

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

Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Végétale et Ecologie.

Mémoire de Magistère
En

GENETIQUE ET AMELIORATION DES PLANTES
OPTION : GENOMIQUE ET TECHNOLOGIES AVANCEES DES VEGETAUX

Présenté par :

Gramma Borhane Samir

Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude
de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses.

Soutenu le :

Devant le jury :

Président : Mr M. Bensari
Rapporteur : Mr D.Khelifi
Examineurs: Mme N.Khalfallah
Mr D.Boulahrouf
Mr Y Benhizia

Professeur. Université Mentouri, Constantine
Professeur. Université Mentouri, Constantine
Professeur. Université Mentouri, Constantine
Professeur. Université Mentouri, Constantine
Maître de conférence Université Mentouri Constantine

Année Universitaire 2007-2008

Résumé :

Cette étude a porté sur 7 souches bactériennes isolées des nodules d'*Hedysarum coronarium*, 7 souches de *Trifolium campestre*, 9 souches de *Vicia sativa* L et 10 souches de *Vicia faba major*. Des souches témoins de rhizobiums tels que *R. sllae*, *R. leguminosarum* bv. *trifoli*, *R. Leguminosarum* bv *viceae* ont été utilisées.

Après des tests morphologiques et culturaux des isolats, l'appréciation de la diversité des Rhizobia a été effectuée par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE) permettant le fractionnement des protéines totales (Laemmli, 1970) et également par la technique d'électrophorèse multilocus des enzymes (MLEE) de quelques systèmes enzymatiques (ADH, ALD, GOT) (Selander *et al.*, 1986).

Les résultats montrent une diversité dans les populations locales et également par rapport aux souches de référence.

Mots clé : Rhizobia, protéine, enzyme, électrophorèse, diversité.

Summary:

This study related to 7 bacterial strains isolated from the nodules of *Hedysarum coronarium*, 7 strains of *Trifolium campestre*, 9 strains of *Vicia Sativa L* and 10 strains of *Vicia faba major*. Reference strains of rhizobiums such as *R. Sullae*, *R. leguminosarum* bv *trifoli*, *R. leguminosarum* bv *viceae* were used.

After morphological and cultural test, the appreciation of the diversity of Rhizobia was appreciated by monodimensional electrophoresis on freezing polyacrylamide in the presence of a detergent (SDS-PAGE) allowing the fractionation of total proteins according to Laemmli (1970) and also by the technique of electrophoresis multilocus of enzymes (MLEE) of some enzymatic systems (ADH, ALD, GOT) according to (Selander *et al.*, 1986).

The result shows diversity in the populations local and also compared to the reference strains.

Key words: Rhizobia, protein, enzyme, electrophoresis, diversity.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
I- La fixation biologique de l'azote	3
I.1- Présentation de la famille des légumineuses	4
I.1.1- Les <i>Papilionoideae</i>	4
I.1.2- Les <i>Mimosoideae</i>	5
I.1.3- Les <i>Caesalpinoideae</i>	5
I.2- Intérêts des légumineuses	5
II- La symbiose légumineuse-rhizobium	6
II.1- Le microsymbionte : le <i>Rhizobium</i>	6
II.1.1- Caractères morphologiques	6
II.1.2- Caractères biochimiques	7
II.1.3- Caractères physiologiques	7
II.1.4- Caractères culturaux	7
II.2- Le macro symbionte :	8
II.2.1- <i>Vicia</i>	8
II.2.2- <i>Trifolium</i>	9
II.2.3- <i>Hedysarum</i>	9
II.3- La Taxonomie des rhizobiums	10
II.4- Processus de nodulation	11
II.4.1- Pré-échange de signal d'infection	11
II.4.2- L'infection	11
II.4.3- Développement du nodule et maturation des bactéroïdes	12
II.5- La génétique de la nodulation	15
II.5.1- Les gènes <i>nod</i>	15
II.5.2- Les gènes <i>nif</i>	15
II.5.3- Les gènes <i>fix</i>	16
II.5.4- Les gènes de la plante hôte	16
II .6- Les conditions influant l'activité symbiotique et la fixation de l'azote	16

III- La diversité biologique.....	17
III.1- La diversité génétique.....	18
III.2- Les principaux facteurs de la diversité.....	18
III.2.1- Transfert des gènes.....	18
III.2.2- Les mutations.....	19
III.2.3- La transposition.....	19
III.2.4- La recombinaison homologue.....	19
III.3- Polymorphisme et marqueurs génétiques.....	19
III.3.1- Les marqueurs biochimiques.....	20
III.3.1.1- Les applications de la MLEE.....	21
III.3.1.2- Facteurs influençant la MLEE.....	22
III.3.1.3- Les limites de la MLEE.....	22

Chapitre II : Matériel et méthodes

I- Isolement des bactéries à partir des nodules	24
I.1- La collecte des nodules.....	24
I.2- La conservation des nodules.....	25
I.3- Isolement des bactéries.....	26
I.3.1- Stérilisation des nodules.....	26
I.3.2- Isolement selon la méthode du nodule écrasé.....	27
II- Caractères morphologiques et culturels des isolats	28
III- Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE	30
IV- Détermination des profils enzymatiques par la MLEE.....	31

Chapitre III : Résultats et discussion

I- Etude morphologique et culturelle des isolats	33
II- Etude du polymorphisme des protéines totales.....	34
II.1- Identification des rhizobiums par le polymorphisme des protéines	34
II.2- Indices de similarité des diagrammes des souches	42
III- Etude du polymorphisme des isoenzymes des rhizobiums.....	42

Discussion générale	53
Conclusion générale	55
Perspectives	56
Références bibliographiques	57

Annexes

Liste des abréviations

ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
ALD	alanine déshydrogénase
ARN	acide ribonucléique
ARNr	adénosine ribonucléotide ribosomique
Atm	atmosphère
BCP	pourpre de bromocrésol
bv	biovar
BTB	bleu de bromothymol
CaCl₂	chlorure de calcium
CaCO₃	carbonate de calcium
cm	centimètre
EDTA	éthylène-diamine-tétraacétique
g	gramme
GPA	glucose peptone agar
GOT	glutamate oxaloacétate transaminase
h	heure
HgCl₂	chlorure de mercure
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
IAS	indice absolu de similarité
IRS	indice relatif de similarité
IS	séquence d'insertion
Kg	kilogramme
L	linée
LCO	lipochitoooligosacharides
M	mole
ml	millilitre
MLEE	multilocus enzyme electrophoresis
mM	milimole
mm	millimètre

mn	minute
N₂	nitrogène
NH₄⁺	ammonium
Nod	nodulation
PCR	polymerase chain reaction
RFLP	restriction fragment length polymorphisms
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TY	tryptone yeast
V/V	volume par volume
YMA	yeast mannitol agar
YMB	yeast mannitol broth
µm	micrometer
µL	microlitre
°C	degré celsius
16S	16 sveldberg

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses (Annexe 1)	
Tableau 2	Les souches utilisées dans cette étude.....	29
Tableau 3	Résultats de l'étude morphologique et culturaux des isolats.....	33
Tableau 4	Diagrammes types des souches de <i>Vicia sativa L.</i>	38
Tableau 5	Diagrammes types des souches de <i>Vicia Faba major.</i>	39
Tableau 6	Diagrammes types des souches d' <i>Hedysarum coronarium.</i>	40
Tableau 7	Diagrammes types des souches de <i>Trifolium compestre.</i>	41
Tableau 8	Indices de similarité des souches de <i>Vicia sativa L</i> selon les diagrammes électrophorétiques.....	42
Tableau 9	Indices de similarité des souches de <i>Vicia faba major</i> selon les diagrammes électrophor étiques.....	43
Tableau 10	Indices de similarité des souches <i>Trifolium compestre</i> selon les diagrammes électrophorétiques.....	44
Tableau 11	Indices de similarité des souches d' <i>Hedysarum coronarium</i> selon les diagrammes électrophorétiques.....	44

Liste des figures

Figure 1	Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre Rhizobium et une plante (Perry et al., 2004).....	14
Figure 2	Conservation des nodules (Vincent, 1970).....	25
Figure 3	Isolement en quadrants.....	27
Figure 4	Profils protéiques des différentes souches isolées de <i>Vicia Sativa L</i> avec Vr la souche de référence.....	35
Figure 5	Profils protéiques des différentes souches isolées de <i>Vicia Faba major</i> avec Vr la souche de référence.....	35
Figure 6	Profils protéiques des différentes souches isolées d' <i>Hedysarum coronarium</i> avec A6 la souche de référence.....	36
Figure 7	Profils protéiques des différentes souches isolées de <i>Trifolium compestre</i> avec Tr la souche de référence.....	36
Figure 8	Zymogrammes des différentes souches isolées de <i>Vicia Sativa L</i> avec Vr la souche de référence, pour l'enzyme GOT.....	45
Figure 9	Zymogrammes des différentes souches isolées de <i>Vicia Sativa L</i> avec Vr la souche de référence, pour l'enzyme ADH.....	46
Figure 10	Dendrogramme construit par la méthode de Wagner pour les 9 souches isolées de <i>Vicia sativa L</i>	46
Figure 11	Zymogrammes des différentes souches isolées de <i>Trifolium compestre</i> avec Tr la souche de référence, pour l'enzyme ADH.....	47

Figure 12	Zymogrammes des différentes souches isolées de <i>Trifolium compestre</i> , pour l'enzyme GOT.....	47
Figure 13	Zymogrammes des différentes souches isolées de <i>Trifolium compestre</i> , pour l'enzyme ALD.....	48
Figure 14	Dendrogramme construit par la méthode de Wagner pour les 7 souches isolées de <i>Trifolium compestre</i>	48
Figure 15	Zymogrammes des différentes souches isolées d' <i>Hedysarum coronarium</i> avec A6 la souche de référence, pour l'enzyme ADH.....	49
Figure 16	Zymogrammes des différentes souches isolées d' <i>Hedysarum coronarium</i> avec A6 la souche de référence, pour l'enzyme GOT.....	49
Figure 17	Dendrogramme construit par la méthode de Wagner pour les 7 souches isolées d' <i>Hedysarum coronarium</i>	50
Figure 18	Zymogrammes des différentes souches isolées de <i>Vicia Faba major</i> avec Vr la souche de référence, pour l'enzyme GOT.....	51
Figure 19	Zymogrammes des différentes souches isolées de <i>Vicia Faba major</i> avec Vr la souche de référence, pour l'enzyme ADH.....	51
Figure 20	Zymogrammes des différentes souches isolées de <i>Vicia Faba major</i> avec Vr la souche de référence, pour l'enzyme ALD.....	51
Figure 21	Dendrogramme construit par la méthode de Wagner pour les 10 souches isolées de <i>Vicia Faba major</i>	52

I- La fixation biologique de l'azote

Dans la nature, l'azote est abondamment présent sous forme de gaz N₂ dans l'air dont il représente près de 4/5, sous forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante. C'est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone et également un facteur clé et limitant pour la production agricole.

La concentration requise en azote pour une croissance optimale des plantes varie entre 2 et 5 % sur une base de matière sèche (Parent, 1999). Il peut représenter jusqu'à 7% de cette matière et parfois beaucoup plus à certaines périodes du cycle végétatif, comme en début de floraison. L'insuffisance ou la carence de cet élément se manifeste par une chlorose, un nanisme, une stérilité... (Tourte *et al.*, 2005). Les feuilles matures entrent en sénescence puisque leur azote est redirigé vers les feuilles croissantes. S'il y a excès, l'élongation des tiges est favorisée au détriment de la maturation et le développement racinaire est inhibé, pouvant mener à un approvisionnement inadéquat en eau et en éléments minéraux (Parent, 1999).

La fixation biologique de N₂ est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Les organismes assimilateurs de N₂ sont des eubactéries et archaebactéries procaryotes réparties dans plus de 100 genres ; certains fixent l'azote en vivant à l'état libre, d'autres le font au cours d'une symbiose (Pelmont, 2005).

Dans les écosystème terrestres, les bactéries fixatrices d'azote moléculaire vivent en symbiose avec les légumineuse et avec un certain nombre d'autres plantes non légumineuses comme l'aulne (*Alnus*), le piment royal (*Myrica gale*), le filao (*Casuarina*), quelques membres de la famille des *Rosaceae* et certaines graminées tropicales (Hopkins, 2003). Plus de 200 espèces appartenant à d'autres familles que les légumineuses ont été inventoriées (Frontier *et al.*, 2004).

Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbionte. Chez les légumineuses, les bactéries (les rhizobiums) s'installent dans les racines des plantes ; le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie ; celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Pousset, 2003). Cependant dans les nodules des non légumineuses, le symbionte est une bactérie filamenteuse, appelée Frankia, qui fait partie du groupe des actinomycètes (Hopkins, 2003).

I.1- Présentation de la famille des légumineuses

Les légumineuses ou *Fabaceae* sont classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones. Elles sont les sœurs des *Polygalaceae*, composant avec les familles des *Quillajaceae* et *Surianaceae*, les Fabales (Judd *et al.*, 2001).

Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces (après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*), avec 727 genres et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.*, 2006). Les espèces vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (Judd *et al.*, 2001). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds, les formes herbacées dans les régions tempérées (Guignard et Dupont, 2005). Elles sont extrêmement diversifiées, cependant elles présentent un point commun, leur fruit est une gousse (Caratini, 1984).

En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinioideae*) (Guignard et Dupont, 2005). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000). Cependant il y a encore 40% des légumineuses qui n'ont jamais été examinées pour la nodulation (Sprent, 1999).

I.1.1- Les *Papilionoideae*

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « papillon » (Guignard et Dupont, 2005). La sous-famille monophylétique des *Papilionoideae* renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent, 1995). Elle est cosmopolite et compte 11300 espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus (Labat *et al.*, 1996). Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995). La majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd *et al.*, 2001).

Les papilionacées sont utilisées pour la production des graines alimentaires (Pois, Haricot...), pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage (Luzerne, Sainfoin, Trèfle...), le soja est utilisé sur une large échelle dans l'élevage industriel.

I.1.2- Les *Mimosoideae* :

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd *et al.*, 2001).

I.1.3- Les *Caesalpinoideae* :

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (Judd *et al.*, 2001).

I.2- Intérêts des légumineuses

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont fixés annuellement, alors que la quantité d'engrais azotés utilisée en agriculture est de 40 millions de tonnes par an (Lévêque et Mounoulou, 2001). Au total un champ de trèfle fixe entre 50 et 100 Kg d'azote par hectare et par an. Le Soja et le Lupin, connus pour leur richesse en protéines, apportent au sol plus de 300 et jusqu'à 500 kg d'azote par hectare et par an (Frontier *et al.*, 2004). Cette fixation leur permet de produire en abondance des protéines végétales ce qui constitue une source très importante dans l'alimentation humaine et animale (Baudoin, 2001). Leurs graines sont des aliments d'excellente qualité car leur contenu en protéines est parmi les plus élevés de toutes les plantes destinées à l'alimentation. Cela représente le meilleur moyen de produire des protéines végétales dans le cadre d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement. En effet leurs capacités à fixer l'azote rendent inutile l'utilisation d'engrais azotés dont la synthèse, le transport et l'épandage consomment des combustibles fossiles (2 tonnes de fuel pour une tonne d'ammoniac) et contribuent à l'effet de serre (Dénarié, 2000).

Leur utilisation joue également un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols agricoles. Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, elles apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique dans le système (Babo, 2002). Dans les systèmes de culture utilisant les rotations, l'azote fixé par les légumineuses peut être utilisé d'abord par elles-mêmes, puis par les cultures suivantes qui peuvent bénéficier indirectement par l'entremise des résidus qu'elles laissent (Baudoin, 2001). Enfin elles servent également de cultures de fourrages, d'engrais

verts et produisent un grand nombre de composés utiles comme des médicaments, des poisons, des teintures et des parfums.

II- La symbiose légumineuse-rhizobium

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

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

La symbiose rhizobium/légumineuse est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi au rhizobium pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement. Le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie, celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Raven *et al.*, 2000).

Ces bactéries n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante ; cette assimilation du N₂ est une propriété qu'elles n'acquièrent qu'à l'état de symbionte. L'association symbiotique est généralement très spécifique ; chaque souche n'infecte qu'une espèce de plante ou une gamme très limitée d'hôtes (Pelmont, 1995).

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

II.1- Le microsymbionte : *Rhizobium*

II.1.1- Caractères morphologiques

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

- **La forme végétative** : les rhizobiums sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobiums à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les rhizobiums à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

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

II.1.2- Caractères biochimiques :

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

II.1.3- Caractères physiologiques

Le rhizobium est un micro-organisme aérobic ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm).

Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6.8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*.

La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

II.1.4- Caractères culturaux

Deux groupes de rhizobiums, le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement

chaque 2-4 h. Le deuxième est le groupe des rhizobia à croissance lente, ce sont les *Bradyrhizobium*. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 h (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le yeast mannitol agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture de rhizobiums (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994).

Il est admis que seules les bactéries correspondant aux bactéries non différenciées en bactéroïdes sont capables de pousser sur boîte de Pétri (Boivin-Masson *et al.*, 2006).

II.2- Le macro symbionte

II.2.1- *Vicia* (vesce)

Ce genre réunit quelques 140 espèces annuelles et vivaces, originaires pour la plupart de l'hémisphère nord tempéré ; quelques-unes croissent dans les Andes sud-américaines et dans l'Est africain. La plupart des espèces sont munies de vrilles à l'extrémité de leurs feuilles pennées et se hissent ainsi sur divers supports. La fève, *Vicia faba major*, fait exception, avec ses tiges dressées sans vrille (Burnie *et al.*, 2005). Deux espèces ont été utilisées :

- *Vicia faba major*

Espèce de saison froide, la fève ne réussit qu'en climat tempéré. On la sème surtout en automne sur un sol bien drainé, chaulé et fumé en rayons surélevés si nécessaire, de préférence sur un emplacement n'ayant pas contenu récemment de légumineuses. Elle semble avoir été l'une des toutes premières plantes cultivées. Au proche Orient, les archéologues ont mis au jour des graines datant de plusieurs milliers d'années. Inconnue à l'état spontané elle pourrait être une forme dérivée, après des siècles de culture, de l'espèce méditerranéenne *Vicia narbonense* (Burnie *et al.*, 2005).

- *Vicia sativa L* (vesce commune)

C'est une plante spontanée dans toute l'Eurasie tempérée, elle s'est naturalisée en maintes régions du globe. Très variable, elle compte plusieurs sous-espèces, dont certaines sont cultivées comme fourrage, alors que d'autres sont de simples adventices (Burnie *et al.*, 2005). De nos jours, la vesce commune est essentiellement cultivée comme plante fourragère,

principalement comme fourrage vert. L'utilisation des graines est plus rare, en dépit de leur valeur nutritive liée en particulier à un taux élevé de protéines. Il s'avère qu'elles soient toxiques, au moins chez les animaux monogastriques, lorsqu'elles sont consommées régulièrement et en quantité notable (Bouby et Léa, 2006).

II.2.2- *Trifolium*

Le genre *Trifolium* comprend approximativement 240 espèces, appartenant à la tribu trifolieae (Vizintin *et al.*, 2006). Le nom du genre fait référence habituellement aux feuilles distinctives composées de trois folioles. La diffusion native du *Trifolium* inclut les régions tempérées et une étendue moindre dans les Hémisphères Nord et Sud ; les trèfles sont absents dans le sud-est d'Asie et en Australie. Les espèces de trifolium survivent dans une large gamme d'habitats tels les prés, les prairies, les régions semi-désertiques, les montagnes et les sommets des Alpes. Une caractéristique commune de ces habitats divers est la haute radiation solaire ; peu d'espèces de trèfle tolèrent l'ombre (Ellison *et al.*, 2006).

