

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université A.MIRA-BEJAIA**



**جامعة بجاية**  
**Tasdawit n Bgayet**  
**Université de Béjaïa**

**Faculté des Sciences de la nature et de la vie.**  
**Département de la Biologie Physico Chimique**

# **Mémoire**

**Pour l'obtention du diplôme de Master**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Option : Pharmacotoxicologie**

**Thème**

**Rôle des phytohormones dans la régulation de la symbiose plante-  
microorganisme**

**Présenté par :**    BENSEID YOUCEF                      BAHIDJ KHADIJA

Soutenu le : 30 Septembre 2021. Devant le Jury composé de :

<b>Mme Bakdi Boubellouta H.</b>	Univ. de Béjaïa	Président
<b>Mr Belkacem N.</b>	Univ. de Béjaïa	Examineur
<b>Mme SALMI A.</b>	Univ. de Béjaïa	Encadreur

**Année Universitaire : 2020 / 2021**

## **Remerciements**

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre gratitude.

Nous voudrions tout d'abord adresser toute notre reconnaissance à la directrice de ce mémoire, Madame SALMI ADOUDA, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous tenons à remercier avec plus grande gratitude Mme BAKDI HOURIA, Professeur à l'université de Béjaïa de l'honneur qu'elle nous fait d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions également Mr BELKACEM NASSIM, Professeur à l'université de Béjaïa, d'avoir accepté de se joindre à ce jury comme examinateur.

Nous désirons aussi remercier les professeurs de l'université de Béjaïa, qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Nous voudrions exprimer notre reconnaissance envers les amis et collègues qui nous ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de notre démarche.

Enfin, nous remercions nos très chers parents, qui ont toujours été là pour nous.

# Table des matières

Remerciements	
Tables des matières	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

## **Chapitre I : La fixation de l'azote**

I. L'azote .....	2
II. Le cycle de l'azote .....	3
II. 1. Les principaux processus du cycle d'azote .....	3
II. 1. 1. Ammonification .....	4
II. 1. 2. Nitrification.....	5
II. 1. 3. Dénitrification.....	5
II. 1. 4. Anammox .....	6
II. 1. 5. Interconversion nitrite-nitrate .....	6
III. La fixation de l'azote .....	6
III. 1. La fixation chimique de l'azote.....	7
III. 2. La fixation biologique de l'azote.....	7
III. 2. 1. Fixateurs libres .....	8
III. 2. 1. Fixateurs symbiotiques.....	8

## **Chapitre II : La symbiose légumineuse-rhizobium**

I. La Symbiose Rhizobium/ Légumineuse .....	9
II. Le partenaire végétale .....	9
II. 1. Généralités .....	9
II. 2. Caractéristiques botaniques .....	10
II. 2. 1. Appareil végétatif .....	10
II. 2. 2. Appareil reproducteur.....	11
II. 3. Taxonomie .....	11
III. Le partenaire bactérien.....	12
III. 1. Caractéristiques .....	12

III. 2. Taxonomie.....	13
------------------------	----

## **Chapitre III : Interaction légumineuse-rhizobium**

I. Dialogue moléculaire et signalisation symbiotique.....	15
I .1. Les flavonoïdes .....	15
I. .1 .1. Biosynthèse .....	16
I .1 .2. Rôle des flavonoïdes .....	17
II. Spécificité de la symbiose .....	17
III. Processus de nodulation des légumineuses .....	19
III .1. Définition.....	19
III. 2. Génétique de nodulation.....	20
III. 2. 1. Gènes Nod .....	20
III. 2. 2. Facteurs Nod.....	20
III. 3. La formation des nodosités.....	21
IV. La fixation biologique de l'azote.....	24
IV. 1. Généralités.....	24
IV.2. Nitrogénase et mécanismes de la fixation de l'azote atmosphérique.....	24
IV .2 .1. La nitrogénase au molybdène (Mo) .....	24
IV. 3. Génétique de la réduction de l'azote .....	26
IV. 4. Protection de la nitrogénase .....	26
IV. 5. Mécanisme moléculaire de la fixation biologique de l'azote.....	26

## **Chapitre IV : Régulation de la symbiose**

I. Le système hormonal des plantes .....	29
I. 1. Définition .....	29
I. 2. Perception des phytohormones .....	30
I. 3. Importance du système hormonal chez les plantes .....	30
I. 4. Les Auxines.....	31
I. 5. Les cytokinines .....	31
I. 6. Les gibbérellines .....	31
I. 7. Brassinostéroïdes .....	32
I. 8. Ethylène .....	32
I. 9. Acide abscissique .....	32
II. Régulation des interactions légumineuses-Rhizobia.....	33
II. 1. Les auxines .....	34

II. 2. Les cytokinines .....	34
III. 2. 1. Interaction entre l'auxine et les cytokinines .....	35
II. 3. Les Gibbérellines .....	36
II. 4. Les Brassinostéroïdes .....	37
II. 5. Ethylène .....	38
II. 6. Acide abscissique.....	39
<b>Conclusion</b> .....	40
<b>Résumé</b> .....	41
<b>Références bibliographiques</b> .....	42

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau.1.** Distribution de l'azote et principaux apports d'azote..... 2

**Tableau 2.** Quelques exemples de la capacité de nodulation de symbiotes de l'ordre des Rhizobiales en fonction de l'espèce végétale .....18

**Tableau 3.** Diversité des Facteurs de Nodulation.....21

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Vue d'ensemble du cycle d'azote .....	3
<b>Figure 2.</b> Principales étapes du cycle de l'azote.....	4
<b>Figure 3.</b> Interactions entre les processus de nitrification et dénitrification.....	6
<b>Figure 4.</b> Exemples d'évolution des feuilles chez les légumineuses .....	10
<b>Figure 5.</b> Phylogénie des légumineuses .....	12
<b>Figure 6.</b> Représentation microscopique du <i>Rhizobium trifolii</i> .....	13
<b>Figure 7.</b> Arbre phylogénétique d' $\alpha$ , et $\beta$ -protéobactéries.....	14
<b>Figure 8.</b> Représentation schématique du dialogue moléculaire lors de la symbiose.....	15
<b>Figure 9.</b> Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	16
<b>Figure 10.</b> Schéma d'échange des signaux symbiotiques et la spécificité d'hôte.....	19
<b>Figure 11.</b> Nodosités racinaires des légumineuses et détail d'une cellule infectée .....	20
<b>Figure 12.</b> Perception et transduction du signal bactérien lors de la symbiose .....	22
<b>Figure 13.</b> Illustration schématique de la formation du cordon d'infection et sa progression .....	22
<b>Figure 14.</b> Formation des symbiosomes et libération des bactéries .....	23
<b>Figure 15.</b> Processus d'infection de la racine et mise en place du nodule chez <i>M. truncatula</i> .....	23
<b>Figure 16.</b> Structure de la nitrogénase au Mo.....	25
<b>Figure 17.</b> Schéma simplifié du mécanisme de fixation symbiotique de N <sub>2</sub> .....	27
<b>Figure 18.</b> Les étapes de réduction de l'azote atmosphérique .....	28
<b>Figure 19.</b> Les hormones végétales et l'équilibre hormonal.....	29
<b>Figure 20.</b> Acide indole-3-acétique (IAA).....	31
<b>Figure 21.</b> Structure de la zéatine .....	31
<b>Figure 22.</b> Noyau gibbane.....	31
<b>Figure 23.</b> Structure du brassinolide .....	32
<b>Figure 24.</b> Structure de l'Acide abscissique .....	32
<b>Figure 25.</b> Effets des phytohormones sur le processus de nodulation chez les légumineuses .....	33
<b>Figure 26.</b> Régulation positive de la nodulation par l'action des hormones végétales .....	35
<b>Figure 27.</b> Rôles des auxines et des cytokinines lors des interactions symbiotiques .....	36
<b>Figure 28.</b> Biosynthèse, métabolisme et signalisation des Ags .....	37
<b>Figure 29.</b> Rôle de l'éthylène dans l'inhibition locale de la nodulation.....	39

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ABa** : Acide abscissique.
- Ac** : Acetyl.
- AcMeFuc** : Fucosyl méthylé et acétylé.
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- ADP** : Adénosine diphosphate.
- AG** : Acide Gibbérellique.
- AHPs** : Aspartate-histidine phospho- transfer proteins.
- ANR** : Anthocyanidine réductase.
- Ara** : Arabinosyl.
- ATP** : Adénosine triphosphate.
- BNL** : Bactéries nodulant les Légumineuses.
- BRs** : Brassinostéroïdes.
- Cb** : Carbamoyl.
- CHS** : Chalcone synthase.
- CHR** : Chalcone réductase.
- CHI** : Chalcone isomérase.
- Cks** : Cytokinines.
- CRE** : Cytokinin receptor.
- DFR** : Dihydroflavonol réductase.
- Enod** : Early nodulin genes.
- ET** : Éthylène.
- F3H** : Flavanone 3 hydroxylase.
- F3'H** : Flavonoïde 3' hydroxylase.
- F3',5'H** : Flavonoïde 3',5' hydroxylase.
- FLS** : Flavonol synthase.
- FNS I** : Flavanone synthase I.
- FNS II** : Flavanone synthase II.
- Fuc** : Fucosyl.
- GAs** : Gibbérellines.
- GID1** : Gibberellin insensitive.
- ha** : Hectare.

**IAA** : Indole-3-acetic acid.

**IFR** : Isoflavone réductase.

**IFS** : Isoflavone synthase.

**Kd** : Kilodalton.

**LAR** : Leucoanthocyanidine réductase.

**LDOX** : Leucoanthocyanidine dioxygénase.

**LCOs** : Lipo-chitooligosaccharides.

**LegHb** : Leghémoglobine.

**LPS** : Les lipopolysaccharides.

**LPWG** : The Legume Phylogeny Working Group.

**LRR-RLK** : Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase.

**Me** : Methyl.

**MeFuc** : Fucosyl méthylé.

**Mo** : Molybdène.

**M. truncatula** : Medicago truncatula.

**N<sub>2</sub>O** : Protoxyde d'azote.

**NF** : Nodule Facteurs.

**NPA** : N-(1-naphtyl) phtalamique.

**NXR** : Nitrite oxidoreductase.

**PAMPs** : Pathogen Associated Molecular Patterns.

**Pb** : Paire de bases.

**PH** : Potentiel hydrogène.

**Pi** : Phosphate inorganique.

**PYRs** : Pyrobactines.

**SMeFuc** : Fucosyl méthylé et sulfaté.

**Spp** : Espèces non identifiées.

**TIBA** : Acide 2,3,5-triiodobenzoïque.

**V** : Vanadium.

**ΔH** : Variation d'enthalpie.

# **INTRODUCTION**

## Introduction

L'air de l'atmosphère comprend 78% d'azote, qui est très stable que les plantes sont incapables d'assimiler directement (Laval & Mazliak, 1995). Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées rhizobiums.

Au contact des *rhizobia*, les légumineuses vont former de petits organes racinaires, appelés nodules, au sein desquels les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable, l'ammoniac. En retour, les plantes fournissent aux bactéries une niche écologique et des sources de carbone nécessaires à leur développement (Graham & Vance, 2003).

Le processus infectieux qui conduit les *rhizobia* jusqu'aux cellules hôtes est caractérisé par un échange de signaux et un véritable dialogue moléculaire entre les deux partenaires, et par une spécificité de haut niveau (Perret *et al.* 2000).

L'interaction symbiotique entre ces deux partenaires ne se fait pas au hasard mais elle repose sur un réseau complexe de boucles de régulation. En effet, la symbiose est caractérisée par un système de régulation, harmonieux et reproductible, rendu possible grâce à des messagers chimiques internes qu'on appelle hormones végétales ou phytohormones (Foo *et al.* 2019).

Du fait du potentiel environnemental et écologique de la symbiose, la présente étude a pour objectif de comprendre la mise en place de cette interaction et la fixation biologique de l'azote. De plus, nous analysons la régulation particulièrement fine par les phytohormones.

Le travail est divisé en quatre chapitres : Le premier chapitre porte sur l'azote, son cycle et sa fixation chimique. Dans le second chapitre, nous présentons un état des connaissances générales sur les deux partenaires. Le troisième chapitre décrit l'interaction entre ces deux partenaires, la mise en place des nodosités et le mécanisme enzymatique de la fixation biologique de l'azote. Finalement, nous consacrons le dernier chapitre à situer le rôle des phytohormones et la régulation de la symbiose.

# **CHAPITRE I**

## **LA FIXATION DE L'AZOTE**

## I. L'azote

Dans le langage courant, l'azote désigne le corps simple N<sub>2</sub> (diazote). Un gaz incolore et inodore. Il est le constituant majoritaire de l'atmosphère terrestre, représentant presque 4/5 de l'air (Bobi, 2018). C'est un élément essentiel pour toutes les formes de vie. Après l'hydrogène, le carbone et l'oxygène, il représente le 4<sup>ème</sup> élément le plus abondant de la biomasse vivante totale (Howarth, 2009). C'est un constituant essentiel du protoplasme, des protéines (construites à partir d'acides aminés), des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle (permettant le processus de photosynthèse) et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes (Ohyama & Sueyoshi, 2010).

Cet élément joue un rôle très important dans divers processus physiologiques. Il confère une couleur vert foncé aux plantes, stimule la croissance et le développement végétatif de la plante, principalement au niveau des feuilles et des tiges et favorise l'absorption et l'utilisation d'autres nutriments, y compris le potassium et le phosphore (Hemerly, 2016)

Dans le sol, les entrées d'azote s'effectuent principalement via la fixation symbiotique ou non symbiotique, la minéralisation de la matière organique, les apports atmosphériques et les engrais de synthèse (Sylvie *et al.* 1997). Des estimations des valeurs annuelles de ces apports sont indiquées dans le Tableau 1. Distribution de l'azote et principaux apports d'azote.

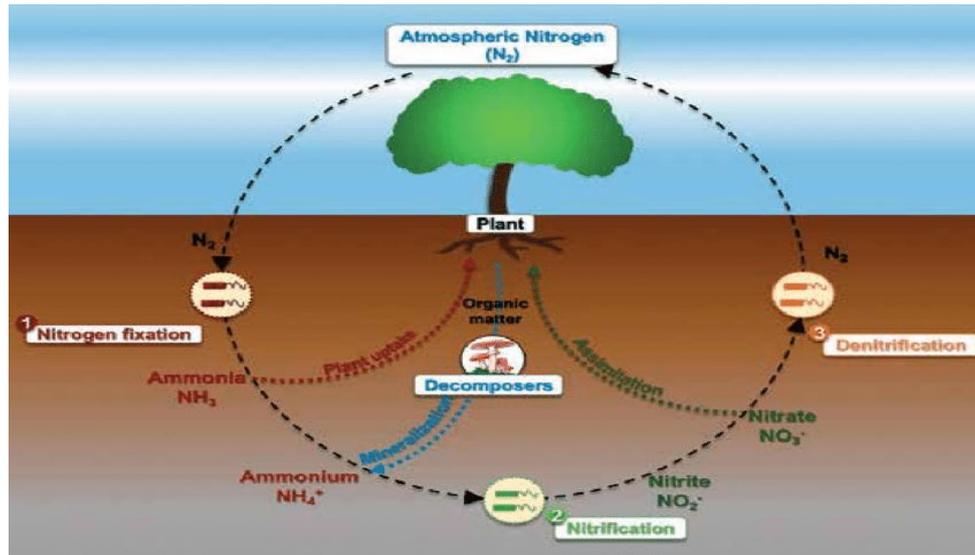
Apports d'azote (tonnes/an)		Distribution (tonnes)	
Fixation biologique	140 x 10 <sup>6</sup>	Atmosphère	3.9 x 10 <sup>6</sup>
Fertilisation (Synthèse)	74 x 10 <sup>6</sup>	Sol (Non vivant)	1.5 x 10 <sup>6</sup>
Déposition atmosphérique	8 x 10 <sup>6</sup>	Microorganismes du sol	6 x 10 <sup>6</sup>
		Plantes	1.5 x 10 <sup>6</sup>
		Animaux	2.0 x 10 <sup>6</sup>
		Humains	1.0 x 10 <sup>6</sup>
		Océans (nature diverse)	2.4 x 10 <sup>6</sup>

**Tableau 1.** Distribution de l'azote et principaux apports d'azote (D'après Jenkinson, 1990).

## II. Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est un cycle biogéochimique qui décrit une succession de processus très complexes et de transformations naturelles que subissent les différentes formes de l'azote (Belalite, 2020). Il se décompose en plusieurs étapes distinctes même si elles ne sont pas

séparables. En effet, ce cycle est gouverné par des processus de minéralisation et de ré-assimilation de l'azote, tant dans les océans que sur les continents.

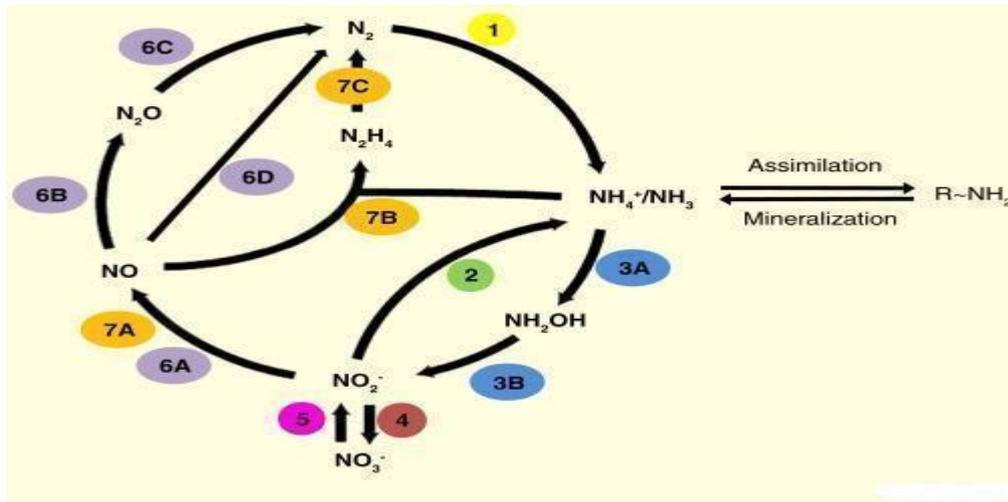


**Figure 1.** Vue d'ensemble du cycle d'azote (D'après Soloneski & Larramendy, 2018).

En fait, il existe de nombreux facteurs qui peuvent modifier ce cycle. Le premier facteur important est l'activité humaine qui contribue à l'augmentation de la dénitrification, non seulement par l'utilisation des engrais aux sols, mais aussi par l'utilisation des combustibles fossiles qui transforment l'azote en oxyde d'azote  $NO_2^-$  (Berner EK & Berner RA 1996). L'augmentation du ratio  $N_2O/N_2$  affecte la composition chimique de l'atmosphère et entraîne l'apparition d'un effet de serre additionnel. Un autre facteur important est la structure des communautés microbiennes des sols, le ratio  $N_2O/N_2$  de la dénitrification est très vraisemblablement déterminé par les communautés microbiennes existantes (Sylvie *et al.* 2007). Ces communautés sont pour leur part influencées par les conditions du milieu (oxygène, température, pH), la disponibilité de substrats carbonés et la possibilité de réactions d'oxydoréduction (Sutton *et al.* 2011).

