	0,037	0,014
Proline	0,177	0,337	0,061	0,145	0,277	0,086	0,317	0,296
Thréonine	0,011	0,055	0,067	0,079	0,126	0,055	0,124	0,185
Isoleucine	0,006	0,032	0,021	0,136	0,010	0,162	0,254	0,133
Phénylalanine	0,030	0,064	0,025	0,089	0,061	0,068	0,201	0,078
Tryptophane	0,037	0,198	0,070	0,018	0,077	0,063	0,309	0,091
Lysine	0,066	0,115	0,054	0,047	0,044	0,030	0,074	0,029
Glycine	0,056	0,166	0,018	0,167	0,134	0,080	0,075	0,043
Sérine	0,292	0,227	0,346	0,164	0,177	0,180	0,111	0,154
Histidine	0,077	0,121	0,020	0,291	0,150	0,070	0,158	0,119
Arginine	0,099	0,121	0,156	0,156	0,062	0,120	0,103	0,061
Méthionine	0,002	0,010	0,004	0,005	0,012	0,008	0,006	0,007
Alanine	0,095	0,128	0,141	0,084	0,116	0,212	0,139	0,101
Asparagine	0,229	0,261	0,285	0,250	0,161	0,179	0,232	0,140
Cystéine	0,051	0,078	0,103	0,063	0,080	0,070	0,097	0,005

**Tableau 19 : Utilisation acides aminés chez les mutants**

	4s	19s	A6s	A6m	F1s	F2s	H1s	H2	Is	Tr	Tr1	Tr2	Tr3	Ts	Vs	Vm
glutamate de sodium	0,306	0,157	0,005	0,144	0,155	0,003	0,080	0,040	0,057	0,148	0,340	0,212	0,279	0,201	0,086	0,168
Valine	0,224	0,108	0,042	0,161	0,070	0,004	0,095	0,003	0,062	0,0001	0,112	0,229	0,164	0,062	0,057	0,097
Tyrosine	0,072	0,121	0,046	0,087	0,053	0,014	0,033	0,102	0,038	0,061	0,210	0,075	0,029	0,090	0,035	0,131
Leucine	0,256	0,227	0,053	0,125	0,213	0,119	0,029	0,190	0,268	0,024	0,208	0,249	0,297	0,253	0,218	0,256
Proline	0,122	0,278	0,150	0,001	0,150	0,068	0,073	0,003	0,082	0,005	0,200	0,217	0,214	0,000	0,172	0,108
Thréonine	0,128	0,010	0,031	0,120	0,070	0,064	0,056	0,031	0,083	0,027	0,126	0,172	0,153	0,211	0,095	0,120
Isoleucine	0,115	0,261	0,139	0,201	0,202	0,200	0,232	0,170	0,266	0,131	0,184	0,193	0,209	0,140	0,224	0,006
Phénylalanine	0,009	0,058	0,050	0,090	0,016	0,047	0,113	0,047	0,042	0,057	0,069	0,050	0,080	0,012	0,051	0,028
Tryptophane	0,124	0,047	0,015	0,044	0,079	0,006	0,114	0,117	0,035	0,055	0,003	0,021	0,018	0,133	0,087	0,001
Lysine	0,129	0,063	0,004	0,003	0,077	0,052	0,004	0,001	0,088	0,015	0,084	0,054	0,003	0,061	0,056	0,001
Glycine	0,002	0,009	0,001	0,002	0,003	0,010	0,018	0,013	0,001	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000
Sérine	0,001	0,002	0,010	0,005	0,009	0,001	0,000	0,008	0,000	0,212	0,036	0,090	0,113	0,002	0,004	0,058
Histidine	0,001	0,002	0,004	0,000	0,003	0,037	0,002	0,003	0,001	0,001	0,004	0,002	0,003	0,001	0,002	0,003
Arginine	0,002	0,052	0,010	0,004	0,001	0,041	0,003	0,001	0,001	0,062	0,054	0,081	0,111	0,002	0,004	0,132
Méthionine	0,001	0,004	0,003	0,002	0,102	0,057	0,001	0,008	0,005	0,007	0,002	0,102	0,001	0,009	0,056	0,003
Alanine	0,199	0,006	0,001	0,002	0,001	0,004	0,005	0,002	0,001	0,002	0,005	0,002	0,009	0,001	0,002	0,001
Asparagine	0,217	0,158	0,266	0,195	0,002	0,008	0,001	0,001	0,005	0,073	0,241	0,004	0,066	0,008	0,182	0,152
Cystéine	0,073	0,001	0,004	0,065	0,029	0,003	0,031	0,069	0,226	0,024	0,002	0,004	0,212	0,099	0,005	0,003