L'espèce, *Trifolium compestre*, a été choisie dans notre étude. Il s'agit d'une plante herbacée, basse, annuelle parfois bisannuelle, poussant en plaine et en altitude. Elle est commune dans les champs, les prés secs, les pelouses, les landes ou au bord des chemins et sur les dunes. Légèrement basophile, elle s'adapte aussi aux sols acides. Les feuilles sont toutes alternes. Probablement d'origine méditerranéenne, elle est aujourd'hui cosmopolite.

II.2.3- *Hedysarum*

Le genre *Hedysarum* renferme des espèces annuelles ou pérennes. Il est représenté par 154 espèces. Il est représenté en Afrique du Nord par des espèces faisant partie du groupe méditerranéen présentant un nombre chromosomique de base $n = 8$ (Quezel et Santa, 1962). Ces espèces présentent plusieurs intérêts agronomiques grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique. Elles peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides.

Notre étude a porté sur l'espèce *Hedysarum coronarium* ou Sulla. C'est une légumineuse qui est présente dans beaucoup de pays méditerranéens où elle est bien adaptée. Elle est principalement associée à d'autres espèces fourragères (Rodriguez-Navarro *et al.*, 1991). Plante pérenne et résistant à la sécheresse, à enracinement relativement profond, elle pousse en climat chaud à été doux, mais non tropical, elle est utilisée comme espèce fourragère.

II.3- La Taxonomie des rhizobiums

Les rhizobiums ont été traditionnellement assignés aux groupes taxonomiques sur la base des spécificités de l'hôte, c'est le concept d'inoculation croisée (Kalita et Malek, 2004). Un groupe d'inoculations croisées peut être défini comme l'ensemble des souches de rhizobiums nodulants un groupe donné de plantes-hôtes (Prin *et al.*, 1993). Cette première classification comportait un seul genre, le genre *Rhizobium* avec six espèces qui sont *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupinian* et *R. japonicum*. Sur la base de la vitesse de croissance *in vitro*, les rhizobiums ont été ensuite reclassés dans deux genres : le genre *Rhizobium* correspondant aux souches à croissance rapide et le nouveau genre *Bradyrhizobium* pour les souches à croissance lente (Ndiaye *et al.*, 2002).

L'isolement de rhizobiums associés aux légumineuses, non prises en compte auparavant, a souvent conduit au bouleversement de la taxonomie des Rhizobia. Ces modifications constantes de la taxonomie ont conduit à la recherche des nouveaux critères à prendre en compte pour la description de nouveaux taxa (Ndiaye *et al.*, 2002). C'est ainsi qu'il a été proposé l'utilisation de la taxonomie polyphasique basée sur des techniques spécifiques (phylogénétiques, phénotypiques et génotypiques) pour définir les nouveaux groupes (Graham *et al.*, 1991 ; Vandamme *et al.*, 1996).

Graham *et al.* (1991) proposent que toute modification de la classification des rhizobiums ne soit prise en compte qu'après avoir franchi un certain nombre d'étapes et de contrôles, parmi lesquels on note la description de l'espèce dans International Journal of Systematic Bacteriology et le dépôt de la souche-type dans une collection de souches internationalement reconnue, la description devant porter sur des caractères tels que les performances symbiotiques, les caractéristiques culturelles et morphologiques, l'homologie ADN/ADN, l'hybridation ARN/ADN, le séquençage de l'ARNr 16S, RFLP de l'ADN et la comparaison des profils isoenzymatiques.

La combinaison de ces techniques a révélé à la fois des diversités génétiques au sein des groupes bactériens qui avaient été considérés comme homogènes et des relations entre des groupes très éloignés (Ndiaye *et al.*, 2002). Sur cette base, la famille des *Rhizobiacées* inclue 6 genres qui sont *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* et connus collectivement sous le nom de Rhizobia (Tighe *et al.*, 2000 ; Ndiaye *et al.*, 2002).

Plusieurs espèces bactériennes nouvelles, capables de noduler également, ont été décrites ces dernières années. *Methylobacterium nodulans* a été isolée à partir de *Crotalaria*

spp (Sy *et al.*, 2001). Chen *et al.* (2001) ont décrit l'espèce *Ralstonia taiwanensis*, espèce de B-protéobactéria qui à été tirée des racines des *Mimosa*. Moulin *et al* (2002) rapportent l'existence de *Burkholderia* spp qui peut noduler efficacement les racines du riz. *Devosia neptuniae* est une autre nouvelle espèce, isolée à partir de *Neptunia natans* (Rivas *et al.*, 2003). *Blastobacter denitrificans* qui a été isolé de *Aeschynomene indica*. *Blastobacter* spp Van Berkum et Eardly (2002). Benhizia *et al.* (2004) ont mis en évidence que des bactéries de gamma- protéobactéria peuvent également noduler des racines de légumineuses.

Tableau 1 : Classification des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses (Annexe 1).

II.4- Processus de nodulation

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

II.4.1- Pré-échange de signal d'infection

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

II.4.2- L'infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, la rhicadhésine. Des lectines sont également impliquées dans l'adhésion mais elles participent à un degré moindre que la rhicadhésine (Perry *et al.*, 2004). Les bactéries migrent vers l'extrémité des poils absorbants, s'y fixent et

libèrent à leur tour des hormones (acides gibbérellique et indole-acétique) qui assouplissent la paroi cellulaire (Dupuy et Nougier, 2005). Le rhizobium s'apprête alors à entrer dans la plante. Le facteur de nodulation induira une dépolarisation de la membrane, une fuite d'électrolytes et une oscillation de la concentration du calcium (Bélangier, 1998). Cette interaction induit une déformation du poil absorbant à 360° appelée « crosse de berger ». Seuls les jeunes poils absorbants peuvent être courbés pour entourer les cellules bactériennes (Machrafi, 2001). En réponse le poil absorbant secrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi ; la pénétration des bactéries est ainsi facilitée (Dupuy et Nougier, 2005). Cette pénétration se fait par un mécanisme d'invagination (Perry *et al.*, 2004). Les cellules bactériennes entrent par un poil absorbant, perdent leur membrane externe et changent de forme, tout en produisant une cytokinine (sorte d'hormone de croissance). (Pelmont, 2005).

II.4.3- Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Dans le poil absorbant, des vésicules golgiennes convergent vers le point de contact, forment un cordon amorphe contenant des mucilages limités par des fibrilles cellulosiques d'origine végétale ; c'est le filament d'infection (Dupuy et Nougier, 2005). Ce cordon relie les cellules épidermiques aux cellules corticales. De là, l'organogenèse se poursuivra jusqu'à l'obtention d'un nodule (Bélangier, 1998). Arrivé dans la zone corticale, le cordon se ramifie et envahit la presque totalité de la racine. La zone corticale réagit par l'augmentation de taille mais aussi par la multiplication cellulaire activée par la libération de cytokinines bactériennes ; un méristème se forme ou différencie une excroissance appelée nodule (Dupuy et Nougier, 2005). Le temps de pénétration est de 5 heures chez le soja (pour un trajet de 70 ou 80 µm), de 17 heures chez le lupin, de 2 jours chez le pois (Heller *et al.*, 1989).

La communication entre les bactéries (Quorum sensing) semble aussi jouer un rôle dans le développement des nodules (Loh *et al.*, 2002). La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des rhizobiums à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (Machrafi, 2001). La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroidienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *et al.*, 2004). Elle protège la plante contre l'ammoniac produit et une pathogénicité potentielle de la bactérie, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation de l'azote (Bélangier, 1998). Les bactéroïdes ne sont pas épars dans le cytoplasme,

mais enfermés dans des vésicules au nombre de 6 à 8 bactéroïdes par vésicule chez le soja et le haricot, un seul chez le trèfle (Heller *et al.*, 1989).

Le passage à l'état symbiotique s'accompagne d'une forte répression des gènes du métabolisme basal et d'une surexpression de ceux impliqués dans la fixation et l'assimilation de l'azote (Becker *et al.*, 2004). Quelques rares cellules bactériennes quiescentes, de forme bacillaire, sont présentes dans le nodule ; ce sont les cellules qui survivront et se multiplieront dans le sol après la mort de la plante. Elles pourront alors infecter les racines des plantes situées dans le voisinage ou de celles qui se développent ultérieurement sur le même site (Perry *et al.*, 2004). Le centre du nodule est entouré de faisceaux conducteurs dans lesquels le xylème est externe, le phloème est interne alors que cette disposition est inversée dans de la structure normale de la racine (Dupuy et Nougier, 2005). Les nodosités utilisent la majeure partie de l'ammonium produit par fixation symbiotique de l'azote pour synthétiser des acides aminés, qui passe ensuite dans le xylème pour se rendre dans le système caulinaire (Campbell et Reece, 2004).

Les deux composantes impliquées dans la sensibilité de la symbiose au sol sont d'une part le développement et le fonctionnement des nodosités et d'autre part la croissance et l'aptitude des organes photosynthétiques à approvisionner les nodosités en photosynthétats (Saadallah *et al.*, 2001).

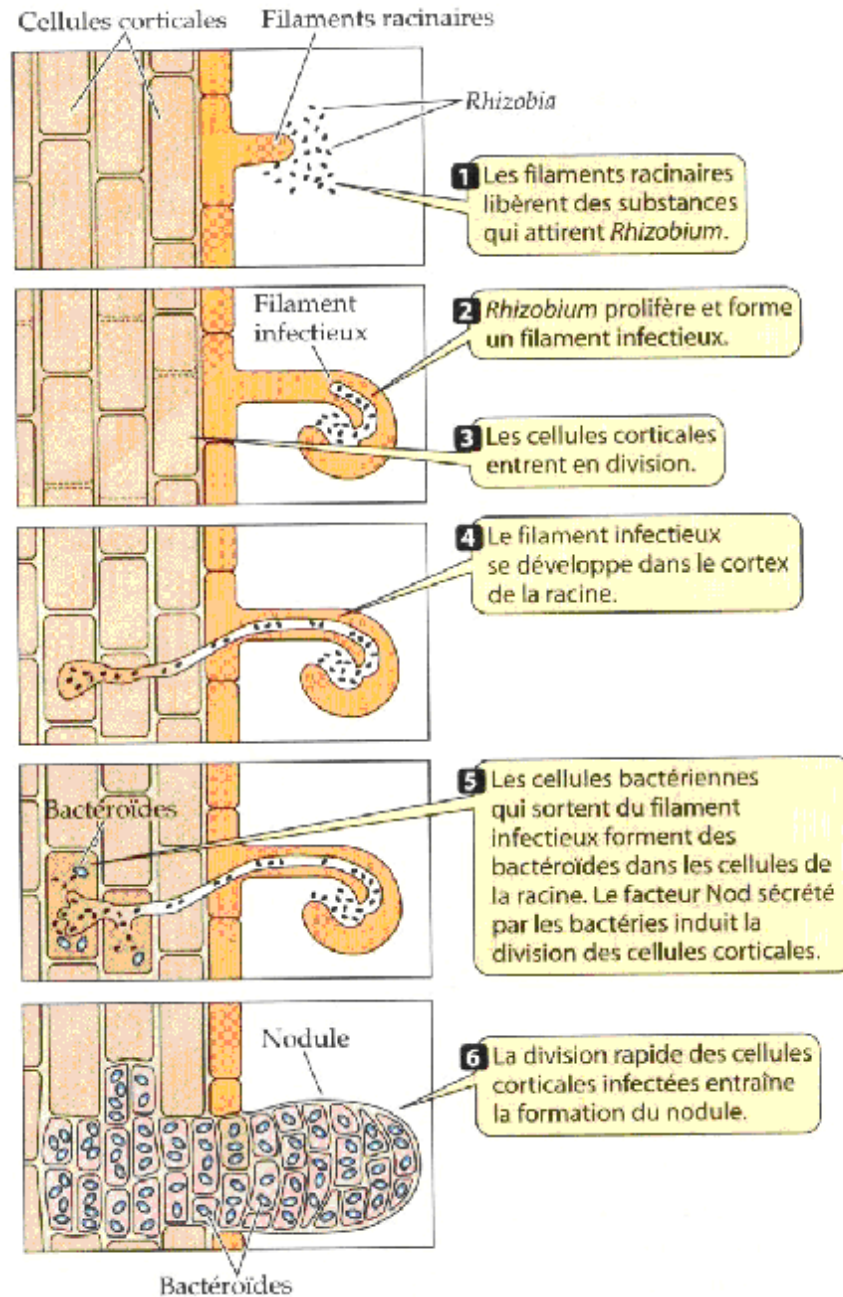


Figure 1 : Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry *et al.*, 2004).

II.5- La génétique de la nodulation

Les gènes qui participent aux interactions symbiotiques sont généralement localisés dans un grand plasmide chez les espèces de rhizobiums et dans le chromosome des souches de bradyrhizobiums (Raven *et al.*, 2000). De nombreux gènes bactériens interviennent dans la nodulation de la plante (gènes *nod*) et dans le fonctionnement du nodule avec tous les gènes impliqués dans la fixation de l'azote (gènes *nif* et *fix*) (Werner, 1992). Les gènes *nod* sont regroupés dans la même région, au contraire les gènes *nif* et les gènes *fix* sont regroupés dans 5 régions distinctes (Crossman, 2004).

II.5.1- Les gènes *nod*

Les gènes *nod* ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy et Nougier, 2005). Les gènes régulateurs *nodD* codent pour des protéines qui, en présence de signaux (de type flavonoïdes) sécrétés par la plante, activent l'expression des autres gènes *nod* de la bactérie ; ils sont dits gènes *nod* structuraux (Pelmont, 1995). Trois gènes *nod* (*nodA*, *nodB*, *nodC*) sont des gènes de nodulations communs à tous les rhizobiums ; ils codent pour le squelette chitino-oligosaccharidique des facteurs de nodulation (Hopkins, 2003). Une autre série de gènes de spécificité d'hôte, *nod E*, *F*, *G*, *H*, codent pour des modifications des facteurs *nod* (Hopkins, 2003).

II.5.2- Les gènes *nif*

Les gènes *nif* ou gènes de la nitrogénase, également découverts sur les plasmides bactériens sont impliqués dans la synthèse des constituants de la nitrogénase et dans la fixation d'azote. Ils interviennent seulement après la formation du nodule, bien qu'ils existent déjà dans le rhizobium libre, ils sont au nombre de 20 (Dupuy et Nougier, 2005). Ils comportent des gènes structuraux de la nitrogénase dont *nif H*, *nif D*, *nif K* ; *nif H* codent pour la réductase alors que *nif D* et *nif K* le font pour les polypeptides de la protéine à cofacteur FeMo (Pelmont, 1995, Crossman, 2004). Les *Nif B*, *E* et *N* codent, eux, pour la synthèse du cofacteur FeMo de la dinitrogénase et enfin le *nif S* pour la maturation de la dinitrogénase (Werner, 1992).

II.5.3- Les gènes *fix*

Les gènes *fix* N, O, Q, P codent pour le cytochrome oxydase, *fix* G, H, I, S codent pour la pompe cationique, *fix* A, B, C, X codent une flavoprotéine, une fonction dans le transport des électrons à la nitrogénase (Crossman, 2004).

Chez tous les rhizobiums et quelque soit le groupe auquel ils appartiennent, il existe au moins un gène *nod D* et des gènes *nod A*, B, C. D'où l'hypothèse d'une origine unique de ces gènes clés impliqués dans les échanges de signaux de nodulation. (Dénarié, 2000).

Ces gènes auraient ensuite été transférés horizontalement entre différents groupes de bactéries du sol, conférant à celles-ci l'aptitude à noduler les légumineuses (Dénarié, 2000). Ce transfert latéral des gènes de nodulations a contribué à l'évolution et à l'étendue de la capacité symbiotique (Moulin *et al.*, 2004).

II.5.4- Les gènes de la plante hôte

Ce sont des gènes spécifiques qui codent les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités, les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la globine de leghémoglobine ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005). Ces nodulines sont codées par des gènes *nod* localisés dans le génome de la plante hôte (Hopkins, 2003),

II.6- Les conditions influant l'activité symbiotique et la fixation de l'azote

Différents facteurs peuvent influencer l'activité symbiotique et la fixation d'azote.

Le manque du phosphore limite sévèrement la formation des nodules et la fixation de l'azote (Somasegaran et Hoben, 1994).

Il était démontré que des concentrations basses de malate et du succinate stimulent la fixation de N₂ et des concentrations modestes de ces acides dicarboxyliques sont inhibitrices (Prell et Poole, 2006).

L'éthylène inhibe la nodulation dans beaucoup de légumineuses (Sugawara *et al.*, 2006).

Une déficience d'eau induit une diminution significative dans le nombre et le rendement des nodules (Mnasri *et al.*, 2007).

Il est généralement admis que la salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote, au moins en partie, en limitant le fonctionnement des nodosités par une baisse de leur

conductance à la diffusion de l'oxygène. En plus, dans les régions arides et semi-arides, la salinité est un facteur majeur de la détérioration du sol et le rendre impropre pour l'agriculture (Saadallah *et al.*, 2001).

La sécheresse aussi est un facteur limitant de cette fixation (Zahran ,2001) ; cette dernière est affectée également par les hautes températures (Beaker *et al.*, 2004).

Les facteurs du sol (édaphiques) jouent aussi un rôle important ; il existe un rapport négatif entre l'azote minéral contenu dans le sol et le taux de fixation. La richesse du sol en azote devient alors un facteur inhibiteur de la fixation biologique ; la synthèse de la nitrogénase est inhibée par la présence d'ions ammoniums ou nitrates, à un certain degré, dans le sol (Pietsch *et al.*, 2007). C'est ainsi que s'expliquent les effets dépressifs des engrais azotés sur la fixation de l'azote de l'air. La nature du sol et la disponibilité des éléments nutritifs influencent l'activité des rhizobiums et de la plante et l'efficacité de l'activité symbiotique (Babo *et al.*, 2002).

III- La diversité biologique

La diversité biologique ou biodiversité désigne la variété des formes de vie comprenant les plantes, les animaux et les micro-organismes, les gènes qu'ils contiennent et les écosystèmes qu'ils forment. Elle englobe à la fois la diversité au sein des espèces (diversité génétique), entre les espèces (diversité d'espèces) et entre les écosystèmes (diversité d'écosystèmes) (Parizeau, 1997).

La diversité biologique est un thème de réflexion et de recherche qui a connu un essor considérable depuis la Conférence des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement à Rio de Janeiro au Brésil en 1992 (Prin *et al.*, 1993). Le groupe de travail sur « La Biodiversité en Ecologie Microbienne » a tenté d'analyser en quoi les microorganismes constitueraient-ils un modèle particulièrement important pour comprendre le rôle de la diversité. L'argumentation de ce groupe de travail repose sur les faits que :

- Les micro-organismes présentent une diversité extrême.
- La diversité de leurs conditions de vie est bien plus étendue que celle des eucaryotes (de -5 à 120°C, de 0 à 1000 atmosphères).
- Leurs effectifs sont extrêmement importants. On estime, par exemple, à 10^{16} le nombre d'individus par hectare pour une espèce bactérienne significative.
- Les temps de génération sont extrêmement courts par rapport à ceux de la plupart des eucaryotes. La descendance et la transmission des caractères sont rapidement identifiables.