## II. 1. Les principaux processus du cycle d'azote

Le cycle d'azote est divisé en trois phases principales : Ammonification, nitrification et dénitrification. Toutefois, notre compréhension antérieure du cycle de l'azote, compliquée par les diverses approches scientifiques, a changé. Ainsi, le cycle implique désormais cinq étapes majeures de transformation de l'azote : ammonification, nitrification, dénitrification, anammox, interconversion nitrite-nitrate (Figure 2) (Stein & Klotz, 2016).



**Figure 2.** Principales étapes du cycle de l'azote (D'après Stein & Klotz , 2016).

### II. 1. 1. Ammonification

Au cours de cette étape, des petites molécules organiques contenant un groupement amine (comme les acides aminés, les sucres aminés, l'urée et les nucléotides) se minéralisent sous l'action des micro-organismes du sol, afin de libérer l'ammonium ( $NH_4^+$ ). Par conséquent, le taux d'ammonification est en partie contrôlé par la taille et l'activité de la flore microbienne. Ainsi, tout facteur affectant la taille et l'activité de cette flore peut modifier le taux d'ammonification (Romillac, 2019). Elle peut être réalisée soit par la réaction 1, réduction du diazote (également appelé « fixation de l'azote »), soit par la réaction 2, réduction assimilatrice du nitrite en ammonium (Strock, 2008). En fait, l'ammonification peut être réalisée par une grande diversité de voies métaboliques, à la fois intracellulaires et extracellulaires. Mais nous n'allons considérer que deux voies :

- **La réduction du diazote:** La fixation de l'azote est l'une des deux voies de l'ammonification et est réalisée par divers microorganismes présents dans le sol et dans l'eau, et qui codent pour des complexes enzymatiques appelées nitrogénases. Cette enzyme est extrêmement sensible à l'oxygène ce qui oblige les micro-organismes à développer des mécanismes de protection, tels que la respiration rapide de l' $O_2$  ou la maximisation de la synthèse et du renouvellement de la nitrogénase...etc (Stein & Klotz, 2016).
- **Réduction assimilatrice et dissimilatrice du nitrite:** La réduction assimilatrice et dissimilatrice des nitrites en ammonium (Figure 2, réaction 2) est la deuxième voie de l'ammonification. Ce processus peut être lié à la réduction intracellulaire ou extracellulaire des nitrates en nitrites (Figure 2, réaction 5).

En théorie, les produits de réduction dissimilatrice obtenus (nitrites, oxyde nitreux  $N_2O$ ) ne sont pas assimilés. Mais il arrive qu'ils puissent être un bon départ pour une réduction

assimilatrice en ammonium (Stein & Klotz, 2016). Par ailleurs, la réduction assimilatrice est réalisée en 3 temps :

La réduction des nitrates et la formation des nitrites dans un premier temps, selon la réaction suivante :  $\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$

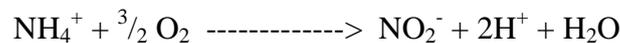
Puis la réduction des nitrites et la production de l'ammonium dans un second temps, selon la réaction :  $\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- \longrightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$

A son tour, l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) se transforme en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) gazeux, dans les sols où le pH est basique, selon la réaction suivante :  $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \longrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$

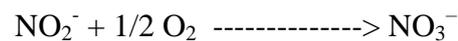
### II. 1. 2. La nitrification

C'est un processus à médiation microbienne, par lequel les produits de la fixation ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ) se transforment en  $\text{NO}_x$  (soient  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$ ), des nitrites et nitrates (Figure 2, réactions 3A, 3B et 4). Ce sont des réactions d'oxydation qui se font par catalyse enzymatique reliée à des bactéries dans les sols et dans l'eau. Elle se réalise en deux grandes étapes, la nitrification et la nitratisation. (Ward *et al.* 1982)

La première étape consiste à la transformation de l'ammonium en nitrite, en présence d'oxygène (Réaction d'oxydation). L'équation de principe est la suivante:



La deuxième étape permet la transformation du nitrite en nitrate en présence d'oxygène (Réaction d'oxydation) (Miloud, 2018). L'équation de principe est la suivante:

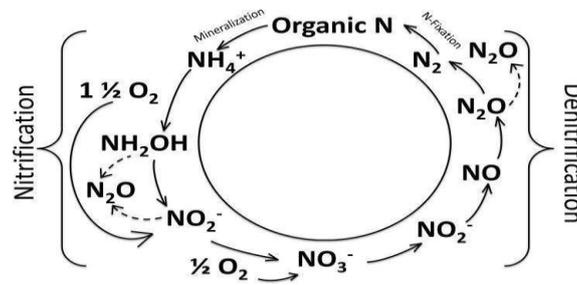


### II. 1. 3. La dénitrification

C'est le processus inverse par lequel les micro organismes dénitrifiants transforment les nitrates en diazote  $\text{N}_2$ , (Galloway *et al.* 2004) avec comme produit secondaire du  $\text{CO}_2$  et de l'oxyde d'azote  $\text{N}_2\text{O}$ , un gaz à effet de serre (Berner EK & Berner RA, 1996).

Le nitrate obtenu par nitrification est, à son tour, un substrat pour la dénitrification (Figure 3). Le processus de dénitrification est considéré comme un service éco systémique vital pour de nombreuses espèces, car il élimine de façon permanente l'azote fixé. Cependant, la nitrification et la dénitrification contribuent toutes deux à la production et à l'émission d'oxyde nitreux ( $\text{N}_2\text{O}$ ), un gaz à effet de serre qui contribue à l'appauvrissement de l'ozone.

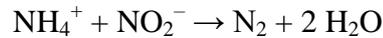
Pour chaque mole de  $\text{NH}_4^+$  nitrifié en  $\text{NO}_3^-$ , deux moles d'oxygène sont consommées. Il est à noter que la proportion de  $\text{N}_2\text{O}$  libérée par nitrification et dénitrification est très variable (Firestone *et al.* 1989).



**Figure 3.** Interactions entre les processus de nitrification et dénitrification.

#### II. 1. 4. L'anammox

Le terme « anammox » est une abréviation pour oxydation anaérobie de l'ammonium  $\text{NH}_4^+$  (« anaerobic ammonium oxidation » en anglais). Il s'agit d'une voie métabolique microbienne permettant la conversion de l'ammonium en azote gazeux en utilisant le nitrite et l'hydrazine ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) comme accepteur d'électrons (Figure 2, réactions 7A-C). (Stein & Klotz, 2016). La réaction globale s'écrit :



Les bactéries réalisant ce processus sont encore mal connues, mais tout à fait uniques. Elles contiennent en effet un compartiment intracellulaire spécifique, l'anammoxosome, grand compartiment lié à la membrane à l'intérieur du cytoplasme (Laura et al, 2004). La membrane de cette vésicule est constituée de lipides possédant une structure chimique particulière, les laddéranes tels que l'acide pentacycloanammoxique, jusqu'à présent uniques en biologie (Sinninghe et al. 2002). Les laddéranes (combinaison d'acide gras à liaison éther et ester) sont constitués de trois ou cinq cycles cyclobutane accolés. Elles forment une barrière extrêmement dense, réduisant ainsi très fortement la perméabilité de la membrane aux petites molécules hautement toxiques de la réaction anammox. Ces molécules à géométrie contrainte peuvent être utilisées en tant que bio marqueurs pour détecter la présence des bactéries anammox dans l'environnement (Kuenen, 2008).

#### II. 1. 5. Interconversion nitrite-nitrate

Il s'agit d'un équilibre biochimique résultant d'une interconversion enzymatique bidirectionnelle entre le nitrate et le nitrite (Figure 2, réactions 4 et 5). La Nitrite oxidoreductase est l'enzyme responsable de cette réaction bidirectionnelle. Cette enzyme, La NXR, est exprimée par certains microorganismes nitrifiants ce qui leur permet de catalyser à la fois l'oxydation de  $\text{NO}_2^-$  et la réduction de  $\text{NO}_3^-$  (Wunderlich *et al.* 2013).

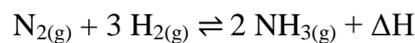
### III. La fixation de l'azote

L'azote est un nutriment essentiel et limitant pour le développement des plantes et, bien que majoritaire dans l'atmosphère sous la forme  $\text{N}_2$  et malgré son cycle qui permet son

recyclage, le diazote (N<sub>2</sub>) n'est pas directement assimilable par les végétaux sous sa forme gazeuse (Teillet, 2008).

### III. 1. La fixation chimique de l'azote

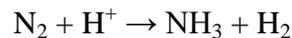
Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, le procédé Haber-Bosch a permis de fixer, de façon économique, le diazote atmosphérique en quantités industrielles pour fabriquer des engrais (Vaclav, 2001). Il s'agit d'un procédé chimique servant à la synthèse de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) par hydrogénation du diazote (N<sub>2</sub>) gazeux atmosphérique par le dihydrogène (H<sub>2</sub>) gazeux en présence d'un catalyseur (Marshall, 1979). Ce procédé consiste à favoriser la réaction exothermique de l'équation chimique à l'équilibre :



Malheureusement, ce procédé est consommateur d'énergie, car la triple liaison N≡N est très stable, et ayant d'émissions peu favorables (Vaclav, 2001).

### III. 2. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote, ou diazotrophie (Fig 2, réaction 1), est un processus qui permet la conversion du diazote (N<sub>2</sub>) gazeux en une forme assimilable par les plantes (ammoniac principalement). Cette étape consiste à combiner le diazote avec les ions hydrogène de l'eau (Igarashi & Seefeldt, 2003). Selon l'équation suivante :



Il s'agit d'un processus de réduction enzymatique du diazote moléculaire en azote ammoniacal (NH<sub>3</sub>) : Une forme combinée intermédiaire qui représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné (Hardy & Knight, 1968).

En effet, certaines bactéries, diazotrophes à l'état libre qui vivent dans le sol, disposent d'équipement enzymatique (Le complexe nitrogénase) nécessaire qui leur permet d'assurer la fixation biologique de l'azote. Cette étape est gérée par l'activité microbienne. Ces bactéries diazotrophes sont capables de transformer l'azote atmosphérique N<sub>2</sub> en azote utilisable par les plantes et les animaux. Ainsi, les plantes peuvent absorber une molécule à base d'azote appelée ammoniac (NH<sub>3</sub>).

Une bactérie fixatrice d'azote est un microorganisme capable de capter l'azote atmosphérique et de le restituer à la plante sous une forme assimilable par les plantes. On distingue deux types de fixateurs d'azote:

---

### III. 2. 1. Fixateurs libres

Ce sont des microorganismes libres (non symbiotiques). Cette catégorie comprend les cyanobactéries (ou algues bleu-vert) *Anabaena* et *Nostoc* et des genres tels que *Azotobacter*, *Beijerinckia* et *Clostridium* (Rogers, 2009). L'intensité de la fixation de l'azote par les bactéries libres est très variable selon les lieux et les conditions climatiques. On les rencontre en conditions anaérobies ou microaérophiles, mais aussi en conditions aérobies (Davet, 1996).

### III. 2. 2. Fixateurs symbiotiques

Ce sont des microorganismes mutualistes (symbiotiques); cette catégorie inclut certains genres tels que le *Rhizobium*, associé aux plantes légumineuses; le genre *Frankia*, associé à certaines espèces dicotylédones (plantes actinorhiziennes) ; et certaines espèces d'*Azospirillum*, associées aux graminées céréalières. (Rogers, 2009)

Les bactéries symbiotiques envahissent les racines des plantes hôtes, où elles se multiplient et stimulent la formation des structures racinaires, les nodosités. Dans ces nodules, les bactéries symbiotiques sont capables de convertir l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ) assimilable par la plante hôte alors que séparément ces organismes ne peuvent pas utiliser l'azote présent dans l'air (Bergersen, 1980). Dans cette association symbiotique entre une plante et la bactérie à bénéfice réciproque, la plante fournit les substances carbonées et les bactéries les substances azotées synthétisées à partir de l'azote atmosphérique (Davet, 1996).

## **CHAPITRE II**

# **LA SYMBIOSE LÉGUMINEUSE-RHIZOBIUM**

## I. La Symbiose Rhizobium/ Légumineuse

Les légumineuses établissent une relation symbiotique avec des bactéries du sol, les Rhizobium. Cette symbiose se manifeste par la formation de nodosités racinaires, organes spécialisés dans lesquelles l'azote atmosphérique est réduit en ammoniac suite à l'infection par les Rhizobia. De même, les Rhizobium profitent de cette interaction symbiotique par l'acquisition de molécules carbonées produites par la plante pendant la photosynthèse.

L'établissement d'une interaction symbiotique entre les légumineuses et les bactéries bénéfiques du sol, collectivement appelées Rhizobia, se produit lorsque la quantité d'azote disponible dans le sol est limitée. Cet énorme avantage que présentent les légumineuses, par rapport aux autres plantes, de pouvoir établir une symbiose avec ce genre de bactéries du sol, leur permettent d'accéder à une source quasi-illimitée d'azote et la réduction de celui-ci en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) assimilables par la plante, et de pouvoir survivre dans les sols pauvres en azote (Graham & Vance, 2003).

## II. Le partenaire végétale

Légumineuses ou *Fabaceae* sont une famille de plantes dicotylédones de l'ordre des Fabales. Avec environ 770 genres et plus de 19 500 espèces, la famille des légumineuses est la troisième plus grande famille de plantes. Les légumineuses ont une distribution cosmopolite et une très grande variété de formes et d'habitats.

D'un point de vue économique, les légumineuses constituent la deuxième famille en importance après les Poacées. Elles constituent une bonne source de protéines végétales les plus précieuses dans l'alimentation humaine, et même les seules sources de protéines dans certaines régions pauvres du monde (Hasanuzzaman *et al.* 2020).

Selon les espèces, les Fabaceae contiennent des Fibres, des Vitamines (A, C, E, ...), des constituants organiques (protéines, oligosaccharides, glucides, lipides, oxalate et acide phytique), et des constituants minéraux (calcium, magnésium, potassium, fer, Zinc, et Azote). C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme (Garza, 2015).

### II. 1. Généralités

Les légumineuses sont des plantes dont le fruit est une gousse contenant des graines différentes autant par leurs formes que par leurs couleurs. Au sens large, ce sont des plantes comprenant des arbres, des herbacées annuelles ou vivaces, des lianes et même des plantes aquatiques. Il s'agit des plantes à répartition cosmopolite, présentes dans presque tous les écosystèmes terrestres (Mirza *et al.* 2020).

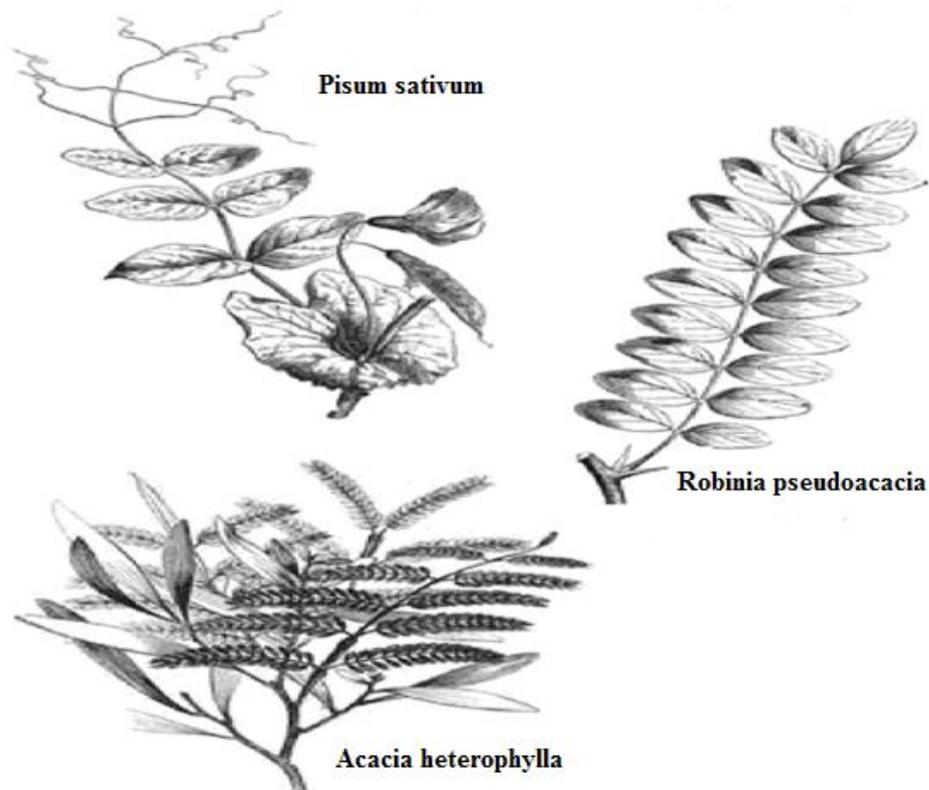
Plusieurs légumineuses sont d'importantes plantes cultivées (le soja, les haricots, les pois, ...etc ) et sont des aliments de base pour l'homme depuis des millénaires (Bargis et al, 2015). On peut citer par exemple : le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le niébé (*Vigna unguiculata*), la lentille (*Lens esculenta*), la cacahuète (*Arachis hypogea*). De ce fait, les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (Perert, 2007).

## II. 2. Caractéristiques botaniques

### II. 2. 1. Appareil végétatif

L'appareil végétatif des légumineuses est particulièrement varié, on peut observer en effet: Des arbres, des arbrisseaux, des lianes volubiles ou pourvues de vrilles, des herbacées annuelles ou vivaces..Etc.

Les feuilles sont primitivement alternes, stipulées ou composées imparipennées et peuvent montrer diverses évolutions. Ainsi, à partir de la feuille à folioles régulière considérée comme type, il peut y avoir : Transformation de la foliole terminale en vrilles (Figure 4, Les pois), transformation des stipules en épines (Figure 4, Le Robinier), disparition de la foliole terminale, réduction à 3 folioles comme le trèfle mais en compensation, par un développement de stipules, élargissement des pétioles en phyllode (Figure 4, Acaci)...etc



**Figure 4.** Exemples d'évolution des feuilles chez les légumineuses.

Les racines présentent la particularité biologique de pouvoir fixer de l'azote atmosphérique grâce à la présence de nodules racinaires. Cette caractéristique biologique est le résultat d'une symbiose entre des bactéries fixatrices d'azote, essentiellement les rhizobiums, et ces différentes espèces de légumineuses.

