

THESE

Présentée à

L'Université Aboubekr BELKAID – Tlemcen –

Institut des Sciences de la Nature

Pour l'obtention du

Diplôme de Doctorat d'Etat Es-Sciences

Option : Biologie Végétale

Par

M^{me} BEKKARA-ATIK Fewzia

Etude des signaux chimiques

Impliqués dans la symbiose entre

Vicia faba* et *Rhizobium leguminosarum

Soutenue le 14 juillet 1999 devant la commission d'examen

Mr **Z. BOUZNAD**
Mr **A. BENSOLTANE**
Mr **M. BELKHOUDJA**
Mr **M. BOUAZZA**
Mr **M. JAY**
Mr **S.A. TALEB BENDIAB**

Pr. à l'IN.A-Alger
Pr. à l'U d'Oran Es-Senia
M.C. à l'U d'Oran Es-Senia
M.C. à l'UAB-Tlemcen
Pr. à l'U de Lyon I
Pr. à l'UAB-Tlemcen

Président
Examineur
Examineur
Examineur
Promoteur
Co-Promoteur

A la mémoire de mon père

A ma mère

A mon mari

A toute ma famille

A tous mes amis (es)

A la mémoire d'une très chère amie et collègue

M^{me} Benzerdjeb Nacéra

A la mémoire d'une très chère amie Ghouali Amina

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement le Professeur Maurice Jay, Directeur du laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie (Lyon I), qui a assuré la direction scientifique de cette thèse. Je lui exprime ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, pour son soutien et ses critiques enrichissantes qui m'ont aidées pendant tout ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Sid Ahmed Taleb Bendiab, pour m'avoir judicieusement conseillé tout au long de ce travail, tout en me laissant une grande liberté d'action. Je lui adresse toute ma sympathie et ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur Bouznad Zouaoui, Professeur à l'Institut National d'Agronomie – El-Harrach – Alger, pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail et pour avoir eu l'amabilité de participer à ce Jury. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur Bensoltane Ahmed, Professeur à l'Université d'Oran ES-Senia, pour avoir gracieusement accepté d'être membre du Jury. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie également Monsieur Belkhoudja Mohamed, Maître de conférence à l'Université d'Oran ES-Senia pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail, en acceptant de le juger en qualité de membre du Jury.

Je remercie Monsieur Bouazza Mohamed, Maître de conférence à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateur dans ce jury de thèse. Je lui exprime ma profonde reconnaissance.

Je voudrais également remercier Monsieur Boucherit Kébir, Directeur de l'institut des Sciences de la Nature, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour les services rendus au cours de la préparation de cette thèse.

Que Sophie Rome et Marie-Louise Bouillant, du laboratoire d'Ecologie Microbienne du sol (Lyon I), reçoivent toute ma gratitude pour m'avoir initiée à de nouvelles techniques (étude de l'expression de gènes de nodulation), qui m'ont fait découvrir des perspectives intéressantes dans le domaine de l'interaction plante-*Rhizobium*. Leurs conseils scientifiques m'ont été très précieux.

Je remercie également Phillippe Normand, actuel Directeur du laboratoire d'Ecologie Microbienne du sol, pour avoir mis à ma disposition tous les moyens tant matériels que scientifiques, pour la réalisation de la dernière partie de mon travail. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance.

Je remercie Gérard Duc, Directeur de recherche à la station de génétique et d'amélioration des plantes de l'INRA de Dijon, qui a mis à notre disposition sa collection de Féveroles; je lui sais gré de sa collaboration et de ses précieux conseils.

J'adresse mes remerciements amicaux à Marie Rose Viricel, Jean Louis Fiasson, Katia Fiasson, Claire Boisson, Bernard Voirin, je leur sais gré de leur collaboration et de leur gentillesse.

Je ne voudrais pas oublier:

Nadia, Hassiba, Ounissa, Kheira, Nora, Sonia, Houria, Carolle, Sylvie et Sarouda, avec lesquelles j'ai passé des moments agréables lors de mes séjours à Lyon.

Aux autres membres de l'équipe du laboratoire: Laury, Olivier, Cedric, Cristelle, Carolle, Marie Rose, à tous merci pour ces années inoubliables, pour l'ambiance délirante qui y régnait et qui y règne toujours...

Enfin, je remercie tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Cette thèse a été soutenue financièrement par une bourse Franco-Algérienne dans le cadre de la formation alternée.

الخلاصة :

العلاقات التكافلية بين بكتيريا العقد الجذرية والنباتات البقولية والتي تقود الى تكوين عقد على جذور هذه النباتات حيث يحكم ذلك التبادل الجزيئي المتخصص بينهما . تعمل المركبات الفينولية (الفلافونويدات) المنتجة من قبل النبات على ترجمة الجينات البكتيرية الخاصة بتكوين العقد ، من أجل تفهم أهمية إنتاج المواد الفينولية للبذور والمجموع الجذري ودراسة طرق حث الجينات الخاصة بتكوين العقد عند نبات *Vicia faba* فإن الدراسة إهتمت بجانبية أساسيين :

إبتداءً تبين أن الإنتاج الفينولي للبذرة كاملة لكل من *Vicia faba cv Blandine* وبدون التانان و *Vicia faba cv Alfred* مع التانان كانت أكثر إيجابية عند درجة حرارة 30 درجة منها عند 4 درجة ، الدراسات التحليلية باستخدام الفصل الكروماتوجرافي الدقيق HPLC بين أن النباتين السابقين يبدان إختلافاً بينهما من حيث المواد الفينولية المنتجة ففي حالة *Vicia faba cv Alfred* فإن المحتوى الفينولي للبذرة يتكون من أحماض فينولية وكاتيكين بينما الفلافونات تبقى بكميات ضئيلة في مثل هذه الحالات بينما في حالة بذور نبات *Vicia faba cv Blandine* فإن المحتوى الفينولي يحتوي أساساً على الأحماض الفينولية وجزئياً على الفلافونات والفلافونول وأحماض فينولية والفلافونول المختزل .

إن الأيض الفينولي للبذور والعقد +++ f123 غني بالفلافونات والكاتيكين بينما - f48 فيتكون من الفلافونات ومشتقات الكاتيكين والأحماض الفينولية والتانان المركز . لتفهم الأدوار الأساسية التي تقوم بها المركبات الفينولية في العلاقة القائمة بين نبات *Vicia faba* وبكتيريا *Rhizobium* تمت دراسة آلية إنتاج هذه المركبات من جذور نبات *Blandine* حيث بينت النتائج المتحصل عليها أن النبات يبدأ في إنتاج هذه المواد منذ المراحل الأولى للنمو حيث أن جذوره تفرز إبتداءً الفلافون والفلافانول والتي تلعب دوراً هاماً في ظاهرة التكافل بين النبات والبكتيريا .

إهتمت المرحلة الأخيرة من العمل بتشخيص الجزئيات التي تحت الجين الخاص بتكوين العقد على الإفراز الجذري خاصة نبات Alfred . حيث تبين أن هذه الجزئيات هي عبارة عن مواد التريسيتين والنارابنجين في المجموع الجذري كما أن المركب الوحيد الذي أدى الى حث جين العقد لبكتيريا *Rhizobium leguminosarum* كانت مادة Me-3 eridiodictyol كما وجد بخلصة جذور النبات مادتين أخريتين تؤديان الى حث الجين الخاص بالعقد وهما : Me-3 eridiodictyol و مادة 1 eridiodictyol .

الكلمات المفتاحية :

Vicia faba ، إفرازات جذرية ، الثانان المركز ، التكافل ، الفلافانونات ، الكاتيكين ، الفلافون ، *Rhizobium leguminosarum* .

RESUME

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse, qui conduit à la formation des nodosités sur les racines des légumineuses est gouvernée par un échange de signaux moléculaires très spécifiques entre les deux partenaires. Les composés phénoliques (flavonoïdes) émis par la plante déclenche la transcription des gènes de nodulation de la bactérie. Afin de déterminer l'importance de l'exsudation phénolique de la graine et de la racine et l'étude de l'induction de gènes de nodulation chez *Vicia faba*, deux niveaux d'approche ont été engagés.

Dans un premier temps, l'exsudation des composés phénoliques de la graine entière des deux cultivars de *Vicia faba* cv Blandine (sans tannins) et le cv Alfred (avec tannins), était plus favorable à une température de 30°C qu'à 4°C.

L'analyse par CLHP nous a révélé que les deux cultivars présentent un *pattern* phénolique différent. Le *pattern* phénolique de la graine entière de cv Alfred renferme des acides phénols et catéchines, quant aux flavones elles restent des composés mineurs dans ce type de compartiment; les téguments seuls contiennent surtout des tannins condensés. Le *pattern* phénolique de la graine entière et cotylédons de cv Blandine est basé essentiellement d'acides phénols; les téguments contiennent des flavones, des flavonols, des acides phénols et dihydroflavonol. Le métabolisme phénolique des exsudats de graines du nodulant précoce f123⁺⁺⁺ est riche en flavones et catéchines, en ce qui concerne le non nodulant f48⁻, il est constitué de flavones, dérivés catéchiques, acides phénols et tannins condensés.

Pour mieux comprendre le rôle des composés phénoliques dans la relation *Vicia faba* - *Rhizobium*, nous avons étudié la cinétique de l'exsudation des composés phénoliques des racines du cultivar Blandine, les résultats obtenus nous ont montrés, que ces composés sont exsudés dès les premiers jours de croissance de la vie de la plantule. Ces racines exsudent surtout des molécules de type flavones et flavanones qui jouent un rôle important dans le phénomène de la symbiose.

Dans la dernière étape de ce travail nous avons identifié les molécules inductrices de gène de nodulation dans les exsudats de racines et racines du cultivar Alfred. Ces composés inducteurs de gènes *nod* dans les exsudats racinaires sont la tricétine et la naringénine. Dans les racines, un seul composé a induit le gène *nod* de la bactérie *Rhizobium leguminosarum* : c'est le Me-3' ériodictyol. Deux inducteurs de gène *nod* ont été révélés dans les hydrolysats de racines: le Me-3' ériodictyol et l'ériodictyol.

Mots clés: *Vicia faba*, exsudats racinaires, tannins condensés, symbiose, catéchine, flavanone, flavone, *Rhizobium leguminosarum*.

SUMMARY

The leguminous-*Rhizobium* Symbiosis which conduct to the formation of nodosities on the legumonous's roots is controled by an exchange of a very specific molucular signes between the two partners. The phenolic compounds (flavonoids) produce by this plant provoke the transcription of the nodulation genes of bacteria. In order to determine the importance of the phenolic exudation of the seed and root and the study of the genes induction of nodulation in *Vicia faba*, two different approchs have been undertaken.