-
- Les bactéries sont fonctionnellement haploïdes.
 - Il est possible de connaître la diversité d'importantes portions de l'ADN sans qu'il soit nécessaire de connaître les phénotypes associés.
 - Il est possible d'étudier des micro-organismes non cultivables et d'avoir ainsi accès à un pool caché de diversité.
 - Les micro-organismes occupent des fonctions-clés (nitrification, dénitrification, fixation d'azote, cellulolyse, méthanogénèse, détoxification etc.), si bien que l'on peut souvent étudier les niveaux moléculaires, cellulaires et écosystémiques d'une fonction et de sa diversité (Prin *et al.*, 1993).

III.1- La diversité génétique

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes. C'est la variation de la quantité d'information génétique des individus, des populations, des espèces, des assemblages ou des communautés. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité. (Parizeau, 1997). C'est la diversité intraspécifique (polymorphisme génétique) qui représente le potentiel et la capacité à répondre aux changements environnementaux, à la fois sur le court terme (faculté d'adaptation) et sur le long terme (potentiel d'évolution). La richesse des espèces est la mesure d'évaluation de la biodiversité la plus largement utilisée (Lewin, 1992).

III.2- Les principaux facteurs de la diversité

La source ultime de la diversité biologique réside dans la variabilité inscrite dans le patrimoine génétique des organismes. C'est au niveau de ce patrimoine que l'on doit rechercher les mécanismes fondamentaux qui sont à l'origine de la diversification du vivant (Lévêque et Mounoulou, 2001). Il existe plusieurs mécanismes qui peuvent générer des variations génétiques dans le monde bactérien :

III.2.1- Transfert des gènes

Les bactéries peuvent échanger des gènes ; ce qui représente une forme de sexualité primitive, mais également un processus adaptatif très efficace qui permet d'incorporer de l'ADN exogène. Elles disposent pour cela de plusieurs mécanismes tels que la conjugaison, la transduction et la transformation (Lévêque et Mounoulou, 2001).

III.2.2- Les mutations

Elles correspondent aux changements de base dans la structure des molécules d'ADN modifiant l'information génétique portée par les gènes. Elles peuvent entraîner la perte totale d'une information et la suppression de la protéine codée par le gène muté ou une altération de la structure de cette protéine. Dans toute population microbienne il existe des individus, les mutateurs, qui entretiennent constamment une grande diversité dans leur descendance (Lévêque et Mounoulou, 2001).

III.2.3- La transposition

Les éléments transposables ou transposons constituent une autre cause essentielle de variation. Ce sont des séquences du génome qui sont mobiles ; elles sont capables de se transposer d'un endroit génomique à un autre à l'aide de transposasses. Ils provoquent des réarrangements génomiques tels que l'inversion, la translocation, la duplication, la délétion et l'insertion. Dans le monde bactérien, les types d'éléments transposables communs sont les transposons (TN) et les séquences d'insertions (IS) (Singleton, 1994).

III.2.4- La recombinaison homologue

Elle signifie l'échange génétique entre des séquences homologues. Cela induit des variations dans les séquences des gènes existants plutôt qu'introduire de nouvelles informations génétiques dans le génome. Les deux types de recombinaisons homologues : le crossing-over qui est une recombinaison réciproque et la conversion du gène qui est une recombinaison non réciproque. C'est la séquence d'ADN d'un segment du chromosome qui est remplacée par une séquence homologue d'un autre chromosome (Lewin, 1992).

III.3- Polymorphisme et marqueurs génétiques

On utilise le terme polymorphisme pour désigner l'existence d'une variation discontinue (chaque type étant une morphe) au sein d'une population (Harry, 2001). À l'intérieur d'une population les individus ont un génotype légèrement différent. Ce polymorphisme génétique peut être quantifié sous forme de fréquences alléliques qui sont variables d'une population à l'autre et peuvent évoluer dans le temps (Lévêque et Mounoulou, 2001).

On appelle un marqueur génétique tout marqueur biochimique, chromosomique ou moléculaire qui permet de révéler un polymorphisme. Le développement de la biochimie des

protéines, de l'enzymologie et de l'immunologie puis de la biologie moléculaire du gène ont permis d'avoir accès soit au produit du gène, la chaîne peptidique, soit à la séquence du gène lui-même, aussi dans bien des cas, l'analyse biochimique des protéines ou moléculaire du gène donne accès à des polymorphismes sans traduction perceptible à l'échelle morphologique ou physiologique et permet de percevoir, à cette échelle, un polymorphisme génétique non perceptible à l'échelle de l'organisme (Serre, 2006). L'identification de formes de polymorphismes dans les espèces peut aider à comprendre leurs distributions et leur évolution historique et aussi bien leur mécanisme d'interaction et leurs co-évolutions avec les autres espèces (De Moraes *et al.*, 2007).

III.3.1- Les marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs à avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique (Harry, 2001). En 1966 deux avancées, l'une conceptuelle et l'autre technologique, ont permis d'appréhender pour la première fois la variabilité génétique. En effet l'étude des gènes pouvait être faite de façon indirecte au travers de l'étude de la séquence des acides aminés codés par ces gènes. En partant du principe que toute variation de la séquence d'acide aminé reflète une variation au niveau du gène codant pour cette protéine. L'avancée technologique repose sur la mise au point de l'électrophorèse des protéines (Harry, 2001).

Deux approches différentes d'études électrophorétiques de protéines sont employées dans les études bactériennes (Kerstens et De Ley, 1975) :

- Approche par étude des protéines dites "totales": électrophorèse en gel de polyacrylamide d'un extrait cellulaire de protéines solubles ou solubilisées par traitement au SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate), avec une coloration permettant de faire apparaître toutes les protéines contenues dans l'extrait.
- Approche par étude particulière d'un ou plusieurs enzymes : électrophorèse en gel d'amidon ou d'agarose ou de polyacrylamide ou de polyacrylamide-agarose, d'un extrait cellulaire de protéines, soumis à une coloration spécifique d'un enzyme choisi.

La MLEE et l' SDS-PAGE sont des techniques très sensibles qui peuvent mettre en évidence les relations intraspécifiques (Vandamme *et al.*, 1996). C'est à partir de 1978 seulement que les techniques de détection des variations génétiques par comparaison des profils isoenzymatiques ont été étendues aux populations bactériennes (Selander *et al.*, 1986).

Les isoenzymes constituent de multiples formes moléculaires de la même enzyme qui catalysent la même réaction dans la cellule. Elles se distinguent les unes des autres par des propriétés de détail, notamment par leurs coefficients cinétiques, leur spécificité, parfois par leur stabilité ou leur sensibilité de certains inhibiteurs (Pelmont, 1995). Le terme isoenzyme est généralement utilisé pour désigner plusieurs formes moléculaires dérivées de loci génétiques différents ; cependant le terme alloenzyme ou allozyme désigne plusieurs formes moléculaires dérivées de différents allèles situés dans le même loci génétique (Manchanko, 2003). Les séquences nucléotidiques codant une protéine équivalente partagent communément 40 à 100 % d'identité entre elles (Boivin-Masson *et al.*, 2006).

Les multiples formes moléculaires d'une enzyme sont causées par trois facteurs principaux qui sont :

- la présence de plus d'un locus de gène qui code l'enzyme,
- la présence de plus d'un allèle dans le même locus qui code l'enzyme,
- les modifications post-traductionnelles qui sont les résultats d'une formation non génétique (Manchanko, 2003). Les isoenzymes générées par les changements post-traductionnelles sont appelées isoenzymes secondaires.

III.3.1.1- Les applications de la MLEE

L'utilisation de cette technique permet l'analyse souple des préparations enzymatiques non épurées, incluant :

- la détection et l'identification des protéines enzymatiques et leurs isoenzymes.
- l'examen des propriétés fonctionnelles des isoenzymes sur le gel.
- l'examen de l'expression spatiale et temporelle et la localisation des isoenzymes.
- la discrimination entre des différents enzymes par leurs similarités et leurs recouvrements de la spécificité du substrat.
- l'identification des protéines enzymatiques qui ont une large spécificité de substrat, ce qui démontre plusieurs fonctions catalytiques distinctes.
- la détermination de la structure des sous-unités des molécules enzymatiques.
- la détermination du poids moléculaire des différentes isoenzymes par la combinaison avec la technique SDS-PAGE.

Ces exemples démontrent l'importance mais pas la totalité des applications de l'électrophorèse des enzymes dans les investigations protéomiques (Manchanko, 2003)

III.3.1.2- Facteurs influençant la MLEE

Il y a des facteurs qui empêchent la réaction enzymatique de s'effectuer correctement car les conditions de son déroulement ne sont pas remplies (pH, force ionique, présence d'ions) et les inhibiteurs proprement dits dus à la présence d'un composé chimique n'entrant pas normalement dans les réactions enzymatiques et qui en bloquent le fonctionnement. (Pasteur *et al.*, 1987). De nombreux facteurs étrangers, plus ou moins accidentels, peuvent modifier profondément la vitesse de la réaction enzymatique et la stabilité de l'enzyme. Il s'agit de l'oxygène dissous, de la lumière (par formation de radicaux libres) ou des impuretés contenues dans les produits commerciaux ou dans l'eau distillée de laboratoire. Une cause fréquente de la perte de l'activité dans un extrait cellulaire est sa destruction par des protéases (Pelmont, 1995).

Les dénaturants comme les inhibiteurs se traduisent sur le gel par l'absence de certains isoenzymes. Certains isoenzymes étant plus sensibles aux agents dénaturants que d'autres, il est alors possible d'utiliser ces propriétés pour classer les molécules séparées par électrophorèse. L'urée ou le mercaptoéthanol agissent sur la structure quaternaire des molécules protéiques. L'addition de ces composées, dans les extraits ou dans les gels d'électrophorèse, affectera donc uniquement les molécules ayant une structure quaternaire, laissant les autres intactes (Pasteur *et al.*, 1987). Le SDS affecte les liaisons de la structure tertiaire des protéines, or certains sont capables de retrouver spontanément leur structure et donc leur activité, quand on supprime le SDS, d'autres non : C'est cette propriété qui est mise à profit pour faire « disparaître » certains systèmes isoenzymatiques. (Pasteur *et al.*, 1987).

III.3.1.3- Les limites de la MLEE

Cette technique ne détecte pas l'intégralité des polymorphismes biochimiques existants telles que les différences qui sont présentes aux niveaux des introns. Elle ne s'intéresse qu'aux produits de synthèse des gènes de structures (Pasteur *et al.*, 1987).

Un nombre limité, seulement, d'enzymes représentatives peut être évalué par cette technique (Selander *et al.*, 1986).

Dans le cas de deux protéines de même taille, le remplacement d'un acide aminé par un autre de charge équivalente dans l'une d'elles, donne bien sûr une mobilité électrophorétique identique, bien que la séquence nucléotidique qui les détermine soit différente. C'est la variabilité cachée ou le polymorphisme cryptique (Pasteur *et al.*, 1987).

L'étude de la biodiversité des rhizobiums permet de caractériser leur structure génétique. La connaissance de cette base génétique de départ et de sa diversité permettra d'orienter les stratégies d'amélioration à entreprendre. De même, l'analyse de la biodiversité permet de différencier et de classer (taxonomie) les ressources génétiques disponibles dans un but de conservation aussi bien chez les rhizobiums que chez d'autres micro-organismes du sol (Prin *et al.*, 1993).

Matériel d'étude

I- Isolement des bactéries à partir des nodules

I.1- La collecte des nodules

La collecte des nodules est faite à partir de quatre espèces de légumineuses différentes qui sont *Hedysarum coronarium* (Sulla), *Trifolium campestre* (trèfle), *Vicia faba major* (la fève), *Vicia sativa* L (la vesce commune). L'échantillonnage a été réalisé au niveau du périmètre du Campus universitaire (Chaab Er Sas) pour *Hedysarum coronarium* et *Vicia sativa* L, et la région de Zighoud Youssef pour *Vicia faba major* et *Trifolium campestre*.



Hedysarum coronarium



Vicia faba major



Trifolium campestre



Vicia sativa L

La collecte est réalisée suivant la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran (1994) qui consiste à :

- creuser à environ 15 cm autour de la plante et à 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire.
- essayer d'enlever soigneusement le sol lié au niveau des racines en faisant attention à ne pas abîmer les nodules.
- placer délicatement la plante dans un sachet de plastique.
- laver délicatement au laboratoire les racines et les nodules sous l'eau courante.
- détacher les nodules à 1-2 mm du site d'attache, les rincer, puis les sécher avec du papier filtre.

I.2- La conservation des nodules

En vue d'un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C pour une durée qui ne dépasse pas les 48h après leur séparation des racines de la plante alors que pour une longue conservation la dessiccation des nodules est recommandée. Elle est réalisée dans des flacons en verre contenant un déshydratant tel que CaCl_2 (Figure 2). Le flacon en verre est rempli au quart de son volume par du CaCl_2 et par une couche de coton sur laquelle sont déposés les nodules. Ainsi les nodules peuvent être conservés de 6 à 12 mois.

Chaque flacon est identifié et portera :

- le nom de la plante hôte.
- la date et lieu de prélèvement.
- la date de la mise en conservation.

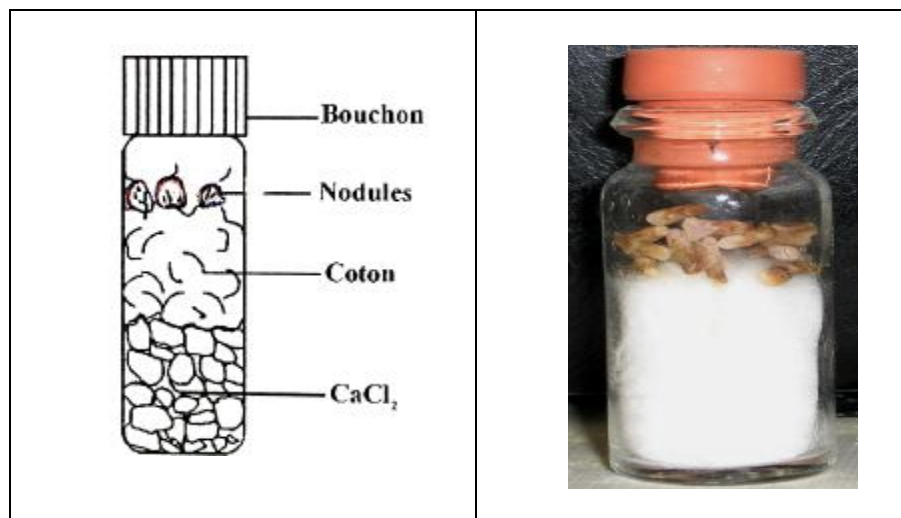
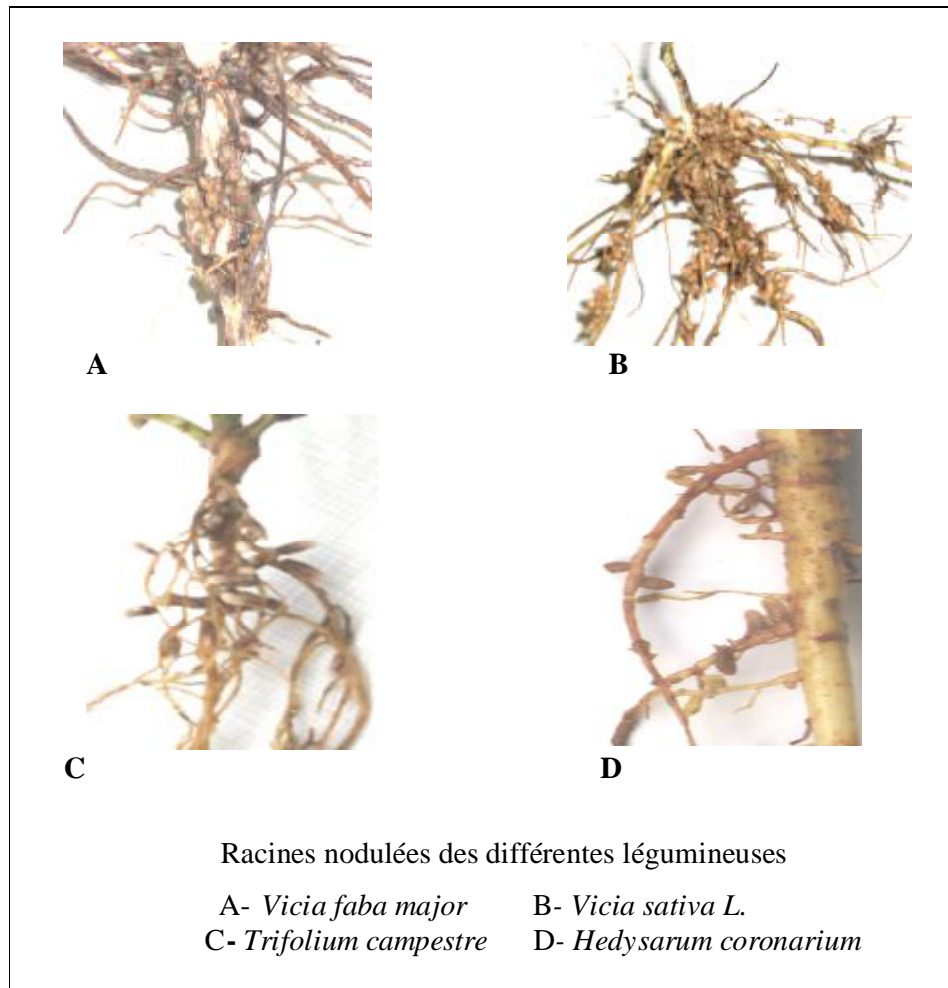


Figure 2: Conservation des nodules (Vincent, 1970).



I.3- Isolement des bactéries

Les nodules fraîchement lavés sont détachés de la racine à l'aide d'une pince et utilisés directement alors que ceux qui seront conservés par dessiccation sont réhydratés durant une nuit au réfrigérateur dans de l'eau distillée, puis laissés pendant une heure à température ambiante (Vincent, 1970 ; Somasegaran, 1994).

I.3.1- Stérilisation des nodules

Les nodules sont immergés pendant 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 95% puis transférés immédiatement dans du chlorure de mercure (HgCl_2) acidifié à 0,1% pendant 3 minutes. La stérilisation est suivie directement par un abondant rinçage ; les nodules sont rincés 10 fois à l'eau distillée et laissée dans un flacon d'eau distillée, toujours, pendant une heure après le dernier rinçage (Vincent, 1970).

Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules.

I.3.2- Isolement selon la méthode du nodule écrasé

L'isolement est réalisé selon la technique de Vincent (1970).

- Les nodules stériles sont déposés séparément dans une boîte de pétri stérile ; chacun est immergé par 2 à 3 gouttes d'eau distillée.
- Les nodules sont écrasés avec une pince stérile par immersion dans l'éthanol et flambage au bec bunsen.
- A l'aide d'une anse de platine, le broyat du nodule est prélevé et ensemencé sur des boîtes de pétri contenant le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) + rouge Congo (Annexe 2).

L'ensemencement est réalisé selon la technique des quadrants (Figure 3) de manière à isoler des simples colonies. Les boîtes de pétri sont incubées pendant 24 à 48 heures à 30°C.

L'utilisation d'un milieu gélosé au cours de la phase d'isolement permet de différencier chaque isolat issu d'un même nodule, de localiser et d'éliminer les éventuels contaminants, ce qui est impossible avec un milieu liquide.

Les colonies ayant absorbé peu de colorant sont séparées des autres fortement colorées (les contaminants).