### Besoin en vitamines

**Tableau 20 : Besoin en vitamines des souches sauvages**

	G 4	G 19	G A 6	G F	G H	G I	G T	G V
Milieu complet	0,681	0,134	0,162	0,038	0,140	0,165	0,136	0,117

MM+ Riboflavine	0,081	0,135	0,126	0,096	0,212	0,087	0,115	0,120
MM+ Acide p-aminobenzoïque	0,120	0,155	0,162	0,074	0,140	0,280	0,130	0,169
MM+ Acide Nicotinique	0,089	0,145	0,055	0,071	0,233	0,090	0,184	0,156
MM+ Biotine	0,363	0,229	0,124	0,143	0,430	0,328	0,394	0,256
MM+ Thiamine-HCl	0,169	0,091	0,132	0,023	0,164	0,184	0,272	0,275
MM+Pyridoxine-HCl	0,210	0,048	0,050	0,037	0,337	0,261	0,266	0,202
MM+Panthotenate de Ca	0,051	0,086	0,106	0,035	0,337	0,221	0,151	0,130

**Tableau 21** : Besoin en vitamines des souches **mutantes**

	Milieu complet	MM+ Riboflavine	MM+ Acide p-aminobenzoïque	MM+ Acide Nicotinique	MM+ Biotine	MM+ Thiamine-HCl	MM+Pyridoxine- HCl	MM+ Panthotenate de Ca
4s	0,069	0,100	0,053	0,078	0,004	0,110	0,042	0,105
19s	0,107	0,005	0,003	0,071	0,051	0,068	0,072	0,187
A6s	0,071	0,050	0,038	0,102	0,058	0,081	0,058	0,073
A6m	0,101	0,127	0,123	0,125	0,003	0,158	0,127	0,046
F1s	0,078	0,050	0,108	0,067	0,002	0,093	0,052	0,104
F2s	0,100	0,098	0,116	0,088	0,006	0,098	0,095	0,038
H1s	0,058	0,167	0,226	0,127	0,011	0,084	0,083	0,042
H2	0,102	0,114	0,127	0,110	0,003	0,110	0,110	0,110
Is	0,078	0,077	0,084	0,091	0,002	0,098	0,077	0,041
Tr	0,066	0,103	0,110	0,128	0,002	0,058	0,159	0,105
Tr1	0,130	0,118	0,071	0,105	0,005	0,098	0,097	0,144
Tr2	0,130	0,072	0,091	0,088	0,004	0,093	0,069	0,093
Tr3	0,032	0,083	0,063	0,108	0,005	0,100	0,140	0,080
Ts	0,076	0,005	0,032	0,073	0,001	0,306	0,031	0,076
Vs	0,111	0,081	0,095	0,060	0,001	0,064	0,066	0,111
Vm	0,109	0,095	0,051	0,090	0,002	0,084	0,064	0,109

**Tolérance au sel NaCl**

**Tableau 22** : Tolérance au sel NaCl des souches **sauvages**.

	G 4	G 19	G A6	GF	GH	GI	GT	GV
0,5%(85mM)	0,040	0,021	0,034	0,053	0,039	0,028	0,067	0,086

1%(170mM)	0,088	0,081	0,096	0,056	0,092	0,114	0,092	0,071
2%(340mM)	0,136	0,073	0,359	0,101	0,070	0,081	0,095	0,06
3 %(510mM)	0,070	0,067	0,101	0,053	0,078	0,194	0,075	0,054
5 %(850mM)	0,038	0,070	0,058	0,031	0,049	0,040	0,140	0,021
10%(1700mM)	0,005	0,035	0,000	0,008	0,002	0,000	0,005	0,012