### II. 2. 2. Appareil reproducteur

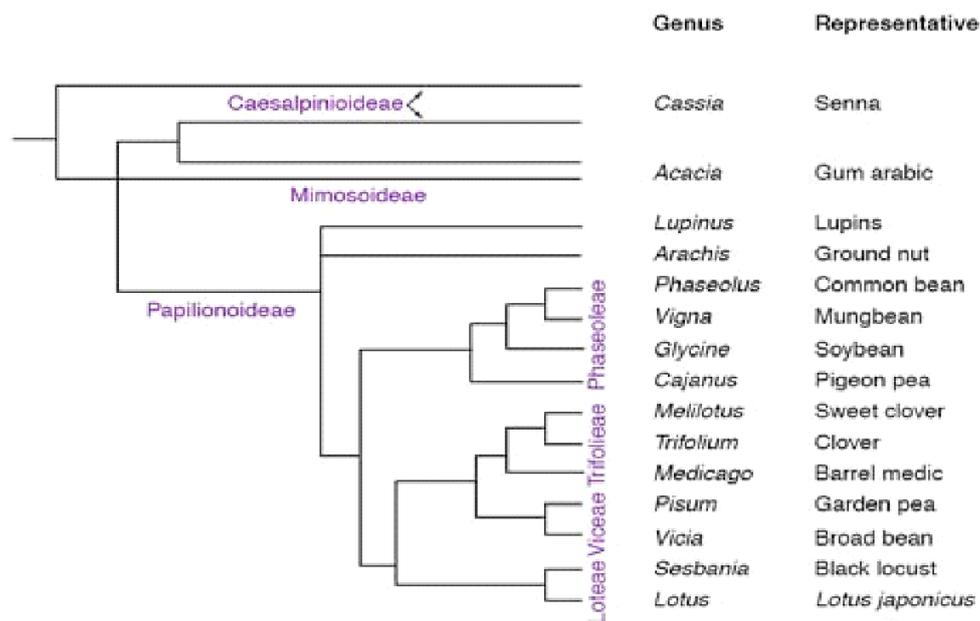
Les inflorescences sont le plus souvent groupées en racèmes ou en grappes plus ou moins denses. Les fleurs portent 5 pétales, plus ou moins soudés entre eux. Les fleurs hermaphrodites, encore régulières chez les *Mimosoideae*, deviennent très Zygomorphes chez les autres sous-familles.

Les fruits sont presque toujours des gousses à une loge, parfois divisées en 2 segments portant chacun une rangée de grains. Elles peuvent être pauciséminés et indéhiscentes comme chez la cacahuète (Fruit de l'Arachide), devenir lomentacée comme chez la Coronille ou développer une fausse cloison longitudinale comme chez les Astragale (Botineau, 2010).

### II. 3. Taxonomie

La famille des légumineuses fait partie du règne des *Plantae*, la division des *Magnoliophyta*, la classe des *Magnoliopsida* et l'ordre des *Fabales* (Petit-Aldana *et al.* 2014). Elle constitue une des familles de végétaux supérieurs les plus abondants et les plus diversifiés (Broughton, 1984). Elle comprend des arbres, des arbustes et des plantes herbacées pérennes ou annuelles, qui sont facilement reconnaissables par leurs fruits (légumineuses) (Judd *et al.*, 2002). Classiquement, les légumineuses ont été subdivisés en trois grandes sous-familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Faboideae* ou *Papilionoideae* (Figure 5) (Garza, 2015).

Cependant, la classification traditionnelle en trois sous-familles a été révisée et modifiée par le LPWG et Sprent *et al.* en 2017. Une nouvelle classification des sous-familles basée sur les analyses phylogénétiques divise les *Fabacées* scientifiquement en 6 nouvelles sous-familles : *Detarioideae* (84 genres ; 760 espèces), *Cercidoideae* (12 genres ; 335 espèces), *Duparquetioideae* (1 genre ; 1 espèce), *Dialioideae* (17 genres ; environ 85 espèces), *Caesalpinioideae* (148 genres ; env. 4400 espèces), et *Papilionoideae* (503 genres ; environ 14 000 espèces) (Hasanuzzaman *et al.* 2020).



**Figure 5.** Phylogénie des légumineuses (D'après Udvardi *et al.* 2005).

### III. Le partenaire bactérien

Rhizobium signifie étymologiquement : ce qui vit dans les racines, créé en 1889 par Frank pour les bactéries qui nodulent les racines des légumineuses et dans lesquelles elles vivent comme des endosymbiotes (Schultze & Kondorosi, 1998).

Les rhizobia ou bactéries nodulant les Légumineuses (BNL) sont des bactéries aérobies du sol, qui peuvent interagir avec les plantes de la famille des légumineuses (ou fabacées ) afin de leur apporter de l'azote (Sebihi, 2008).

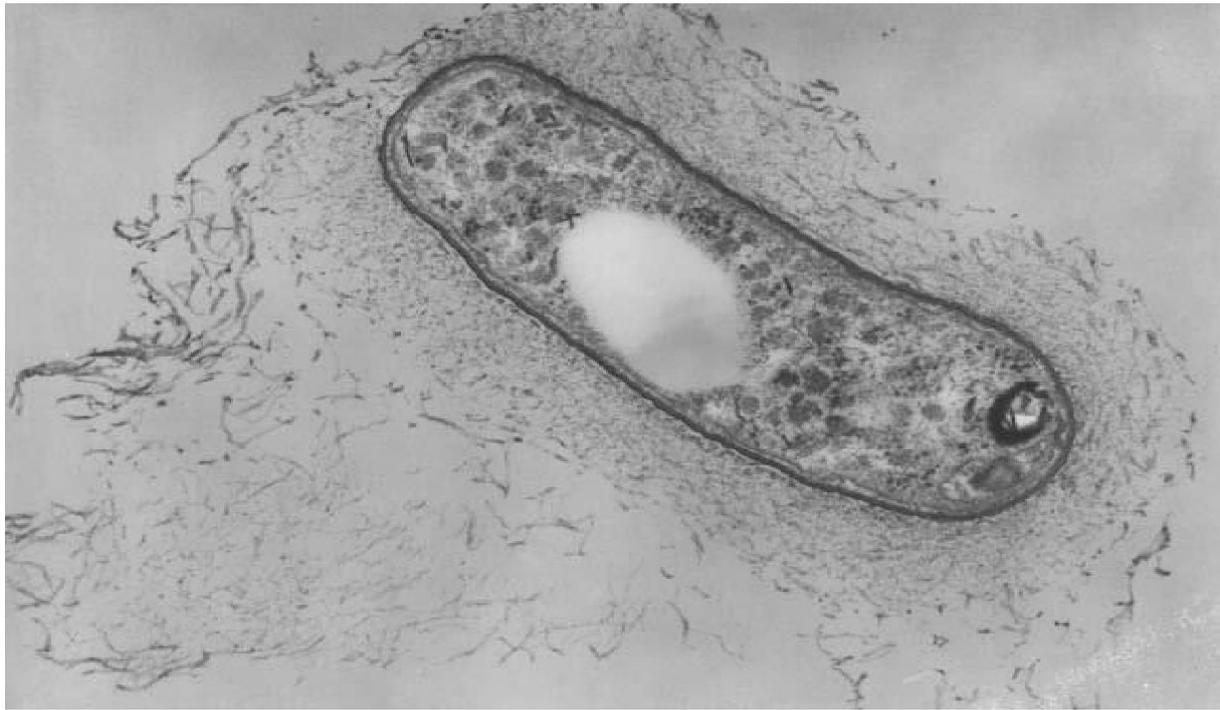
Rhizobia est un nom générique pour un certain groupe Gram-négatif d'Alpha proteobacteria et Beta proteobacteria qui peuvent former des nodules sur la racine, ou dans certains cas sur les tiges, de nombreuses espèces de plantes, notamment les Fabacées et fixer l'azote (Sprenst, 2008). Le genre Rhizobium a été le premier groupe décrit de ces BNL, et c'est pourquoi ce nom a été fréquemment utilisé pour les bactéries fixatrices d'azote des légumineuses.

#### III. 1. Caractéristiques

Les rhizobiums sont des bacilles à Gram négatif (Figure 6) avec deux couches de paroi cellulaire (la première couche est constituée de glucides et de protéines, et la deuxième couche de lipides et de glucides). Ce sont des bactéries aérobies, vivant dans la rhizosphère (soit à l'état libre soit en association avec les légumineuses) et se nourrissant des restes d'organismes morts. Elles possèdent une forme de bâtonnets de 0.6 à 0.9 nm de largeur et de 1.2 à 3 nm de longueur et non sporulants.

Les rhizobiums sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches. Leur croissance est optimale à une température de 28 ° C et un pH entre

6 et 7. Ils appartiennent à la sous classe alpha des proteobacteria de la grande classe des eubactéries (Benselama, 2015).



**Figure 6.** Représentation microscopique du *Rhizobium trifolii* (D'après Vincent, 1982).

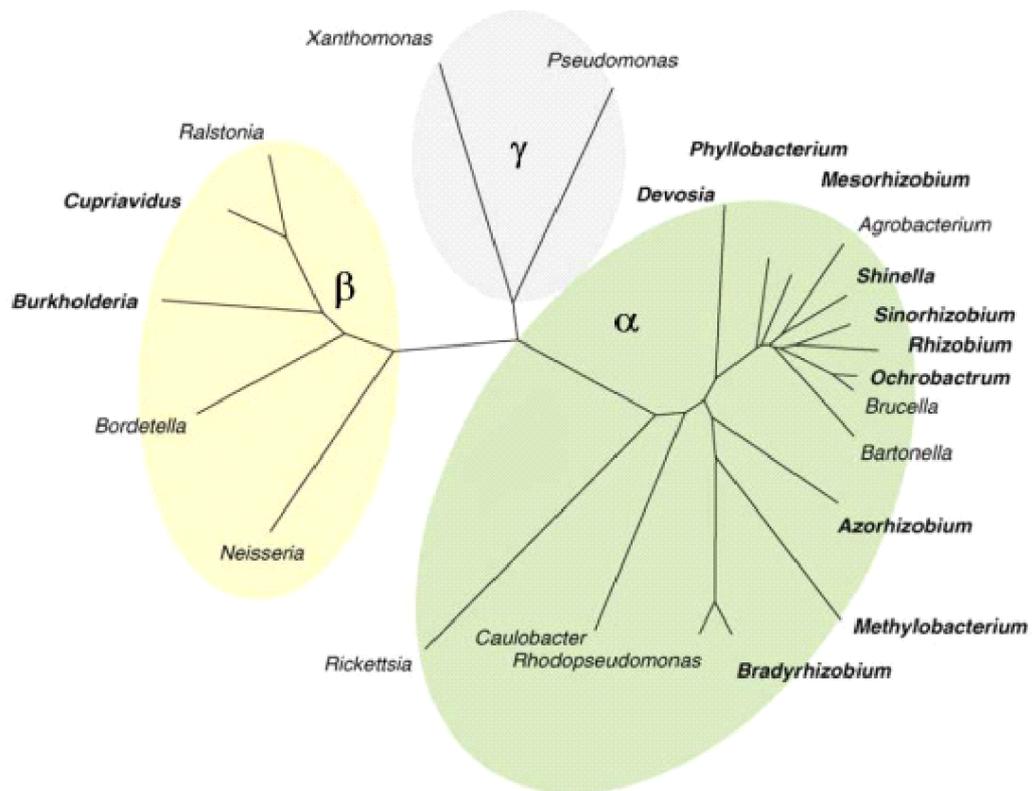
### III. 2. Taxonomie

Suite à l'adaptation de la Taxonomie poly-phasique comme critère de caractérisation, leur classification a subi de nombreux remaniements ces dernières années.

Actuellement, les rhizobiums sont répartis dans 13 genres et 98 espèces symbiotiques. Quatre genres d' $\alpha$ -protéobactéries constituent les symbiotes majoritaires de la plupart des espèces de légumineuses rencontrées à travers le monde : *Rhizobium* (Franck, 1889), *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) (Young, 2003), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.* 1997), et *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982). Toutefois il existe d'autres genres d' $\alpha$ -protéobactéries, induisant des nodules, moins fréquemment isolés, ayant une distribution géographique réduite et un spectre d'hôtes limité, et découvertes plus récemment.

Par ailleurs, des symbiotes de légumineuses ont également été trouvés dans le phylum des  $\beta$ -protéobactéries (Figure 7), *Burkholderia* et *Cupriavidus*. D'autres études auraient également identifié la présence de protéobactéries du groupe  $\gamma$  dans les nodules des légumineuses (Riah, 2014).

Cependant, cette classification des rhizobiums est loin d'être définitive, elle s'affine sans cesse et s'enrichit d'année en année de nouvelles espèces et nouveaux genres de bactéries.



**Figure 7.** Arbre phylogénétique d' $\alpha$ , et  $\beta$ - protéobactéries. Les genres indiqués en gras comprennent des rhizobiums (Masson *et al.* 2009).

# **CHAPITRE III**

## **INTERACTION**

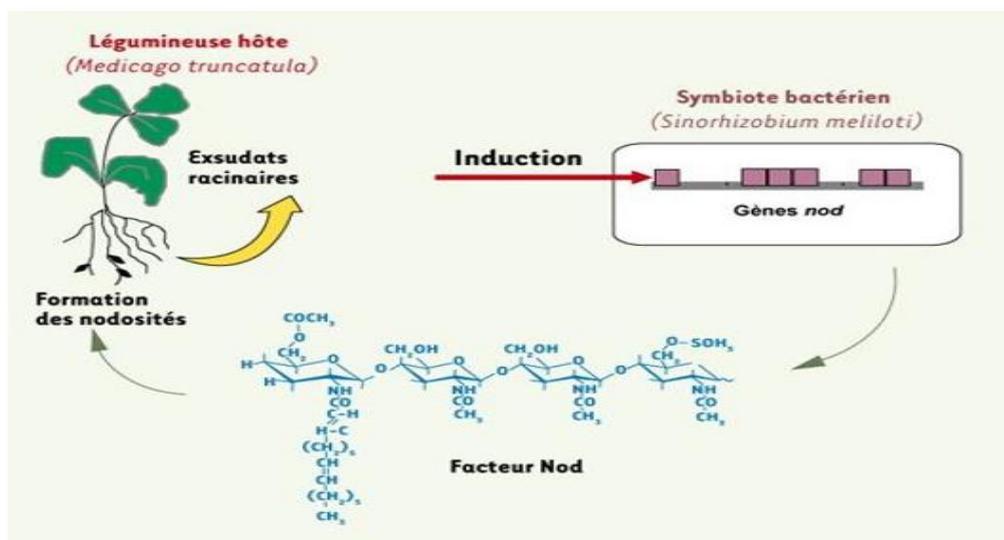
### **LÉGUMINEUSE-RHIZOBIUM**

## I. Dialogue moléculaire et signalisation symbiotique

Pour être capable de se défendre contre les parasites, les plantes ont à leur disposition des systèmes de défense contre les micro-organismes pathogènes. Ces mécanismes de défense reposent sur la reconnaissance des antigènes spécifiques : les PAMPs, « Motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes », comme les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries.

Dans le cadre des interactions symbiotiques, le micro-organisme doit être capable de s'identifier comme partenaire symbiotique potentiel. Ainsi, l'établissement de la symbiose Rhizobium-Légumineuse est le résultat d'interactions complexes entre la bactérie et son hôte.

Ces interactions, impliquant un dialogue moléculaire qui s'installe entre les deux partenaires, débutent par une reconnaissance mutuelle (Godfroy, 2008). Dans un premier temps, les Légumineuses produisent des exsudats racinaires contenant des composés phénoliques; flavonoïdes, des stachydrines, ou des acides aldoniques, qui seront perçus par la bactérie ce qui permet l'activation de la transcription de gènes bactériens particuliers (Selami, 2017). En réponse à l'émission par les légumineuses de composés phénoliques, les rhizobiums synthétisent des molécules spécifiques de la symbiose qui leurs permettent de s'identifier comme partenaires symbiotiques potentiels non pathogènes (Figure 8). Ces molécules perçues par la plante sont appelées facteurs de nodulation, ou Facteurs Nod (Godfroy, 2008).



**Figure 8.** Représentation schématique du dialogue moléculaire lors de la symbiose (D'après Bouzred, 2016).

### I.1. Les flavonoïdes

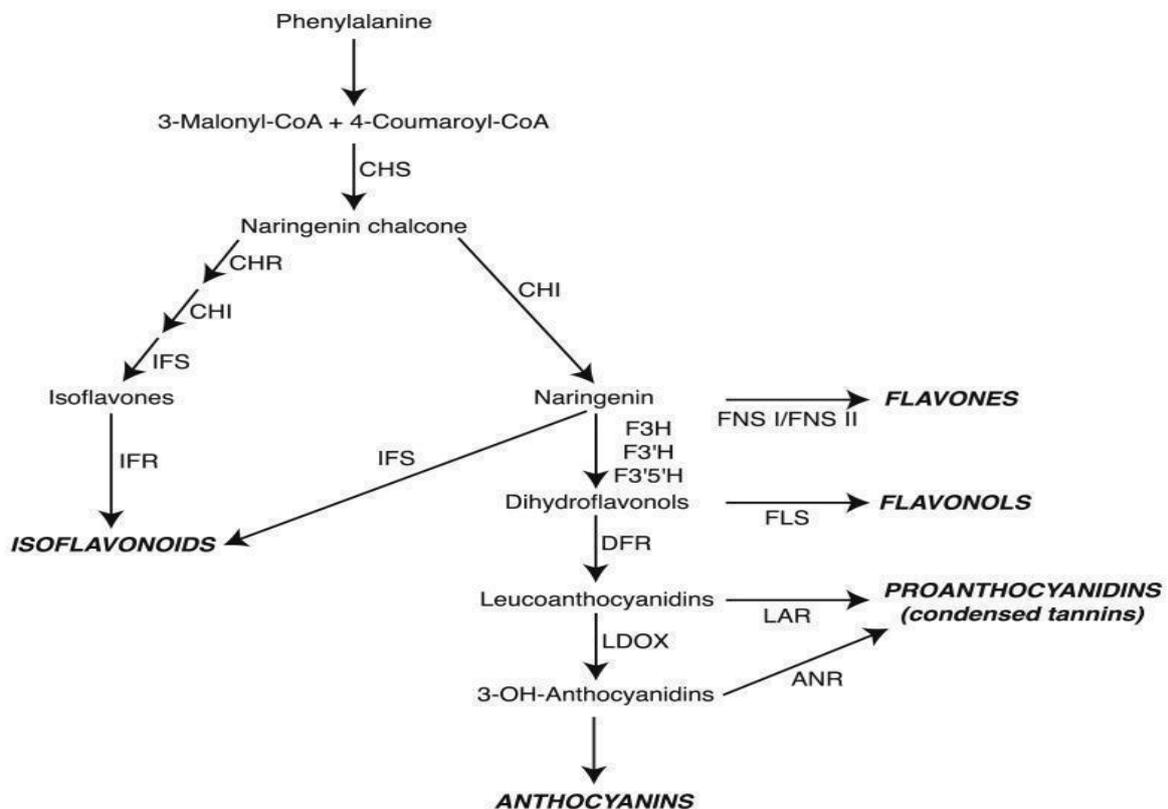
Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des métabolites secondaires des plantes vasculaires.

Structurellement, ils se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins (Bruneton, 2009).

### I. 1.1. Biosynthèse

Les flavonoïdes sont synthétisés à partir de la voie des phénylpropanoïdes, transformant la phénylalanine en 4-coumaroyl-CoA, qui entre finalement dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Figure 9).

La première enzyme caractéristique de la voie des flavonoïdes, la chalcone synthase, produit des échafaudages de chalcone à partir desquels tous les flavonoïdes sont dérivés. Bien que la voie principale de la biosynthèse des flavonoïdes soit conservée, selon l'espèce, un groupe d'enzymes, comme les isomérases, les réductases, les hydroxylases et plusieurs oxygénases dépendantes du Fe (II) /2-oxoglutarate, modifient la structure de base des flavonoïdes, donnant lieu à différentes sous-classes de flavonoïdes (Martens *et al.*, 2010).