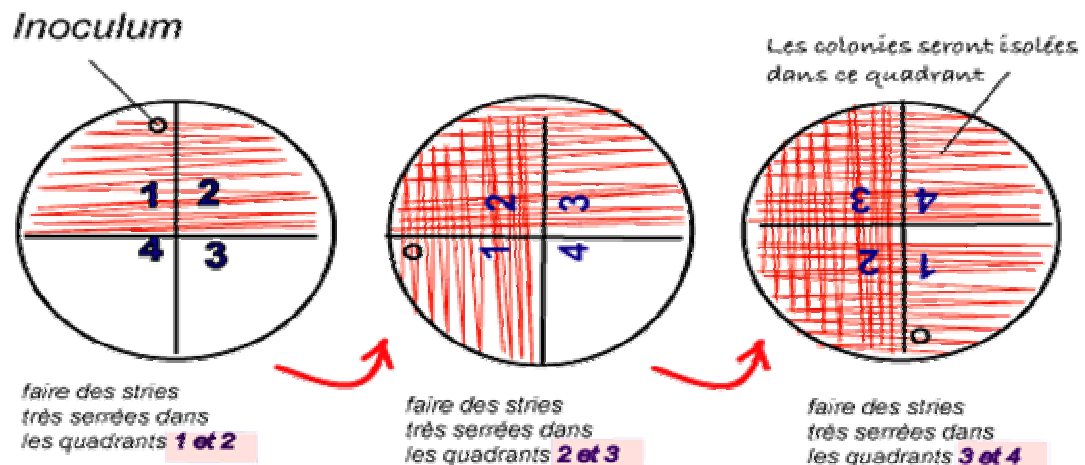


Figure 3 : Isolement en quadrants.

II- Caractères morphologiques et culturels des isolats

Ces caractères sont :

- la forme, l'aspect et la couleur des colonies.
- la croissance sur le milieu YMA (Yeast mannitol agar).
- la croissance sur le milieu YMA+ RC (Yeast mannitol agar + rouge Congo).
- la croissance sur le milieu YMA+ BTB (Yeast mannitol agar + bleu de bromothymol).
- la croissance sur le milieu GPA+BCP (Glucose peptone agar + pourpre de bromocrésol).

La composition des différents milieux : YMB, YMA, YMA+ rouge congo, YMA+ BTB, GPA+BCP (Annexe 2). Toutes les souches sont ensemencées dans des tubes à essai contenant 9 ml du milieu YMB. Après ensemencement ces tubes sont placés dans un bain-marie agitateur à 28 °C pendant 24 heures. L'ensemencement sur milieux solides se fait à partir de cette culture de YMB sur les différents milieux YMA, YMA+BTB, GPA+BCP selon la méthode des quadrants puis incubation dans une étuve à 30° pendant 24 H.

- Examen microscopique de la coloration de Gram

A partir des cultures YMB de chaque souche, on prépare des lames pour la coloration. La préparation est étalée en couche mince sous la hotte, le protocole expérimental consiste à :

- recouvrir la lame par le violet de gentiane et laisser agir pendant 1 minute.
- verser sur la lame la solution iodée et laisser agir pendant 30 secondes.
- incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte l'alcool acétone.
- laver à l'eau distillée.
- recolorer avec de la fuschine et laisser agir 1 minute.
- laver à l'eau distillée.
- observer au microscope.

- La conservation des isolats

La conservation des souches isolées se fait sur le milieu YMA+CaCO₃. On y ajoute 3g de CaCO₃ au milieu YMA ; le mélange est porté à ébullition afin de permettre la dilution du CaCO₃. On met 10ml de ce mélange dans des tubes en verre qui seront autoclavés à 120°C pendant 20 mn. À leur sortie de l'autoclave, les tubes sont inclinés en laissant un culot au fond des tubes. L'ensemencement se fait à partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle en milieu YMB. Des stries sont effectuées sur la surface de la gélose inclinée. Après une incubation de 03 jours à 30°C, les tubes sont conservés au réfrigérateur à 4°C. Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent, 1970).

Tableau 2 : Les souches utilisées dans cette étude

N ° Souche	Plante hôte	Site d'isolement
F1	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F2	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F3	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F4	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F5	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F6	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F7	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F8	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F9	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
F10	<i>Vicia faba major</i>	Zighroud Youssef
H1	<i>Hedysarum coronarium</i>	Chaab Er Sas
H2	<i>Hedysarum coronarium</i>	Chaab Er Sas
H3	<i>Hedysarum coronarium</i>	Chaab Er Sas
H4	<i>Hedysarum coronarium</i>	Chaab Er Sas
H5	<i>Hedysarum coronarium</i>	Chaab Er Sas
H6	<i>Hedysarum coronarium</i>	Chaab Er Sas
H7	<i>Hedysarum coronarium</i>	Chaab Er Sas
T1	<i>Trifolium campestre</i>	Zighroud Youssef
T2	<i>Trifolium campestre</i>	Zighroud Youssef
T3	<i>Trifolium campestre</i>	Zighroud Youssef
T4	<i>Trifolium campestre</i>	Zighroud Youssef
T5	<i>Trifolium campestre</i>	Zighroud Youssef
T6	<i>Trifolium campestre</i>	Zighroud Youssef
T7	<i>Trifolium campestre</i>	Zighroud Youssef
V1	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
V2	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
V3	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
V4	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
V5	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
V6	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
V7	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
V8	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
V9	<i>Vicia sativa L.</i>	Chaab Er Sas
A6 : <i>Rhizobium sullae</i> sp.nov RHA6 - souche de référence.		
Tr : <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>trifolli</i> 843 - souche de référence.		
Vr : <i>Rhizobium leguminosarium</i> bv. <i>viciae</i> 1003 - souche de référence.		

III- Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

De faibles différences caractérisent des souches pouvant être déterminés par des méthodes très fines comme l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS ou SDS-PAGE (Ndiaye *et al.*, 2002). Cette technique de l'électrophorèse, utilisée depuis plusieurs années dans la systématique microbienne est très sensible et donne surtout des informations sur l'analogie des souches qui se trouvent dans les mêmes genres, espèces ou sous-espèces (Ndoye, 2000). Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Laemmli (1970) (Annexe 3).

Principe

C'est un système discontinu qui consiste en deux gels contigus mais distincts : le gel de séparation ou gel de résolution (inférieur) et le gel de concentration ou gel d'empilement (supérieur). Ils diffèrent par le pH, la porosité et la force ionique.

A la différence des systèmes électrophorétiques qui ne contiennent pas de détergents ioniques, dans lesquels la migration d'une protéine dépend de la dimension moléculaire et de la charge ; dans cette technique la protéine réagit avec un détergent anionique, le sodium dodecylsulfate, pour former des complexes chargés négativement. La quantité du SDS par protéine et la charge du complexe est rudement proportionnel à sa taille, généralement de 1.4 g SDS/g de protéine. Les protéines sont généralement dénaturées et solubilisées par cette association. Les protéines acides ou basiques forment alors des complexes chargés négativement (Walker, 1994). La densité des charges est pratiquement identique, la vitesse de migration des polypeptides est alors inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire car elles sont d'autant plus freinées qu'elles sont volumineuses. Cette migration se fait sur une matrice de polyacrylamide (Walker, 1994).

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 (Ndoye, 2000 ; Ndiaye *et al.*, 2002). Chaque bande d'un profil électrophorétique est composée de plusieurs protéines de structure différente mais de mobilité identique (Ndoye, 2000). La séparation permet généralement de distinguer deux protéines dont les masses respectives diffèrent de 2% (Bernot, 2001). La croissance de chaque souche bactérienne, sous les mêmes conditions, produit un profil électrophorétique constant qui présente un marqueur qui peut être utilisé pour la comparaison (Kerstern et De ley, 1975).

IV- Détermination des profils enzymatiques par la MLEE

Cette technique analyse les variations de mobilité des enzymes. Elle implique le regroupement des bactéries suivant cette mobilité électrophorétique (Selander *et al.*, 1986 ; Flint *et al.*, 1996)

Principe

Elle permet d'étudier les variations de mobilité électrophorétique pour une protéine de même fonction enzymatique entre différents organismes. Cette mobilité est due à la charge globale de l'enzyme, laquelle est résultante de la charge élémentaire de chaque acide aminé. La mobilité reflète donc la structure primaire de la protéine (Hide, 2004). Les changements dans la composition des acides aminés changent la charge, en produisant de cette façon un changement dans la mobilité électrophorétique de la protéine qui reflète donc, directement des mutations et des changements dans la séquence de l'ADN du gène de structure pour cette protéine (de Moraes *et al.*, 2007 ; Brisabois, 2001 ; McInnes *et al.*, 2004) ou des modifications post-traductionnelles au niveau de la structure de la protéine (Pasteur *et al.*, 1987).

La variation de la mobilité électrophorétique d'une enzyme est interprétée comme la représentation des produits des différents allèles dans des locus spécifiques qui codent pour cette enzyme (McInnes *et al.*, 2004 ; Stephens *et al.*, 2004 ; Selander *et al.*, 1986).

A ce tri moléculaire fait suite une révélation enzymatique effectuée dans le support lui-même grâce à des techniques dérivées de l'histochemie et utilisant les propriétés catalytiques de l'enzyme recherchée. La réaction consiste à faire catalyser par l'enzyme, en lui fournissant un substrat naturel ou artificiel, l'apparition d'un produit terminal coloré et insoluble ; il se forme alors une ou plusieurs bandes colorées correspondant à l'emplacement des enzymes sur le gel qualifiées, désormais, de zymogrammes (Manchanko, 2003). Dans ce modèle, les zymodèmes (isolats présentant un profil isoenzymatique commun) sont assimilables à des clones ou à des familles de clones étroitement apparentées (Brenière *et al.*, 1991).

L'électrophorèse multilocus des enzymes et probablement une des meilleures approches dans les études à grande échelle de l'estimation de la diversité génétique et de l'apparenté structurelle des populations (Selander *et al.*, 1986). C'est une technique largement utilisée pour la caractérisation des différents groupes bactériens, y compris les rhizobia (Rinaudo *et al.*, 1993). Plusieurs études sur les rhizobiums ont utilisé cette technique pour différencier les types de souches dans les populations, communautés et diverses souches de collections (Mc Innes *et al.*, 2004).

- Analyse statistique

Le calcul des indices de ressemblances (IRS) a été utilisé pour l'appréciation du polymorphisme des protéines totales. Pour l'étude du polymorphisme enzymatique, on a utilisé la méthode de parcimonie de Wagner (Annexe 5).

I- Etude préliminaire : étude morphologique et culturale des isolats

Les résultats de l'étude morphologique et culturale des isolats, sont rassemblés dans le tableau 3.

Tableau 3: Résultats de l'étude morphologique et culturale des isolats

	Les souches V	Les souches H	Les souches F	Les souches T
Croissance sur milieu YMA	Croissance après 24 h. Colonies circulaires avec un diamètre de 2 à 4 mm, de couleur blanche ou laiteuse, lisse, brillante avec une texture translucide.	Croissance après 24 h. Colonies circulaires avec un diamètre de 2 à 4 mm, de couleur blanche ou laiteuse, lisse, brillante avec une texture translucide.	Croissance après 24 h. Colonies circulaires avec un diamètre de 2 à 4 mm, de couleur blanche ou laiteuse, lisse, brillante avec une texture translucide.	Croissance après 24 h. Colonies circulaires avec un diamètre de 2 à 4 mm, de couleur blanche ou laiteuse, lisse, brillante avec une texture translucide.
Croissance sur milieu YMA contenant le rouge Congo	Les isolats n'absorbent pas le rouge Congo	Les isolats n'absorbent pas le rouge Congo	Les isolats n'absorbent pas le rouge Congo	Les isolats n'absorbent pas le rouge Congo
Croissance sur milieu GPA contenant le pourpre de bromocrésol	Peu ou pas de croissance et sans changement de couleur.	Peu ou pas de croissance et sans changement de couleur.	Peu ou pas de croissance et sans changement de couleur.	Peu ou pas de croissance et sans changement de couleur.
Croissance sur milieu YMA contenant le bleu de bromotymol	Apparitions des colonies avec virage du milieu de culture du vert au jaune.	Apparitions des colonies avec virage du milieu de culture du vert au jaune.	Apparitions des colonies avec virage du milieu de culture du vert au jaune.	Apparitions des colonies avec virage du milieu de culture du vert au jaune.
Observation microscopique	Cellules en forme de bâtonnets courts, Gram négatif.	Cellules en forme de bâtonnets courts, Gram négatif.	Cellules en forme de bâtonnets courts, Gram négatif.	Cellules en forme de bâtonnets courts, Gram négatif.

- La croissance sur milieu YMA contenant le rouge Congo : les isolats n'absorbent pas le rouge Congo contrairement au contaminant qui l'absorbe et qui présente une couleur rouge.
- Sur le milieu GPA contenant le pourpre de bromocrésol, il n'y a pas de changement de couleur, les isolats ne changent pas alors le pH, contrairement au contaminant qui change la

couleur du milieu du violacé en jaune (Ce milieu est généralement utilisé comme milieu de purification pour les *Rhizobia*).

- Pour les cultures sur milieu YMA contenant le bleu de bromotymol ; il y a apparitions des colonies avec virage du milieu de culture du vert au jaune, indiquant une production d'acide ; ce qui confirme que les isolats sont à croissance rapide.

Ces caractères morphologiques et culturaux sont typiques des *Rhizobia* à croissance rapide (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

II- Etude du polymorphisme des protéines totales

Le problème de la reconnaissance des souches bactériennes n'est pas nouveau. Différentes tentatives ont été rapportées depuis plusieurs années pour le résoudre ; la plupart des tests présentent malheureusement plusieurs inconvénients. Leur spécificité est faible car ils permettent de distinguer des classes et non des souches uniques.

Par conséquent, pour palier aux inconvénients signalés ci-dessus, il semble nécessaire de faire appel à des propriétés biochimiques et physico-chimiques de certains constituants et tout particulièrement des protéines. La structure de celles-ci qui, apparaît étroitement associée au patrimoine héréditaire, peut en effet constituer un véritable marqueur génétique exploitable pour des essais d'identification de genres, d'espèces ou de souches. Il est bien démontré maintenant qu'une souche bactérienne est caractérisée par l'électrophorogramme de ses protéines.

Nous nous intéressons tout d'abord à l'étude de l'identification proprement dite de toutes les souches. Après quoi et compte tenu des résultats, nous poursuivrons cette étude par l'appréciation de la diversité des souches pour chaque légumineuse.

II.1- Identification des rhizobiums par le polymorphisme des protéines

L'application de l'électrophorèse selon Laemmli (1970), telle que nous avons pu la réaliser, ne nous a pas fourni des diagrammes satisfaisants (manque de reproductibilité, déformations des bandes, traînées et séparation peu nette des protéines). Des modifications de la concentration en acrylamide du gel de séparation ont été apportées.

Cette méthode est réalisée sur des gels de 1.5 mm d'épaisseur. Elle permet d'obtenir une meilleure résolution des protéines avec une bonne reproductibilité.

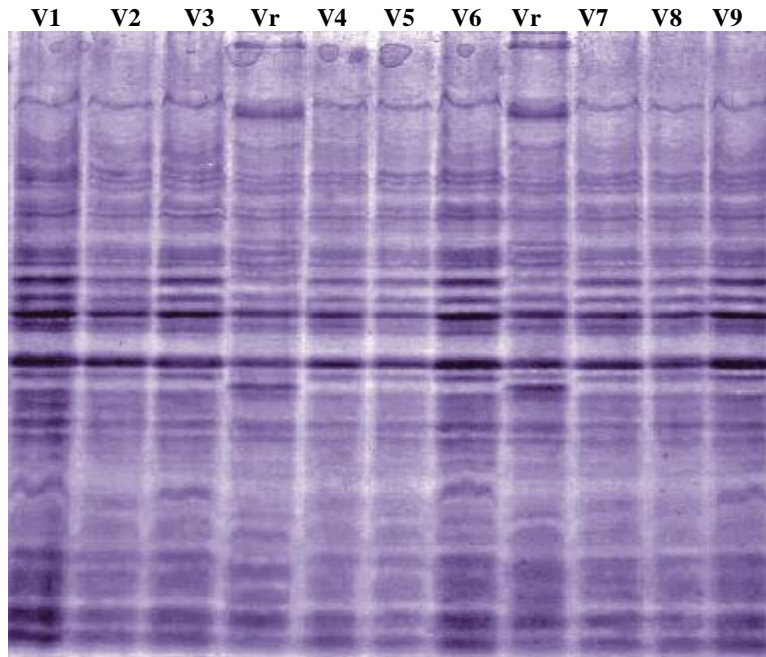


Figure 4: Profils protéiques des différentes souches isolées de *Vicia Sativa L* avec Vr la souche de référence.

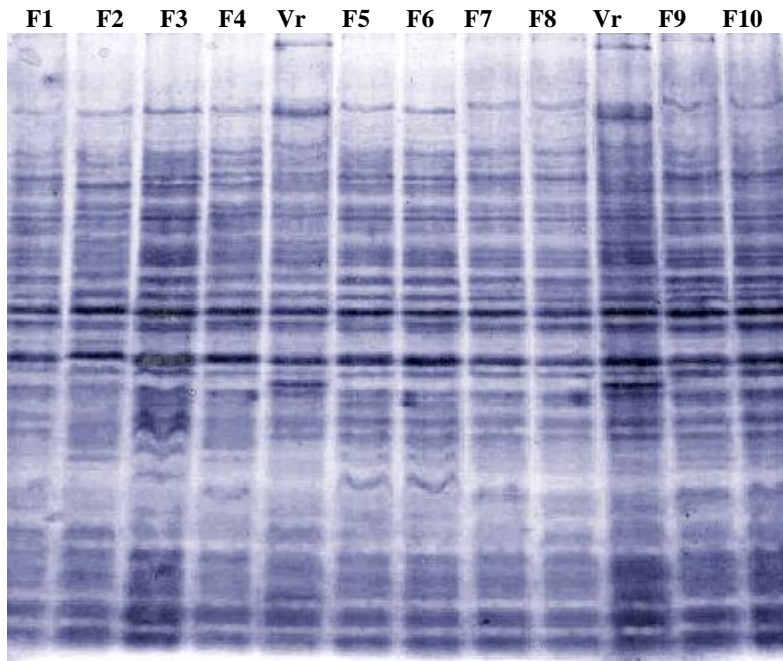


Figure 5: Profils protéiques des différentes souches isolées de *Vicia Faba major* avec Vr la souche de référence.

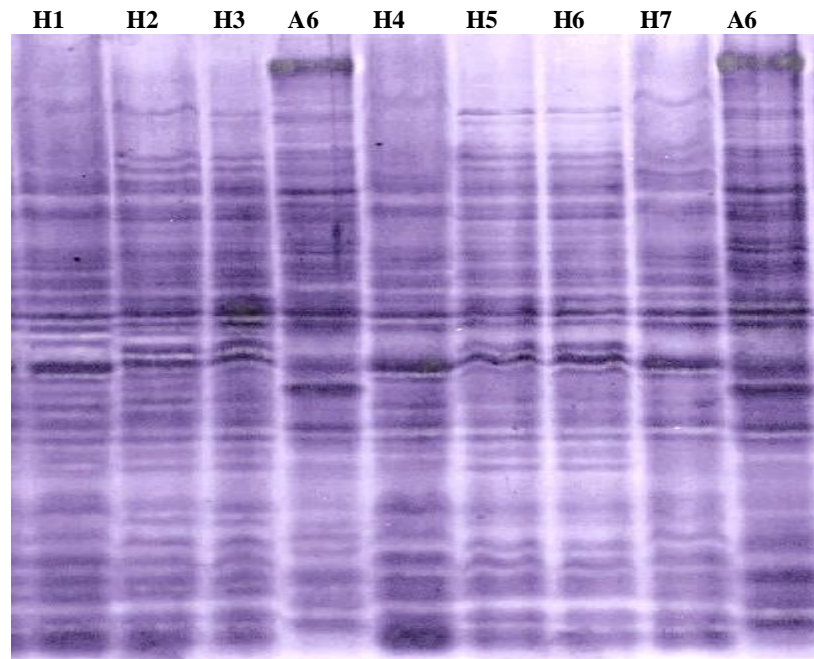


Figure 6: Profils protéiques des différentes souches isolées d'*Hedysarum coronarium* avec A6 la souche de référence.