At the first, the exudation of the phenolic compounds of the whole seed to the two cultivars of *Vicia faba* cv Blandine (without tannins) and the cv Alfred (with tannins), was more favorable to a temperature from 30°C to 4°C. The HPLC analyses, demonstrate to us, that the cultivars present a different phenolic pattern. The phenolic patterns of the whole seed of the cultivar cv Alfred contain phenolic acids and catechin, while the flavones that remain the minor components in this type of compartment. The seed coats alone especially contain condensed tannins. The phenolic patterns of the whole seed and the cotyledons of the cv Blandine is essentially based on phenolic acids. The seed coats was dominated by flavones, flavonols, phenolic acids and a dihydroflavonol. The phenolic metabolism of the seeds exudates of the nodulant f123⁺⁺⁺ is rich in flavones and catechins and what concern the non nodulant f48⁻, he is constituted of flavones, the catechin derivatives, phenolic acids and condensed tannins.

For a better understanding the rôle of the phenolic components in the *Vicia faba-Rhizobium* relation, we have studied the kinetic exudation of the phenolic component of Blandine cultivar roots. The data indicated that phenolic compounds were rapidly released from the emerging root as the amonts of phenolic compounds in exudates were maximum the first day after the seed germination. These roots exude molecules of flavones and flavanones type which play a leading role in the symbiosis phenomena.

The last step of this work, we have identified the inducer molecules of the nodulation gene in the exudates of roots and roots of the cultivar Alfred. These inducer compounds of the *nod* genes in the root exudates are the tricitin and naringenin. In the roots, only one compound has induced the *nod* gene of the *Rhizobium leguminosarum* bacteria: It is the Me -3' eriodictyol. Two iducers of the *nod* gene have been revealed in the hydrolysat roots: It is the Me-3' eriodictyol and eriodictyol.

Keys words: *Vicia faba*, tannin, symbiosis, *Rhizobium leguminosarum*, phenolic compound, root exudation, catechin, flavone, flavanone, seed exudation.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide desoxyribonucleique
ARN	acide ribonucleique
ARNr	acide ribonucleique ribosomique
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
CCM	chromatographie sur couche mince
Kb	Kilobase
SM	spectro de masse
Tr	temps de retention

S O M M A I R E

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	5
-------------------------------	---

A. TAXONOMIE DES BACTÉRIES NODULANT LES LÉGUMINEUSES	5
--	---

1. Taxonomie et caractéristiques des <i>Rhizobiaceae</i>	5
--	---

1.1 Le genre <i>Rhizobium</i>	6
-------------------------------------	---

1.2 Le genre <i>Sinorhizobium</i>	9
---	---

1.3 Le genre <i>Bradyrhizobium</i>	9
--	---

1.4 Le genre <i>Azorhizobium</i>	10
--	----

B. GÉNÉRALITÉS SUR LA FÉVEROLE (<i>VICIA FABA</i>)	11
--	----

1. Identité taxonomique de <i>Vicia faba</i>	11
--	----

1.1 Ordre des légumales	11
-------------------------------	----

1.2 Famille des Papilionacées	12
-------------------------------------	----

2. <i>Vicia faba</i> L.	12
------------------------------	----

2.1 Description botanique	12
---------------------------------	----

3. Culture de la féverole	14
---------------------------------	----

3.1 Féverole de printemps	14
---------------------------------	----

3.2 La féverole d'hiver:	15
--------------------------------	----

4. Utilisation dans l'agro-alimentaire de la graine de féverole	15
---	----

5. Diversité variétale	16
------------------------------	----

6. Phénols et tannins de la féverole	19
--	----

6.1 Les flavonoides, présentation générale	19
--	----

6.2 Rôle des flavonoides	21
--------------------------------	----

6.2.1 Induction des gènes <i>nod</i>	22
--	----

6.2.2 Développement, germination et croissance du tube pollinique	22
---	----

6.2.3 Protection contre les U.V	22
---------------------------------------	----

6.3 Flavonoides et réactions de défense : Les phytoalexines	23
---	----

7. Les flavonoides non tanniques chez <i>Vicia faba</i>	23
---	----

8. Les tannins	25
----------------------	----

8.1 Les tannins hydrolysables	25
-------------------------------------	----

8.2 Les tannins condensés	25
---------------------------------	----

9. Les tannins chez <i>Vicia faba</i>	27
---	----

10. Rôle des tannins	27
----------------------------	----

C. LES EXSUDATS RACINAIRES ET LA RHISOSPHERE	29
1. Sites d'exsudation le long de la racine.....	29
2. Composition chimique des exsudats.....	31
2.1 Composés du métabolisme primaire.....	31
2.2 Composés du métabolisme secondaire.....	31
2.3 Facteurs influençant l'exsudation racinaire.....	31
D. RELATION <i>RHIZOBIUM</i> - LÉGUMINEUSE.....	32
1. Généralités sur la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuse	32
2. Gènes impliqués dans le processus de la nodulation	34
2.1 Les gènes <i>nod</i> communs.....	34
2.2 Les gènes de spécificité d'hôte.....	34
2.3 Nature et propriétés des gènes <i>nod</i> chez les <i>Rhizobium</i> spp	36
2.4 Régulation de l'expression des gènes de nodulation	36
2.5 Nature des molécules exsudées par les légumineuses qui contrôlent l'expression de gènes <i>nod</i>	38
2.5.1 Caractéristiques structurales des composés inducteurs des gènes <i>nod</i>	38
3. Relation <i>Rhizobium</i> - légumineuse.....	40
3.1 Les exemples les plus étudiées.....	42
3.2 Signaux symbiotiques dans le genre <i>Vicia</i>	45
3.3 <i>Rhizobium</i> - <i>Vicia faba</i>	45
4. Propriétés biologiques décrites pour les composés flavoniques.....	45
5. Caractéristiques structurales des composés inducteurs des gènes de la nodulation de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> et <i>Rhizobium leguminosarum</i>	49
5.1 <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	49
5.2 <i>Rhizobium leguminosarum</i>	50
6. Pénétration des flavonoïdes dans les cellules.....	50
6.1 Dégradation des flavonoïdes par les <i>Rhizobium</i>	50
E. MUTANTS VÉGÉTAUX POUR LES CARACTÈRES SYMBIOTIQUES.....	51
1. Introduction	51
2. Les mutants naturels	51
2.1 La luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.).....	54
2.2 Le Soja (<i>Glycine max</i> L. Merr).....	54
2.3 Le pois (<i>Pisum sativum</i> L.).....	54
2.4 La fève (<i>Vicia faba</i> L.).....	54
3. Les mutants induits.....	55

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES	56
Introduction.....	56
A. MATÉRIEL BIOLOGIQUE	56
1. Matériel végétal.....	56
1.1 Cultivars de <i>Vicia faba</i>	57
1.1.1 Cultivar Blandine	57
1.1.2 Cultivar Alfred.....	57
1.2 Mutants de <i>Vicia faba</i>	57
B. MÉTHODES D'OBTENTION DES EXUDATS DE GRAINES ET DE RACINES	57
1. Récupération des exsudats de graines	57
2. Récupération des exsudats de racines.....	58
2.1 Stérilisation du matériel.....	58
2.2 Stérilisation des graines du cultivar Blandine et récupération des exsudats racinaires	58
C. MÉTHODE D'ANALYSE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES	58
1. Dosage des phénols totaux utilisant la méthode de bleu de Prusse	59
2. Dosage des tannins condensés	59
2.1 Test de vanilline	61
2.2 Production d'anthocyanidines par oxydation à chaud	61
3. Méthodes de séparation et de détermination des structures chimiques fonctionnelles....	63
3.1 Procédés de séparation.....	63
3.1.1 Extraction directe du matériel végétal.....	63
3.1.1.1 les graines	63
3.1.1.2 les exsudats racinaires.....	63
3.1.1.3 les racines.....	63
3.1.2 Extraction après hydrolyse.....	64
3.2 Procédés de caractérisation.....	64
3.2.1 Traitement des différentes fractions par C.C.M.....	64
3.2.2 Analyse des composés phénoliques par CLHP couplée à barrette de diodes (CLHP/UV)	65
3.2.3 Chromatographie préparative.....	66
3.2.4 Identification des composés inductrices de gènes <i>nod</i> par HPLC couplée à la Spectro de Masse (HPLC/SM)	66
D. MÉTHODE MICROBIOLOGIQUE	67
1. Introduction	67
2. Matériel et méthodes	69
2.1 Souche utilisée.....	69
2.2 Milieux de culture	69

2.3 Origine des composés phénoliques testés	69
2.4 Méthodes d'étude de l'expression des gènes <i>nod</i> communs	70
2.4.1 Criblage des inducteurs	70
2.4.2 Détermination de l'activité β - galactosidase	71

CHAPITRE III

PHYSIOLOGIE DE L'EXSUDATION ET MÉTABOLISME PHÉNOLIQUE DE *VICIA FAB*A AUX PREMIERS STADES DE LA CROISSANCE..... 73

1. Introduction	73
2. Rôle de la température sur l'exsudation phénolique potentielle des divers compartiments de la graine	74
2.1 Cas des phénols totaux	74
2.2 Cas des polymères proanthocyanidines	76
3. Comparaison des capacités globales d'exsudation des cultivars Blandine et Alfred et des mutants f123 ⁺⁺⁺ , f48 ⁻ , f32 ⁺⁺	76
3.1 Intérêt génétique de ces mutants	76
3.2 Exsudation des phénols et tannins	78
4. Cinétique de l'exsudation chez cv Blandine	80
5. Nature chimique de produits d'exsudation	82
5.1 cv Alfred	82
5.2 cv Blandine	82
5.3 Les mutants f123 ⁺⁺⁺ , f48 ⁻	85
5.3.1 Graines	85
5.3.2 Cas particulier des téguments	85
6. Discussion	88
6.1 Signification de la température par rapport à la physiologie biochimique de l'exsudation phénolique	89
6.2 Origine des composés phénoliques exsudés par les différents compartiments de la graine ...	90
6.3 Cinétique des composés phénoliques des exsudats racinaires et racines chez <i>Vicia faba</i> cv Blandine	91