**Figure 9.** Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (D'après Popovici *et al.* 2010).

Des étapes ultérieures, de glycosylation surtout et d'acylation, amènent le flavonoïde à sa forme définitive, modulant ainsi l'activité physiologique du flavonoïde résultant en altérant

sa solubilité, sa réactivité et son interaction avec les différentes cibles cellulaires (Ferrer *et al.*, 2008).

Les enzymes clés sont abrégées comme suit : CHS, chalcone synthase ; CHR, chalcone réductase ; CHI, chalcone isomérase ; IFS, isoflavone synthase ; IFR, isoflavone réductase ; F3H, flavanone 3 hydroxylase ; F3'H, flavonoïde 3' hydroxylase ; F3',5'H, flavonoïde 3',5' hydroxylase ; DFR, dihydroflavonol réductase ; FNS, flavone synthase ; FLS, flavonol synthase ; LDOX, leucoanthocyanidine dioxygénase ; LAR, leucoanthocyanidine réductase ; ANR, anthocyanidine réductase. Les principales classes de produits finaux sont soulignées en italique gras.

### I.1.2. Rôle des flavonoïdes

Les fonctions des flavonoïdes sont très variées allant de la pigmentation des pétales à la défense contre les pathogènes. Au cours de la symbiose rhizobium/légumineuse, les flavonoïdes ont pour principale fonction la signalisation, principalement la chimio-attraction des *rhizobia* (Caetano, et al., 1988). Ils sont libérés en plus grande quantité près de l'extrémité des racines ce qui leur permet, en tant que chimioattractants, de concentrer les Rhizobium à la surface de la racine des légumineuses (Graham, 1991).

La principale fonction des flavonoïdes est la signalisation. Chez les légumineuses, des flavonoïdes spécifiques sont libérés par les racines interagissent avec la protéine Nod D de Rhizobium, un régulateur transcriptionnel de la famille Lys-R qui reconnaît une séquence d'ADN de 47pb, la « nod box », dans les régions promotrices des gènes de nodulation (Rostas *et al.*, 1986) , pour activer l'expression d'autres gènes nod responsables de la synthèse de lipochitooligosaccharides (LCOs) appelés facteurs Nod (Dénarié *et al.*, 1996). Cette combinaison de protéines Nod D et de flavonoïdes déclenche la production de signaux Nod hautement spécifiques entraînant des transformations structurelles chez les légumineuses, notamment l'enroulement de l'extrémité du tapis racinaire sur lui-même, le piégeage et la concentration des bactéries dans une poche, d'où elles sont transportées dans un fil d'infection intracellulaire fabriqué par la plante (Wang *et a.l.*, 2011).

## II. Spécificité de la symbiose

La symbiose Rhizobium /Légumineuses présente une particularité intéressante: sa spécificité. En effet, un rhizobium donné est capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote seulement avec un nombre limité de légumineuses, défini comme son spectre d'hôte (Tableau 2) (Perret *et al.*, 2000). Inversement, une espèce de légumineuses pourra établir une association symbiotique avec une ou plusieurs espèces de rhizobia, définissant ainsi le spectre

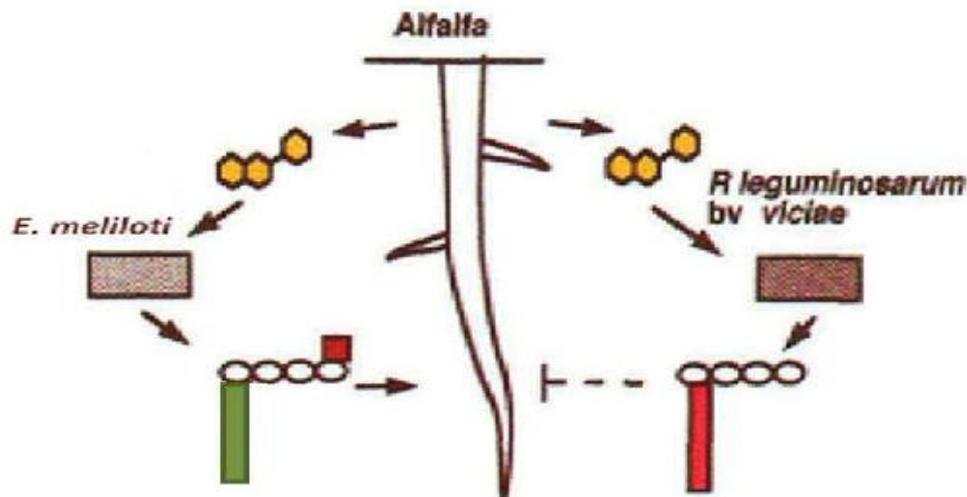
d'hôte de la légumineuse. Ainsi les associations peuvent être très spécifiques (Spectre très limité) ou généralistes, lorsque le spectre d'hôte de l'espèce de rhizobia considérée est large.

Cette spécificité est généralement dépendante de la composition des exsudats racinaires de Légumineuses ainsi que la perception de ces exsudats par les protéines NodD des différents Rhizobiums (Hassan *et al.* 2012). La composition des flavonoïdes émis par les racines étant différente d'une plante à l'autre, la nature de la protéine NodD d'une espèce bactérienne donnée détermine sa capacité à détecter les flavonoïdes émis par une plante donnée. Cette reconnaissance spécifique entre les protéines NodD et certains flavonoïdes introduit un premier niveau de spécificité de l'interaction symbiotique (Figure 10).

La reconnaissance du facteur Nod par la plante représente un second niveau de spécificité de la symbiose.

Le partenaire bactérien	Le partenaire végétal	Le spectre d'hôte
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Robiniae , Sesbania spp</i>	Compatible seulement avec <i>Sesbania punctata</i> et <i>S. rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium elkani</i>	<i>Phaseoleae , Glycine spp.</i>	<i>Acacieae , Mimoseae , Desmodieae , Loteae , Psoraleeae , Phaseoleae , Aeschynomeneae</i>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	<i>Galegeae , Astragalus spp.</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Gaegeae , Galega spp.</i>	Compatible seulement avec <i>Galega spp.</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseoleae , Phaseolus spp.</i>	<i>Galegeae , Crotalarieae , Desmodieae , Mimoseae , Robinieae , Loteae</i>

**Tableau 2.** Quelques exemples de la capacité de nodulation de symbiotes de l'ordre des Rhizobiales en fonction de l'espèce végétale (D'après Perret *et al.*, 2000).



**Figure 10.** Schéma d'échange des signaux symbiotiques et la spécificité d'hôte (D'après Long, 1996).

Ce schéma représente la spécificité de la luzerne envers *Ensifer meliloti* :

- A gauche, la luzerne produit des flavonoïdes (en jaune) qui stimulent la transcription des gènes nod (rectangle gris) dans *E. meliloti*. Cette transcription permet la synthèse des facteurs Nod (en rouge et vert), conduisant à une réponse spécifique de la plante hôte.
- A droite, la luzerne déclenche l'expression de l'ensemble des gènes nod de *R. leguminosarum sv. viciae*. Les FN de cette espèce sont synthétisés en réalisant des modifications spécifiques à l'hôte (symbole rouge) mais cela n'est pas adapté avec la luzerne. Par conséquent, les signaux de *R. leguminosarum bv viciae* ne provoquent pas de réponse dans la luzerne (Long, 1996).

•

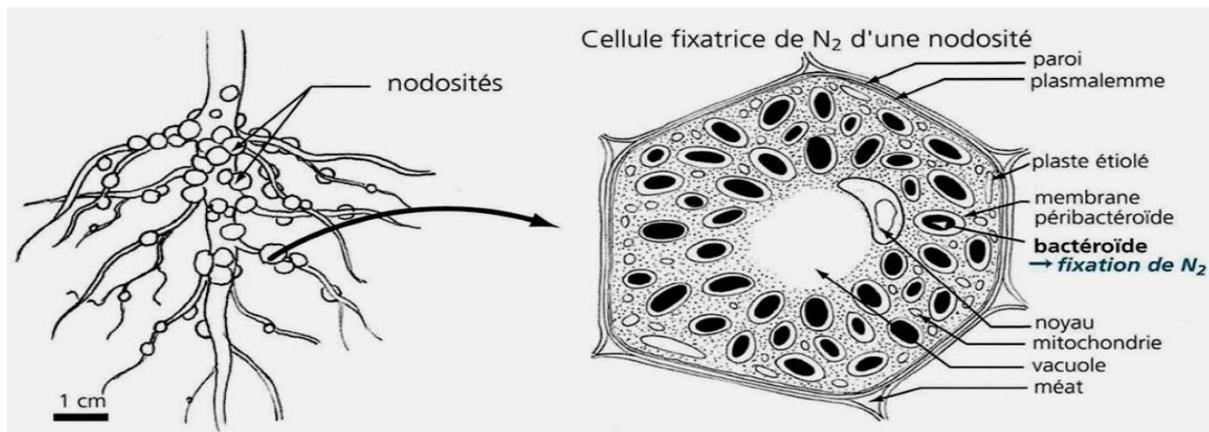
### III. Processus de nodulation des légumineuses

#### III .1. Définition

La nodulation est un processus qui aboutit à la formation des nodules, souvent racinaires, sur les légumineuses. La formation de nodules est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique Rhizobia / Légumineuse (Lohar *et al.* 2009).

La formation des nodules (Figure 11) est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte. L'interaction commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. Ces nodosités ou nodules sont des organes spécialisés dans lesquelles l'azote atmosphérique est réduit en ammoniac suite à l'infection par les

Rhizobia. Ces nodules racinaires formés sur les légumineuses constituent l'unité fonctionnelle de l'association symbiotique permettant la fixation de l'azote atmosphérique.



**Figure 11.** Nodosités racinaires des légumineuses et détail d'une cellule infectée (D'après Meyer *et al.* 2008).

### III. 2. Génétique de nodulation

Lors de la symbiose rhizobium-légumineuses, trois types de gènes interviennent dans le processus de nodulation et de fixation biologique de l'azote. Il s'agit des gènes Nod indispensables à la nodulation, des gènes *nif* qui codent pour le complexe nitrogénasique et des gènes *fix* nécessaires pour le processus de fixation (Hennecke *et al.* 1987).

#### III. 2. 1. Gènes Nod

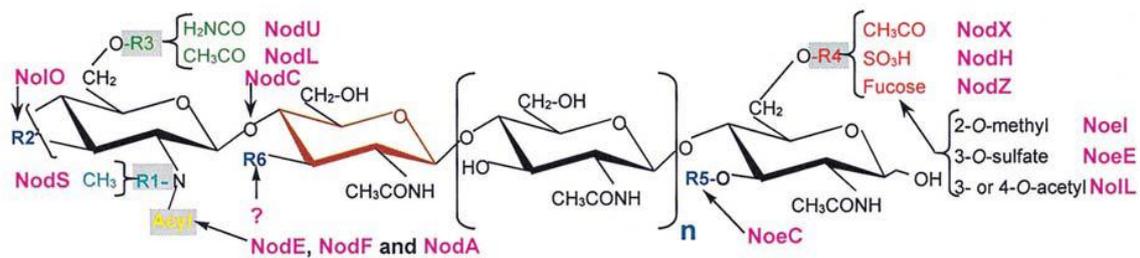
Ce sont des gènes spécifiques de la nodulation, appelés opéron nod, et qui représentent la clé de l'établissement de la symbiose Rhizobium / Légumineuses. Ils se répartissent en trois catégories :

- Gènes commun (Nod ABC), présentes chez toutes les espèces de Rhizobium (Le Rudulier *et al.*, 1986).
- Gènes Nod spécifiques (*hsn*), déterminent la structure finale du facteur Nod, et de ce fait le spectre d'hôte de chaque espèce de Rhizobium.
- Gènes Nod régulateurs (Nod D), activent l'expression des gènes Nod communs et spécifiques (Van de Sande & Bisseling, 1997).

#### III. 2. 2. Facteurs Nod

Les facteurs Nod sont des substances de nature lipo- ochitooligosaccharidique (LCO) formées par une chaîne de N-acétyl-D-glucosamine réunies par des liaisons  $\beta(1 \rightarrow 4)$  et associée à un acide gras dont la composition détermine la comptabilité du Rhizobium vis à vis des légumineuses (Fisher, 1994). Ces facteurs Nod sont le principal déterminant de la

spécificité de l'hôte. Le tableau suivant (Tableau 3) montre la structure des FNs et la diversité de ces facteurs selon l'espèce rhizobienne.



Souche	Acide gras	R1	R2	R3	R4	R5	R6	n
<i>Rhizobium</i> sp. strain GRH2	C16:0,C18:0,C18:1,C20:1	Me, H	OH	H	S,H	H	OH	1,2,3
<i>Rhizobium</i> sp. strain ORS1645	C18:0,C18:1	Me	Cb <sup>c</sup>	Cb <sup>c</sup>	S,H	H	OH	2
<i>Rhizobium</i> sp. strain NGR234	C16:1,C18:0,C18:1	Me	Cb,OH	Cb, H	MeFuc, AcMeFuc, SMeFuc	H	OH	2
<i>R. etli</i> CFN42	C18:1	Me	Cb,OH	H	AcFuc	H	OH	2
<i>R. etli</i> CE3	C18:0,C18:1	Me	Cb,OH	H	AcFuc	H	OH	2
<i>R. fredii</i> USDA191 <sup>b*</sup>	C18:1,C18:0,C16:1	H	H	H	Fuc,MeFuc	H	H	0,1,2
<i>R. fredii</i> USDA257 <sup>*</sup>	C18:1	H	OH	H	Fuc,MeFuc	H	OH	0,1,2
<i>R. galegae</i>	C18:1,C18:2,C18:3,C20:2,C20:3	H	OH	Cb	H	H	Ac	1
<i>R. huakuii</i> <sup>d</sup>	C18:4	H	OH	H	S	H	OH	2
<i>R. leguminosarum</i>								
bv. <i>trifolii</i> ANU843	C16:0,C16:1,C18:0,C18:1,C18:2,C20:3	H	OH	H,Ac	H	H	OH	0,1,2
bv. <i>trifolii</i> LPR5045	C18:0,C18:1,C20:3,C20:4	H	OH	Ac	H	H	OH	2
bv. <i>viciae</i> RBL5560	C18:1,C18:4	H	OH	Ac	H	H	OH	1,2
bv. <i>viciae</i> TOM	C18:1,C18:4	H	OH	Ac	Ac	H	OH	1,2
<i>R. loti</i> NZP2213 <sup>**</sup>	C16:0,C16:1,C18:0,C18:1,C20:0,C20:1,C2	H	Cb	H	Fuc,AcFuc	H	Fuc	-1, 0,1,2

**Tableau 3.** Diversité des Facteurs de Nodulation (D'après Perret *et al.* 2000).

### III. 3. La formation des nodosités

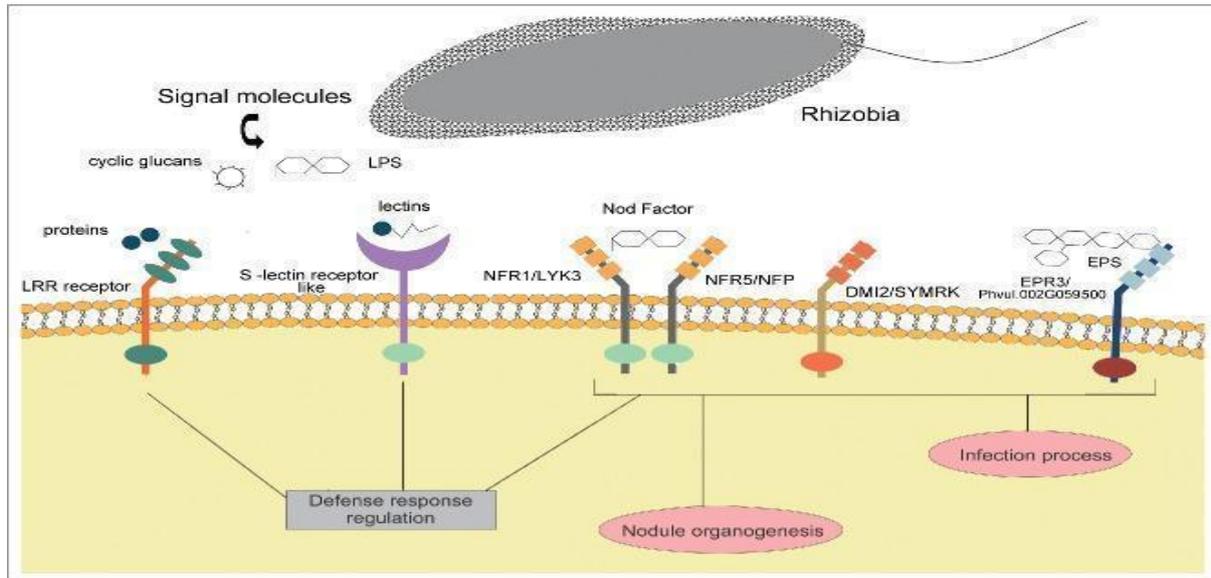
La formation d'un nodule fonctionnel est un processus très complexe. Mais celle-ci peut être divisée en quatre étapes : la pré-infection, l'infection, l'organogenèse et la fixation de l'azote.

#### - Pré-infection

Cette phase est caractérisée par une multiplication intense des *Rhizobia* dans la rhizosphère, et commence avec la colonisation de jeunes poils absorbants par les *Rhizobia* et fait intervenir, comme nous l'en avons parlé, un échange de molécules signales dont les médiateurs principaux sont les flavonoïdes et les Facteurs Nod (Sprent, 2001).

En réponse aux signaux flavonoïdes excités par la racine de la plante hôte, la protéine NodD des *Rhizobia* va induire en retour l'expression des gènes de la nodulation (Bergen *et al.*, 2001) et la déformation des poils absorbants qui vont se courber pour former une structure dite «crosse de berger» afin de permettre l'adhésion des *Rhizobia* à la surface des racines. L'adhésion des bactéries à la surface des poils absorbants est assurée par des lectines

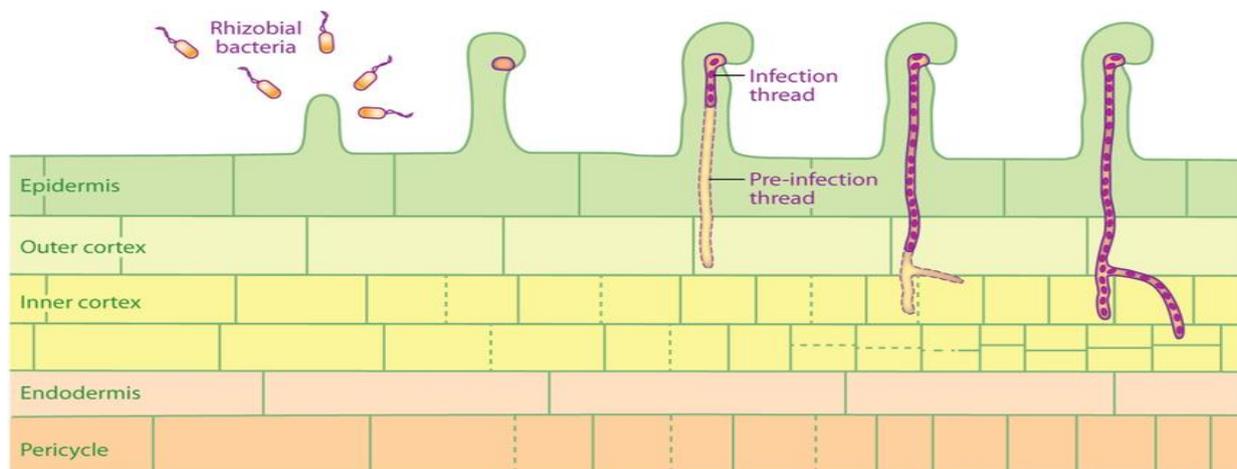
spécifiques (glycoprotéine d'origine végétale). Ces lectines s'unissaient sélectivement avec les polysaccharides de la paroi bactérienne (Figure 12) (Selami, 2017).