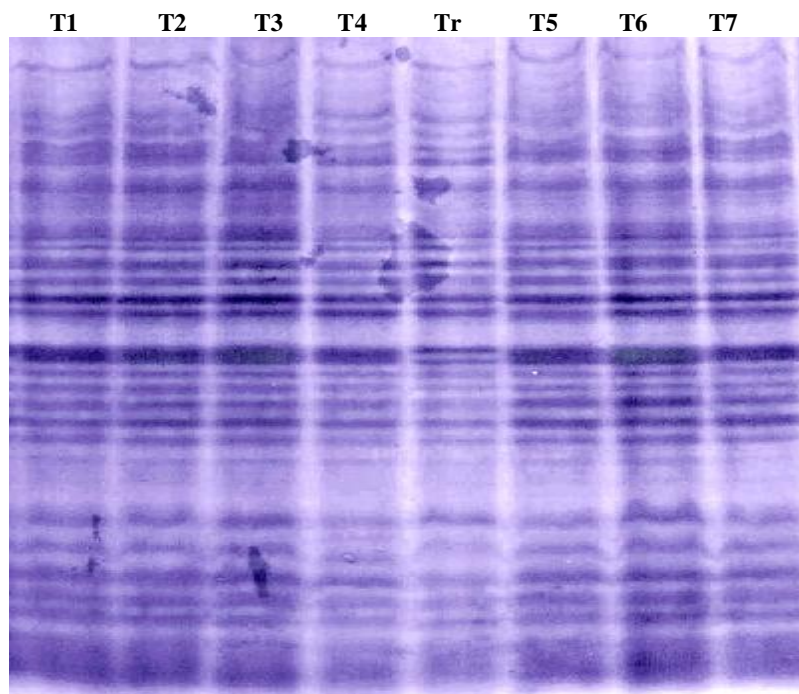


Figure 7: Profils protéiques des différentes souches isolées de *Trifolium compestre* avec Tr la souche de référence.

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité (en mm) entre le point d'application de l'échantillon et la position de la bande correspondante dans le gel.

Les mobilités relatives des différents composants révélés par SDS-PAGE sont calculées à l'aide d'une bande témoin commune à toutes les souches analysées jusqu'ici. Il s'agit d'un composant majeur auquel on a convenu d'attribuer la mobilité 51 pour les souches de *Vicia faba major* et les souches de *Vicia sativa L* et la mobilité 49 pour les souches de *Hedysarum coronarium* et les souches de *Trifolium compestre*. L'ensemble des composants des diagrammes se situe alors dans une zone de mobilité comprise entre 3 et 136 (Tableaux 4-5-6 et 7).

Cette méthode permet d'obtenir l'ensemble des protéines; on distingue trois groupes de bandes avec des mobilités différentes :

- Groupe des bandes lentes : mobilité de 3 à 45
- Groupe des bandes intermédiaires : mobilité de 45 à 100
- Groupe des bandes rapides : mobilité de 100 à 136

Nous rapportons aux tableaux n° 4-5-6 et 7 les diagrammes types pour toutes les souches de rhizobiums (1: Présence de la bande, 0: absence de la bande avec en première colonne la distance de migration de la bande polypeptidique).

Ces diagrammes renferment selon les souches 30 à 40 bandes électrophorétiques décelables. On constate aussi que les diagrammes des protéines totales présentent de nettes différences à la fois qualitatives et quantitatives.

Un tel ensemble de résultats peut être alors exploité en estimant le degré de différence (ou d'analogie) entre les diagrammes des souches considérés deux à deux.

Tableau 6 : Diagrammes types des souches d'*Hedysarum coronarium*.

	H1	H2	H3	A6	H4	H5	H6	H7	A6
08	0	0	0	1	0	0	0	0	1
15	0	0	1	1	0	0	0	0	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	0	0	0	1	0	1	1	0	1
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	0	0	0	1	0	0	0	0	1
42	1	1	1	0	1	1	1	1	0
47	0	0	1	1	0	0	0	1	1
49	1	1	1	1	1	1	1	1	1
52	0	0	1	1	1	0	0	0	1
54	1	1	1	1	1	1	1	1	1
56	1	1	1	0	1	1	1	1	0
57	0	0	0	1	0	0	0	0	1
58	1	1	1	1	1	1	1	1	1
62	1	1	1	1	1	1	1	1	1
65	1	1	1	1	1	1	1	1	1
67	0	1	1	0	0	0	0	0	0
68	1	0	0	0	0	0	0	0	0
71	0	1	1	0	0	1	1	0	0
74	1	1	1	1	1	1	1	1	1
78	1	1	1	1	1	1	1	1	1
80	1	1	1	1	1	1	1	1	1
84	1	1	1	1	1	1	1	1	1
88	1	1	1	1	1	1	1	1	1
90	1	1	1	1	1	1	1	1	1
92	1	1	1	1	1	1	1	1	1
94	1	1	1	1	1	1	1	1	1
97	1	1	1	1	1	1	1	1	1
103	1	0	0	0	1	0	0	1	0
105	1	1	1	1	1	1	1	1	1
107	0	1	1	0	1	1	1	1	0
108	0	0	0	1	0	0	0	0	1
113	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116	0	0	0	1	0	0	0	0	1
118	1	1	1	0	1	1	1	1	0
121	1	1	1	1	1	1	1	1	1
124	1	1	1	0	1	1	1	1	0
126	0	0	0	1	0	0	0	0	1
128	1	1	1	0	1	1	1	1	0
130	0	0	0	1	0	0	0	0	1
133	1	1	1	0	1	1	1	1	0

II.2- Indices de similarité des diagrammes des souches

L'indice de similarité (ou indice de ressemblance) a été calculé selon la méthode de Dedio *et al.* (1969), en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un, au moins, des diagrammes des souches comparées. L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes d'une autres c'est-à-dire qu'ils ont la même mobilité.

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

Les valeurs de l'IRS sont rassemblées dans les tableaux N° 8-9-10 et 11. Des valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances et inversement, lorsque les diagrammes apparaissent très voisins. La plupart des souches reste différenciable car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative.

Indices de similarité des souches de Vicia sativa L. (Tableau 8).

Le calcul des indices de similarité montre que :

- Les valeurs de l'IRS varient entre 72 et 100%

Pour l'ensemble des souches on remarque des valeurs d'IRS très élevées 95-100% ce qui représente une grande similitude entre les souches.

- Quelques souches ont des indices de 100% ces souches sont V4-V2-V7-V8, V5, V9-V6.

- Par rapport à la souche de référence des similitudes moins élevées 72-76% ont été obtenus.

Tableau 8 : Indices de similarité des souches de *Vicia sativa L* selon les diagrammes électrophorétiques.

V1	V2	V3	Vr	V4	V5	V6	V7	V8	V9	
100	98	100	72	97	97	98	97	97	98	V1
	100	98	76	100	100	95	100	100	95	V2
		100	72	97	97	98	97	97	98	V3
			100	76	76	74	76	76	74	Vr
				100	100	95	100	100	95	V4
					100	95	100	100	95	V5
						100	95	95	100	V6
							100	100	95	V7
								100	95	V8
									100	V9

Indices de similarité des souches de Vicia faba major (Tableau 9).

Le calcul des indices de similarité des souches de *Vicia faba major* montre que :

- Les valeurs de l'IRS varient entre 72 et 100%.
- Pour l'ensemble des souches on remarque des valeurs d'IRS très élevées de 92 à 100%, ce qui représente une grande similitude entre les souches.
- Quelques souches ont des indices de 100%, F6-F5, F8-F7-F9-F10.
- Par rapport à la souche de référence des similitudes moins élevées 72-76 % ont été obtenues.

Tableau 9 : Indices de similarité des souches de *Vicia faba major* selon les diagrammes électrophorétiques.

F1	F2	F3	F4	Vr	F5	F6	F7	F8	F9	F10	
100	97	97	92	76	94	97	92	92	92	92	F1
	100	94	95	76	92	92	92	92	92	92	F2
		100	94	74	97	97	97	97	97	97	F3
			100	75	97	92	92	92	92	92	F4
				100	74	74	72	72	72	72	Vr
					100	100	94	94	94	94	F5
						100	94	94	94	94	F6
							100	100	100	100	F7
								100	100	100	F8
									100	100	F9
										100	F10

Indices de similarité des souches de Trifolium compestre (Tableau 10).

Le calcul des indices de similarité montre que :

- Les valeurs de l'IRS varient entre 70 et 100%
- Des valeurs d'IRS très élevées à la fois entre T1, T2, T3, T4, Tr : 83-100% et T5, T6, T7, 97-100% ce qui représente une grande similitude entre les souches.
- Quelques souches ont des indices de 100%, ces souches sont T1-T2-T3, T5-T7.

Tableau 10 : Indices de similarité des souches *Trifolium compestre* selon les diagrammes électrophorétiques.

T1	T2	T3	T4	Tr	T5	T6	T7	
100	100	100	91	91	78	76	78	T1
	100	100	91	91	78	76	78	T2
		100	91	91	78	76	78	T3
			100	83	77	70	77	T4
				100	71	75	71	Tr
					100	97	100	T5
						100	97	T6
							100	T7

Indices de similarité des souches d'*Hedysarum coronarium* (Tableau 11).

Le calcul des indices de similarité montre que :

- Les valeurs de l'IRS varient entre 65 et 100%
- Entre les différentes souches, des valeurs élevées 79-100% ont été obtenues.
- Quelques couples ont des indices de 100%, ces souches sont H6-H5.
- Par rapport à la souche de référence des similitudes moins élevées 65-70 %, ont été obtenues.

Tableau 11 : Indices de similarité des souches d'*Hedysarum coronarium* selon les diagrammes électrophorétiques.

H1	H2	H3	A6	H4	H5	H6	H7	
100	86	79	65	89	86	86	91	H1
	100	92	67	89	94	94	89	H2
		100	70	87	87	87	85	H3
			100	67	69	69	65	A6
				100	86	86	95	H4
					100	100	91	H5
						100	91	H6
							100	H7

Conclusion

La comparaison des profils des protéines totales obtenus par électrophorèse en présence de SDS peut être fiable pour grouper un certain nombre de souches (Kersters *et al.*,1994).

Pour l'ensemble des souches étudiées, que ce soit les souches de *Vicia faba major*, les souches de *Trifolium compestre*, de *Vicia sativa L* et d'*Hedysarum coronarium*, on constate une similitude élevée entre les souches de chaque groupe. Cette similitude est moins élevée par rapport aux souches de référence.

III- Etude du polymorphisme des isoenzymes des rhizobiums

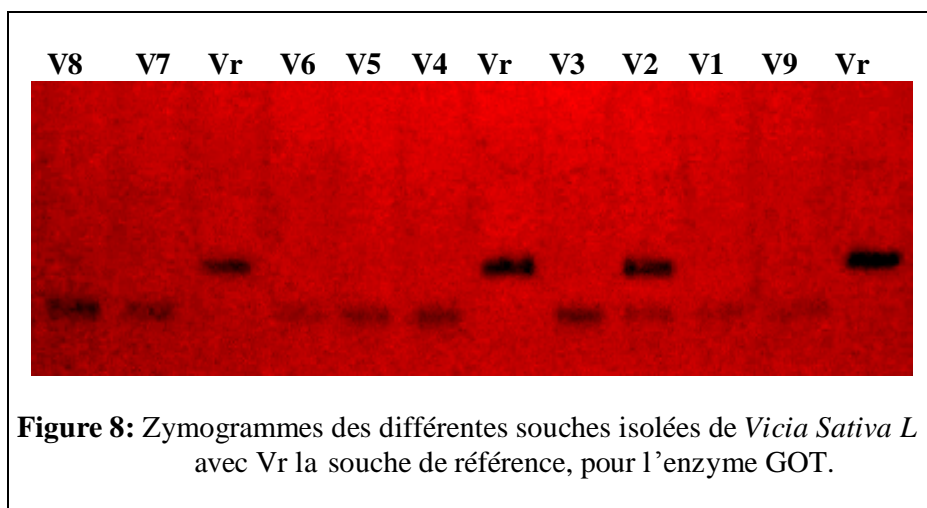
C'est la technique de Selander *et al.* (1986) (Annexe 4) qui a été utilisée pour estimer la diversité des systèmes enzymatiques.

L'interprétation des isoenzymes a été faite suivant le caractère "présence-absence" et non par une approche allélique.

Les profils isoenzymatiques sont lus comme suit : chaque bande est codée par un numéro en commençant par la bande la plus lente (notée 1). Les bandes communes à plusieurs souches sont, bien sûr, codées par les mêmes numéros. On obtient donc un code de type «1-3-4 » pour chaque souche. Cela implique le regroupement des bactéries suivant leur mobilité électrophorétique.

Chez les souches de Vicia Sativa L. on remarque que (Figure 8-9).

- Pour le GOT : les souches V1-V3-V4-V5-V6-V7-V8-V9 sont regroupées au niveau 2, la souche Vr est différente et se situe au niveau 1 et la souche V2, avec les niveaux 1-2, est elle aussi différente à la fois entre Vr et les autres souches.
- Pour l'ADH : les souches V1-V2-V4-V5-V6-V7-V8-V9 sont regroupées au niveau 3, la souche Vr est différente, au niveau 1 et la souche V3, avec les niveaux 2-3, est différente aussi à la fois entre Vr et les autres souches.



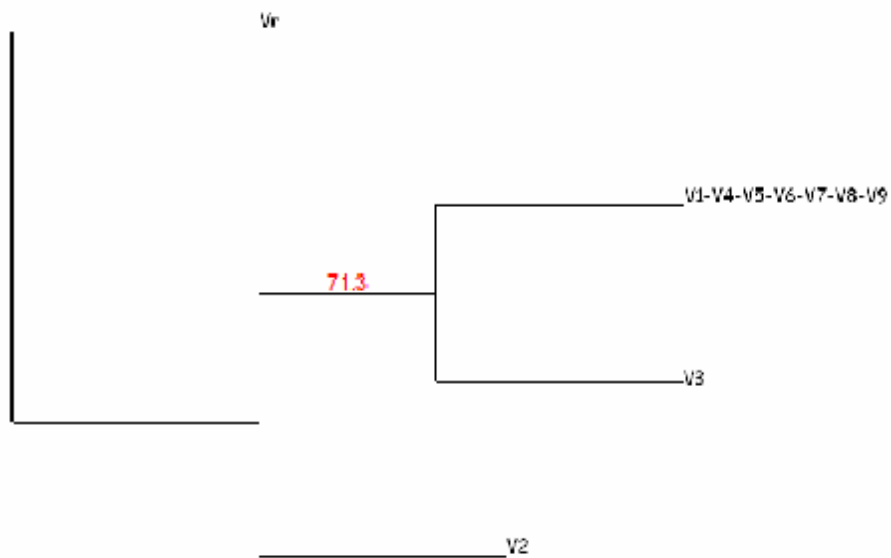
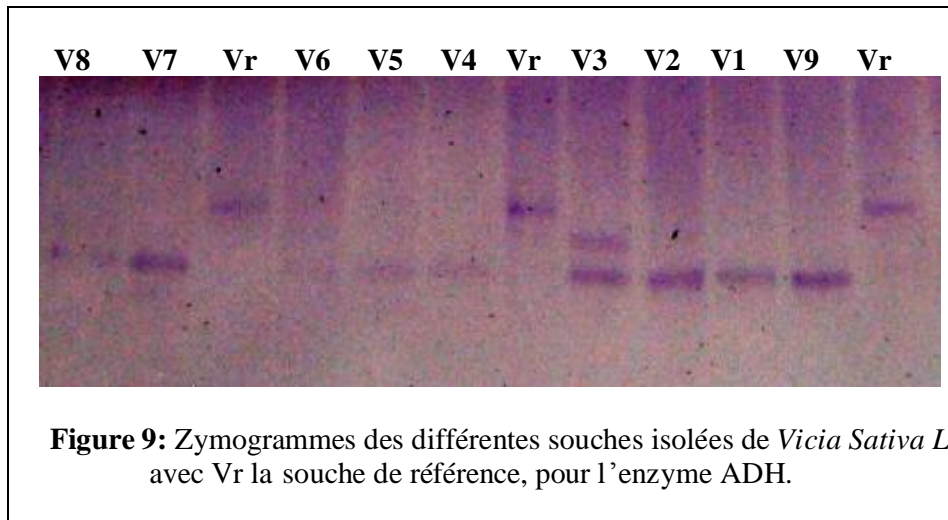


Figure 10 : Dendrogramme construit par la méthode de Wagner pour les 9 souches isolées de *Vicia sativa L*,

Le dendrogramme des les souches isolées de *Vicia sativa L* (figure 10) possède une topologie avec 2 clades. Le premier clade regroupe l'ensemble des souches V1, V4, V5, V6, V7, V8, V9 regroupées sur la première branche et la souche V3 sur la seconde ; le deuxième clade regroupe le premier clade avec la souche V2 présentée sur une branche a part.

Pour les souches de *Trifolium compestre* on remarque que (Figure 11-12-13).

- Pour le GOT : les souches T2-T4-T5-T6-T7 sont regroupées au niveau 2, la souche T1 au niveau 1, la souche de référence a présentée un puit nul.
- Pour l'ALD: les souches T1-T2 sont regroupées au niveau 1, les souches T4-T5-T6-T7 sont regroupés avec les niveaux 1-2 et la souche T3 est différente avec, les niveau 2, la souche de référence a présentée un puit nul.
- Pour l'ADH: on remarque une grande différence entre souches, T4,T5,T7 ce regroupe avec le niveau 2, les souches T1, T6 avec les niveaux 1-2, la souche de référence Tr et T2 avec les niveaux 2-3 et enfin la souches T3 avec les niveaux 1-2-3.

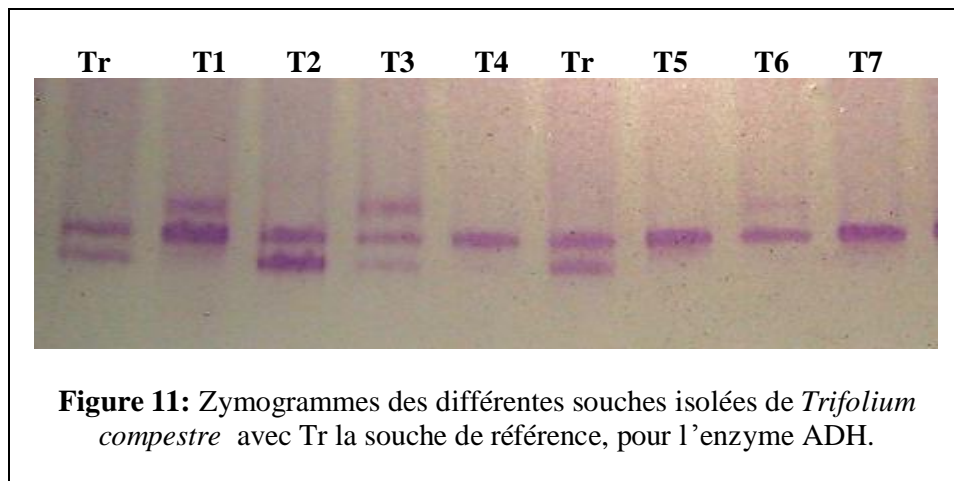


Figure 11: Zymogrammes des différentes souches isolées de *Trifolium compestre* avec Tr la souche de référence, pour l'enzyme ADH.