CHAPITRE IV

LES SIGNAUX CHIMIQUES DANS LA RELATION *VICIA FAB*A ET *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*..... 93

1. Introduction	93
2. Résultats	95

2.1 Action des différents extraits bruts: des exsudats de graines et de racines de <i>Vicia faba</i> "cv Blandine", "cv Alfred" et ses mutants fl23 ⁺⁺⁺ et f43 ⁻ sur <i>Rhizobium leguminosarum</i> nod C - Lac Z	95
3. Action des différentes fractions des exsudats de racines, extrait de racines et hydrolysats de racines de <i>Vicia faba</i> cv Alfred sur <i>R. leguminosarum</i> nod C - lacZ	97
3.1 Exsudats racinaires	97
3.2 Extrait de racines	97
3.3 Hydrolysats de racines	97
4. Etude du pouvoir d'induction des gènes de nodulation de <i>Rhizobium leguminosarum</i> des différentes molécules isolées soit des exsudats racinaires soit des extraits des racines et des hydrolysats de racines	99
5. Caractérisation par CCM des composés responsables de l'activité des gènes <i>nod</i> de l'extrait et de racines sur <i>Rhizobium leguminosarum</i> nod C - lacZ	102
6. Essai d'identification des composés actifs vis à vis de gènes <i>nod</i>	104
6.1 Procédure d'analyse structurale	104
6.1.1 Approche générale	104
6.1.2.1 Exsudats racinaires	104
6.1.2.2 Racines natives	105
6.1.2.3 Hydrolysats de racines	106
6.3 Identification des molécules inductrices de gènes <i>nod</i> des exsudats racinaires, extraits de racines et racines hydrolysées	108
6.3.1 Molécules inductrices de gènes <i>nod</i> chez <i>Vicia faba</i> cv Alfred	108
6.3.1.1 Exsudats racinaires: Molécules de la famille des flavones	108
6.3.1.2 Exsudats racinaires: Molécules de la famille des flavanones	109
6.3.2 Racines: Molécules de la famille des flavanones	109
6.3.3 Hydrolysats de racines: Molécules de la famille des flavanones	111
7. Composés non inducteurs de gènes <i>nod</i> chez <i>Vicia faba</i> cv Alfred	113
7.1 Exsudats racinaires	113
7.2 Hydrolysats de racines	115
Conclusion	119
8. Discussion	119
8.1 Exsudats de graines non inducteurs de gènes <i>nod</i> chez <i>Vicia faba</i> cv Alfred	121
8.2 Molécules inductrices de gènes <i>nod</i> chez <i>Vicia faba</i> cv Alfred: Flavones et flavanones	121
8.2.1 Exsudats racinaires	121
8.2.2 Racines	121
8.2.3 Hydrolysats de racines	123
9. Molécules non inductrices de gènes <i>nod</i> chez <i>Vicia faba</i> cv Alfred: Isoflavones et acide phénols	123
9.1 Exsudats racinaires	123
9.2 Hydrolysats de racines	123

10. Catéchine et <i>Rhizobium</i>	124
Conclusion.....	125
CONCLUSION GENERALE	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	129
PUBLICATIONS	146
ANNEXES	147

I N T R O D U C T I O N

INTRODUCTION

Les légumineuses constituent une part très importante de l'alimentation de nombreuses populations en Asie, Afrique, Amérique centrale et Latine (Reddy et al., 1986). La féverole tout comme la fève est consommée tout particulièrement dans les pays circum-méditerranéens: en Italie, *Vicia faba* est cultivée pour la consommation humaine (Nozollillo et al., 1989). En 1990, la CEE a utilisé près de 20 millions de tonnes de soja dont la majorité est importée des U.S.A (Merghem, 1995).

En France la féverole est employée essentiellement pour l'alimentation animale. Pour les agriculteurs, l'avantage économique de cette espèce est la marge bénéficiaire qui est importante puisqu'ils utilisent très peu ou pas d'engrais pour la croissance de cette plante; de l'ordre de 200 kg N/ha/an (Duke, 1981).

L'association très efficace serait responsable de plus de la moitié de l'azote fixé biologiquement à la surface de la terre (jusqu'à 400 kg d'N fixé/ha/an), (Rolfe et Shine, 1984). Cette symbiose est particulièrement importante dans les agrosystèmes. En effet, la majorité des protéagineux sont des légumineuses, comme le sont également la plupart des plantes fourragères qui servent d'engrais vert.

x Les légumineuses possèdent la capacité de fixer l'azote par symbiose avec les bactéries du sol. La fixation de l'azote moléculaire est réalisée dans un tissu bien spécialisé la nodosité. Dans les nodosités les *Rhizobium* sont capables de convertir l'azote atmosphérique en ammonium qui est utilisé par la plante. En retour la plante hôte procure à la bactérie des composés carbonés nécessaires à la croissance bactérienne et à la fixation d'azote.

Vicia faba, une plante riche en protéines (22 à 36%), est utilisée dans l'alimentation animale. Cependant la présence de facteurs antinutritionnels (F.A.N) limitent son emploi, (Bond et al., 1976). Les effets négatifs de tannins condensés sur la valeur nutritive de la féverole ont contraint les sélectionneurs à

dire tout, d'autre part

rechercher les variétés sans tannins. Mais ce type de variétés (sans tannins) présente une mauvaise résistance aux conditions environnementales et également une baisse de la productivité (Bond et al., 1976; Duc et al., 1995; Duc, 1997). En effet, les tannins jouent un rôle de défense pour le végétal lui-même en particulier vis-à-vis des pathogènes et prédateurs (Salunke et al., 1990).

L'intérêt économique de l'association symbiotique entre *Vicia faba* et *Rhizobium* a motivé certains chercheurs pour améliorer cette voie de sélection. Des mutants de *Vicia faba* ayant une haute performance symbiotique dans la nodulation et la fixation de l'azote (Duc et al., 1989; Duc et al., 1995) ont été isolées. Ils sont devenus de bons outils pour étudier les signaux entre plante et *Rhizobium* afin d'optimiser cette relation.

× Environ 90% des espèces appartenant à la famille des légumineuses forment une symbiose fixatrice d'azote avec des bactéries du sol appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. La symbiose *Rhizobium*-légumineuse, qui conduit à la formation des nodosités sur les racines des légumineuses, est gouvernée par un échange de signaux moléculaires très spécifique entre les deux partenaires. Les plantes initient le dialogue en libérant dans le sol un mélange divers de molécules organiques. Parmi ces molécules, les flavonoides sont des composés importants de la rhizosphère de la jeune racine et de la graine sont connus pour contrôler la transcription de gènes responsables de la réponse symbiotique de la bactérie (Redmont et al., 1986).

Au cours de ces dix dernières années, avec le développement des techniques de biologie moléculaire; la connaissance de la génétique des *Rhizobium*.ssp a énormément progressé (Long, 1989a). Plus particulièrement, les gènes impliqués dans les premières étapes de la nodulation (gènes *nod*) ont été identifiés. Leur régulation est sous la dépendance du produit du gène *nod D* et d'un composé flavonique émis par la plante (Long, 1989 a; Long 1989 b). La fonction biochimique de certains des gènes *nod* a pu être déterminée (Roche et al., 1991; Schwedock et Long, 1990). Le produit des gènes *nod* a également été purifié et caractérisé. Il s'agit d'un glycolipide (Lerouge et al., 1990, Spaink et al., 1991).

Kosslak et al., (1987) ont identifié dans des extraits de plantules de Soja les inducteurs de gènes *nod* de *Bradyrhizobium japonicum* : daidzeine (4',7 - dihydroxy-isoflavone) et génisteine (4',5,7- trihydroxy-isoflavone). Il a ainsi été démontré que les molécules responsables de l'induction des gènes *nod* sont des flavonoides et des bêtaïnes (Redmont et al., 1986, Phillips et al., 1995).

Les flavonoides sont les inducteurs majoritaires. La famille des légumineuses est particulièrement riche en flavonoides et produit environ 25% de flavonoides connus. La recherche de composés activateurs ou inhibiteurs des gènes *nod* dans les exsudats racinaires de différentes légumineuses a été facilitée par l'emploi de souches de *Rhizobium* spp modifiées génétiquement. Elles comportent en effet une fusion de gènes entre les promoteurs des différents opérons *nod* et le gène de structure de l'enzyme β - galactosidase (*lac Z*) de *E.coli*.

Zaat et al (1989) ont mis en évidence six flavanones inductrices de gènes *nod* dans les exsudats racinaires de *Vicia sativa*; ils ont pu identifier deux composés : la 3,5,7,3'- tétrahydroxy 4'-méthoxy-flavanone et la 7,3'-dihydroxy-4'-méthoxy-flavanone. *Rhizobium meliloti* est activé spécifiquement par les flavones lutéoline et apigénine et très faiblement par deux flavanones : ériodictyol et naringénine (Kosslak et al., 1987, Peters et Long, 1988). Deux inducteurs apigénine 7-O glucoside et l'ériodictyol ont été trouvés dans les graines de pois (Firmin et al., 1986).

Les flavonoides inducteurs produits par différentes légumineuses appartenant à des familles ou des genres différents ne sont pas les mêmes. Ainsi les inducteurs produits par *Medicago sativa* sont différents de ceux produits par *Trifolium*, *Glycine max* ou *Sesbania* (Phillips, 1992) et cette diversité permettrait d'expliquer une partie de la spécificité symbiotique entre certaines espèces de *Rhizobium* et certaines légumineuses. Deux inducteurs majeurs ont été trouvés dans le extraits de semis de *Trifolium repens* qui sont la 7,4' dihydroxy-flavone et la 7,4' dihydroxy 3' méthoxy-flavone (géraldone).

La lutéoline (3',4',5,7 tétrahydroxy-flavone) isolée des exsudats de graines de *Medicago sativa* a été le premier composé inducteur trouvé. C'est quantitativement l'inducteur le plus important de la graine (Peters et al., 1986).

Six flavanones et deux chalcones, inducteurs majeurs de gènes *nod*, exsudés par les racines de *Vicia sativa* ont été identifiés, (Recourt et al., 1991). Pour la première fois, la présence de deux composés isolés des exsudats de graines de *Vicia faba* ont été identifiés qui sont le 7,4'- dihydroxyflavone et le 7,3',4' - trihydroxyflavone; ces deux flavonoïdes jouent un rôle important dans la symbiose *Rhizobium*-légumineuse (Tomas- Lorente et al., 1990).

L'induction de gènes *nod* dans la relation Plante -*Rhizobium* est amenée à faire varier des concentrations de flavonoïdes afin d'améliorer le rendement de ces légumineuses (Hernandez et al., 1995).

Cependant dans le cas de *Vicia faba*, peu de travaux ont été réalisés sur la physiologie de l'exsudation phénolique; l'identification des inducteurs de gènes *nod* n'a pas été envisagée jusqu'à présent.

Notre travail a donc pour objectif d'étudier les composés phénoliques des exsudats racinaires chez *Vicia faba* en relation avec les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* (*Rhizobium leguminosarum*).