**Figure 12.** Perception et transduction du signal bactérien lors de la symbiose (D'après Dalla *et al.* 2015).

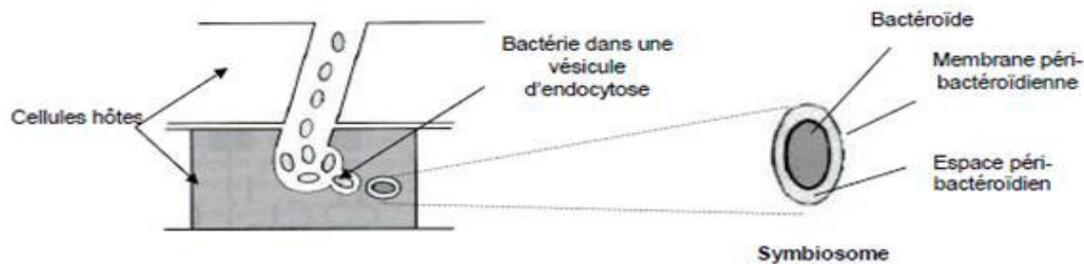
### - Infection du système racinaire

A partir de la courbure en crosse de berger, les Rhizobia pénètrent la cellule végétale par la formation d'une structure tubulaire appelée cordon d'infection. Ces cordons progressent vers le cortex interne de la racine en produisant des ramifications assurant une bonne colonisation du nodule (Selami, 2017). Cette pénétration est facilitée par une fragilisation localisée de la paroi des poils sous l'effet d'enzymes hydrolytiques (Viprey *et al.* 2000 ). La Figure 13 illustre la formation de celle-ci ainsi que sa progression dans les tissus internes de la racine.



**Figure 13.** Illustration schématisée de la formation du cordon d'infection et sa progression (D'après Oldroyd *et al.* 2010).

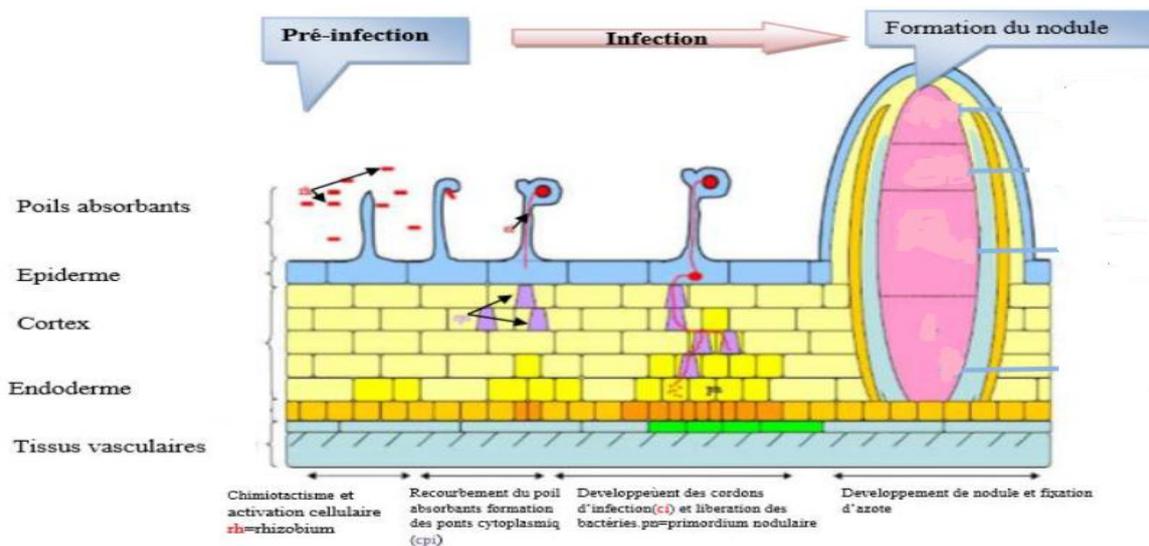
Durant leur progression, les cordons libèrent les Rhizobium, qui prennent une forme en Grass caractéristique, dans les cellules racinaires (Figure 14). C'est à ce stade, que les symbiosomes fabriquent la nitrogénase (Selami, 2017).



**Figure 14.** Formation des symbiosomes et libération des bactéries (D'après Selami, 2017).

### - Nodulation proprement dit (Organogénèse du nodule)

La multiplication intense des cellules du cortex racinaire et leur différenciation se traduit par une augmentation du volume des tissus nodulaires et l'émergence du nodule à la surface de la racine. Les grandes étapes de formation des nodosités sont détaillées ci-dessous et représentées (Figure 15).



**Figure 15.** Processus d'infection de la racine et mise en place du nodule chez *Medicago truncatula* (D'après Selami, 2017).

### - Réduction et assimilation de la l'azote

Durant cette phase, les nodosités élaborent une molécule proche de la léghémoglobine, de couleur brun – rouge : la léghémoglobine qui assure le transport et la régulation de l'oxygène vers les bactéroïdes (Hamida, 2003). Ce qui confère à la nitrogénase une niche protectrice (Ott *et al.* 2005). Ainsi, la symbiose se met en place et les rhizobiums trouvés dans

les nodules racinaires des légumineuses peuvent fixer une grande quantité d'azote à partir de l'air.

## IV. La fixation biologique de l'azote

### IV. 1. Généralités

Naturellement, à l'état libre, les « Rhizobium » sont des bactéries souvent flagellées mobiles mais, en association au sein des légumineuses, ces bactéries perdent leur mobilité et présentent une autotrophie à l'azote (capacité d'assimiler le  $N_2$ ) tout en demeurant hétérotrophes au carbone (incapacité d'assimiler le carbone minéral).

La réduction de l'azote moléculaire est possible grâce à un complexe enzymatique bactérien, la nitrogénase. Cette dernière agit comme un catalyseur, en réduisant cette barrière énergétique de telle sorte que la réaction puisse avoir lieu à température ambiante. En effet, ce complexe nitrogénasique est extrêmement sensible au dioxygène ( $O_2$ ) et peut être irréversiblement dénaturé par celui-ci. C'est pourquoi cette fixation biologique de l'azote n'est possible qu'au sein des nodules qui assurent la protection de la nitrogénase contre l'oxygène (Hirsh *et al.* 1997).

### IV. 2. Nitrogénase et mécanismes de la fixation de l'azote atmosphérique

Les nitrogénases sont une famille de métallo-enzymes complexes classées comme oxydoréductases et qui catalysent la réduction de l'azote ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ) (Hoffman *et al.* 2014).

Trois nitrogénases homologues ont été identifiées à ce jour, qui contiennent des cofacteurs qui se distinguent principalement par les hétéro-métaux qu'ils contiennent sur leurs sites de cofacteurs respectifs : les nitrogénases au molybdène (Mo) dites "conventionnelles" qui peut être remplacée par des nitrogénases alternatives dans des environnements pauvres en cofacteur Mo. Deux types de ces azotases sont connus: au vanadium (V) et au fer (Fe) (Hu *et al.* 2012).

Outre ces iso formes de nitrogénases, plusieurs homologues structurels/fonctionnels des nitrogénases ont été identifiés ces dernières années (Moser *et al.*, 2011). Mais nous ne présentons ici qu'une vue d'ensemble de structure et des fonctions de la nitrogénase conventionnelle.

#### IV .2 .1. La nitrogénase au molybdène (Mo)

La nitrogénase Mo (EC 1.18. 6. 1) est la nitrogénase des Rhizobiums. Elle est sans aucun doute l'isomère la plus étudiée et donc la mieux caractérisée de cette super famille d'enzymes. Elle est constituée de deux protéines métallo sulfurées, sensibles à l'oxygène,

purifiables séparément, désignées respectivement comme la protéine Fe et la protéine MoFe (Figure 16, A ) (Burgess *et al.*, 1996a).

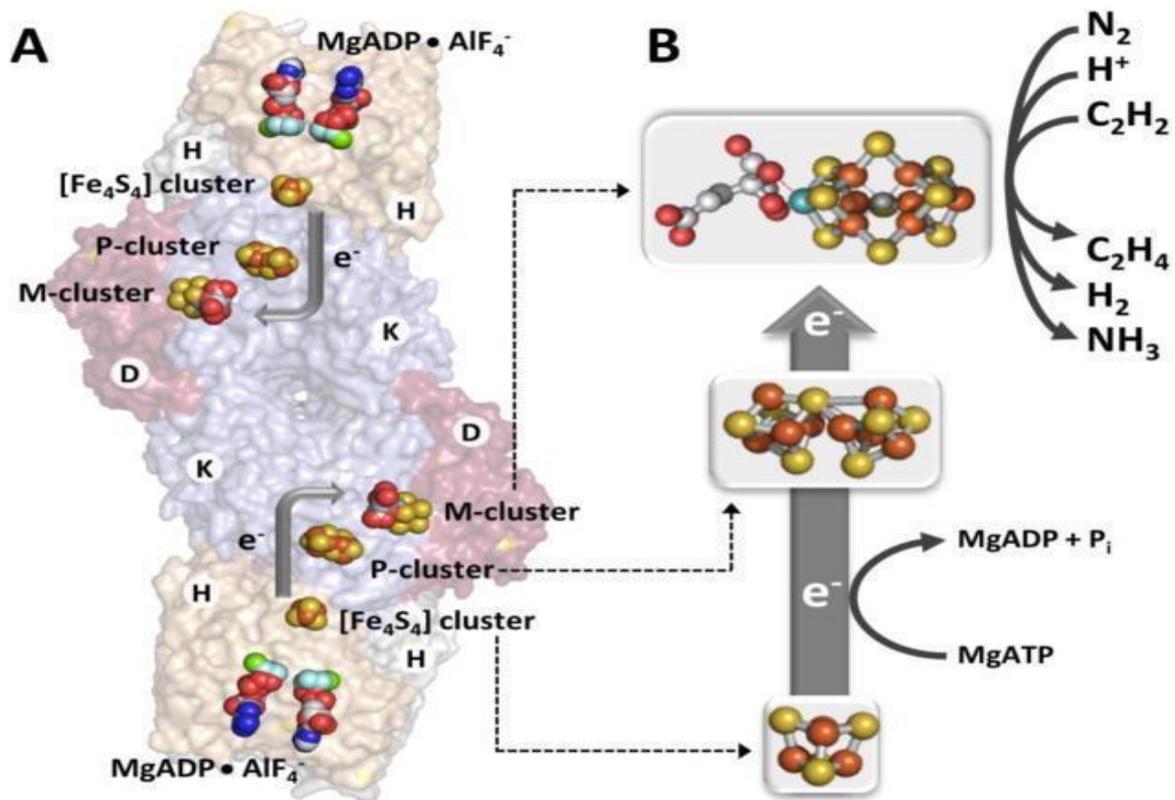


Figure 16. Structure de la nitrogénase au Mo.

**A:** Présentation de surface (transparente) de la structure du complexe protéine Fe/MoFe stabilisé par le cluster MgADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Les deux sous-unités de la protéine Fe (désignée par H) sont colorées en gris et en bleu clair, respectivement, et les sous-unités  $\alpha$ - et  $\beta$  de la protéine MoFe sont colorées en rouge ( désignée par D ) et en bleu clair (désignée par K), respectivement.

**B:** Éléments impliqués dans le transfert d'électrons pendant la réaction catalytique. Les atomes sont colorés comme suit : Fe, orange ; S, jaune ; Mo, cyan ; O, rouge ; C, gris ; N, bleu ; Mg, vert foncé ; Al, vert clair ; F, bleu clair.

Les deux protéines sont associées à quatre atomes de fer, quatre atomes de soufre et un atome de molybdène. Elle se présente sous la forme d'un complexe renfermant deux composantes enzymatique distinctes :

- **La dinitrogénase (Mo-nitrogénase):** C'est le composant responsable de la réduction de l'azote. Elle est représentée par un tétramère protéique, constitué de deux sous-unités  $\alpha$  et de deux sous-unités  $\beta$ , pesant environ 240-250 kD et associé avec le molybdène, le fer et le

soufre. Elle contient également deux amas de fer-soufre, appelés clusters P, situés à l'interface entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et deux cofacteurs FeMo, dans les sous-unités  $\alpha$ .

- **La dinitrogénase réductase** : représentée par un dimère protéique ( environ 60 à 64 kDa ) contenant du fer et du soufre (Burges *et al.*, 1996 b). Elle assure le transfert des électrons, à partir d'un donneur (ferrédoxine ou flavodoxine ) vers la nitrogénase.

#### IV. 3. Génétique de la réduction d'azote

Le symbiosome fournit la machinerie génétique essentielle pour la synthèse du complexe nitrogénasique: ce sont les gènes *nif* et *fix*.

- **Les gènes *nif***: Ce sont des gènes qui codent pour la synthèse de la nitrogénase, dont les gènes de structure *nifH*, *nifD* et *nifK*. Le gène *nifH* code pour la dinitrogénase réductase (protéine Fe) constitué de deux chaînes identiques, alors que les gènes *nifD* et *nifK* codent pour la dinitrogénase.

- **Les gènes *fix***: Ce sont des gènes essentiels à la fixation d'azote rencontrés uniquement chez les micro-organismes fixateurs symbiotiques. Ces gènes sont impliqués dans les étapes tardives de développement des nodules. Certains de ces gènes sont des régulateurs de la synthèse du gène *nif A*, intervenant dans la régulation de la synthèse de la nitrogénase. D'autres encore (*fix* NOPQ) codent pour la synthèse d'enzymes catalysant la régulation de l'oxygène au sein des nodules (Fischer, 1994).

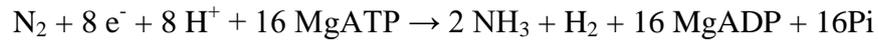
#### IV. 4. Protection de la nitrogénase

La nitrogénase est très sensible à la concentration en dioxygène qui peut inhiber fortement son activité voire l'altérer irrémédiablement. Mais *Rhizobium* est une Eubactérie Gram négatif hétérotrophe au carbone, qui nécessite le dioxygène pour sa respiration. Cet apparent paradoxe est contourné car les bacteroides synthétisent un pigment, la leghémoglobine (LegHb), une hétéroprotéine de structure quaternaire fixatrice, avec une forte affinité, de dioxygène : elle libère une quantité de dioxygène permettant la respiration des *Rhizobium* tout en interdisant les pressions partielles en dioxygène toxiques pour la nitrogénase (Ott *et al.* 2005).

#### IV. 5. Mécanisme moléculaire de la fixation biologique de l'azote

La fixation de l'azote est une réaction de réduction de l'azote moléculaire  $N_2$  en ammoniac  $NH_3$  (ou  $NH_4^+$ ). Ce processus de fixation du  $N_2$  est endergonique consommateur d'ATP mais aussi d'agents réducteurs apportant les électrons et les ions  $H^+$  nécessaires.

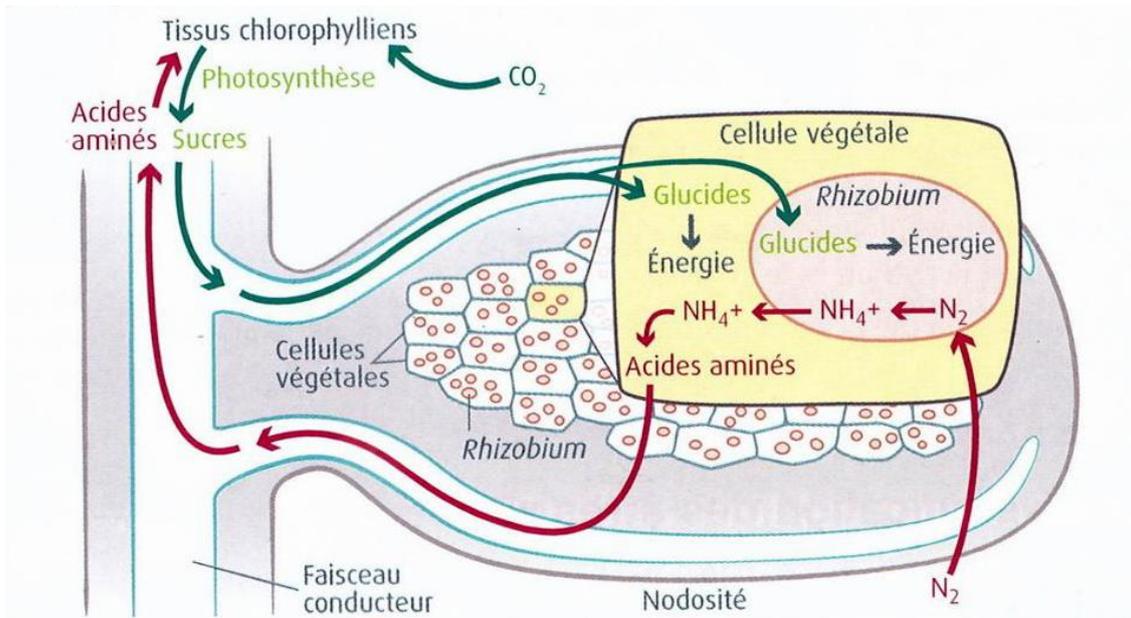
Contrairement aux fixateurs libres, c'est seulement à l'intérieur des nodosités que les Rhizobiums peuvent fixer de selon la réaction :



L'ammoniac produit (ou sa forme ionisée  $\text{NH}_4^+$ ) est alors :

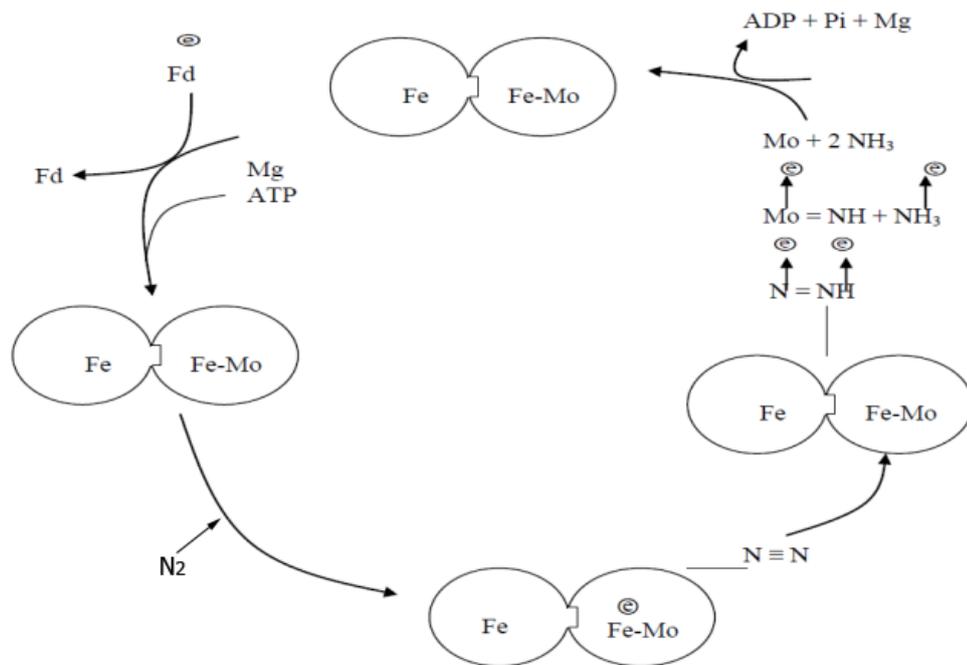
- Pour une partie, directement utilisée par le bactéroïde dans la synthèse d'acides aminés propres (parfois ensuite transférés à la plante).
- Pour une autre partie, exportée vers la cellule végétale qui peut alors produire ses propres acides aminés (Figure 17).