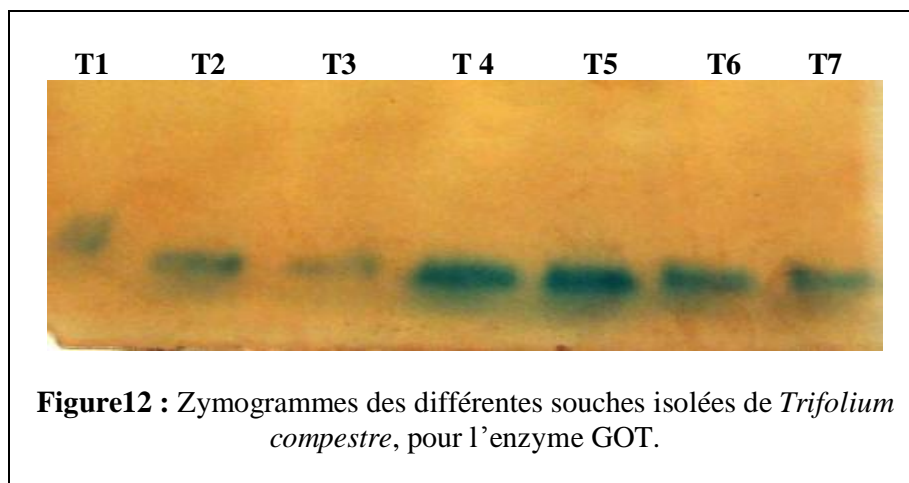


Figure12 : Zymogrammes des différentes souches isolées de *Trifolium compestre*, pour l'enzyme GOT.

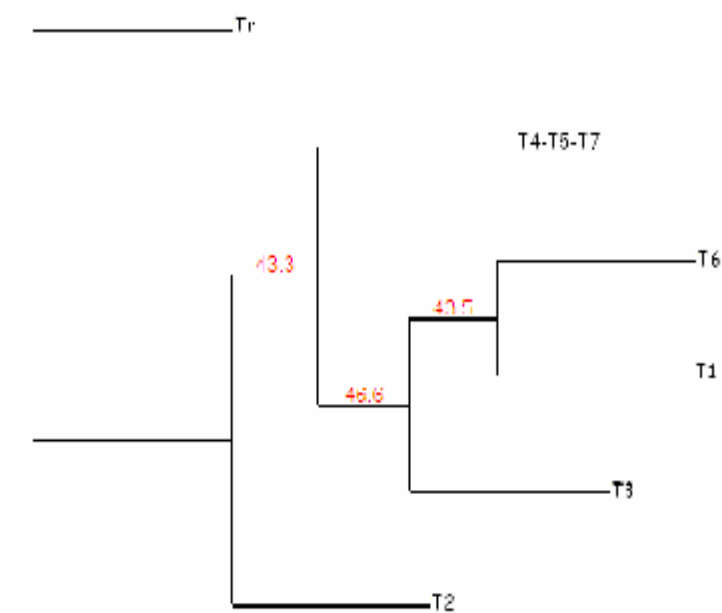
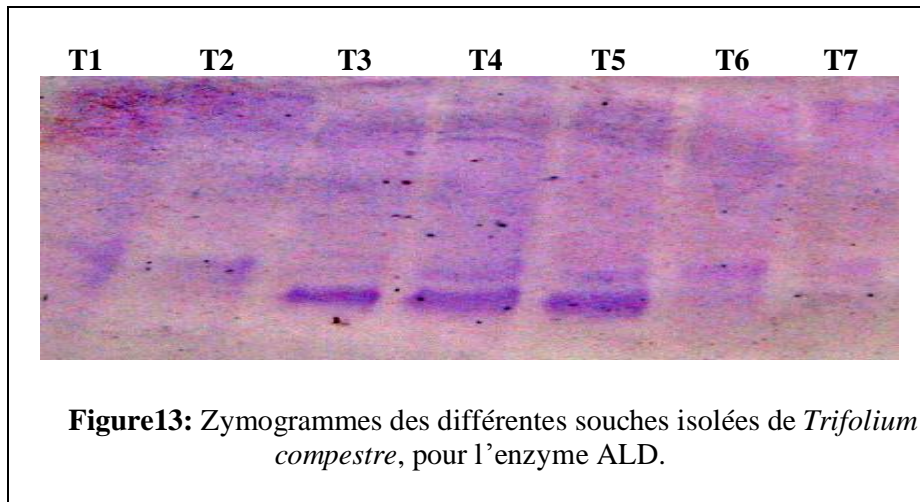


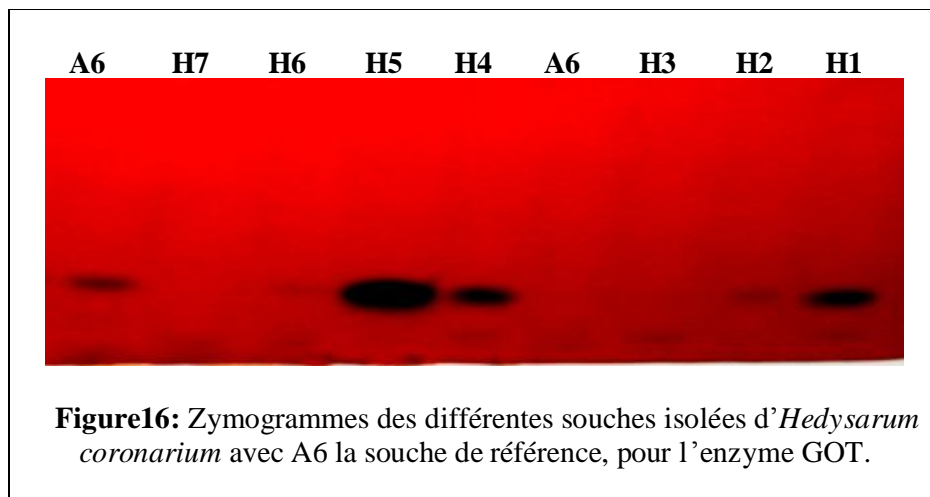
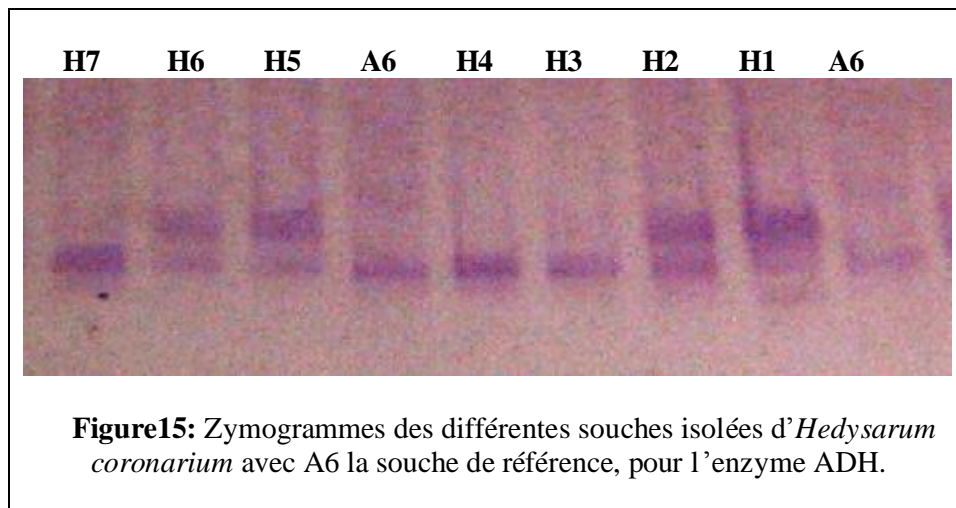
Figure 14 : Dendrogramme construit par la méthode de Wagner pour les 7 souches isolées de *Trifolium compestre*.

L'analyse du regroupement des souches isolées de *Trifolium compestre* (figure 14) possède une topologie avec 4 clades. Le premier clade formé par les souches T6, T1 ; le second regroupe le premier clade avec la souche T3, le troisième est formé par le deuxième clade, avec les souches T4, T5, T7 regroupés sur une même branche, enfin le quatrième clade regroupe le troisième clade avec la souche T2 présentée sur une branche a part.

Pour les souches de *Hedysarum coronarium* on remarque que (Figure 15-16).

- Pour l'ADH : les souches H1-H2-H5-H6 sont regroupées avec les niveaux 2-3, les souches H3-H4-H7 avec le niveau 3 et la souche de référence avec les niveaux 1-3.

- Pour le GOT : les souches A6,H2-H5-H6 sont regroupées avec le niveau 1, les souches H1-H4 avec les niveaux 1-2 , la souche 3 est différente avec le niveau 3, et la souche H7 a présenté un puit nul.



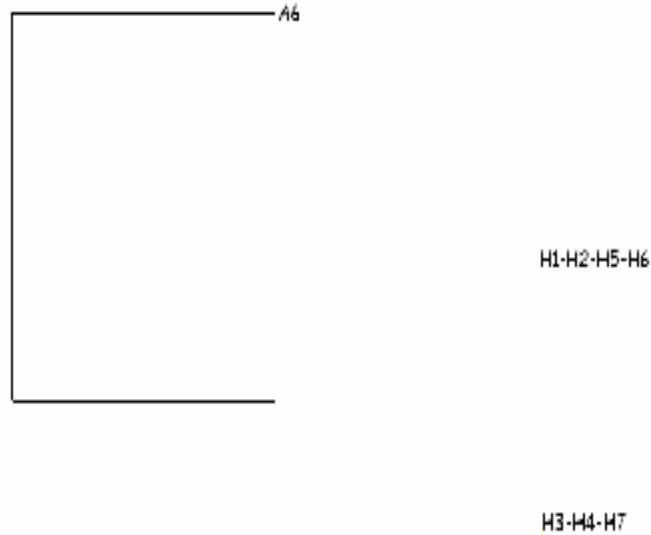


Figure17: Dendrogramme construit par la méthode de Wagner pour les 7 souches isolées d'*Hedysarum coronarium*.

Le dendrogramme des les souches isolées d'*Hedysarum coronarium* (figure 17) possède une topologie avec un seul clade qui regroupe les souches H1, H2, H5, H6 sur la première branche et les souche H3, H4, H7 sur la seconde, la valeur de bootstrap est absente car elle est négligeable .

Pour les souches de Vicia Faba major on remarque que (Figure 18-19-20).

- Pour l'ADH : les souches F2-F3-F4-F5-F6-F7-F8-F9-F10 sont regroupées avec le niveau 2, la souche Vr est différente avec le niveau 1, la souche F1 a présenté un puit nul.
- Pour le GOT : les souches F3-F5-F6-F8-F9-F10 sont regroupées avec le niveau 2, les souches F2, F4, F7 avec le niveau 3 , la souche de référence est différente avec le niveau 1, et également la souche F1 avec les niveaux 1-3.
- Pour l'ALD : une grande diversité a été obtenus les souches F2-F3-F5 sont regroupées avec le niveaux 3, les souches F6-F8-F10 avec les niveaux 3-4, Vr, F1, F7, F9 sont différentes respectivement avec les niveaux 2, 1-3, 1-4, 1-3-4 , la souche F4 a présentée un puis nul.

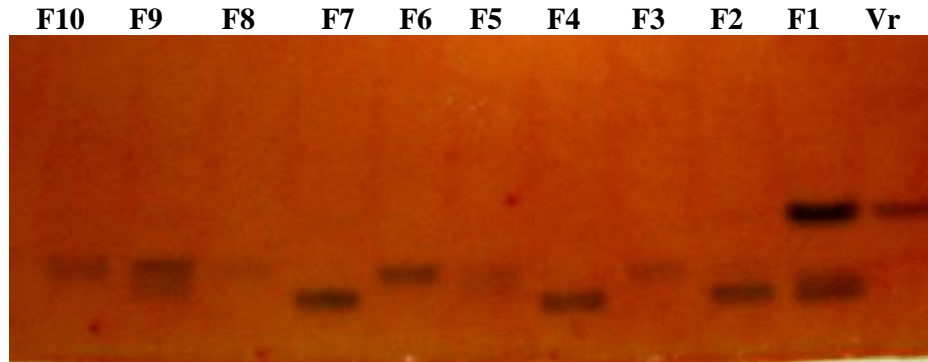


Figure18 : Zymogrammes des différentes souches isolées de *Vicia Faba major* avec Vr la souche de référence, pour l'enzyme GOT.

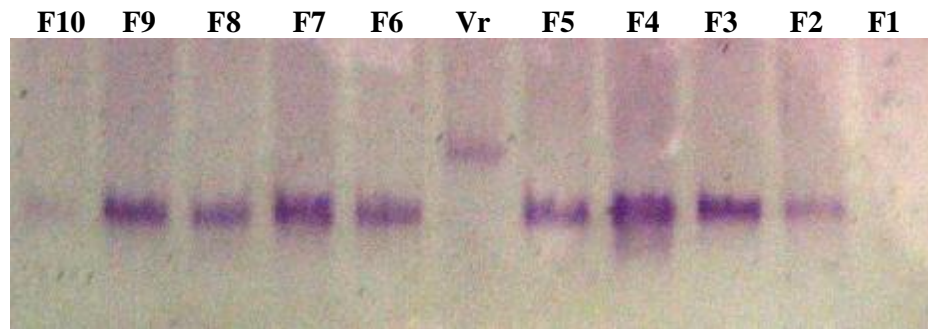


Figure19 : Zymogrammes des différentes souches isolées de *Vicia Faba major* avec Vr la souche de référence, pour l'enzyme ADH.

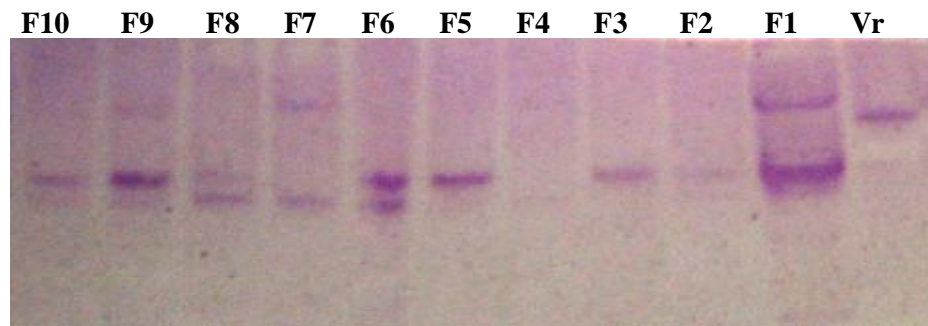


Figure 20 : Zymogrammes des différentes souches isolées de *Vicia Faba major* avec Vr la souche de référence, pour l'enzyme ALD.

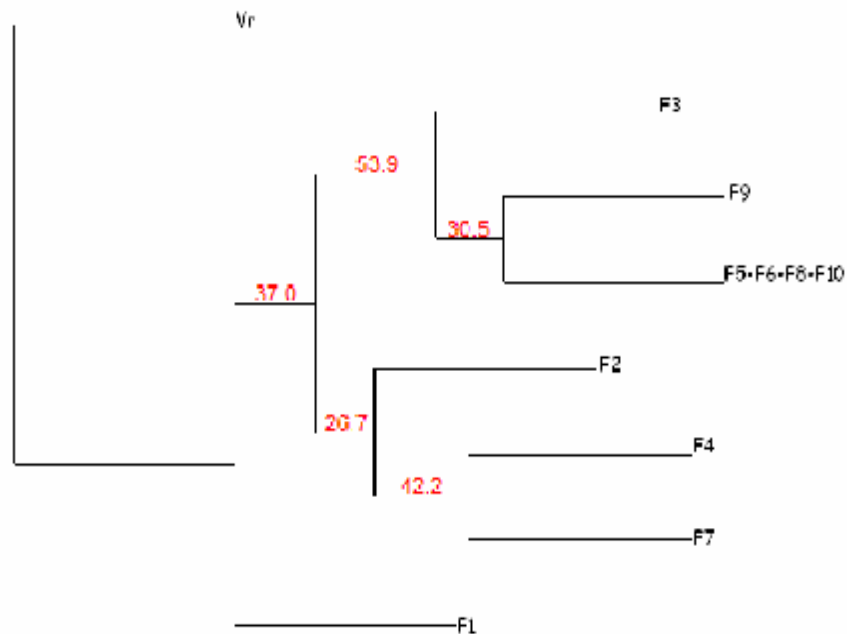


Figure 21 : Dendrogramme construit par la méthode de Wagner pour les 10 souches isolées de *Vicia Faba major*.

Dans le dendrogramme représentant les dix souches isolées de *Vicia Faba major* (figure 21), trois groupes sont distingués. Le premier regroupe les souches F5, F6, F8, F10- F9- F3, le second regroupe les souches F7, F4, F2 et enfin le troisième regroupe les deux groupes précédents avec la souche F1 présentée sur une branche à part.

Conclusion :

Les résultats montrent des degrés d'hétérogénéité différents dans les profils enzymatiques des isolats. Une diversité caractérisée par un polymorphisme enzymatique est obtenue entre les souches isolées du même site et également par rapport aux souches de références. On constate par ailleurs que le degré du polymorphisme diffère selon la plante hôte et également selon le système enzymatique considéré.

Discussion générale

Pour la deuxième approche, l'utilisation de la technique d'électrophorèse multilocus des enzymes de quelques systèmes enzymatiques a permis de déterminer des profils enzymatiques des souches. Le pouvoir de discrimination est nettement plus important puisque nous constatons une diversité entre souches du même groupe c'est-à-dire une diversité dans les populations locales et également par rapport aux les souches de références.

Dans notre examen des études rhizobiales, nous avons constaté que la richesse des souches et la diversité génétique des populations ont changé considérablement selon la puissance discriminatoire de la méthode de typage utilisée.

De nombreux auteurs ont montré qu'il existe une grande diversité parmi les souches isolées des nodules d'une même légumineuse (Prévost *et al.*, 1987 ; Zhang *et al.*, 1991 ; Moreira *et al.*, 1993 ; Dupuy, 1993). Ndoye (1999) a constaté qu'il existe une diversité génétique au sein des populations locales de rhizobiums nodulants *Acacia nilotique*. Il était également possible de distinguer parmi des souches isolées des nodules d'Haricot d'une même région un degré élevé de diversité génétique (Horta de Sá *et al.*, 1996).

La comparaison avec les études publiées est difficile parce que les méthodes de typages changent dans leur puissance discriminatoire (Bottomley, 1992).

Passer en revue et analyser les études publiées pour identifier les tendances globales dans la structure et la diversité parmi les populations et les communautés rhizobiales serait complémentaire de cette étude.