Dans une introduction bibliographique (chapitre I), nous rappelons brièvement les connaissances actuelles sur la symbiose *Rhizobium*-légumineuse. Cette introduction est séparée en 4 parties. La 1^{ère} porte sur la taxonomie des bactéries nodulantes, la 2^{ème} rappelle les généralités de *Vicia faba*, la 3^{ème} concerne les exsudats racinaires et rhisosphère et la 4^{ème} est l'étude du fonctionnement de la symbiose *Rhizobium* - *Vicia faba*.

Le chapitre II sera consacré aux méthodes d'obtention des exsudats graines et de racines, à l'analyse des composés phénoliques et à la détermination de la β -galactosidase pour l'induction de gène *nod*.

Dans le chapitre III, nous cherchons à étudier le métabolisme phénolique des cultivars, mutants et la physiologie de l'exsudation au niveau de la graine et la racine de cv Blandine.

Dans la dernière partie (chapitre IV), nous abordons l'interaction *Rhizobium-Vicia faba* en analysant les signaux chimiques émis par la plante (les flavonoïdes).

CHAPITRE I

Données

Bibliographiques

CHAPITRE I : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

A. Taxonomie des bactéries nodulant les légumineuses

1. Taxonomie et caractéristiques des *Rhizobiaceae*.

Bien que l'atmosphère terrestre contienne près de 80% d'azote moléculaire N₂, l'azote est l'un des principaux facteurs limitants de la croissance et de la production végétale.

C'est en 1888, qu'Hellriegel et Wilfarth ont clairement établi l'assimilation de l'azote atmosphérique par les nodules des légumineuses. Beijerinck (1888) a isolé les bactéries symbiotiques et a confirmé leur capacité de fixer l'azote. Il a proposé pour ces bactéries le nom de *Bacillus radiciola* mais Frank (1889) a renommé ces organismes du nom de *Rhizobium*. Plus tard, des études d'inoculations croisées ont mis en évidence la spécificité qui s'exprime à la fois par le pouvoir de nodulation du *Rhizobium* (infectivité) et par son aptitude à former des nodules fixateurs d'azote (efficience).

Selon l'international Committee of Systematic bacteriology (Graham et al., 1991), la classification des bactéries symbiotiques ne doit plus être basée uniquement sur des résultats de performances symbiotiques, mais aussi sur l'analyse de caractéristiques phénotypiques suffisamment stables et nombreuses pour effectuer une analyse de taxonomie numérique, des homologies ADN/ADN (classement des espèces), ADN/ARN (classement des genres) d'analyses des séquences de l'ADN r 16S, du polymorphisme des fragments de restriction et du polymorphisme des isoenzymes.

Ainsi, selon ces critères, on distingue actuellement 4 genres : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium*. Ces genres appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* qui comprend également deux autres genres : *Agrobacterium* et *Phyllobacterium*. Ces 6 genres contiennent des bactéries

capables d'induire des hypertrophies corticales sur les plantes. Le genre: *Agrobacterium* établi par Conn (1942), est divisé en 4 espèces tenant compte de critères de pathogénicité: *A. tumefaciens* induit le développement des tumeurs (crown gall), *A. rubi* induit le développement anormal des racines (chevelu racinaire), et *A. radiobacter* est l'espèce contenant les souches non pathogènes. Les bactéries appartenant au genre *Phyllobacterium* induisent la formation de nodosités sur les feuilles de certaines plantes appartenant aux familles des Myrsinacées et Rubiacées (selon le Bergey's Manual, 1984). Le tableau 1 résume les genres et espèces de bactéries symbiotiques isolées de nodosités de légumineuses, actuellement connus.

1.1 Le genre *Rhizobium*

Le genre *Rhizobium* est divisé en 7 espèces: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, *R. galega*, *R. huakuii*, *R. tropici* et *R. fredii*. En plus de leur croissance rapide sur milieu Yem et de l'acidification qu'elles produisent, ces espèces ont également en commun le fait de posséder au moins un plasmide de taille importante (90 à 250 Md, Masterson et al., 1982) qui héberge les gènes responsables de la nodulation (gènes *nod*) et de la fixation d'azote (gènes *nif*, nitrogénase et *fix*, fixation). Ce plasmide prend communément le nom de pSym (plasmide symbiotique).

Le genre *Rhizobium* tel qu'il a été décrit par Jordan (1984) comprend les 3 espèces suivantes: *R. leguminosarum* (contenant trois biovars, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, bv. *phaseolus*, bv. *viceae*) *R. meliloti* et *R. loti*. La séparation de *R. leguminosarum* et *R. meliloti* a été basée sur plusieurs études employant la taxonomie numérique (Graham 1964., Moffet et Colwell., 1968), l'hybridation ADN /ADN (Helberlein et al., 1967; Jarvis et al., 1980), les profils de protéines cellulaires (Roberts et al., 1980), la sérologie (Graham 1963, Vincent et Humphey, 1970), et la composition en polysaccharides (Robertsen et al., 1981).

Actuellement l'espèce *R. meliloti* a été reclassée dans le genre *Sinorhizobium*. Ces travaux ont aussi mis en évidence qu'il existait une forte similarité chromosomique entre *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* et *R. trifolii*, qui

Genres	Espèces	Biovars	Plantes hôtes	Références
Rhizobium	<i>leguminosarum</i> <i>leguminosarum</i> <i>leguminosarum</i> <i>tropici</i>	<i>Viceae</i> <i>Trifolii</i> <i>Phaseoli</i>	<i>Pisum</i> , <i>Lens</i> , <i>Vicia</i> <i>Trifolium</i> <i>Phaseolis vulgaris</i> <i>Phaseolis vulgaris</i> , <i>leucaena</i> sp. <i>Phaseolis vulgaris</i>	Jordan 1984 Jordan 1984 Jordan 1984 Martinez-Romero 1991 Segovia 1993 Jarvis 1982
	<i>elti</i> <i>loti</i>		<i>Lotus</i> sp., <i>Caragana</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Robinia</i> , <i>Trifolium</i>	
	<i>Galegae</i>		<i>Galega orientalis</i> , <i>Galega officinalis</i>	Lindström 1989
	<i>huakuii</i> <i>ciceri</i> <i>mediterraneum</i> <i>tianshanense</i>	<i>Renge</i>	<i>Astragalus sinicus</i> cv. <i>Japon</i> <i>Cicer aietinum</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Glycyrrhiza uralensis</i> , <i>G.</i> <i>pallidiflora</i> , <i>Sphora</i> <i>alopecurooides</i> , <i>Caragana</i> <i>polourensis</i> , <i>GLycin max</i>	Murooka 1993 Nour 1994 b Nour 1995 Chen 1995
Sinorhizobium	<i>Meliloti</i>		<i>Medicago</i> , <i>Trigonella</i> , <i>Melilotus</i>	De Lajudie 1994
	<i>Fredii</i> <i>Saheli</i>		<i>Glycin max</i> <i>Sesbania</i> , <i>Acacia</i>	Jarvis 1992 De Lajudie 1994
	<i>Terranga</i>		<i>Sesbania</i> , <i>Acacia</i>	De Lajudie 1994
Azorhizobium	<i>Caulinodans</i>		<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus 1988
Bradyrhizobium	<i>Japonicum</i>		<i>Glycine max</i> , <i>Macroptilium</i> <i>atropurpureum</i>	Jordan 1982
	<i>Elkanii</i> sp.		<i>Glycine max</i> , <i>Arachis</i> <i>hypogaea</i> <i>Lotus</i> sp., <i>Vigna</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Sesbania</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Mimosa</i> , <i>Acacia</i>	Kuykendall 1988 Jarvis 1982

Tableau 1 : Classification des Rhizobium.

devaient donc être regroupés dans une seule espèce *R. leguminosarum*. Entre ces 3 biovars la spécificité d'hôte est facilement transférable de l'un à l'autre par le transfert de plasmides symbiotiques (Jordan 1984, et Johnston et al., 1978). Jarvis et al., (1982) ont défini *R. loti* comme une espèce comprenant des souches à croissance rapide nodulant une large gamme de plantes hôtes : *Lotus corniculatus*, *Lotus divaricatus*, *Lotus marococcanus*, *Lotus tenuis*, *Lupinus densifloris*, *Trifolium lupinastus* et *Carmichaelia* sp.

Rhizobium galegae a été isolé uniquement de nodosités de plante du genre *Galegae* (*G. orientalis*, *G. officinalis*) provenant de Finlande, URSS et Nouvelle Zélande (Liondström, 1989).

Rhizobium huakuii : Les souches de cette espèce sont isolées de la légumineuse *Astragalus sinicus* cultivée dans les provinces sud de la chine et au Japon (Chen et al., 1991). Au sein du genre *Astragalus* la spécificité comme la diversité des souches bactériennes sont importantes. En effet les souches isolées de *A. sinicus* ne nodulent pas les espèces *A. membranaceus*, *A. adsurgens*, *A. alginosus* ni d'autres légumineuses et n'ont quasiment aucune homologie d'ADN avec les microorganismes issus de ces plantes. Une équipe japonaise a montré que la souche de type de *R. huakuii* n'était pas infective sur le cultivar japonais. Murooka et al., (1993) ont proposé que les isolats de *A. Sinicus* c.v Japon soient classés comme *R. huakuii* biovar renge.

Rhizobium trianshanense: Ces *Rhizobium* ont été isolés de différentes légumineuses du Nord de la chine qui poussent dans des milieux désertiques et des sols salins (Chen et al., 1995). Le % de G+C compris entre 59 et 63 les rapprochent du genre *Rhizobium*.

- Les souches nodulant le haricot (*Phaseolus vulgaris*) appartiennent toutes au genre *Rhizobium*. Elles avaient été classées dans l'espèce *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Mais l'hétérogénéité de ces souches mis en évidence par des hybridations ADN/ADN (Crow et al., 1981; Jarvis et al., 1980; Scholla et al., 1990), par l'analyse des caractères phénotypiques (Beynon et Josey., 1980; Robert et Schmidt., 1985; Zevenhuizen et Bertocchi., 1989), a conduit à la réexamination de cette espèce, 7 espèces génomiques ont été mises en évidence:

Rhizobium tropici possède une seule copie de nif H (Martinez et al., 1985; Quinto et al., 1982) et nodule *Leucaena* en plus du Haricot (Martinez et al., 1985; Martinez et al., 1988).

Rhizobium elti (possédant des copies multiples de nif H et nodulant uniquement le haricot), a été isolé de haricots d'Amérique Centrale.

Sur les cultivars de haricot poussant en Europe, trois espèces génomiques ont été trouvées: *Rhizobium leguminosarum* biovars *phaseoli*, et 2 espèces génomiques représentées par les souches R 602 et H 152 (Laguerre et al., 1993).