Cette réaction de fixation est très coûteuse d'un point de vue énergétique (ATP et pouvoir réducteur); 16 molécules d'ATP sont nécessaires pour réduire une molécule de  $\text{N}_2$  (Shanmugan *et al.* 1978). C'est pour ça que l'activité fixatrice dépend aussi du partenaire végétal. En effet, celui-ci fournit l'énergie nécessaire à la réduction de  $\text{N}_2$  et les squelettes carbonés pour l'assimilation du  $\text{NH}_3$  formé. Dans un cycle de fonctionnement, la dinitrogénase réductase accepte les électrons de la ferrédoxine (Fd) (Figure 16, B) et lie deux molécules d'ATP qui se réagissent avec les ions de magnésium (Mg) et donnent un complexe qui se lie typiquement avec le complexe (Fe-Mo) pour lui transférer les électrons.



**Figure 17.** Schéma simplifié du mécanisme de fixation symbiotique de  $\text{N}_2$ .

L'hydrolyse de l'ATP lui permet de retourner à une conformation oxydée prête à accepter de nouveaux électrons de la ferrédoxine (Figure 18). Huit cycles sont nécessaires pour que la dinitrogénase réduise  $\text{N}_2$  en  $\text{NH}_3$  (Bouchanan *et al.* 2000).



**Figure 18.** Les étapes de réduction de l'azote atmosphérique (D'après Blondeau, 1980).

La réaction requiert un donneur d'électrons en plus de l'ATP. Les électrons sont générés de différentes manières et transférés directement à la flavodoxine ou à la ferrédoxine et un cycle de réactions d'oxydo- réduction démarrera en conséquence (figure 18). Alors, deux molécules de MgATP vont se lier à la protéine Fe réduite puis elles vont être hydrolysées pour qu'il y ait un transfert d'un électron de la protéine Fe à la protéine MoFe. La réduction de  $N_2$ , qui se fait en plusieurs étapes, se déroule réellement au niveau de la protéine MoFe. Chaque atome d'azote fixé nécessite le transfert de six électrons ce qui fait un total de 12 molécules d'ATP pour une seule molécule de  $N_2$ . Cependant, la nitrogénase réduit aussi les protons en  $H_2$  donc elle a besoin ainsi de deux électrons supplémentaires. Le bilan total s'élève alors à 8 électrons transférés et 16 molécules de MgATP hydrolysées (Cheng 2008).

Chaque étape de transfert d'un électron, requiert obligatoirement un cycle d'association/dissociation de la protéine Fe et la protéine MoFe. La nitrogénase est une enzyme relativement lente ( $\mu_{max} \sim 5s^{-1}$ ). C'est le cycle association/dissociation du complexe qui est à l'origine de cette vitesse de la réaction (Dixon et al. 2004).

## **CHAPITRE IV**

# **RÉGULATION DE LA SYMBIOSE**

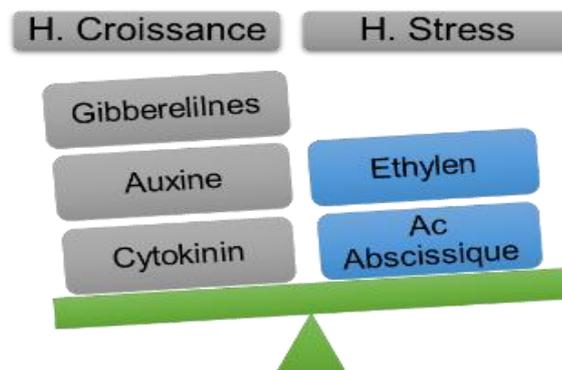
Le développement d'une symbiose ne se fait pas au hasard ni de façon anarchique. L'interaction symbiotique entre les Rhizobia et les légumineuses repose sur un réseau complexe de boucles de régulation. En effet, ce système harmonieux et reproductible est rendu possible grâce à des messagers chimiques internes qu'on appelle hormones végétales ou phytohormones.

## I. Le système hormonal des plantes

### I. 1. Définition

D'une façon très générale, une hormone est une molécule synthétisée par un organisme et qui, à très faible concentration, va avoir une action sur le développement de certains tissus de cet organisme, généralement différents de ceux dans lesquels cette molécule a été produite. Cette molécule porte donc une information à la cellule de destination et influence le fonctionnement de celle-ci (Shuster, 2014).

Dans ce sens, les phytohormones, ou hormones végétales, ne sont pas à proprement parler des hormones (Hallé, 1999). Ce sont des substances organiques hautement actives produites par une partie d'un corps végétal, et transportées vers une autre partie où, en très petite quantité, elle contrôle ou stimule un procédé différent, voire même elle agit en tant que vecteur d'information pour communiquer entre plantes (Davies, 2010).



**Figure 19.** Les hormones végétales et l'équilibre hormonal.

Le système hormonal des plantes est, entre autres choses, un système fondamental de communication entre ses différentes parties. Ce sont ces phytohormones qui, en tant que messagers chimiques, transportent des informations précieuses d'une partie à l'autre. On connaît actuellement six principaux types d'hormones que l'on peut classer schématiquement en substances stimulatrices du développement (Hormones de croissance) et des substances à effets mixtes (Hormones de stress) (Figure 19).

Pour les premières, les hormones clés sont : Les Auxines, Cytokinines, Gibbérellines et Brassinostéroïdes. Pour la seconde catégorie, les principaux phytohormones sont: L'Ethylène et l'Acide Abscissique (Nagata & Akihiro, 2014).

Il est fondamental de considérer que ces hormones ont une présence presque permanente dans la plante entière, mais tous ne présentent pas la même intensité à tout moment. Chaque phase du développement de la plante nécessite un certain équilibre entre les 6 principaux groupes d'hormones, la préservation ou le retour de la plante à cet équilibre naturel optimal étant un besoin important. En tout état de cause, les variations du niveau d'une hormone auront un effet sur les autres compagnons, car elles sont essentielles pour maintenir un équilibre correct à chaque moment, de sorte que la plante puisse offrir son potentiel génétique et maximiser sa production.

## I. 2. Perception des phytohormones

Chaque phytohormone est perçue par un ou plusieurs récepteurs spécifiques pour activer une cascade de signalisation. Ces récepteurs peuvent être divisés en deux catégories :

- Récepteurs transmembranaires pour les CKs, ET, BRs : Les CKs et l'ET sont perçus par des récepteurs à domaine histidine kinase , respectivement nommés CRE et ETR. Alors que les BRs sont perçues par des LRR-RLK, localisés dans la membrane plasmique.

- Récepteurs hydrosolubles pour les IAAs, ABA, GAs : Ils comprennent respectivement les protéines à motif F-Box cytosoliques TIR, les pyrobactines cytosoliques PYRs et l'  $\alpha/\beta$ -hydrolases nucléaire GID1.

Une fois liée à son récepteur, la phytohormone induit une cascade de signalisation spécifique, par phosphorylation du récepteur ou formation d'un complexe avec un co-récepteur, pour induire la transcription des différents gènes de réponse (Pons, 2020).

## I. 3. Importance du système hormonal chez les plantes

Les hormones végétales affectent pratiquement tous les aspects de la croissance et du développement des plantes en symbiose, y compris la formation des nodules (Ferguson et Mathesius, 2014). L'omniprésence des phytohormones signifie qu'elles sont souvent des plaques tournantes qui intègrent les signaux environnementaux des plantes aux processus de développement, y compris la nodulation.

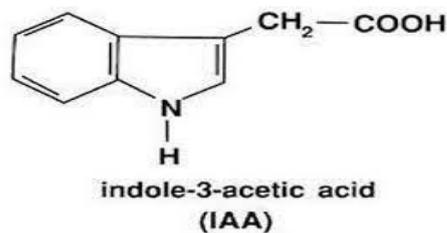
Les hormones végétales sont présentes à différents niveaux à différents stades de développement du cycle végétal. Ainsi, la compréhension du fonctionnement de ces hormones

et de la manière dont elles peuvent agir permet à mieux étudier comment cette symbiose fonctionne en détail (Lin *et al.* 2020).

#### I. 4. Les Auxines

L'auxine est la première classe des phytohormones à être découverte dans les plantes (Chan & Gresshoff, 2009). Il existe trois grandes classes d'auxines: les acides aryl-acétiques, qui comprennent l'acide indole-acétique (IAA) et l'acide 1-naphtyl-acétique, les acides phénoxy acétiques, représentés par l'acide 2,4-dichlorophénoxy acétique et les acides benzoïques, représentés par l'acide 2,3,6-trichloro benzoïque.

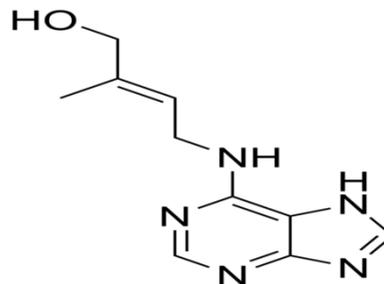
Le composé le plus important de la classe des auxines est l'acide indole-3-acétique (IAA) (Figure 20), une auxine native des plantes, dérivée de la voie de biosynthèse des phényl-propanoïdes (Zhao, 2012).



**Figure 20.** Acide indole-3-acétique (IAA).

#### I. 5. Les cytokinines

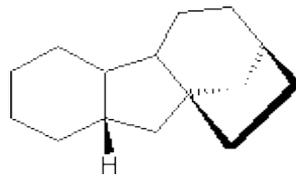
Les cytokinines, ont été ainsi appelées en raison de leur aptitude à réguler la division cellulaire (Miller *et al.*, 1955). Ce sont des adénines substituées qui augmentent la division cellulaire. La première cytokinine découverte fut la zéatine (Figure 21), isolée dans le maïs (Werner & Schmülling, 2009).



**Figure 21.** Structure de la zéatine.

#### I. 6. Les gibbérellines

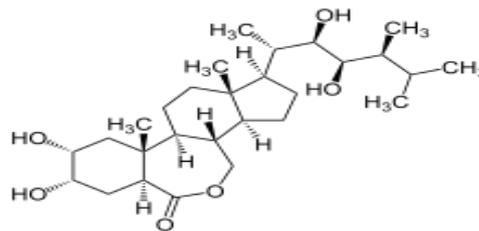
Les gibbérellines (GAs) constituent un large groupe de composés ayant toutes un noyau commun qui est le noyau gibbane ( $C_{15}H_{24}$ ) (Figure 22). Il existe plus de 100 gibbérellines désignées par  $GA_N$ . « N » peut varier de 1 à 130 environ. La gibbérelline A3 est la plus commune (Yamaguchi, 2008).



**Figure 22.** Noyau gibbane..

### I. 7. Brassinostéroïdes

Les brassinostéroïdes (BR) sont une classe de polyhydroxystéroïdes ayant une structure de cholestane (proche de celles des stéroïdes animaux). Ces molécules ont été initialement isolées avec du pollen de *Brassica majus* sous le terme de brassines (Grove *et al.*, 1979a). En 1979, le premier brassinostéroïde, le brassinolide (Figure 23), a été isolé (Grove, 1979b).



**Figure 23.** Structure du brassinolide.

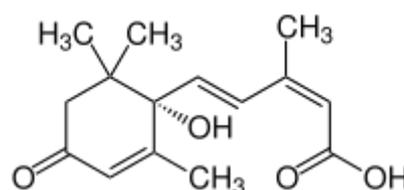
### I. 8. Ethylène

L'éthylène est un hydrocarbure à deux atomes de carbone, de formule  $C_2H_4$ , plus précisément  $CH_2=CH_2$ , avec une double liaison entre les deux atomes de carbone, C (Zimmermann & Walz, 2008). Elle est également une phytohormone aux effets multiples.

D'un point de vue moléculaire, l'éthylène, produit par tous les organes, est l'hormone végétale la moins complexe. Il s'agit d'une hormone gazeuse qui se déplace dans les espaces libres entre les cellules végétales. Cette hormone est responsable du mûrissement des fruits, de l'inhibition de la croissance et de l'abscission (Arshad & Frankenberger, 2002).

### I. 9. Acide abscissique

L'acide abscissique (ABA) est un sesquiterpène à 15 C (Figure 24), synthétisé par les végétaux supérieurs (Finkelstein, 2013). L'acide abscissique est une phytohormone importante qui agit sur la réaction au stress hydrique des plantes.

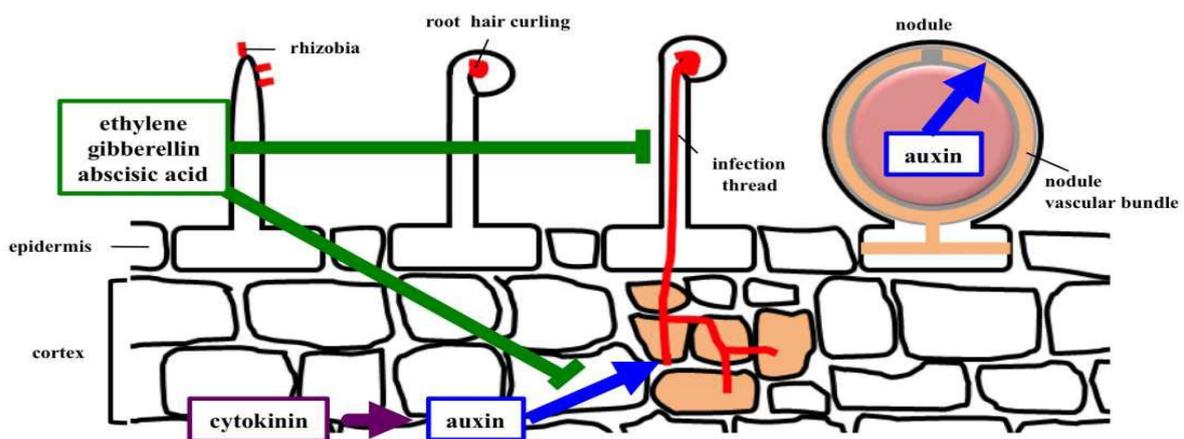


**Figure 24.** Structure de l'Acide abscissique.

## II. Régulation des interactions légumineuses-Rhizobia

Une fois la symbiose établie, elle est contrôlée par les phytohormones, qui favorisent ou inhibent son maintien. Les rhizobiums produisent des hormones végétales auxquelles les légumineuses sont sensibles. Ce sont des molécules qui exercent des fonctions régulatrices de presque tous les aspects du développement des plantes et qui interviennent dans la communication entre les deux partenaires.

Actives à de très faibles concentrations, avec une régulation étroite de la synthèse et de la réponse, de nombreuses hormones végétales jouent un rôle clé dans les interactions entre les légumineuses et les rhizobia. Ces phytohormones provenant à la fois de la plante et du partenaire microbien jouent un rôle dans la communication, l'établissement et le fonctionnement de cette symbiose (Foo *et al.*, 2019). Chacune des phytohormones participe simultanément à de nombreux rôles physiologiques. De nombreux « cross-talks » peuvent alors avoir lieu, avec des hormones pouvant combiner leurs effets ou être antagonistes l'une de l'autre (Figure 25).



**Figure 25.** Effets des phytohormones sur le processus de nodulation chez les légumineuses (D'après Nagata & Akihiro, 2014).

En conséquence, cela peut influencer sur la régulation d'une autre hormone par différents mécanismes, tels que la régulation de la biosynthèse, la conjugaison ou l'expression des enzymes impliquées, mais aussi par la régulation de l'expression des récepteurs et partenaires associés dans la signalisation (Pons, 2020).

---

Dans le reste de ce chapitre, nous allons nous intéresser aux rôles de principales phytohormones dans le contrôle de l'infection, du positionnement et du développement de la symbiose.

## II. 1. Les auxines

L'auxine (Acide Indole Acétique, AIA) est indispensable à la symbiose Légumineuse-Rhizobium, à différents niveaux. Elle joue un rôle important dans la régulation et le développement des nodules symbiotiques (Long, 2011).

L'AIA est produite par les rhizobiums en réponse aux flavonoïdes libérés par les légumineuses (Theunis *et al.* 2004). Le rôle de l'AIA est peut-être mieux illustré par la capacité des inhibiteurs du transport de l'auxine à induire la formation de structures ressemblant à des nodosités chez les plantes non-légumineuses (Rightmyer & Long, 2011).

Selon Hirsch *et al.* (1989), les inhibiteurs de transport d'auxine tels que l'acide N-(1-naphtyl) phtalamique (NPA) et l'acide 2,3,5-triiodobenzoïque (TIBA), induisent la formation de structures de type nodule chez *Medicago sativa*.

Les mécanismes moléculaires responsables de ces changements sont inconnus mais il semble que les facteurs Nod agissent sur les flux d'auxine à deux niveaux : une inhibition du transport de l'auxine et l'induction de la synthèse de flavonoïdes (Saoudi, 2017).

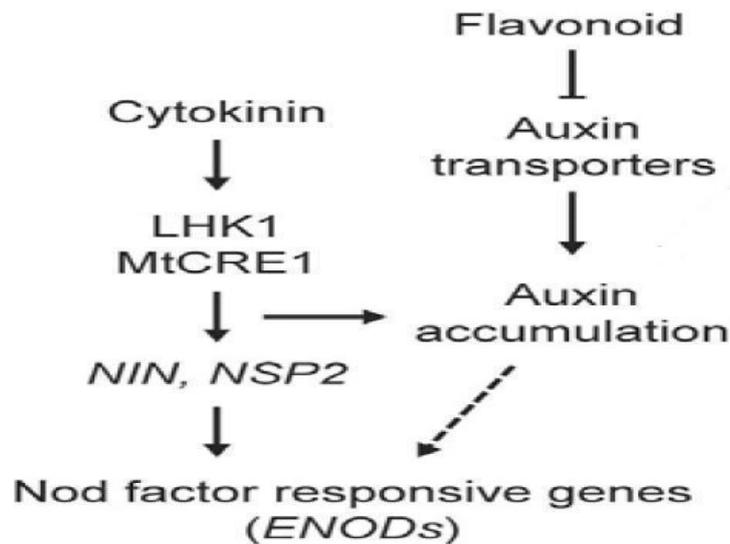
## II. 2. Les cytokinines

Les Cks sont impliquées dans le contrôle du développement de l'architecture racinaire, y compris la nodulation des racines lors de la symbiose. Elles jouent un rôle positif dans l'initiation de l'organogénèse des nodules. La surexpression du gène de synthèse de la CK dans une souche de rhizobium non nodulante (NF défectueuse) permet d'induire l'organogénèse des nodules dans la luzerne (Cooper & Long, 1994).