**Tableau 23 :** Tolérance au sel NaCl des souches **mutantes**.

	0,5% (85mM)	1% (170mM)	2% (340mM)	3% (510mM)	5% (850mM)	10% (1700mM)
4s	0,144	0,023	0,017	0,018	0,004	0,007
19s	0,188	0,148	0,103	0,113	0,066	0,042
A6s	0,104	0,130	0,290	0,106	0,067	0,011
A6m	0,037	0,089	0,148	0,077	0,032	0,003
F1s	0,127	0,131	0,151	0,051	0,027	0,011
F2s	0,096	0,080	0,090	0,088	0,054	0,009
H1s	0,069	0,073	0,125	0,120	0,016	0,001
H2	0,117	0,120	0,103	0,049	0,056	0,057
Is	0,070	0,097	0,094	0,012	0,002	0,004
Tr	0,172	0,148	0,148	0,047	0,000	0,003
Tr1	0,199	0,105	0,071	0,043	0,015	0,001
Tr2	0,086	0,122	0,116	0,056	0,034	0,005
Tr3	0,089	0,032	0,054	0,100	0,016	0,005
Ts	0,032	0,06	0,061	0,086	0,013	0,006
Vs	0,082	0,05	0,083	0,032	0,028	0,004
Vm	0,051	0,080	0,055	0,043	0,014	0,002

### Croissance à différents pH

**Tableau 24 :** Variation de pH chez les souches **sauvages**.

	G 4	G 19	G A6	GF	G H	GI	GT	GV
4	0,227	0,180	0,300	0,228	0,240	0,230	0,230	0,230
4,5	0,264	0,167	0,288	0,250	0,277	0,254	0,260	0,237

5	0,232	0,173	0,340	0,227	0,230	0,247	0,294	0,247
5,5	0,283	0,212	0,332	0,264	0,263	0,248	0,252	0,237
6	0,684	0,552	1,120	0,925	0,890	0,776	1,280	0,812
6,5	0,902	0,766	1,14	1,041	1,088	0,772	1,090	1,044
6,8	1,14	0,865	1,031	1,030	1,100	0,880	0,901	0,950
7	0,970	1,015	0,845	0,748	0,790	0,676	0,825	0,760
7,5	0,458	0,190	0,303	0,341	0,368	0,361	0,344	0,373
8	0,353	0,401	0,349	0,315	0,330	0,338	0,338	0,353
8,5	0,353	0,330	0,358	0,341	0,357	0,315	0,338	0,349
9	0,331	0,360	0,340	0,300	0,338	0,322	0,320	0,324
9,5	0,280	0,328	0,362	0,280	0,219	0,314	0,329	0,297
10	0,15	0,280	0,326	0,203	0,196	0,204	0,26	0,16

**Tableau 25 : Variation de pH chez les souches mutantes**

	4	4,5	5	5,5	6	6,5	6,8	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
4s	0,144	0,256	0,303	0,398	0,580	0,601	0,646	0,565	0,390	0,396	0,352	0,300	0,284	0,255
19s	0,245	0,355	0,367	0,385	0,620	0,680	0,680	0,681	0,412	0,395	0,388	0,385	0,370	0,368
A6s	0,260	0,280	0,334	0,415	0,650	0,710	0,784	0,625	0,345	0,338	0,332	0,265	0,263	0,209
A6m	0,301	0,331	0,345	0,376	0,670	0,738	0,801	0,687	0,394	0,388	0,354	0,346	0,298	0,133
F1s	0,290	0,320	0,326	0,384	0,571	0,603	0,740	0,598	0,398	0,390	0,385	0,367	0,273	0,237
F2s	0,198	0,264	0,348	0,360	0,545	0,584	0,764	0,610	0,384	0,364	0,374	0,347	0,252	0,154
H1s	0,171	0,231	0,342	0,384	0,613	0,643	0,750	0,622	0,371	0,360	0,346	0,344	0,285	0,184
H2	0,278	0,305	0,348	0,361	0,631	0,700	0,813	0,645	0,390	0,374	0,361	0,309	0,284	0,189
Is	0,136	0,227	0,281	0,366	0,670	0,746	0,861	0,731	0,513	0,462	0,413	0,398	0,252	0,236
Tr	0,260	0,346	0,350	0,362	0,701	0,768	0,870	0,752	0,435	0,412	0,395	0,390	0,357	0,166
Tr1	0,254	0,365	0,376	0,378	0,635	0,714	0,785	0,635	0,385	0,336	0,268	0,254	0,224	0,119
Tr2	0,281	0,331	0,366	0,391	0,587	0,657	0,730	0,597	0,383	0,337	0,338	0,323	0,244	0,245
Tr3	0,193	0,220	0,241	0,319	0,589	0,621	0,672	0,680	0,323	0,291	0,291	0,259	0,154	0,131
Ts	0,115	0,203	0,340	0,352	0,540	0,610	0,632	0,645	0,389	0,359	0,329	0,380	0,299	0,140
Vs	0,139	0,285	0,338	0,368	0,532	0,547	0,590	0,564	0,375	0,327	0,304	0,286	0,190	0,183
Vm	0,214	0,293	0,306	0,345	0,498	0,517	0,591	0,530	0,346	0,310	0,299	0,281	0,226	0,224