- Les souches nodulant *Cicer arietinum* ont été séparées en 2 groupes A et B sur la base de leur polymorphisme enzymatique, leur polymorphisme des fragments de restriction des gènes ribosomiques 16S-IGS, de leur profil trophique et par des tests phénotypiques (Nour et al., 1994a). Les souches du groupe A ont un temps de génération supérieur à 5h, et celles du groupe B inférieur à 6 h (Cadahia et al., 1986). Les souches du groupe B qui sont homogènes et proches de *R. loti* ont été classées dans l'espèce *R. ciceri* (Nour et al., 1994 b). Les souches du groupe A sont plus hétérogènes et présentent au moins 4 espèces génomiques, une de ces 4 espèces a été créée et nommée *R. mediterraneum* (Nour et al., 1995).

1.2 Le genre *Sinorhizobium*

Le nom de *Sinorhizobium* donné à ce genre vient de Chen et al., (1988) qui avait classé les souches à croissance rapide isolées du Soja (*R. freddiei* et *R. xinjuangensis*) dans le genre *Sinorhizobium*. Actuellement ce genre comprend 4 espèces: *Sinorhizobium meliloti* associé aux légumineuses tempérées, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium saheli* et *Sinorhizobium teranga* toutes les trois associées à des légumineuses tropicales.

1.3 Le genre *Bradyrhizobium*

Ce genre regroupe les bactéries à croissance lente ($T_d > 6h$) qui alcalinisent les milieux YEM et qui nodulent principalement des espèces végétales tropicales. Elles possèdent des flagelles polaires ou subpolaires (De Ley et Rassel, 1965), et leurs gènes symbiotiques sont chromosomiques. Deux espèces bactériennes sont reconnues dans ce genre :

Bradyrhizobium japonicum est isolée de Glycine max (Soja) et peuvent noduler *Macroptilum atropurpureum*.

Bradyrhizobium elkanii peut être séparée de l'espèce *B. japonicum* par sa composition en acide gras, en exopolysaccharides et sa sensibilité aux antibiotiques (Minamisawa., 1989; Kuykendall et al., 1992). Les souches de cette espèce ont un spectre d'hôtes plus large que *B. japonicum*, car certaines peuvent noduler *Arachis hypogea*. Des plantes de Soja inoculées avec ces souches ont une croissance et un développement des parties aériennes très faible par rapport aux souches de *B. japonicum* (Vasilas et Fuhrmann., 1993). Les autres souches de *Bradyrhizobium* non classées ont été nommées *Bradyrhizobium* sp. suivi du nom entre parenthèses de la plante hôte qu'elles nodulent (par exemple *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) pour les *Bradyrhizobium* sp. (Vigna). Ce genre est communément appelé *Bradyrhizobium cowpea* (nom usuel en anglais).

1.4 Le genre *Azorhizobium*

Certaines espèces de légumineuses tropicales appartenant aux genres *Neptunia*, *Aeschynomene* et *Sesbania* ont la propriété de porter des nodosités aussi bien sur leur système racinaire que caulinaire. Dans le cas de *Sesbania rostrata*, une étude approfondie des caractéristiques physiologiques, biochimiques et moléculaires de 20 souches isolées des nodosités aériennes a permis à Dreyfus et al., (1988) de proposer la création du nouveau genre *Azorhizobium* contenant une seule espèce, *Azorhizobium caulinaudans*. Cette espèce a la propriété de former des nodosités efficaces sur les tiges et les racines de *S. rostrata*. Par rapport aux autres genres, les *Azorhizobium* n'assimilent curieusement qu'un seul sucre, le glucose. Physiologiquement, ils possèdent des caractères communs aux *Rhizobium* (temps de génération de 3 à 5 heures, présence de pSym) et aux *Bradyrhizobiums* (alcanisation du milieu à base d'extrait de levure et de glucose).

Actuellement, les genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* appartiennent à des embranchements différents dans la sous classe alpha des protéobactéries (Jarvis et al., 1986; Stackebrandt et al., 1988; Williems et Collins., 1993; Young et al., 1991). Cependant les branches des arbres

phylogénétiques sont très longues. *Rhizobium* est très proche du genre *Agrobacterium* qui forme des tumeurs sur certaines plantes. Le genre *Bradyrhizobium* est plus proche du genre *Rhodopseudomonas palustris* (bactéries du sol photosynthétiques qui peuvent fixer l'azote) que des autres genres de la famille des *Rhizobiaceae*.

B. Généralités sur la féverole (*Vicia faba*)

1. Identité taxonomique de *Vicia faba*

1.1 Ordre des légumales

La féverole appartient à l'ordre des légumineales ou légumineuses et à la famille des Papilionacées ou Fabacées qui comprend 12 000 à 17 000 espèces selon les taxonomistes réparties entre 600 et 700 genres. Ces plantes sont distribuées dans le monde entier et principalement dans les régions chaudes. Les légumineuses constituent un intérêt important dans l'alimentation de nombreuses populations à travers le monde et représentent une source de protéines intéressante pour l'homme et l'animal.

De nombreux représentants, tel que le *Lotus*, *Melilotus*, *Medicago* ou *Trifolium* sont cultivés à grande échelle pour le fourrage ou ils sont semés pour enrichir les pâturages. Les autres légumineuses alimentaires sont cultivées pour les gousses, leurs graines ou l'ensemble des deux : c'est le cas de *Arachis*, *Cicer*, *Glycine*, *Lens*, *Lupinus*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Vigna* et *Vicia*.

Outre son fruit caractéristique, la gousse ou légume, une des particularité de cette famille est sa capacité à fixer l'azote par symbiose avec les bactéries du Genre *Rhizobium*, qui se traduit par la formation de nodules au niveau des racines. Cette propriété confère aux légumineuses une grande richesse en protéines et particulièrement en Lysine, acide aminé essentiel, déficient dans la plupart des aliments d'origine végétale. Cet ordre comprend trois familles: Les Mimosacées, les Césalpinacées et les Papilionacées ou Fabacées à laquelle appartient la féverole.



Figure 1. *Vicia faba* L.

Il existe au sein de la sous espèce minor, une grande diversité de coloration des fleurs et des graines:

- les fleurs peuvent être totalement blanches, uniformément colorées, ou blanches avec les ailes colorées.
- l'enveloppe des graines, ou tégument peut être grise, beige, brune, rouge, jaune, violette ou verte, elle peut présenter des ornements tels que points, taches ou marbrures. Cette variabilité, ainsi que celle de la couleur du hile, sert de base aux critères de sélection pour l'amélioration de la plante.

3. Culture de la féverole

La féverole fait partie des végétaux riches en protéines dont le principal représentant est le Soja. Environ 90 Millions de tonnes de Soja sont produits chaque année dans le monde, les principaux pays producteurs étant les Etats-Unis (environ 50 millions de tonnes) et le Brésil (15 millions). En 1978, la production de pois atteignait 570 000 tonnes, en 1984, celle de la féverole 190 000 tonnes (Brun, 1991). En ce qui concerne la féverole, l'Italie et le Royaume Uni restaient encore les principaux producteurs dans la CEE en 1985, la production Européenne atteignent presque 500 000 tonnes à cette date. L'utilisation annuelle du pois et de la féverole en alimentation animale atteint les 5.4 et 0.75 millions de tonnes respectivement de 1987 à 1991 (Eurostat 1991).

Il existe deux catégories de variétés de féverole celle du printemps et celle d'hiver. Les premiers sont semés en fin Février début Mars et sont récoltés fin Août, les seconds sont semés de fin Octobre à mi-Novembre selon la zone géographique et récoltée à la mi-Août.

3.1 Féverole de printemps

Elle présente une teneur en protéines supérieure à celle de la féverole d'hiver ou à celle du pois; ses besoins hydriques élevés en juin et juillet limitent son aire de cultures aux zones maritimes bien arrosées (depuis la pointe de Bretagne au Pas-de-Calais) et à la partie Nord-Est de la France.

- lectines
- la pyrimidine glucosidase (vicine et convicine) accumulée dans les cotylédons. Ces substances peuvent être responsables de dérèglements métaboliques et de la baisse du poids chez les animaux dont la ration alimentaire est essentiellement à base de légumineuses (Kossa, 1977).

5. Diversité variétale

Les variétés à grosses graines sont cultivées depuis longtemps dans les régions méditerranéennes sous le nom de fève. Elle est devenue depuis une grande culture protéagineuse en Europe, principalement en Angleterre. La moitié des valeurs mondiales, soit 4 millions de tonnes, sont produits par la chine.

Il existe au sein de la sous espèce minor une grande diversité de coloration de fleurs et de graines:

- les fleurs blanches et graines non colorées qui correspondent aux espèces dépourvues de tannins.
- les fleurs colorées et graines à téguments gris, beige, brun, rouge, fauve, violet ou vert pour les espèces pourvues de tannins. Les graines sont parfois ornementées de taches ou ponctuations. Ces descripteurs phénotypiques servent de base non seulement à la classification mais aussi à la sélection comme moyen de tri.
- Les génotypes de la première catégorie, à fleurs dépourvues de pigments, donnent naissance à des graines dépourvues de tannins et d'anthocyanes. Ces graines sont en général de couleur grise mais elles peuvent être colorées en vert ou même en noir par des pigments non anthocyanidiques.
- Les génotypes à fleurs colorées, quelque soit le type de coloration, contiennent tous des tannins et des flavonoïdes en plus ou moins en grande quantité.