L'organogénèse induite par les cytokinines est dépendante de l'activation des facteurs de transcription NSP1, NSP2, NIN et ERN1 (Figure 27) (Plet *et al.*, 2011). Deux cytokinines ont été identifiées, LOG1 et LOG2, chez *M. truncatula*. Leur transcription est dépendante de CRE1 et elles participent au développement du primordium nodulaire mais aussi à la formation des racines latérales (Mortier *et al.*, 2014).

La perception du NF via les complexes de C-récepteurs dans l'épiderme entraîne la formation du nodule. La perception des cytokinines (CKs) par le récepteur CRE1 induit une voie de signalisation impliquant des AHPs (aspartate-histidine phospho- transfert proteins), ce qui permet l'activation de régulateur de réponse de type A (comme RR4) et de NIN. Ces deux

voies déterminent la différenciation de cellules corticales spécifiques qui donneront naissance au nodule.

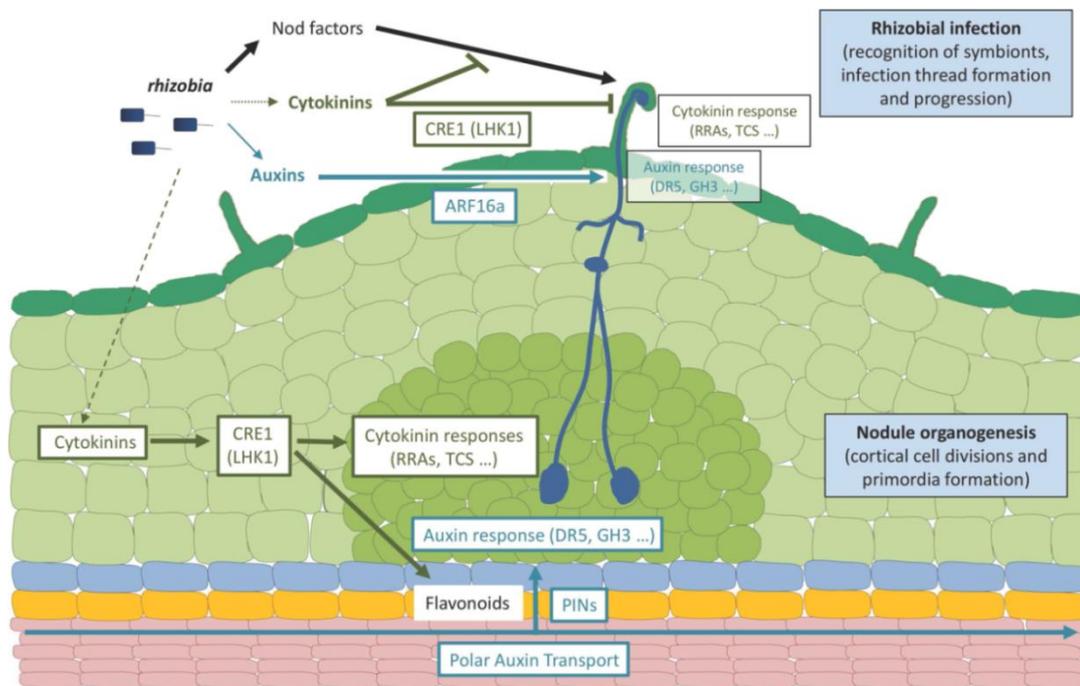


**Figure 26.** Régulation positive de la nodulation par l'action des hormones végétales (D'après Ryu *et al.* 2012).

### II. 2. 1. Interaction entre l'auxine et les cytokinines

Au cours de la symbiose Rhizobium- légumineuse, l'auxine et la CK interagissent et se compensent mutuellement en régulant leur métabolisme, leur signalisation et leur transport (El-Showk *et al.*, 2013). Dans le processus du développement des nodules, l'auxine et la CK ont une activité plus synergique, car la présence des deux est requise pour l'initiation des nodules.

Le développement des racines latérales et des nodules de racines est régulé par le ratio auxine-cytokinine. Une augmentation de la concentration d'auxine stimule la formation de racines latérales tandis qu'une augmentation de la concentration en cytokinine ou une inhibition du transport de l'auxine induit le développement de pseudo-nodules (Hirsch *et al.* 1989). La figure. 27 représente un processus d'infection rhizobienne dans une racine de légumineuse (*Medicago truncatula*) et le rôle des auxines et des cytokinines dans l'interaction.



**Figure 27.** Rôles des auxines et des cytokinines lors des interactions symbiotiques (D'après Boivin *et al.* 2016).

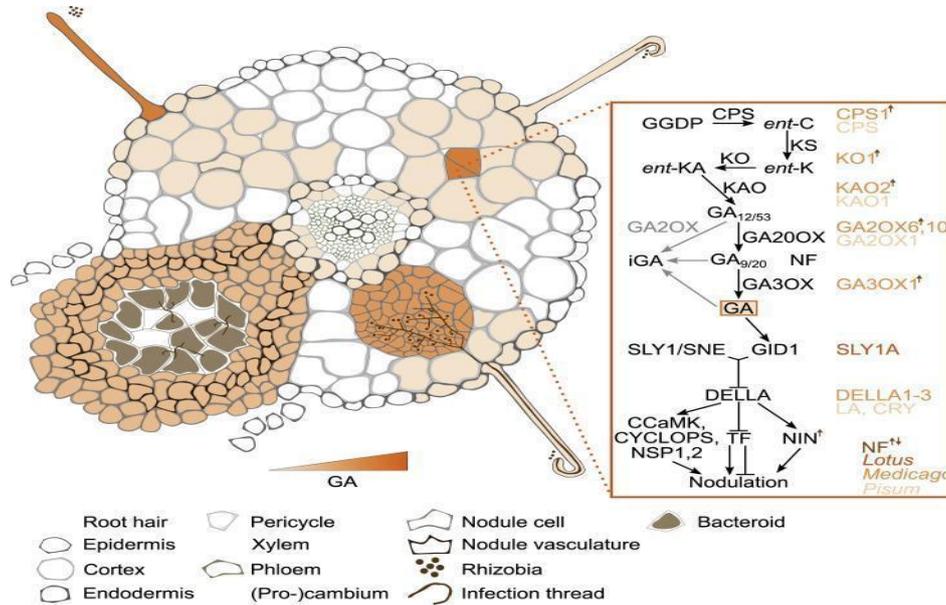
Chez *Medicago truncatula*, les rhizobiums produisent des facteur Nod ainsi que des phytohormones : auxines et cytokinines. La réponse aux phytohormones dans les cellules épidermiques infectées, est contrôlée par les gènes RRs (RRA) de type A ou le marqueur de réponse cytokinique TCS (Two Component output Sensor) et par le gène de réponse auxine GH3 (Gretchen Hagen3) ou le marqueur de réponse auxine DR5.

La réponse aux auxines et cytokinines est due à des modulations du cycle cellulaire conduisant soit à la formation du cordon d'infection (au niveau de l'épiderme), soit à des divisions cellulaires (au niveau du cortex).

### II. 3. Les Gibbérélines

Ces métabolites secondaires interviennent dans les voies de signalisation des interactions symbiotiques Rhizobia-légumineuse (Bottini *et al.*, 2004). Les gibbérélines activent une voie de signalisation localisée dans le noyau qui implique les récepteurs DWARF1 (GID1), les protéines (GAI), les protéines F-box (SLY1) et SNE) (Davière & Achard, 2013). En l'absence de ces phytohormones, les récepteurs GID1 sont inactifs (Griffiths *et al.*, 2006), ce qui permet aux protéines DELLA d'inhiber cette voie de signalisation en inhibant la fonction des facteurs de transcription tels que les PIFs (Davière & Achard, 2013).

La perception de l'AG par les récepteurs *GID1* entraîne la formation d'un complexe avec les protéines F-box *SLY* et *SNE*, ce qui permet la dégradation de *DELLA* (Figure 28) (Ariizumi *et al.* 2011). Par conséquent, les facteurs de transcription auparavant réprimés peuvent servir de médiateurs de transcription.



**Figure 28.** Biosynthèse, métabolisme et signalisation des AGs (D'après Lin *et al.*, 2020).

Les niveaux d'AG actifs doivent être parfaitement équilibrés. Chez *Lotus japonicus*, un effet favorisant la nodulation est observé chez le pois à de faibles concentrations de GA, tandis qu'un effet inhibiteur est observé à des concentrations élevées (Ferguson *et al.*, 2005). Chez *M. truncatula*, l'injection de GA inhibe la formation de nodules (Jin *et al.*, 2016). Cependant, le paclobutrazol, un antagoniste des GAs, réduit la formation de nodules chez le pois (McAdam *et al.*, 2018) mais stimule la nodulation à de faibles concentrations chez *M. truncatula* (Fonouni-Farde *et al.*, 2016).

Ces résultats paradoxaux peuvent s'expliquer par le fait que les GAs sont susceptibles de provoquer des anomalies lorsqu'ils se trouvent à des concentrations élevées en dehors de la marge normale (Yamagami *et al.* 2004).

## II. 4. Les Brassinostéroïdes

Bien que des avancées aient été réalisées au cours de la dernière décennie sur la biosynthèse, la perception et la réponse des hormones brassinostéroïdes (BRs), on en sait encore peu de choses sur le rôle des BR dans la régulation de l'interaction symbiotique Rhizobia-légumineuses (Ferguson *et al.* 2005).

---

Un certain nombre d'autres études ont porté sur l'effet de l'application de BR sur la nodulation. En revanche, le 24-épibrassinolide entraîne une augmentation du nombre de nodules, et de l'activité de la nitrogénase (Shahid *et al.* 2011). Par contre, une récente étude a permis de constater que l'épibrassinolide diminue à la fois le taux de nodulation et l'intensité de la fixation de l'azote chez le soja (Hunter, 2001).

## II. 5. Ethylène

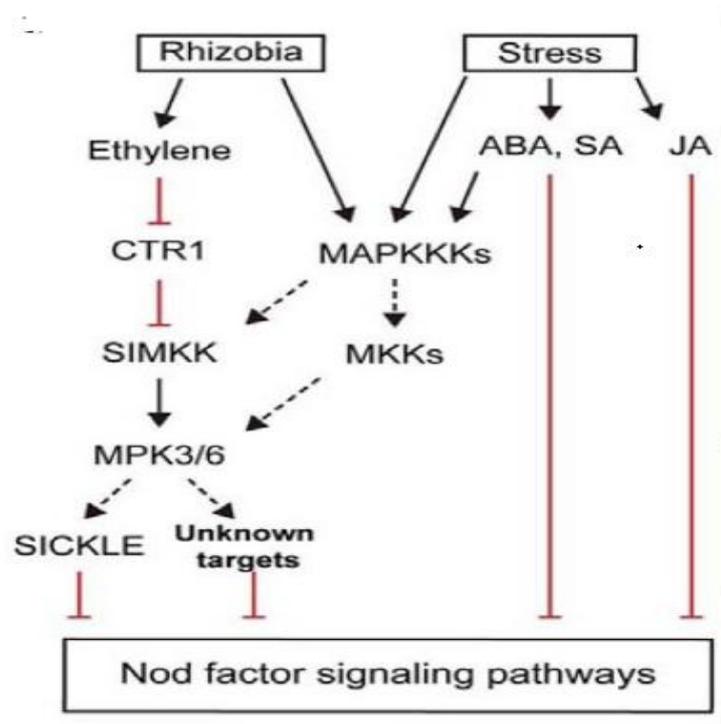
Cette hormone gazeuse joue un rôle de régulateur négatif de la nodulation, et agit sur différents processus pendant la formation des nodules, y compris la régulation du nombre total de nodules, de la morphologie des nodules et du positionnement de ceux-ci.

L'éthylène est produit dans les légumineuses en réponse à une infection rhizobienne (Ligero *et al.* 1986). Ses effets s'expliquent par son implication dans les mécanismes de défense des plantes (Prayitno *et al.* 2006a), ainsi qu'à son intervention dans le transport de l'auxine (Prayitno *et al.*, 2006b) et son interaction avec l'ABA (Figure 29) (Chan *et al.*, 2013). Très tôt au cours du processus de nodulation, l'éthylène interfère avec la signalisation calcique et régule négativement l'infection (Oldroyd *et al.* 2001).

L'éthylène est synthétisé dans les cellules situées au-dessus des pôles du phloème, ce qui génère un gradient d'éthylène qui, par cet effet de positionnement, assure une restriction du développement radial des nodules à des positions opposées aux pôles du xylème (Heidstra *et al.* 1997).

Les rhizobiums semblent contribuer également aux taux d'éthylène pendant la nodulation (Figure 29). De nombreuses espèces rhizobiennes codent pour l'ACC désaminase, qui dégrade le précurseur de l'éthylène, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) et améliore la tolérance des légumineuses au stress environnemental (Brigido *et al.* 2013).

Enfin, l'éthylène peut également modifier la morphologie des nodules et le nombre de bactéroïdes chez Les légumineuses (Lohar *et al.* 2009).



**Figure 29.** Rôle de l'éthylène dans l'inhibition locale de la nodulation (D'après Ryu *et al.*, 2012).

L'éthylène, en tant qu'un régulateur négatif majeur du processus de nodulation, stimule les cascades SIMKK(*AtMKK4/5*)-MPK3/6 en supprimant l'activité de CTR1. Les protéines MPK3/6 activées inhibent directement ou indirectement les voies de signalisation du facteur Nod. Les voies de signalisation ABA, SA et JA répriment directement la signalisation du facteur Nod

## II. 6. Acide abscissique

L'acide abscissique (ABA) a un effet inhibiteur de la nodulation. Cette hormone réduit de manière significative le nombre de nodules chez différentes espèces de légumineuses.

Cependant, la teneur en ABA au sein des nodules est élevée par rapport au tissu racinaire environnant. Cela pourrait signifier que l'hormone est nécessaire pour le développement et/ou le fonctionnement des nodules. Ces résultats en apparence contradictoires confirment que le rôle de l'ABA dans la symbiose n'est peut-être pas simple. Ainsi, il exerce un effet stimulateur (Effet positif) dans différents tissus et/ou différents stades de développement, et devient une hormone inhibitrice (Effet négatif) lorsque ses taux sont élevés (Brett & Ulrike, 2014).

## Conclusion

Ce travail de type théorique mené au cours de ce mémoire sur le rôle que jouent les phytohormones dans la régulation de la symbiose plante- microorganisme, nous a permis de comprendre la mise en place de cette association, les mécanismes de la fixation biologique de l'azote à l'échelle moléculaire et le fonctionnement des phytohormones et de la manière dont elles peuvent agir.

Grâce à cette association symbiotique, les légumineuses participent à la revégétalisation des écosystèmes pauvres en azote, en s'établissant comme flore pionnière, initiatrice d'une succession écologique.

Le potentiel commercial des légumineuses ayant une valeur nutritionnelle et médicale est important. En plus d'être économiques et polyvalentes, les légumineuses ont une excellente valeur nutritive (Lentilles, Fèves...etc). L'exploitation commerciale de ces espèces est, donc, source d'une amélioration du revenu des populations locales et de bénéfices en termes de soins médicaux (Des baumes utilisés contre l'arthrite à base de feuilles de *Cassia tora*, des savons pharmaceutiques à partir de feuilles de *Lonchocarpus cyanescens*...etc).

Pour les pays du Sud, ce potentiel justifie la nécessité de comprendre l'interaction symbiotique entre les légumineuses et les rhizobium ainsi que la régulation de cette relation par les hormones végétales. Ce qui va permettre d'exploiter à la fois ces propriétés symbiotiques pour la fixation d'azote et de constituer donc une alternative aux engrais azotés responsables de pics de pollution atmosphérique et émetteurs de gaz à effet de serre.

Notre compréhension de la contribution des phytohormones reste partielle et superficielle. À l'heure actuelle, il est difficile de concevoir un modèle détaillé des interactions hormonales lors de la symbiose car les études ont été réalisées sur différentes espèces de légumineuses dans différentes conditions.

Malgré les avancées effectuées ces dernières années en identification des mutants d'hormones végétales et des mutants ayant des défauts de signalisation chez les légumineuses en symbiose grâce à la biologie moléculaire, des études complémentaires demeurent cependant nécessaires pour mieux comprendre l'équilibre phytohormonal de la symbiose légumineuse-rhizobium.

## **Résumé**

Les légumineuses développent des interactions symbiotiques avec des bactéries du genre rhizobium pour pouvoir exploiter efficacement l'azote atmosphérique. Cette interaction aboutit à la formation de nodules fixateurs d'azote au niveau du système racinaire de la plante. Ces nodosités sont le siège d'une activité symbiotique dans laquelle la plante fournit les sucres et l'énergie issus de la photosynthèse, et bénéficie en retour d'un micro-habitat exceptionnellement favorable.

Cette association à bénéfices réciproques, mettant en jeu un dialogue moléculaire complexe entre les légumineuses et les rhizobiums, repose sur un réseau complexe de boucles de régulation. Ce sont les phytohormones qui, en tant que messagers chimiques, transportent des informations précieuses d'une partie à l'autre, permettant de contrôler, positivement ou négativement, cette association avec un juste équilibre entre le système racinaire de plante hôte et le partenaire rhizobien.

## **Mots clés**

Légumineuses, Rhizobium, Symbiose, Fixation biologique du diazote, Phytohormones.

## **Abstract**

Legumes are able to establish symbiotic interactions with rhizobial bacteria to efficiently utilize nitrogen. This interaction leads to the formation of nitrogen-fixing nodules on root systems in the plant. This nodule, is the seat of a symbiotic activity in which the plant provides sugars and energy from photosynthesis, and benefits in return from the amino acids produced in these nodules.

This mutually beneficial association (symbiosis), in which a complex molecular dialogue between legumes and rhizobia takes place, is based on a complex network of regulatory mechanisms. It is the plant hormones that, as chemical messengers, carry precious information from one party to the other, allowing to control, positively or negatively, this association with a perfect balance between the host plant root system and the rhizobial partner.

## **Keywords**

Legume, Rhizobium, Symbiosis , Biological nitrogen fixation, Plant hormones

## Références bibliographiques

**Ariizumi T, Lawrence PK, Steber CM.** The role of two F-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis gibberellin signaling. *Plant Physiol.* 2011;155:765–775.

**Arshad M , Frankenberger W.** Ethylene- Agricultural Sources and Applications. Springer US. 2002 : 289.

**Bargis P, Lévy- Dutel L.** Légumes et légumineuses: nutrition-- santé-- bien-être. Eyrolles. 2015: 6-8.

**Belalite H.** Géochimie des enveloppes superficielles : Le cycle de l'azote. Cours du module Géochimie des Enveloppes superficielles. Institut des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Batna 2. 2020 : 2-14.