L'analyse de la richesse des populations et des communautés rhizobiales éditées a prouvé que la diversité structurale du rhizobia résidant dans le sol change suivant l'emplacement spécifique du site prospecté. De ce fait elle ne peut pas être prévue sur la base des espèces de rhizobia présentes. La richesse élevée peut être associée aux populations pour des espèces particulières de légumineuses données, mais ceci diffère également entre les emplacements (McInnes *et al.*, 2004). Les méthodes pour l'énumération des rhizobia et les mesures de diversité ne donnent pas habituellement une description précise. Des nombres peuvent être sous-estimés et la diversité pourrait également être masquée en raison des anomalies provoquées par le choix du centre d'isolement des souches et également par les facteurs du sol (Sadowsky et Graham, 1998). Par exemple, on observe une diversité plus élevée de rhizobiums du type *Leguminosarum biovar viciae* dans les sols arables que dans des sols d'herbes (Palmer et Yang, 2000). En outre Mendes et Bottomley (1998), dans leur étude des populations de rhizobium *Leguminosarum biovar trifolii*, ont suggéré que la taille

des différents agrégats du sol commandent la distribution des bactéries et influencent leur croissance et leurs activités. La dimension particulaire de sol n'affecte pas seulement la biomasse bactérienne, mais détermine également la structure de ces communautés (Gonzalez-Acosta *et al.*, 2006). Les différences chimiques et physiques entre les sols peuvent être au moins partiellement responsables des différences génétiques parmi les souches (Paffetti *et al.*, 1996). Quelques auteurs ont également proposé que les paramètres comme l'argile contenue dans le sol et sa texture influencent la survie et la prolifération des bactéries dans le sol et la rhizosphère (Fages, 1992; Bashan *et al.*, 1995). Sessitsch *et al.* (2002) ont observé que des sols composés principalement d'argile et de particules fines de vase a montré une plus grande diversité des bactéries que les sols à grandes particules.

Beaucoup d'auteurs ont trouvé une corrélation apparente entre la variation génétique et le stress environnemental comprenant des extrémités de pH (Harrison *et al.*, 1989). On a démontré que pH peut limiter la présence des micro-organismes dans les sols et peuvent être une barrière à la diversité (Brockwell *et al.*, 1991). Laranjo *et al.* (2002) ont étudié des populations de rhizobia de pois chiche (*Cicer arietinum*) dans les sols avec différents pH et ont observé une évidente corrélation positive entre la diversité génétique et le pH du sol (une diversité génétique plus élevée dans les sols alcalins). Fierer et Jackson (2006) ont considéré que le pH était le meilleur prédicteur de la diversité bactérienne du sol, avec des niveaux plus bas de la diversité des bactéries et la richesse observée dans les sols acides.

Woomer *et al.* (1988) ont montré l'importance de la légumineuse hôte appropriée à la présence d'une population particulière de rhizobiums. La diversité et la taille de la population rhizobiale dans le sol peuvent changer avec la présence ou l'absence de légumineuse hôte (Parker, 1999; Andrade *et al.*, 2002).

Coutinho *et al.* (1999) ont suggéré que les changements de la diversité rhizobiale observée dans les sols convertis en culture de soja sont probablement le résultat des modifications profondes imposées à l'environnement du sol par l'application des produits agrochimiques (engrais, herbicides et pesticides), par la perturbation physique (labourage et tillages) et par la récolte de soja elle-même.

Mohammed *et al.* (2001) ont étudié des profils de plasmides d'isolats de rhizobiums d'espèces différentes de *Sesbania* de sites écologiquement distincts. Leurs résultats montrent une plasticité du patrimoine héréditaire rhizobial en réponse aux changements environnementaux pour permettre au rhizobia de s'adapter à l'hétérogénéité de l'habitat.

Conclusion générale

Ce travail de recherche avait pour objectif, d'une part, d'identifier différents rhizobiums chez quelques légumineuses et, d'autre part, d'apprécier la diversité existante au sein des souches.

Notre première préoccupation a été d'obtenir la meilleure expression possible des protéines totales et des isoenzymes. Ceci nous a conduit à tester la méthode monodimensionnelle SDS- PAGE selon Laemmli (1970). L'application de cette technique, telle que nous l'avons appliquée, ne nous a pas fourni des diagrammes satisfaisants. Il nous a donc paru important d'apporter des modifications à la composition du gel. Ceci nous a permis de mieux révéler la diversité de ces protéines.

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, à l'aspect des colonies et à l'examen microscopique montre que l'ensemble des isolats ont les caractères des rhizobia.

L'utilisation de la technique d'électrophorèse monodimensionnelle sur gel polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE) a permis de déterminer les profils des protéines totales des souches. Les coefficients de similitude des bandes polypeptidiques obtenus montrent des similitudes élevées à la fois entre les souches du même groupe et également par rapport aux souches de références.

L'utilisation de la technique d'électrophorèse multilocus des enzymes de quelques systèmes enzymatiques a permis de déterminer les profils enzymatiques des souches. Le pouvoir de discrimination est nettement plus important puisque nous constatons une diversité entre souches d'un même groupe c'est-à-dire une diversité dans les populations locales et également par rapport aux souches de références.

Dans notre examen des études rhizobiales nous avons constaté que la richesse des souches et la diversité génétique des populations et des communautés ont changé considérablement selon la puissance discriminatoire de la méthode de typage utilisée.

Références bibliographiques

Andrade D.S., Murphy P.J., Giller K.E., 2002. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. *Soil Biol. Biochem* 34: 477-485.

Babo B V., 2002. Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina faso. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor. Université Laval, Québec.

Bashan Y., Puente M.E., Rodriguez-Mendoza M.N., Toledo G., Holguin G., Ferrera-Cerrato R., Pedrin S., 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol* 61: 1938-1945.

Baudoin J-P., 2001. Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 5(4): 221-230.

Beaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R., 2004. Legume seed inoculation technology. *Soil Biology & Biochemistry* 36:1275-1288.

Becker A., Berges H., Krol E., Bruand C., Ruberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe F., de Bruijn F.J., Fourment J., Francez-Charlot A., Kahn D., Kuster H., Liebe C., Puhler A., Weidner S., Batut J., 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 17(3): 292-303.

Bélanger E., 1998. Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium sp.* (*Oxytropis Arctobla*) souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.

Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A., 2004. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System. Appl. microbiol* 27: 462-468.

Bernot A., 2001. Analyse de Génomes, Transcriptomes et Protéomes. 3^{ème} Edition Dunod, Paris.

Boivin-Masson C., Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Talini L., 2006. Détection et typage du gène *nodC* à l'aide de biopuces à ADN: perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. Les Actes du BRG 6: 97-110.

Bottomley P.J., 1992. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. Biological Nitrogen Fixation, (Eds.) Chapman and Hall, New York

Bouby L., Léa V., 2006. Exploitation de la vesce commune (*Vicia sativa L*) au Néolithique moyen dans le sud de la France. Données cartographiques du site de Claparouse (*Lagnes, Vaucluse*) C.R Palevol 5: 973-980.

Brenière S.F., Araniki I., Le Ray D., Tibayrenc M., 1991. L'analyse SDS-PAGE des protéines et antigènes de surface révèle une forte hétérogénéité chez les clones naturels de *Trypanosoma cruzi*, corrélée à la variabilité isoenzymatique. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 312, Série III, p. 449-454.

Brisabois A., 2001. Intérêts et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella*. Epidémiol et santé anim 39: 31-42.

Brockwell J., Pilka A., Holliday R.A., 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. Aust. J. Exp. Agric 31: 211-219.

Burnie G., forrester S., Greing D., Guest S., Harmany M., Hobley S., Jackso G., Ledgett P., McDonald R., Macoboy S., Molyneux B., Moodie D., Newman D., North T., Purdy G., Ryan S., Schien G., Silk J., 2005. Botanica. Encyclopédie de botanique & d'horticulture. Editions Place des Victoire.

Campbell N.A., Reece J.B., 2004. Biologie. 2^{ème} Edition de boeck, Quebec.

Caratini R., 1984. Les plantes. Bordas, Paris.

Chen W.M., Leavens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M., Vandamme P., 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp.nov. Isolated from rood nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Sys Evol Microbiol* 51: 1729-1735.

Coutinho H.L.C., Oliveira V.M., Lovato A., Maia A.H.N., Manfio G.P., 1999. Evaluation of diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Appl. Soil Ecol* 13: 159-167.

Cronk Q., Ojeda I., Pennington R.T., 2006. Legume comparative genomics: progress in phylonenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology* 9: 99-103.

Crossman L.C., 2004. Plasmid replicons of *Rhizobium*. *Biochemical Society Transactions* Volume 33, part 1.

Dedio W., Kaltsikes P.J., Larter E.N., 1969. Numerical chemo taxonomy in the genus *secale*. *Can. J.Bot*:1175-1180.

de Moraes P.L.R., Nehme C.J., Alves M.C., Teresa M., Derbyshire M.T., Cavaleiro A.J., 2007. Chemical composition of flavonoids and styrylpyrones and the genetic variability of isozymes in natural populations of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae). *Biochemical systematics and Ecology* 35: 233-244.

Dénarié J., Texte de la 8^{ème} conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier 2000.

Dupuy N., 1993. Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote entre *Acacia albida* et *Bradyrhizobium* sp. Thèse de doctorat. Université de Lille Flandres Artois, France.

Dupuy Y., Nougier P. 2005. Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses. Paris.

Ellison N.W., Liston.A ., Steiner J.J., Williams W.M ., Taylor N.L., 2006 . Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 688-705.

Fages J., 1992. An industrial review of Azospirillum inoculant: formulation and application technology. Symbiosis 13: 15-26.

Felsenstein J., 1985. Confidence limits in phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution 39: 368-76 In: Hide M., 2004. Variabilité pathologique du complexe *Leishmania donovani*, agent de leishmaniose viscérale, Etude comparative des caractères biologique, génétique et d'expression génétique. Thèse de Doctorat en Parasitologie. Université de Montpellier II.

Fierer N., Jackson R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. PNAS 103: 626-631.

Flint S.H., Nikki J., Kells N.J., 1996. The sub-typing of *Listeria monocytogenes* isolates from food, environments surrounding food manufacturing sites, and clinical samples in New Zealand using multilocus enzyme electrophoresis. Food Microbiology 31: 349-355.

Frontier S., Piched-Viale D., Leprêtre A., Davoult D., Luczak C., 2004. Ecosystème: structure, fonctionnement, évolution. 3^{ème} Edition Dunod, Paris.

Gonzalez-Acosta B., Bashan Y., Hernandez-Saavedra N.Y., Ascencio F., de la Cruz-Aguero G., 2006. Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. FEMS Microbiol. Ecol 55: 311-321.

Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., Deley D.J., Jarvis B.D.W., RoslyCcky E.B., Strijdom B.W., Young J.P.W., 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol 41: 582-587.

Guignard J.L., Dupont F., 2005. Botanique. 13^{ème} Edition Masson.

Harrison S.P., Jones D.G., Young J.P.W., 1989. Rhizobium population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. J. Gen. Microbiol 135: 1061-1069.

Harry M., 2001. Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine., Paris.

Heller R., Esnart R., Lance C., 1989. Physiologie végétale. 4^{ème} Edition Masson, Paris.

Hide M., 2004. Variabilité pathologique du complexe *Leishmania donovani*, agent de leishmaniose viscérale, Etude comparative des caractères biologique, génétique et d'expression génétique. Thèse de Doctorat en Parasitologie. Université de Montpellier II.

Hopkins W.G., 2003. Physiologie végétale. Université des Science et technologie de Lille. Edition de boeck.

Horta de Sá N.M., DA Silva Kattah L., Seldin L., Vasconcelos M.J.V., Paiva E., 1996. Genomic heterogeneity within bean nodulating Rhizobium strains isolated from cerrado soils. Soil. Biol. Biochem. 29(5/6):1011-1014.

Judd W.S., Campbell C.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A., Stevens P., 2001. Botanique systématique : une perspective phylogénétique. Edition de boeck.

kalita M., Malek w., 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of Rhizobia isolated from *Genista tinctoria* root nodules. System. appl. Microbiol 27: 707-715.

Kerstens K., De ley J., 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoresis proteins patterns. J. Gentile. Microbiol 87: 333-342.

Kerters K., Pot B., Dewettinck D., Torck U., Vancanneyt M., Vauterin L., Vandamme P., 1994. Identification and typing by of bacteria by protein electrophoresis, In Priset F.G., Ramos-Comenzan A., Tyndall B. Bacterial diversity and systematics. Ed Plenum Press, New York.

Labat J-N., 1996. Biogéographie, endémisme et origine des légumineuses papilionacées de Madagascar. Biogéographie de Madagascar: 95-108.

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

Laranjo M., Branco C., Soares R., Alho L., Carvalho M.D.E., Oliveira S., 2002. Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *J. Appl. Microbiol* 92: 1043-1050.

Lewin B., 1992. Genes. Flammarion médecine-sciences, Paris.

Lévêque C., Mounoulou J.C., 2001. Biodiversité, Dynamique biologique et conservation. Edition Dunod, Paris.

Loh J., Pierson E.A., Pierson L.S., Stacey G., Chatterjee A., 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 1369-5266.

Machrafi Y., 2001. Inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.

Manchenko D.G.P., 2003. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. second edition. CRC Press.

McInnes A., Thies J.E., Abbott L.K., Howieson J.G., 2004. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities. *Soil Biology & Biochemistry* 36:1295-1308.

Mendes I.C., Bottomley P.J., 1998. Distribution of a population of *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* among different size classes of soil aggregates. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 970-975.

Mnasri B., Aouani M.E., Mhamdi R., 2007. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1744-1750.

Mohammed M., Sharma R.M., Ali S., Babu C.R., 2001. Molecular diversity of the plasmid genotypes among *Rhizobium* gene pools of sesbanias from different habitats of a semiarid region. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 171-178.

Moreira F. M. S., Gillis M., Pot B., Kersters K., Franco A. A., 1993. Characterization of Rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide Gel Electrophoresis of their total proteins. *Systematic Applied Microbiology*, 16: 135-146.

Moschetii G., Peluso A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepe O., Defez R., 2005. Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarium* biovar *viciae*. *Systematic and applied Microbiology* 28: 619-631.

Moulin L., Béna G., Boivin-Masson C., Steplowski T., 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 720-732.

Moulin L., Munive A., Drefus B., Boivin-Masson C., 2002. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria . *Nature* 411: 948-950.

Ndiaye A.A., Sylla S.N., Gueye M., Delajudie P., Ndoye I., 2002. Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide-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. Science and Engineering Series* 3 (1): 33-43.

Ndoye I., 1999. Caractérisation taxonomique des bactéries fixatrices d'azote nodulant *Acacia nilotica* var.*adansonii* et var. *tomentosa* (*Mimosoideae*, sous famille des *Acacieae*). Rapport de stage (LSTM, Laboratoire commun IRD-CIRAD/INRA-ENSAM) Campus du CIRAD, Baillarguet, Montpellier.

Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S., Fancelli S., Bazzicalupo M., 1996. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2279-2285.

Palmer K.M., Young J.P.W., 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in arable soils than in grass soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2445-2450.

Parent L.É., 1999. Notes de cours de Fertilisation des sols. Département des sols et de génie agroalimentaire, Université Laval, Québec In : Villeneuve S., 1999. Fertilisation azotée et utilisation de testes rapides de dosage des nitrate dans la production brocoli. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Parizeau M.E., 1997. La biodiversité. Edition de boeck.

Parker, M.A., 1999. Relationship of *Bradyrhizobium* from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. Appl. Environ. Microbiol 65: 4914–4920.

Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J., 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Tec& Doc. Paris.

Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., 2004. Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* 234: 201-62.

Pelmont J., 1995. Bactérie et environnement. Vol 2. Office des Publication Universitaire. Grenoble.

Pelmont J., 1995. Enzymes catalyseurs du monde vivant. Press universitaire de Grenoble.

Pelmont J., 2005. Biodégradation et métabolisme. EDP Sciences.

Perry J.J., staley J.T., Lory S., 2004. Microliologie. Edition Dunod, Paris.

Pietsch G., Friedel J.K., Freyer B., 2007. Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Research* 102:104-118.

Pousset J., 2003. Engrais verts et fertilité des sols. 2^{ème} Edition Agridecisions, Paris.

Prell J., Poole P., 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology* Vol14 No.4

Prévost D., Bordeleau L., Caudry-Reznick M., Schulman H.M., Antoun H., 1987. Characteristics of rhizobia isolated from three legumes indigenous to the Canadian high arctic: *Astragalus alpinus*, *Oxytropis maydeliana* and *Oxytropis arctobia*. Plant and Soil, 98: 313-324.

Prin Y., Galiana A., Ducouso M., Dupuy N., De Lajudie P., Neyra M., 1993. Les Rhizobiums d'Acacia. Biodiversité et taxonomie. Bois et forêts des tropiques, n 238, 4^{ème} trimestre.

Quezel P., Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, ed. Paris.

Raven P. H., Evert R. F., Eichlorn S. E., 2000. Biologie végétale. 6ème Edition de boeck , Paris.

Rinaudo G., Fernandez M.P., Effosse A., Picard B., Bardin R., 1993. Enzyme polymorphism of *azorhizobium* strain and other stem and root nodulating bacteria isolated from *Sesbania rostrala* . Res Microbial 144: 55-67.

Rivas R., Willems S., Subba-Rao N.S., Mateos P.F., Dazzo F.B., Kroppenstedt R.M., Martinez-Molina E., Gillis M., Velazquez E., 2003. Description of *Devosia neptuniae* sp.nov.that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, and aquatic legume from India. Syst appl Microbiol 26: 47-53.

Rodriguez-Navarro D.N., Temprano F., Orive R., 1991. Survival of *Rhizobium* sp (*Hedysarum coronarium* L.) On peat-based inoculants and inoculated seeds. Soil Biol. Biochem 23(4): 375-379.

Saadallah K., Drevon J-J., Abdelly C., 2001. Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. Agronomie 21: 627-634.

Sadowsky M. J., Graham P.H., 1998. Soil biology of the Rhizobiaceae. In: The Rhizobiaceae: Molecular Biology of model plant-associated bacteria. (Spaink H.P.,

Kondorosi A., Hooykaas P.J.J. editions: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.

Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S., 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology* 51(5): 873-884.

Serre J.L., 2006. Génétique des populations. Edition Dunos, Paris.

Sessitsch A., Howieson J.G., Perret X., Antoun H., Martinez- Romero E., 2002 . Advances in Rhizobium research. *Crit. Rev. Plant Sci* 21: 323-378.

Singleton P., 1994. Bactériologie. 2^{ème} édition Masson, Paris.

Somasegaran P., Hoben H.J., 1994. Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York.

Sprent J.I., 1995. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem* 27(4/5): 401-407.

Sprent J.I., 1999. Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. *Perspective in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 2/2: 149-162.

Stephens C.P., Oxberry S.L., Phillips N.D., La T., Hampson D.J., 2004. The use of multilocus enzyme electrophoresis to characterise intestinal spirochetes (*Brachispira spp.*) colonising hens in commercial flocks. *Veterinary Microbiology* 107: 149-157.

Sugawara M., Okazaki S., Nukui N., Ezura H., Mitsui H., Minamisawa K., 2006. Rhizobiotoxine modulates plant-microbe interactions by ethylene inhibition. *Biotechnology advances* 24: 382-388.

Sy a., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C., Dreyfus B., 2001. Methylophobic bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*.183: 213-220.

Tighe S.W., de Lajudie P., Dipietro K., Lindstrom K., Nick G., Jarvis B.D.W., 2000. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 787-801.

Tourtrel Y., Bordonneau M., Henry M., Tourtel C., 2005. Le monde des végétaux. Edition Dunod, Paris.

Van Berkum P., Eardly B.D., 2002. The aquatic Budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a Nitrogen-Fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* 68: 1132-1136.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos M., Kersters K., Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* 60 (2): 407-438.

Vessey J.K., Chemining G.N., 2006. The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarium* bv. *Viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 153-163.

Vincent J.M., 1970. The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication. Oxford, United Kingdom.