## ANNEXE 4

### Electrophorèse des protéines totales (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

#### Préparation du tampon d'échantillon (tampon de lyse)

Tris	25mM
Glycérol	192Mm
SDS	2,5%

$\beta$ -mercaptoéthanol	2,5% (v/v)
Bleu de Bromophénol	5mg
Eau distillée	200 ml

### Préparation des solutions stock

- **solution d'acrylamide**

§ Acrylamide 30%	60g
§ Bis acrylamide 0,8%	1,6g
§ Eau distillée	QSP 200 ml

- **Tampon du gel de séparation (resolving gel buffer) : Tris-HCl 3M pH 8,8**

§ Tris 3M	72,7g
§ SDS 0,8%	1,6g
§ Mercaptoéthanol (MCE)	0,8 ml
§ Eau distillée	QSP 200ml

Ajuster à pH 8,8 avec HCl

- **Tampon du gel de concentration (stacking gel buffer) : Tris-HCl 0,5M pH 6,8**

§ Tris 0,5M	12,1g
§ SDS 0,4%	0,8g
§ MCE 0,2%	400 $\mu$ l
§ Eau distillée	QSP 200 ml

Ajuster à pH 6,8 avec HCl

### Préparation des gels

- **préparation du gel de séparation à 12%**

Solution d'acrylamide	10,4 ml
Tampon de séparation	3,14 ml
Temed	12,5 $\mu$ l
Eau distillée	QSP 25 ml

- **Préparation du gel de concentration à 7,5%**

Solution d'acrylamide	5 ml
Tampon de concentration	5 ml
Temed	20 $\mu$ l
Eau distillée	QSP 20 ml

Juste avant de couler chaque gel ajouter du persulfate (ammoniumperoxodisulfate) 15%

Préparer 0,15 g de persulfate dans 1 ml d'eau distillée et ajouter au

Gel de séparation 140  $\mu$ l

Gel de concentration 200  $\mu$ l

- **Préparation du tampon de migration (running buffer)**

§ Tris 0,025 M 1,06 g

§ Glycine 0,192 M 5,04 g

§ SDS 0,1% 0,35 g

§ MEC 0,05% 175  $\mu$ l

§ Eau distillée QSP 350 ml

- **Préparation des plaques de gel**

Monter les plaques en verre (éviter d'avoir des fuites), la solution du gel de séparation est coulée entre les plaques en verre en laissant une hauteur de 4 cm pour le deuxième gel. A l'aide d'une micropipette niveler le gel avec une solution d'alcool (le butanol), laisser polymériser 20 à 30 min. Retirer l'alcool, rincer délicatement à l'eau distillée, jeter l'eau, sécher avec du papier filtre sans toucher la surface du gel, ensuite couler le gel de concentration (laissant 3-4 mm d'hauteur environ du bord supérieur). Placer rapidement le peigne, laisser polymérisé, retirer le peigne très lentement vers le haut, à chaque étape éviter la formation des bulles d'air.

- **Migration électrophorétique**

Remplir les puits par la solution du tampon de migration. Un volume de 20 $\mu$ l de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque puit. A prés le dépôt, la migration des polypeptides a été assurée par une différence de potentiel de départ de 127V (80 mA), jusqu'à ce que le voltage arrive à 287V.

L'électrophorèse est conduite jusqu'à ce que le bleu de bromophénol arrive à 3-4 mm de l'extrémité anodique du gel.

- **Révélation des bandes protéiques**

✓ **La solution de coloration :**

25ml de la solution mère (bleu de comassie et le méthanol)

40ml de TCA 60% (l'acide tricholacétique)

QSP 400 ml

Agiter la solution

Après démoulage, mettre le gel dans 200 ml de solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation. La décoloration est réalisée dans l'eau distillée.

**Tableau 26:** Analyse du Kit.

Protéines	Mr (Da)	Rf	Log <sub>10</sub> (PM)
Phosphorylase b	97000	0,04	4,98
Albumine	66000	0,14	4,81
Ovalbumine	45000	0,21	4,65
Anhydrase carbonique	30000	0,48	4,47
Inhibiteur Trypsine	20100	0,71	4,3
$\alpha$ -Lactalbumine	14400	0,9	4,15