Selon Cabrera et Martin (1986), la teneur en tannins est plus élevée chez les génotypes à fleurs uniformément pigmentées que chez ceux à fleurs maculées. Les tannins contenus chez 55 lignées de *Vicia faba* sont évalués en fonction de la couleur des fleurs, et des téguments (tableau 2). Ils ont trouvé une corrélation

Lignées	Couleur			Teneurs en tannins %
	Fleurs	Téguments	Hile	
1	Violet, Ailes vertes	Beige	Noir	1.797
9	Blanche	Gris	Noir	0
10	Normal, Ailes jaunes	Beige	Blanc	1.861
13	Violet, Ailes brunes	Vert	Noir	2.681
14	Blanche	Gris	Noir	0
16	Normal, Ailes brunes	Rouge	Noir	2.376
17	Normal, Ailes brunes	Rouge	Blanc	1.862
18	Normal, Ailes brunes	Vert	Noir	1.408
23	Normal, Ailes jaunes	Beige	Noir	1.110
33	Normal, Ailes jaunes	Beige	Blanc	1.845
34	Normal, Ailes brunes	Jaune	Noir	2.921
41	Normal, Ailes brunes	Jaune	Blanc	1.211
43	Normal, Ailes brunes	Rouge	Blanc	2.452
44	Normal, Ailes brunes	Rouge foncé	Noir	0.757
45	Normal, Ailes brunes	Jaune	Noir	1.665
46	Normal, Ailes brunes	Rouge	Blanc	1.180
47	Normal, Ailes brunes	Vert	Blanc	1.560
48	Normal, Ailes brunes	Vert	Noir	1.262
49	Normal, Ailes brunes	Vert	Noir	1.665
50	Normal, Ailes brunes	Vert	Blanc	1.695
54	Normal, Ailes jaunes	Beige	Noir	2.180
57	Blanche	Gris	Noir	0.130
58	Normal, Ailes jaunes	Beige	Noir	1.320
59	Violet uniforme Ailes brunes	Beige	Blanc	3.406
67	Violet uniforme Ailes vertes	Beige	Blanc	2.335
75	Jaune diffus	Beige	Noir	2.795
78	Blanc	Vert	Noir	0.165
100	Blanc	Vert	Blanc	0.136
102	Blanc	Gris	Noir	0.185
108	Jaune diffus	Beige	Noir	2.480
110	Blanche	Gris	Blanc	0

Tableau 2. Teneurs en tannins chez 55 lignées de *Vicia faba*
Cabrera et Martin (1986)

Lignées	Couleur			Teneurs en tannins %
	Fleurs	Téguments	Hile	
111	Blanche	Gris	Noir	0
112	Blanche	Vert	Blanc	0
114	Normal Brun maculé	Brun	-	2.134
115	Normal Brun maculé	Brun	-	2.530
116	Brun diffus	Vert	Blanc	1.620
117	Brun diffus	Beige	Blanc	2.135
118	Violet uniforme Ailes brunes	Brun	Noir	3.540
119	Violet uniforme Ailes brunes	Rouge	-	2.628
120	Violet uniforme Ailes brunes	Vert	Noir	2.452
121	Violet uniforme Ailes brunes	Beige	-	1.962
122	Violet uniforme Ailes brunes	Beige	Blanc	2.705
123	Brun diffus	Brun	Noir	1.696
124	Brun diffus	Rouge	-	2.921
125	Brun diffus	Brun	Noir	3.421
126	Brun diffus	Brun	Blanc	2.590
127	Brun diffus	Rouge	Noir	2.743
128	Brun diffus	Beige	Noir	2.575
129	Brun diffus	Vert	Noir	2.452
130	Brun diffus	Vert	Blanc	2.528
131	Normal Aile-maculé brune	Pourpre	Blanc	2.634
132	Brun diffus	Pourpre	Blanc	1.801
134	Brun diffus	Beige	Blanc	2.220
135	Brun diffus	Brun	Noir	1.525

Tableau 2 (suite). Teneurs en tannins chez 55 lignées de *Vicia faba*
Cabrera et Martin (1986)

entre la couleur des fleurs et la couleur des graines concernant la teneur en tannins.

Les variétés colorées donnent ainsi des graines avec des quantités de tannins qui augmentent progressivement en fonction de la couleur de la graine qui est soit de couleur gris, rouge, beige ou brune. Les variétés à fleurs blanches sans pigments donnent des graines blanches et gris avec une teneur faible en tannins. Ils ont pu ainsi constater que les tannins condensés sont présents seulement dans les téguments des graines colorées chez *Vicia faba*.

Les qualités caractéristiques des lignées parentales et de quelques génotypes standard sont présentés dans le (tableau 3). Ces génotypes proviennent de la station de génétique et d'amélioration de plantes de INRA de Dijon (Duc et al., 1995), leur classement selon l'analyse chimique du contenu phénolique est le suivant :

- Les génotypes porteurs du gène N°1 et gène N°2 à fleurs blanches et graines blanches : les populations Blandine et Albatros présentent une faible teneur en composés phénoliques; ce sont des génotypes sans tannins.
- Les génotypes avec des fleurs à macules jaunes sont divisés en deux groupes en fonction de leur teneur en phénols et en tannins.
- Les génotypes avec des fleurs à macules noires sont caractérisés soit par des teneurs élevées en tannins par exemple les graines de couleur beige, rouge, violet ou des teneurs intermédiaires en tannins avec les graines de couleur brune ou grise.

6. Phénols et tannins de la féverole

La graine de la féverole est riche en phénols et principalement en tannins mais aussi en divers autres flavonoides. Les tannins sont présents en grande majorité dans les téguments de la graine (Reddy et al., 1985).

6.1 Les flavonoides, présentation générale

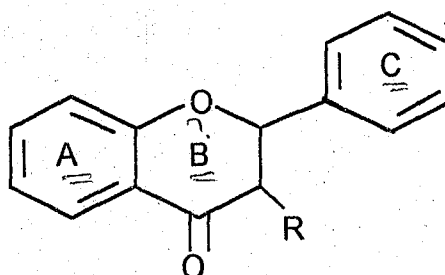
Parmi les métabolites secondaires, les flavonoides représentent l'une des classes les plus étudiées. Les flavonoides sont des composés phénoliques présents

Génotype	Couleur		Phénols totaux	Tannins condensés	
	Graine	Fleur		BuOH-HCL	Vanilline
"Blandine", gène N° 1	beige	blanc	5.3 ± 0.3	0	2.1 ± 0.1
EK-OT, gène N° 2	beige	blanc	6.2 ± 0.5	0	1.5 ± 0.0
EE-OT, gène N° 2	grise	blanc	6.3 ± 0.2	0	1.2 ± 0.2
"Albatros", gène N° 1	beige	blanc	7.0 ± 0.7	2.2 ± 0.1	
FD1. Isogène	beige	jaune maculé	45.6 ± 5.4	113.6 ± 6.8	44.7 ± 4.9
FD2. Isogène	rouge	jaune maculé	48.5 ± 5.3	121.1 ± 7.0	47.5 ± 6.5
1214	beige	jaune maculé	83.7 ± 2.8	126.5 ± 5.8	46.3 ± 1.6
1212	beige	jaune maculé	95.7 ± 0.5	124.1 ± 0.9	55.0 ± 4.0
949	beige	noir maculé	132.6 ± 7.5	191.5 ± 2.2	102.2 ± 5.5
"Ticol"	beige	rouge, noir maculé	113.4 ± 3.4	191.1 ± 5.0	104.0 ± 6.2
D(1) (4)	rouge	noir maculé	106.2 ± 2.3	150.5 ± 10.9	82.3 ± 6
"Alfred"	beige	noir maculé	81.3 ± 2.8	152.1 ± 6.4	63.6 ± 3.7
319(7) (8)	violet	noir maculé	65.6 ± 1.3	111.7 ± 8	30.5 ± 0.7
"Ascott"	beige	noir maculé	57.5 ± 3.0	116.6 ± 6.5	50.4 ± 0.01
893(4) (6)	verte	noir maculé	55.9 ± 3.0	80.1 ± 4.7	34.2 ± 2.5
245(9) (4)	brune	noir maculé	24.9 ± 0.3	57.6 ± 1.5	49.2 ± 0.1

Tableau 3. Teneurs en phénols totaux (eqs catéchine), tannins condensés (eqs catéchine pour le test vanilline, mg/g d'après le E1% de Bate-Smith pour le BuOH-HCL) et pouvoir tannant (éqs ac.tannique) des téguments de graines de féveroles exprimées en mg/g de matière sèche (Duc et al., 1995).

chez presque toutes les plantes supérieures. Actuellement plus de 3500 flavonoides ont été identifiés (Harbonne, 1988).

La plupart des flavonoides ont une structure de base relativement simple, ils sont composés de deux cycles aromatiques de type phényle (notés A et B) liés par une chaîne de 3 carbones généralement cyclique (C). La configuration est la suivante :



Le degré d'oxydation du cycle C détermine les différentes classes de flavonoides: flavane, flavone, proanthocyanidine, anthocyanine, flavonol, isoflavonoïde sont les classes principales, chalcone, flavanone, aurone, dihydroflavonol, dihydrochalcone les classes minoritaires. Par ailleurs, les différents cycles peuvent être modifiés par hydroxylation, méthylation, acylation ou glycolysation. La grande variété de structures possible est à l'origine de leur diversité dans la nature (Van der Meer et *al.*, 1993).

6.2 Rôle des flavonoides

Certains auteurs suggèrent que la fonction première des flavonoides serait de servir de filtre contre les U.V, d'autres qu'ils agiraient plutôt comme des régulateurs physiologiques internes ou des messagers secondaires (Stadford, 1991).

Jusqu'à présent, le rôle de flavonoides en tant que signal chimique n'a pu être mis en évidence que dans un seul cas : celui de l'induction des gènes *nod* de bactéries symbiotiques par l'intermédiaire d'un activateur bactérien de la transcription, la protéine Nod D (Dénarié et *al.*, 1992; Göttfert, 1993).

6.2.1 Induction des gènes *nod*

Chez les légumineuses, les flavonoides sont des composés indispensables à l'établissement de la symbiose entre les bactéries de type *Rhizobium* et leurs plantes hôtes. Les flavonoides sont présents dans les racines et pour un certain nombre d'entre eux dans les exsudats racinaires. Certains de ces flavonoides vont activer directement les protéines régulatrices Nod D de la bactérie en se fixant sur la bactérie.

6.2.2 Développement, germination et croissance du tube pollinique

Des études récentes ont montré que les flavonoides jouaient un rôle dans la reproduction sexuée. Ils s'accumulent dans les anthères et les pistils. Certains flavonols (Kaempferol, quercétine et myricétine) sont capables de stimuler in vitro la germination du pollen et la croissance du tube pollinique (Yistra et al., 1992 ; Mo et al., 1992).

6.2.3 Protection contre les U.V

Les plantes sont exposées à la lumière du soleil et utilisent celle-ci pour leur photosynthèse. Cependant, les U.V produits par le rayonnement solaire peuvent causer les dommages au niveau de l'ADN de la cellule ainsi que dans différents processus biologiques. Les plantes ont la nécessité d'élaborer des mécanismes de protection.

Le spectre d'absorption des flavonoides entre 230 et 380 nm et leur accumulation en réponse aux UV-B suggèrent pour ces composés un rôle de protection contre les radiations U.V. Plusieurs résultats présentés ci-dessous confortent cette hypothèse.

- Les flavonoides s'accumulent dans les cellules épidermiques des feuilles après traitement par les UV-B (Schmelzer et al., 1988).
- Chez le Soja, les cultivars possédant le taux le plus élevé en flavonoides totaux se montrent les plus tolérants vis à vis des UV-B (Middleton et Tamura, 1993).

6.3 Flavonoides et réactions de défense : Les phytoalexines

La notion de phytoalexines a été introduite par Müller et Borger en 1940 pour désigner des substances antifongiques apparaissant dans les tubercules de pomme de terre après infection par *Phytophthora infestans*. Les premières phytoalexines (pisatine et phaséolline) n'ont été isolées et caractérisées que 20 ans après (Cruickshank et Perrin, 1960).