Vizintin L., Javornik B., Bohanec B. 2006. Genetic characterization of selected *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis. *Plant Science* 170: 859-866.

Wagner W.H.J., 1961. Problems in classification of ferns. *Recent advances in botany*. Montreal, University of Toronto Press: 841-844 In: Hide M., 2004. Variabilité pathologique du complexe *Leishmania donovani*, agent de leishmaniose viscérale, Etude comparative des caractères biologique, génétique et d'expression génétique. Thèse de Doctorat en Parasitologie. Université de Montpellier II.

Walker. J.M., 1994. Methods in Molecular Biology, Vol 32: Basic Protein and Peptide protocols: humana Press. Inc, Totowa, N.J.

Werner D., 1992. Symbiosis of plants and microbes. Edition chapman & Hall.Germany.

Woomer P., Singleton P.W., Ben Bohlool B., 1988 . Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. Applied and Environmental Microbiology 54: 1112-1116.

Zahran H.H., 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. Journal of Biotechnology 91: 143-153.

Zakhia F., de Lajudie P., 2001. Taxonomy of rhizobia .Agronomie 21: 569-576.

Zhang X., Harper R., Karsisto M., Lindström K., 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. International Journal of Systematic Bacteriology 41(1): 104-113.

Annexe 1 :

Tableau 1 : Classification des bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses

Espèce	Plantes hôtes	Références
.....		
Classe : <i>Alpha proteobacteria</i>		
Ordre : <i>Rhizobiales</i>		Frank, 1889
Famille : <i>Rhizobiaceae</i>		
Genre : Rhizobium		
<i>R. leguminosarum</i>		Frank, 1889 ; Jordan,1984
biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>	Frank, 1889 ; Jordan,1984
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Frank, 1889 ; Jordan,1984
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L</i>	Frank, 1889 ; Jordan,1984
<i>R. tropici</i>		
Type A	<i>P. Vulgaris L., Leucaena</i>	Martinez-Romero et al.,1991
Type B	<i>P. Vulgaris L., Leucaena</i>	Martinez-Romero et al.,1991
<i>R. elti</i>		
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena</i>	Segovia et al.,1993 ; Hernandez Lucas et al.,1995
biovar <i>mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	Wang et al ., 1999
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum & autres Plantes de région arides</i>	Chen et al ., 1997
<i>R. gallicum</i>		Amarger et al ., 1997
biovar <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger et al ., 1997
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger et al ., 1997
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthencia</i>	Van Berkum et al ., 1998
<i>R. galegae</i>		Lindstrom, 1989
biovar <i>orientalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Radeva et al ., 2001
biovar <i>officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	Radeva et al ., 2001 ; Zakhia et al .2004
<i>R. giardinii</i>		Amarger et al ., 1997
biovar <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris L .</i>	Amarger et al ., 1997
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger et al ., 1997
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang et al .,1998
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>	Wei et al ., 2002
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini et al ., 2002
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>	Wei et al .,2003
<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla, Amphicarpeae, Gueldenstaedtia</i>	Tan et al ., 2001
<i>R. daejeonense</i>	Bioreactor. Nod+ on <i>Medicago sativa</i>	Quan et al ., 2005

Genre: ***Sinorhizobium***

S. meliloti

Medicago, *Melilotus*
Trigonella

biovar *meliloti*

biovar *acaciae*

biovar *medicaginis*

M. Lasciniata, *M.sauvagei*

S. fredii

chemovar *fredii*

chemovar *siensis*

Sinorhizobium xinjiangense

S. sahelense

biovar *acaciae*

biovar *sesbaniae*

S. terangaie

biovar *acaciae*

biovar *sesbaniae*

S.medicae

S. kostiense

S. morelense

S.americanum

S.arboris

S.kummerowiae

S. adhaerens

Glycine max

Glycine max

Glycine max

Sesbania spp.

Acacia spp.

Sesbania spp.

Acacia spp.

sesbani spp.

Medicago spp.

Acacia, *Prosopis*

Leucaena leucocephala

Acacia

Acacia, *Prosopis*

Kummerowia stipulacea

Sesbania, *Medicago*

Chen et al ., 1988 ; de
Lajudie et al ., 1994
Dangeard, 1926 ;Jordan,1984;
de Lajudie et al ., 1994
Villegas et al ., 2006
Bâ et al ., 2002
Bena et al ., 2005; Villegas et
al ., 2006

Scholla et Elkan, 1984; de
Lajudie et al ., 1994
Scholla et Elkan, 1984
Scholla et Elkan, 1984
Chen et al ., 1988
de Lajudie et al ., 1994
Boivin et Giraud, 1999
Boivin et Giraud, 1999
de Lajudie et al ., 1994 ;
Truper et de Clari, 1997

Lortet et al ., 1996

Lortet et al ., 1996

Rome et al ., 1996

Nick et al ., 1999

Wang et al ., 2002

Toledo et al ., 2003

Nick et al ., 1999

Wei et al ., 2002

Casida, 1982

Genre: ***Allorhizobium***

A.undicola

Neptunia natans

de Lajudie et al ., 1998b
de Lajudie et al ., 1998b.

Famille : ***Phyllobacteriaceae***

Genre : ***Mesorhizobium***

M.loti

Lotus corniculatus

Jarvis et al ., 1982

M.huakuii

Astragalus sinicus, *Acacia spp.*

Chen et al ., 1991

Biovar *loti*

Turner et al ., 2002

M.cicer

Cicer arietinum

Nour et al ., 1994

M.tianshanense

Glycyrrhiza pallidiflora&

Chen et al ., 1995

Autres plantes tropicales

M. mediterraneum

Cicer arietinum

Nour et al ., 1995

M.pulrifarium

Acacia, *Prosopis*

de Lajudie et al ., 1998a

M.amorphae

Amorpha fruticosa

Wang et al ., 1999

<i>M.chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velasquez,2001
<i>M.temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al . , 2004
<i>M.septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al . , 2004
<i>M.thioganicum</i>	soil(India, <i>Clitoria ternatea</i>)	Ghosh et Roy, 2005

Genre : ***Phyllobacterium***

<i>P.trifolli</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Valverde et al . , 2005
-------------------	---------------------------	-------------------------

.....

Famille : ***Methylobacteriaceae***

Genre : ***Methylobacterium***

<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>	sy et al . , 2001 ; Jourand et al . , 2004
--------------------	------------------------	--

Famille : ***Brucellaceae***

Genre : ***Ochrobactrum sp.***

<i>Ochrobactrum sp.</i>	<i>Acacia mangium</i>	Ngom et al . , 2004
<i>Ochrobactrum lupini</i>		
<i>Lupinus albus</i>		Trujillo et al . , 2005

.....

Famille : ***Hyphomicrobiaceae***

Genre : ***Azorhizobium***

<i>A.caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al . , 1988
<i>A.johannense</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al . , 1988
<i>Azorhizobium sp.</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Dreyfus et al . , 1988
	<i>Sesbania rostrata</i>	Rinaudo et al . , 1991

Genre : ***Devosia***

<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas et al . , 2002, 2003
--------------------------	------------------------	----------------------------

Famille : ***Bradyrhizobiaceae***

Genre : ***Bradyrhizobium***

<i>B.japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Jordan, 1982
biovar <i>genistearum</i>	<i>Glycine max</i>	Kirchner,1896 ; Jordan, 1984
biovar <i>glycinearum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Vinuesa et al . , 2005b
<i>B.elkanii</i>		Vinuesa et al . , 2005b
<i>B. liaoningense</i>		Kuykendall et al . , 1992
biovar <i>glycinearum</i>		Xu et al . , 1995
<i>B.yaanmingense</i>	<i>Lespedeza spp</i>	Vinuesa et al . , 2004
<i>B.betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Yao et al . , 2002
<i>B.canariense</i>		Rivas et al . , 2004
biovar <i>genistearum</i>	<i>Genistea et Loteae</i>	Vinuesa et al . , 2005b
biovar <i>glycinearum</i>		Vinuesa et al . , 2005b

Bradyrhizobium sp. Vigna, Lupinus, Mimosa Jordan,1982; Dupuy et al . ,1994
Acacia, Aeschynomene Alazard, 1985; Young et al
.,1991

Genre: ***Blastobacter***

B.denitrificans Aeschynomene Van Berkum et Eardly, 2002

.....
Classe: ***Beta Proteobacteria***

Ordre: ***Burkholderiales***

Famille: ***Burkholderiaceae***

Genre :***Burkholderia***

Burkholderia sp. *Machaerium lunatum* Moulin et al . , 2002

B.caribensis *Aspalatus*

B.cepacia *Alysicarpus glumaceus*

B.tuberum *Aspalatus carnosa* Vandamme et al . , 2002

B.phymatum *Aspalatus carnosa* Vandamme et al . , 2002

Genre : ***Wautersia***(*Ralstonia*)

W.taiwanensis *Mimosa spp.* Chen et al . , 2001

Vaneechoutte et al . , 2004

Genre :***Herbaspirillum***

H.lusitanum *Phaseolus vulgaris* Valverde et al . , 2003

Classe : ***Gamma -proteobacteria***

Benhizia et al. ,2004

Ordre :***Enterobacteriales***

Pantoena agglomerans *Hedysarum carnosum,*

Enterobacter Kobei *H. spinosissimum,*

Enterobacter cloacae *H.pallidum*

Leclercia adecarboxylata

Escherichia vulneris

Ordre : ***Pseudomonadales***

Pseudomonas sp. *Hedysarum carnosum,*

H. spinosissimum,

H.pallidum

Annexe 2 :

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

Mannitol	10
K ₂ HPO ₄	0,5
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extrait de levure	0,5
Eau distillée	1000ml
pH	6,8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes.

Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol agar) en g/l (Vincent, 1970).

YMB	1000ml
Agar	15
pH	6,8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes

Composition du milieu YMA + rouge Congo en g/l (Vincent, 1970).

Solution stock de rouge Congo (250mg/100ml)	1ml
YMB	1000ml
Agar	15
pH	6, 8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes.

Composition du milieu YMA+BTB (bleu de bromothymol) (g/l) :

Solution stock (0,5g BTB/100ml d'éthanol).	10ml
YMB	1000ml
Agar	15
pH	6, 8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes.

**Composition du milieu GPA (Glucose peptone agar) + BCP (pourpre de bromocrésol)
(g/l) :**

Glucose	10
Peptone	5
Solution stock de BCP (0,5g BCP/100 d'éthanol)	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	15
pH	6,8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes.

Composition du milieu TY (Tryptone Yeast) en g/l :

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O	0,87
Eau distillée	1000
pH	6,8
Autoclavage	120 ° pendant 20 minutes.

Annexe 3 :

Protocole de l'électrophorèse des protéines SDS-PAGE :

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Laemmli (1970).

1- Préparation des extraits protéiques :

Une aliquote de 100 μ L de chaque culture bactérienne, en phase de croissance exponentielle en milieu TY, est centrifugée à une vitesse de 7000 tours/min pendant 15 minute à 4C° et le culot mis en suspension dans 50 μ L de tampon de lyse et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes.

- Préparation du tampon d'échantillon (tampon de lyse) :

Tris	25mM
Glycérol	192mM
SDS	2,5%
β -mercaptoéthanol	2,5%
Bleu de Bromophénol	5mg
Eau distillée	200ml

Dans la préparation des échantillons après addition du SDS et β -mercaptoéthanol, la solution est portée au bain-marie bouillant 3min pour une dénaturation complète des protéines.

Ce traitement est nécessaire pour la rupture des ponts disulfure.

2- Préparation des solutions stocks (Solution mères) :

- Solution d'acrylamide :

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

- 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) 0,8ml

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 μ L

Eau distillée QSP 200ml

Ajuster à pH 6,8 avec du HCl

3- Préparation des gels :

- Préparation du gel de séparation à 12% :

Solution d'acrylamide 10,4ml

Tampon de séparation 3,14ml

Tetraméthylènediamide (TEMED) 12,5 μ L

Eau distillée QSP 25ml

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

Solution d'acrylamide 5ml

Tampon de concentration 5ml

TEMED 20 μ L

Eau distillée QSP 20ml

Juste avant de couler chaque gel ajouter du persulfate d'ammonium (ammoniumperoxodisulfate) 15%.

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

Gel de séparation	140 μ L
Gel de concentration	200 μ L

4- Préparation du tampon de migration (running buffer) :

Tris 0,025 M	1,06g
Glycine 0,192M	5,04g
SDS 0,1%	0,35g
MCE 0,05%	175 μ L
Eau distillée	QSP 350ml

5- Préparation des plaques de gel :

- Les plaques, espaceurs et peignes sont lavées, rincer ensuite à l'eau puis par l'éthanol.
- Faire le montage des plaques on évite d'avoir des fuites, la solution du gel de séparation est coulée entre les plaques de verre en laissant une hauteur de 4cm pour le second gel.
- On évite la formation des bulles d'air ; avec une pipette niveler le gel avec une solution de le butanol. Le gel de séparation va se polymériser généralement après 30 à 35 min. On retire le Butanol et on rince délicatement à l'eau distillée.
- Le gel de concentration est coulé ensuite. Les peignes sont rapidement insérés de manière inclinée ce qui évitera la formation des bulles d'air.
- Le gel se polymérise généralement après 20 minutes, on retire ensuite les peignes très lentement. Enfin, remplir les puits avec la solution du tampon de migration

6 - La migration électrophorétique :

- Un volume de 20 μ L de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque puit.
- Après le dépôt, la migration est réalisée en appliquant un ampérage constant de 80mA.
- La migration dure environ 5heures, la fin de la migration est indiquée par l'arrivée du front de migration (bleu de bromophénol) à 3-4mm de l'extrémité du gel.
- Couper le générateur, récupérer le tampon dans le flacon d'origine, démouler la plaque, avec une spatule, en prenant beaucoup de précautions pour ne pas casser le gel. On oriente enfin le gel par une encoche par rapport aux dépôts, et le placer dans un petit bac en plastique.

7- La révélation des bandes protéiques :

- La solution de coloration :

Solution mère (bleu de comassie et de méthanol) 25ml.

Acide tricholacétique (TCA) 60% 40ml.

Eau distillée QSP 200ml.

- Mettre le gel dans 200ml de solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation.

La décoloration est effectuée en remplaçant la solution de coloration par l'eau distillée jusqu'à la décoloration complète du gel et l'apparition des bandes protéiques.

Annexe 4 :

-Protocole de la MLEE :

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par (Selander *et al.*, 1986).

Les souches sont cultivées sur le milieu TY à 28° C pendant 24 à 48 heures.

Préparations des extraits enzymatiques :

Les cultures bactériennes en phase exponentielle sont centrifugées 6000g pendant 10 minutes à 4°C .Le culot est rincé avec une solution tampon TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) et repris par 1ml dans un tube Eppendorf.. La lyse des cellules est obtenue par l'utilisation d'un détergent non dénaturant le Tween-20. Ce dernier est ajouté aux extraits, puis laissé une nuit entière à 4°C. Le lendemain, les extraits sont centrifugés à 14 000g pendant 20 minutes à 4°C, 100µl de chaque surnageant est repris dans un tube Eppendorf.

Préparation des gels

Un système discontinu a été utilisé, les concentrations des gels utilisés pour l'ISDS-PAGE sont appliquées avec modification (absence de SDS).

La coloration :

Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) :

- Acide aspartique	250 mg
- acide alpha-cétoglutarique	100 mg
- Tris-Hcl 0,5 M pH 7,2	50 ml
- H2O	q.s.p. 100 ml

Rinçage après 15 min d'incubation puis ajouter :

Fast blue BB	200 mg
Tris-Hcl 0,5 M pH 7,2	50 ml
H2O	q.s.p. 100 ml

Incubation à l'obscurité et à 37°C jusqu'à apparition des bandes.

Alcool déshydrogénase (ADH) :

Ethanol		5 mL
NAD	20 mg/mL	0.5 mL
MTT	10 mg/mL	1 mL
PMS	5 mg/mL	1 mL
Tris-HCl,	0.2 M pH 8.0	100 mL

Incubation a l'obscurité et a 37°C jusqu'à apparition des bandes.

Alanine déshydrogénase (ALD) :

Alanine		100mg
Tampon phosphate	pH 7	100ml
NAD	20 mg/mL	0.5 mL
MTT	10 mg/mL	1 mL
PMS	5 mg/mL	1 mL

Incubation a l'obscurité et a 37°C jusqu'à apparition des bandes.

Annexe 5 :

Méthodologie de construction d'un dendrogramme selon la méthode de parcimonie :

Les données sont saisies dans un fichier de type « Excel » avec en ligne les souches et en colonnes les systèmes enzymatiques. Les constructions phylogénétiques sont réalisés ont utilisent le package PHYLIP (PHYLogeny Inference Package).

La méthode de parcimonie de Wagner consiste à construire un arbre contenant le plus petit nombre de pas évolutifs entre les individus (c'est-à-dire) en minimisant le nombre d'hypothèse évolutifs (Wagner,1961), autrement dit l'arbre le plus parcimonieux. Cette méthode est basée sur l'étude des caractères et non sur les distances génétiques. Ensuite la robustesse des nœuds engendrés peut être testé par la méthode du bootstarp (Felsenstein, 1985) c'est une méthodes de ré-échantillonnage appliquée sur les données originales. Les valeurs obtenues représentent le nombre de fois ou chaque nœud est apparu sur un nombre X de ré-échantillonnage. Pour cette méthode, nous utilisons les logiciels MIX (pour faire un dendrogramme de parcimonie (Wagner) basé sur des caractères discrets, SEQBOOT (pour faire un bootstrap avec 100 répétitions) et CONSENSE pour choisir l'arbre le plus consensuel parmi les différentes combinaisons.

Pour les souches de références, ils ont été utilisés pour enraciner les arbres (c'est des outgroup).

Si 2 génotypes sont différents, ils se retrouvent sur 2 branches différentes donc plus un arbre a de branches et plus les génotypes qu'ils abritent sont divergents.

Nom : GRAMA

Date de soutenance

Prénom : Borhane Samir

**Titre Utilisation des techniques d'électrophorèse pour l'identification et l'étude
de la diversité des Rhizobiums de quelques légumineuses.**

Diplôme Magistère en Biotechnologie Végétale

Résumé

Cette étude a porté sur 7 souches bactériennes isolées des nodules d'*Hedysarum coronarium*, 7 souches de *Trifolium campestre*, 9 souches de *Vicia sativa L* et 10 souches de *Vicia faba major*. Des souches témoins de rhizobiums tels que *R. sulae*, *R. leguminosarum* bv. *trifoli*, *R. Leguminosarum* bv *viceae* ont été utilisées.

Après des tests morphologiques et culturaux des isolats, l'appréciation de la diversité des Rhizobia a été effectuée par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE) permettant le fractionnement des protéines totales (Laemmli, 1970) et également par la technique d'électrophorèse multilocus des enzymes (MLEE) de quelques systèmes enzymatiques (ADH, ALD, GOT) (Selander *et al.*, 1986).

Les résultats montrent une diversité dans les populations locales et également par rapport aux souches de référence.

Mots clé : Rhizobia, protéine, enzyme, électrophorèse, diversité.

**Laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie
Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri
Constantine.**

Devant le jury :

Président :	Mr M. Bensari	Professeur. Université Mentouri, Constantine
Rapporteur :	Mr D.Khelifi	Professeur. Université Mentouri, Constantine
Examineurs:	Mme N.Khalfallah	Professeur. Université Mentouri, Constantine
	Mr A.Boulahrouf	Professeur. Université Mentouri, Constantine
	Mr Y Benhiza	Maître de conférence Université Mentouri Constantine