**Benselama A.** Réhabilitation de la culture du Lablab purpureus et études de son partenaire symbiotique. Thèse présentée de Doctorat publiée, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. 2015: 16.

**Bergersen FJ.** Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd. 1980 : 712.

**Berner EK , Berner RA.** Global Environment. Prentice-Hall, Upper Saddle River, 2ème édition, 1996 : 365.

**Blondeau R.** Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Vuibert université biologie, Paris. 1980 :100-103.

**Boivin S, Fonouni FC , Frugier F.** How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions. *Frontiers in Plant Science.* 2016 :7-10.

**Botineau M.** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Lavoisier, 2010 : 599-605.

**Bottini R, Cassan F, Piccoli P.** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biot.* 2004 : 65:497–503.

**Bouzred A.** La voie de signalisation « Nod-dépendante » : création d'une base de données du gène dmi2. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. 2016 :16-105.

**Brett JF , Ulrike M.** Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia Interactions. *J Chem Ecol.* 2014 : 40:770–790.

**Broughton WJ.** Nitrogen fixation: Legumes. *The Journal of Chartto and Windus* 2Td londres. 1984: 117.

**Bruneton J.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 2009 : 1288.

**Bobl M.** The nitrogen cycle : New York Britannica Educational Publishing in association with Rosen Educational Services. 2018 ; Series : Let's Find Out! Our Dynamic Earth.

**Bouchanan BB, Gruissem W, Jones RL.** Biochemistry & molecular biology of plants. *J. Plant Growth Regul.*2000 : 35 : 105–106.

**Burgess BK, Lowe DJ.** Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem Rev.* 1996a ;96:2983–3012.

**Burges BK, Lowe DJ.** Mécanisme de molybdène nitrogénase. *Examens chimiques.* 1996b. 96 (7): 2983–3011.

**Caetano AG, Crist-Estes DK , Bauer WD.** Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *Journal of Bacteriology.* 1988 : 170 (7): 3164-3169.

**Cheng, Q.** Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of Integrative Plant Biology* 2008 ; 50(7): 786-798.

**Chan PK, Biswas B, Gresshoff PM.** Classical ethylene insensitive

mutants of the Arabidopsis EIN2 orthologue lack the expected ‘hypernodulation’ response in *Lotus japonicus*. *J Integr Plant Biol*. 2013 ; 55 ;395–408.

**Chan PK, Gresshoff PM.** Role Of Plant Hormones In Legume Nodulation. BIOTECHNOLOGY. 2009 ; Vol. VIII -Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).

**Cooper JB, Long SR.** Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. *Plant Cell*. 1994 : 6 ; 215–225.

**Dalla VV, Narduzzi C, Aguilar OM, Zanetti ME, Blanco FA.** Changes in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) transcriptome in response to secreted and surface signal molecules of *Rhizobium etli*. *Plant Physiol*. 2015; 169:1356-70.

**Davet P.** Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris. 1996 : 15-23.

**Davière JM, Achard P.** Gibberellin signaling in plants. *Development*. 2013 ; 140:1147–1151.

**Dénarié J, Debelle F, Promé JC.** *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem*. 1996 ; 65:503–35.

**Dixon, R. & D. Kahn.** Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2(8): 621-631.

**El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y.** Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development*. 2013;140:1373–1383.

**Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB.** Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiol*. 2005;138:2396–2405.

**Ferrer J, Austin M, Stewart CJ, Noel J.** Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Biochem*. 2008 ;46, 356–370.

**Finkelstein R.** Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book* / American Society of Plant Biologists. 2013 ; 11: e0166.

**Firestone MK, Davidson EA.** Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil. Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. 1989 ; 7–21.

**Fischer HM.** Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 1994 ; 58, 352–386

**Fonouni FC, Tan S, Baudin M, Brault M, Wen J, Mysore KS, Niebel A, Frugier F, Diet A.** DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nat. Commun.* 2016;7:12636.

**Foo E, Plett JM, Lopez-Raez JA, Reid D.** Editorial: The Role of Plant Hormones in Plant-Microbe Symbioses. *Front Plant Sci.* 2019; 10:1391.

**Franck B.** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges.* 1889. 7: 332–346.

**Galloway JN , Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland CC, Green PA, Holland EA, Karl DM, Michaels AF, Porter JH, Townsend AR, and Vorosmarty CJ.** Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry.* 2004 ; 70:153–226.

**Garza W.** Fabaceae: classification, nutrient composition and health benefits. *Plant science research and practices.* 2015 ; 5-6.

**Godfroy O .** Études génétiques et moléculaires de deux gènes de *Medicago truncatula*, DMI3 et RPG, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires. Thèse de Doctorat publiée, Université de Toulouse. 2008 ; 29-41.

**Graham PH, Vance CP.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant. Physiol.* 2003 ; 131, 872-877.

**Graham TL.** Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* 1991; 95:594–603.

**Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP.** Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2006;18:3399–3414.

**Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC.** Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature.* 1979a ; 281, 216–217.

**Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC.** Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen », *Nature.* 1979b ; vol. 225 : 5237,66–1065 .

**Hallé F.** Éloge de la plante : Pour une nouvelle biologie, Paris, Edition du Seuil, coll. « Points science ». 1999 ; 350.

**Hamida S.** Étude de la symbiose entre *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* et *Trifolium alexandrinum* L (trèfle d'Alexandrie). Thèse de Magister en biologie publiée, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. 2003 ; 16-20.

**Hardy RWF, Knight EJR.** The biochemistry and postulated mechanisms of  $N_2$  fixation. In "Progress in Phytochemistry" (L. Reinhold, ed.). 1968 ; 387-469.

**Hassan S, Mathesius U.** The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* 2012 ; 63:3429-3444.

**Heidstra R, Yang WC, Yalcin Y, Peck S, Emons A, van Kammen A, Bisseling T.** Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development* . 1997 124: 1781–1787.

**Hemerly A.** Genetic controls of biomass increase in sugarcane by association with beneficial nitrogen-fixing bacteria, In Plant and Animal Genome XXIV Conference. Plant and Animal Genome, during the month of January. 2016.

**Hennecke H, Fischer HM, Ebeling S, Gubler M, Thöny B, Göttfert M, Lamb J, Hahn M, Ramseier T, Regensburger B, Alvarez-Morales A, Studer D.** NIF, FIX and NOD Gene Clusters in Bradyrhizobium Japonicum, and NifA-Mediated Control of Symbiotic Nitrogen Fixation. In: Verma D.P.S., Brisson N. (eds) Molecular genetics of plant-microbe interactions. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 1987; vol 3 : 978-94.

**Hirsh AM, La Rue TA** Is the nodulation a modified root or stem or an organ Sui generis?. Crit. Rev. Plant. Soi. 1997 ; 16: 361-392.

**Hirsch AM, Bhuvaneswari TV, Torrey JG, Bisseling T.** Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1989; 86:1244–1248.

**Hoffman BM, Lukoyanov D, Yang ZY, Dean DR, Seefeldt LC.** Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. Chem Rev. 2014;114:4041–4062.

**Howarth R.** Nitrogen in Freshwater Systems and Estuaries Nitrogen : Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, 2009 ; 56-57.

**Hu Y, Lee CC, Ribbe MW.** Vanadium nitrogenase: a two-hit wonder? Dalton Trans. 2012; 41:1118–1127.

**Hunter WJ.** Influence of root-applied epibrassinolide and carbenoxolone on the nodulation and growth of soybean (Glycine max L.) seedlings. J Agron Crop Sci. 2001; 186:217–221.

**Igarashi RY, Seefeldt LC.** Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2003; 38(4):351-84.

**Sinninghe DJ, Strous M, Rijpstra I, Hopmans E, Genevasen J, Van DA, Van NL, Jetten M.** Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. Nature. 2002 ; 419. 708-12.

**Jarvis BDW, Van BP, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M.** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International journal of systematic bacteriology*. 1997 ; 47: 895–898.

**Jordan DC.** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *International journal of systematic bacteriology*. 1982 ; 32: 136–139.

**Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ.** *Plant Systematics, A Phylogenetic Approach*, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 2002 ; 576 pp.

**Jin Y, Liu H, Luo D, Yu N, Dong W, Wang C, Zhang X, Dai H, Yang J, Wang E.** DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. *Nat. Commun.* 2016; 7:12433.

**Jenkinson DS.** An introduction to the global nitrogen cycle. *Soll Use and Management*. 1990; 6 : 56-61.

**Kuenen JG.** Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Microbiol* 6: 320-326. *Nature reviews. Microbiology*. 2008; 6. 320-6.

**Laval MD, Mazliak P.** *Physiologie végétale, nutrition et métabolisme*. Hermann, Paris. 1995; 269-342.

**Lin J, Frank M, Reid D.** No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis. *Plant Commun.* 2020; 1(5): 100104.

**Long SR.** *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell*. 1996 ; 8.10: 1885.

**Lohar D, Stiller J, Kam J, Stacey G, Gresshoff PM.** Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 2009; 104: 277-285.

**Le Rudulier D, Bernard T.** Salt tolerance in Rhizobium : A possible role for betaines. FEMS. Microbiol. Rev. 1986 ; 39 : 69-72.

**Laura A, Van N, John A, Fuerst , Sinninghe DJS , Gijs JK, Mike SM , Jetten, Strous M.** The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria , FEMS Microbiology Letters. 2004. vol. 233 : 1,13-7 .

**Ligero F, Lluch C, Olivares O.** Evolution of ethylene from roots of Medicago sativa plants inoculated with Rhizobium meliloti. J Plant Physiol .1986; 125:361–366.

**Moser J, Bröcker MJ.** Enzymatic systems with homology to nitrogenase. Methods Mol Biol. 2011; 766:67–77.

**Miller CO, Skoog F, Saltza VMH, Strong FMK.** A cell division factor from deoxyribonucleic acid1. J. Am. Chem. Soc. 1955; 77:1392.

**Messyasz B, Barylski J, Gąbka M, Burchardt L, Goździcka JA, Nowicki G, Dondajewska PR, LamentowiczL, Rybak A.** Nitrogen forms concentrations as main factor determining composition of phytoplankton and bacteria assemblages in the eutrophic lake. 2011 ; : 46(S1): 163-164.

**McAdam EL, Reid JB, Foo E.** Gibberellins promote nodule organogenesis but inhibit the infection stages of nodulation. J. Exp. Bot. 2018; 69:2117–2130.

**Mortier V, Wasson A, Jaworek P, De Keyser A, Decroos M, Holsters M, Tarkowski P, Mathesius U, Goormachtig S.** Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on Medicago truncatula. New Phytol. 2014 ; 202, 582-593.

**Marshall S.** Fertilizer Industry : Processes, Pollution Control and Energy Conservation, New Jersey, Noyes Data Corp. 1979 ; 204.

**Mirza H, Araújo S, Sarvajeet SG.** The Plant Family Fabaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses. Publisher: Springer Singapore;Springer. 2020 ; 6-7.

**Mousavi SA.** Revised taxonomy of the family Rhizobiaceae, and phylogeny of mesorhizobia nodulating *Glycyrrhiza* spp. Dissertationes Schola Doctoralis Scientiae Circumiectalis, Alimentariae, Biologica. University of Helsinki. 2016 ; 951-51.

**Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C.** Nodulation of legumes by members of the betasubclass of Proteobacteria. *Nature*. 2001 ; 411: 948-950.

**Moscatiello R, Squartini A, Mariani P, Navazio L.** Flavonoid-induced calcium signalling in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *New Phytologist*. 2010 ; 188:814-823.

**Martens S, Preuss A, Matern U.** Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonols and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry* 71. 2010 ; 1040–1049.

**Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol*. 2009 ; 17: 458–466.

**Meyer S, REEB C, BOSDEVEIX R.** Botanique. Biologie et physiologie végétales. Maloine, Paris, 2e édition. 2008 ; 608.

**Miloud Y.** Etude du potentiel bénéfique des souches de *Rhizobium* pour *Medicago Truncatula*: symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose. Thèse de Doctorat publiée, Université de Toulouse. 2018 ; 12-19.

**Nagata M, Akihiro.** Effects of Phytohormones on Nodulation and Nitrogen Fixation in Leguminous Plants. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. 2014 ; 10 : 5772/57267.

**NAMBARA, E.** Plant Hormones A2 – Maloy, Stanley. In : HUGHES, Kelly (éd.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. San Diego : Academic Press. 2013 ; 346-348.

**Ohshima T, Sueyoshi K.** Nitrogen Assimilation in Plants. Edition: 1. 2010 ; 1-108.

**Oldroyd G, Murray J, Poole P, Downie J.** The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. Annual review of genetics. 2010 ; 45 : 119-44.

**Oldroyd GE, Engstrom EM, Long SR.** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. Plant Cell. 2001 ; 13:1835–1849.

**Ott T, Van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK.** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Current biology. 2005 ; 15 : 531–535.

**Perert B.** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de doctorat publiée, Université de Montpellier II. 2007 ; 4-86.

**Perret X, Staehelin C, Broughton W.** Molecular basis of symbiosis promiscuity. Microbiology and molecular biology reviews 64. 2000 ; 1: 180-201.

**Petit-Aldana J, Noguera-Savelli E, Cetzal-Ix W, Solorio-Sanchez F, Infante-Cruz A.** Productive potential of fenugreek (*Fabaceae: Trigonella foenum-graecum L.*) in Venezuela. American J. of Social Issues and Humanities. 2014 ; 2276 – 6928.

**Pons S.** Les hormones dans la Symbiose Mycorhizienne : étude de la production des effets d'hormones végétales par les champignons endomycorhiziens. Interactions Entre Organismes. Thèse de Doctorat publiée, Université Paul Sabatier -Toulouse III. 2020 ; 20-59.

**Popovici J, Comte G, Bagnarol E, Alloisio N, Fournier P, Bellvert F, Bertrand C, Fernandez MP.** Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale*-*Frankia* actinorhizal symbiosis. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(8): 2451–60.

**Prayitno J, Imin N, Rolfe BG, Mathesius U.** Identification of ethylene-mediated protein changes during nodulation in *Medicago truncatula* using proteome analysis. J Proteome Res. 2006a ; 5: 3084–3095.

**Prayitno J, Rolfe BG, Mathesius U.** The ethylene insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiol.* 2006b ; 142: 168–180.

**Riah N.** Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Thèse présentée de Doctorat publiée, Université constantine. 2014 ; 10-91.

**Rightmyer AP, Long SR.** Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncatula* in response to auxin transport inhibitors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011; 24: 1372–1384.

**Romillac N.** Ammonification : *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)*, Elsevier. 2019 ; 256-263.

**Rogers K.** Nitrogen-fixing bacteria. *Encyclopedia Britannica.* 2009 ; 272.

**Rostas K, Kondorosi E, Horvath B, Simoncsits A, Kondorosi A.** Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 1986 ; 83 (6): 1757-1761.

**Ryu H, Cho H, Choi D, Hwang I.** Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis. *Mol Cells.* 2012; 34(2): 117-126.

**Saoudi M.** Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries nodulant la légumineuse du genre *Phaseolus*. Thèse de Doctorat publiée, Université frères Mentouri Constantine. 2017 ; 43-60.

**Schultze M, Kondorosi A.** *Rhizobium* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting, USA. 1998 ; 89: 192-196.

**Sebihi FZ.** Les Bactéries Nodulant les Légumineuses (B.N.L) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la Légumineuse Fourragère, *Hedysarum perralderianum*. Thèse pour l'obtention de Magister, Université Mentouri de Constantine. 2008 ; 6-8.

**Selami N.** Associations symbiotiques: Polycopié du cours destiné aux étudiants de deuxième année master en biotechnologie et génomique végétale. 2017 ; 2-7.

**Shahid MA, Pervez MA, Balal RM, Mattson NS, Rashid A, Ahmad R, Ayyub CM, Abbas T.** Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.). *Aust J Crop Sci.* 2011 ; 5:500–510.

**Shanmugan K T, O'gara F, Andersen K., Valentine RC.** Biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1978 ; 263-276.

**Shuster M.** *Biology for a changing world, with physiology* (Second ed.). New York, NY. 2014 ; 97 : 814-6415.

**Soloneski S , Larramendy M.** Soloneski, Sonia & Larramendy, Marcelo. *Emerging Pollutants - Some Strategies for the Quality Preservation of Our Environment.* 2018 ; 5040 : 152-203.

**Sprent JI.** 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *J Exp Bot.* 2008 ; 59: 1081–1084.

**Sprent JI.** *Nodulation in legumes.* Royal Botanic Gardens, Kew. 2001 ; 221.

**Stein LY, Klotz MG.** The nitrogen cycle. *Curr Biol.* 2016 ; 8 :26(3): R94-8.

**Strock JS.** Ammonification. in *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set.* Elsevier Inc. 2008 ; 162-165.

**Sutton M, Howard C, Erisman JW.** The European Nitrogen Assessment: Sources, Effects and Policy Perspectives. 2011 ; 10.1017.

**Sylvie R, Gwenaëlle L, Bertrand I.** Couplages et contrôles des cycles du carbone et de l'azote par les communautés microbiennes dans les sols cultivés. Les sols et la vie souterraine: Des Enjeux majeurs en agroécologie,, Editions Quae. 2017 ; 328.

**Teillet A.** Caractérisation de deux déterminants moléculaires impliqués dans le processus d'infection lors de l'interaction symbiotique entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat publiée, Université de toulouse. 2008 :14-20.

**Theunis M, Kobayashi H, Broughton WJ, PrinsenE.** Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp strain NGR234: *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2004 ; 17 : 1153- 1161.

**Udvardi MK, Tabata S, Parniske MS.** *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci*. 2005 ; 10: 222-228.

**Vaclav S.** *Enriching the Earth : Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production*, MIT Press. 2001 ; 358.

**Van-de-Sande K, Bisseling T.** Signalling in symbiotic nodule formation. *Essays in biochemistry*. 1997 ; 32: 127-142.

**Vincent JM.** *Nitrogen Fixation in Legumes*. Academic Press. 1982, Sydney, Australia.

**Viprey V, Perret X, Broughton WJ.** Host-plant invasion by rhizobia. *Subcell Biochem*. 2000;33:437-456.

**Wang Y, Chen S, Yu O.** Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 91: 949–56.

**Ward BB, Olson RJ, Perry MJ.** Microbial nitrification rates in the primary nitrite maximum off southern California. *Deep Sea Res Part A Oceanogr Res Pap*. 1982; 29: 247–255.

**Werner T, Schmülling T.** Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009; 12:527–538.

**Wunderlich A, Meckenstock RU, Einsiedl F.** A mixture of nitrite-oxidizing and denitrifying microorganisms affects the  $\delta^{18}\text{O}$  of dissolved nitrate during anaerobic microbial denitrification depending on the  $\delta^{18}\text{O}$  of ambient water, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 2013 ; 119 : 31–45.

**Yamagami M, Haga K, Napier RM, Iino M.** Two distinct signaling pathways participate in auxin-induced swelling of pea epidermal protoplasts. *Plant Physiol.* 2004; 134: 735–747.

**Yamaguchi S.** Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008; 59: 225–251.

**Young JM.** The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 ; Nov; 53 (Pt 6): 2107-10.

**Zimmermann H, Walz R.** "Ethylene". *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* Weinheim. 2008 ; 123-130.

**Zhao Y.** Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol. Plant.* 2012; 5: 334–338.