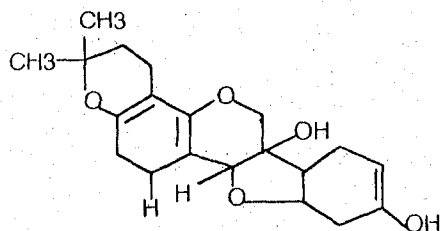
Une définition de référence a été énoncée par Paxton en 1981 « Les phytoalexines sont des composés antimicrobiens de faible poids moléculaire synthétisés et accumulés par la plante lors d'une interaction avec un micro-organisme ». Les phytoalexines ont été isolées à partir de nombreuses plantes chez les dicotylédones mais aussi chez des monocotylédones. La majeure partie des études effectuées à ce jour concerne les légumineuses (isoflavonoides).

Chez les légumineuses, la plupart des études sont centrées sur quelques plantes: Haricot, Soja, Pois, Pois chiche et Luzerne. Les principales phytoalexines produites par ces plantes sont (figure 2): la phaséolline (Haricot), la glycéolline (Soja), la médicarpine (Luzerne et Pois chiche), la maackiaine (Pois chiche) et la pisatine (Pois). Elles appartiennent toutes à la famille des isoflavonoides. Cependant les études ont toujours montré que la synthèse de phytoalexines est très bien corrélée avec la résistance de la plante vis-à-vis d'un pathogène (Mansfield., 1982).

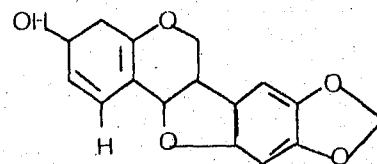
7. Les flavonoides non tanniques chez *Vicia faba*

Nozzollillo et al., (1989) ont étudié l'ensemble de la voie de biosynthèse des flavonoides, aboutissant ainsi à une proposition de contrôle génétique de la synthèse des phénols chez *Vicia faba*, dans laquelle l'ensemble des géotypes peut être repéré par rapport à quatre principales classes de flavonoides :

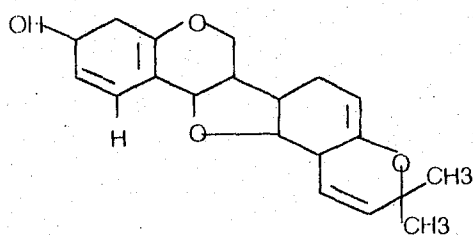
- les flavones dont le principal aglycone est l'apigénine, sont présentes significativement dans les téguments violets, beiges, verts et rouges, et à un degré moindre dans les téguments noirs.
- les flavonols dont le principal aglycone est la myricétine, se trouvent surtout dans les téguments verts et rouges, accessoirement dans les téguments bruns.



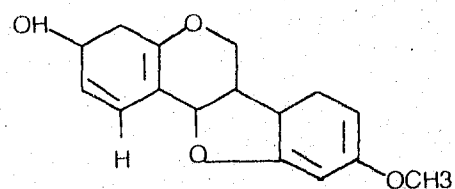
Glycéolline
(Soja)



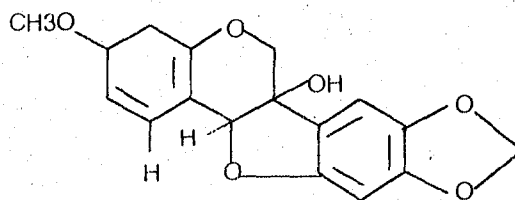
Maackiaine
(Pois chiche)



Phaseolline
(Haricot)



Médicarpine
(Luzerne et Pois chiche)



Pisatine
(Pois)

Figure 2. Les principales phytoalexines chez les légumineuses

- les anthocyanines sont présentes dans les téguments violets avec prédominance de 4 aglycones: delphinidine, cyanidine, malvinidine et pétunidine (figure 3).

Tomas-Lorente et *al*, (1990) ont identifié 7,3',4'-trihydroxy-flavone; 7,4'-dihydroxy-flavone, quercetine, kaempférol, quercetin 7-glycoside et kaempférol 7-glycoside dans les exsudats de graines de *Vicia faba* (figure 4).

8. Les tannins

Les tannins sont des molécules hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 (masse d'unité).

Il existe deux catégories de molécules phénoliques réunies sous le terme de « tannin » : les tannins condensés ou proanthocyanidines, et les tannins hydrolysables. De structure totalement différente, ces deux types présentent des propriétés complexantes quasi-identiques vis-à-vis de nombreuses molécules, d'où leur dénomination commune. Ils sont tous deux présents dans la plupart des génotypes de *Vicia faba*.

8.1 Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucides et d'acides phénols ou de dérivés d'acides phénols. L'hydrolyse chimique ou enzymatique libère outre la molécule de glucose, de l'acide gallique (cas des gallotannins) ou de l'acide ellagique (cas des ellagitannins) (Metche., 1980).

8.2 Les tannins condensés

Les tannins condensés, encore appelés tannins catéchiques ou proanthocyanidines, sont des polymères de flavanes -3-ol (tels que la catéchine), ou encore de flavanes-3-4 diols (leucoanthocyanidines). Les liaisons sont de types carbone-carbone ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables.

Les unités structurales des proanthocyanidines sont essentiellement:

- l'afzéléchine et son isomère l'épiazfzéléchine (monohydroxylée sur le noyau B)

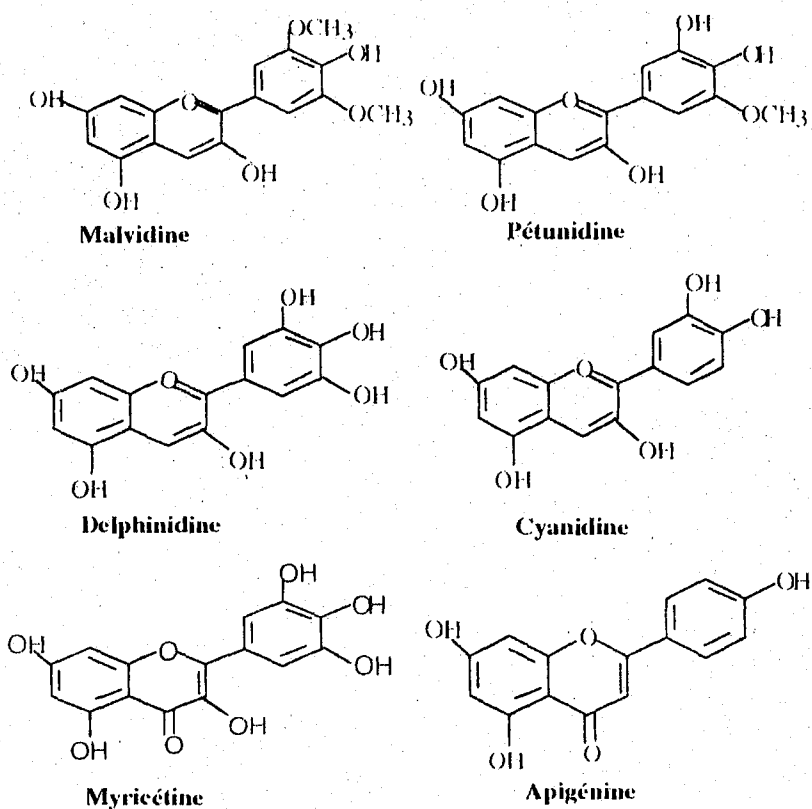


Figure 3. Les flavonoides non tanniques dans les téguments de *Vicia faba*
(Nozzollilo et al., 1989)

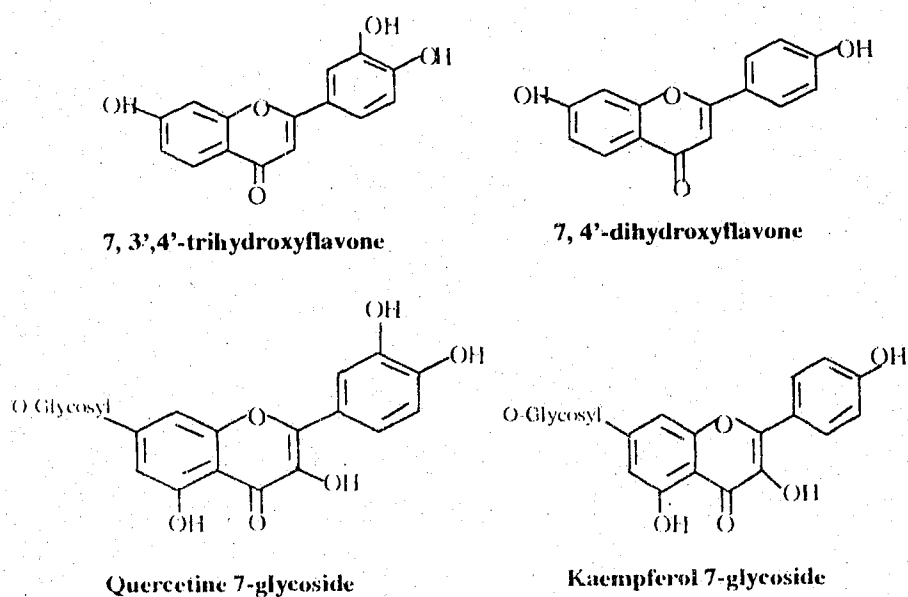


Figure 4. Les flavonoides identifiés dans les exsudats racinaires de *Vicia faba*
(Tomas-Lorente, 1990)

- la catéchine et son isomère l'épicatéchine (dihydroxylée)
- la gallocatéchine et son isomère l'épigallocatéchine (trihydroxylée), (Mergham, 1995), (figure5).

9. Les tannins chez *Vicia faba*

Martin-Tanguy et al., (1977), ont étudié la nature chimique des tannins des variétés de *Vicia faba* à fleurs colorées. Ils ont pu identifier des composés polymères de type flavan-3-ols (catéchine et gallocatéchine).

Les tannins condensés ou proanthocyanidines sont présents dans la plupart des génotypes de *Vicia faba* L., à l'exception des téguments blancs (Nozzolillo et al., 1989).

Kolodziej et al., (1993) ont étudié les proanthocyanidines dans les téguments chez *Vicia faba* et ont pu isoler et identifier par (RMN-H1, CD) les composés suivants:

- * des composés monomères: (-)-épicatéchine et épigallocatéchine
- * des procyanidines dimères : épicatéchine-(4 β ,8)-catéchine, catéchine -(4 α ,8)-catéchine, catéchine-(4 α ,8)-épicatéchine
- * des prodelphinidines: gallocatéchine-(4 α ,8)-catéchine, gallocatéchine-(4 α ,8)-épicatéchine, gallocatéchine-(4 α ,8)-épigallocatéchine.

L'étude structurale des diverses proanthocyanidines de la féverole a été étudié en faisant appel à la spectrométrie de masse, de la microdégradation en présence de phloroglucinol et à l'analyse par CHLP couplée à la barrette de diodes (Merghem., 1995). Dans le cas de la féverole, les dimères identifiés sont des procyanidines : 3 correspondent à des procyanidines de type B constituées de catéchine et de son isomère l'épicatéchine: composés B: catéchine (4 β -8)catéchine; C: épicatéchine (4 β -8)-catéchine; D: épicatéchine (4 β -8)-épicatéchine.

10. Rôle des tannins

Les effets négatifs des tannins condensés sur la valeur nutritive de la féverole ont contraint les producteurs à sélectionner des variétés sans tannins. Malheureusement, la production de la féverole sans tannins engendre non

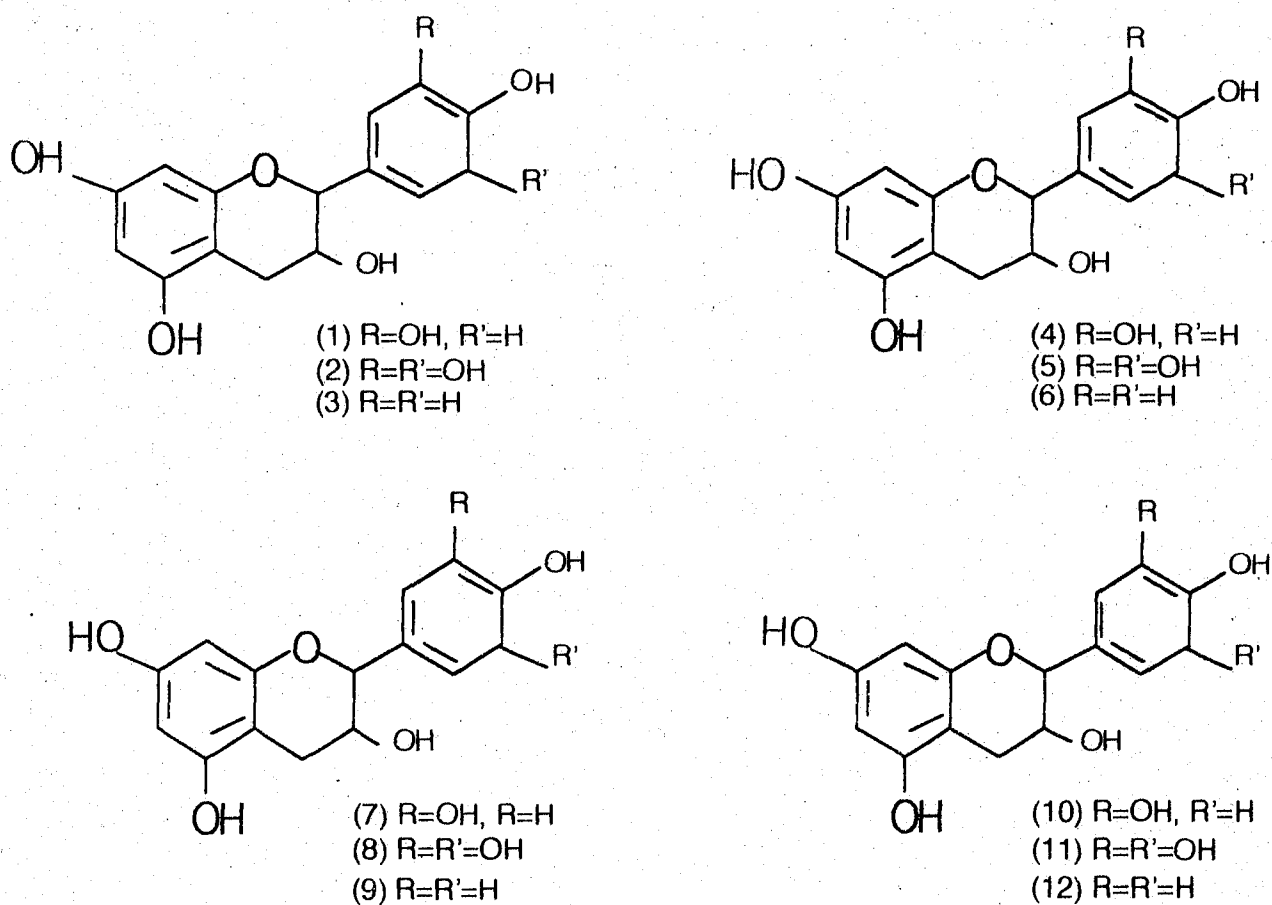


Figure 5. Flavane-3-ol et nomenclature

(Mergham, 1995)

- (1): (-) épicatechine
 (3): (-) épiafzéléchine
 (5): (+) épigallocatechine
 (7): (+) cathéchine
 (9): (+) épiafzéléchine
 (11): (-) galloocatechine

- (2): (-) épigallocatechine
 (4): (+) épicatechine
 (6): (+) épiafzéléchine
 (8): (+) galloocatechine
 (10): (-) cathéchine
 (12): (-) épiafzéléchine

seulement une baisse de la productivité mais également une mauvaise résistance aux conditions environnantes (Bond et *al.*, 1986).

Les tannins jouent un rôle de défense pour le végétal lui-même en particulier vis à vis des micro-organismes et des prédateurs (Salunke et *al.*, 1990). Une teneur faible en tannin, le Sorghum et Faba sont plus susceptibles d'être attaqués par les insectes et les champignons (Bond, 1989). Les génotypes à zéro tannins sont plus sensibles aux maladies (Bond et Duc; 1993; Helsper et *al.*; 1994).

C. Les exsudats racinaires et la rhizosphère

On appelle exsudats racinaires toutes les substances organiques solubles et insolubles libérées dans leur environnement par les racines saines ou lésées (molécules volatiles, hydrosolubles, diffusibles, ou non diffusibles comme les mucilages, ainsi que les cellules et fragments exfoliés).

1. Sites d'exsudation le long de la racine

Les sites d'exsudation racinaire ont été identifiés grâce à l'utilisation de méthodes autoradiographiques (Mac Douglas et Rovira, 1970). Le mode d'exsudation est de 2 types (Rovira 1973) et résulte en :

1. Un rejet intense et discontinu de matériel marqué non diffusible à partir des apex des racines latérales, composé probablement de matériel mucilagineux, cellules de la coiffe ou de coiffes exfoliées.
2. Un rejet diffus associé à l'axe de la racine principale et constituant probablement de composés solubles et diffusibles. Selon Rovira (1973) la zone majeure de rejet d'exsudats diffusibles est la zone d'élongation de la racine. (figure 6).

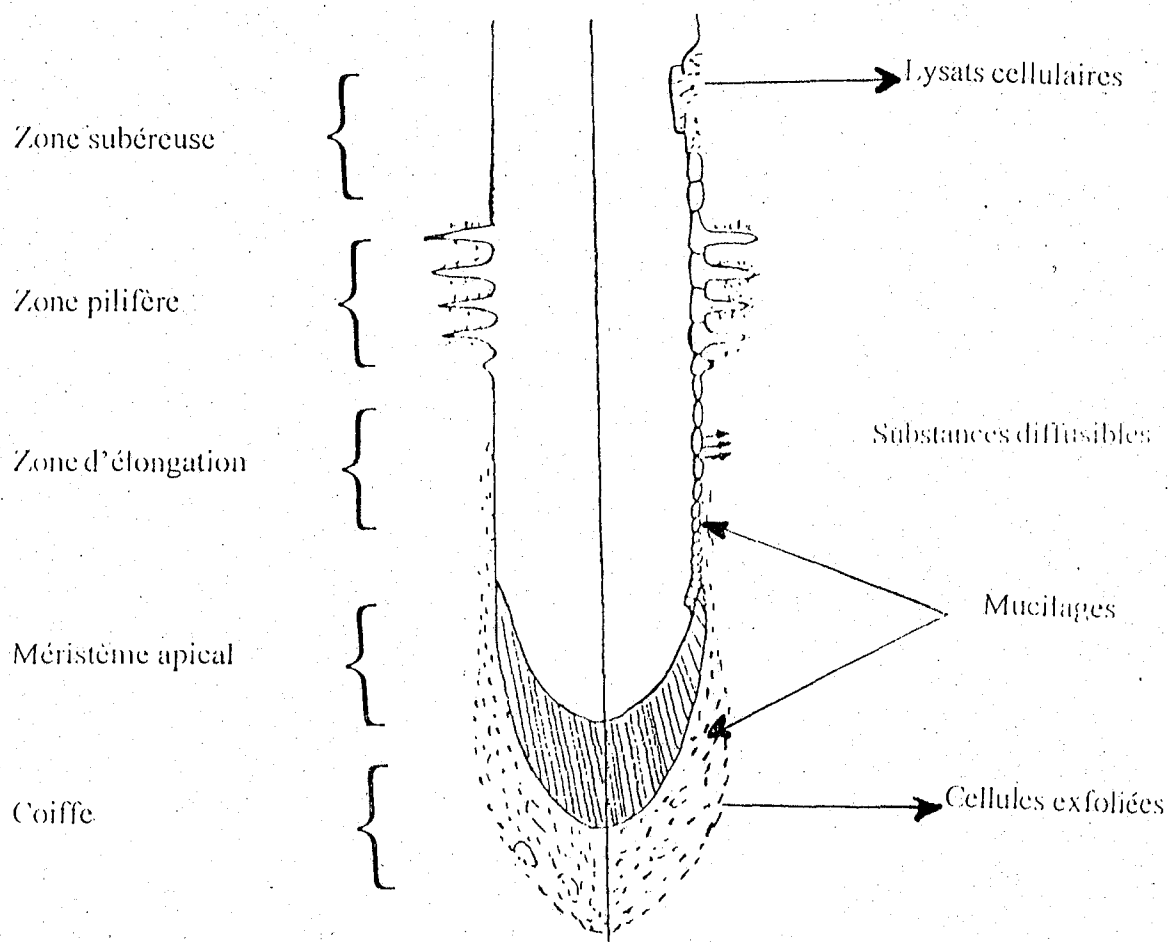


Figure 6. Sites d'exsudation racinaire d'après Chaboud et Rougier (1981)

2. Composition chimique des exsudats

2.1 Composés du métabolisme primaire

La composition chimique de ces exsudats, largement influencée par les conditions environnementales, comprend surtout des glucides et des acides organiques très majoritaires, accompagnés d'acides aminés, de nucléotides (Smith 1976 ; Mench et *al.*, 1988).

2.2 Composés du métabolisme secondaire

Nous avons les composés phénoliques parmi eux les acides phénols (Rice, 1979; Bokhari et *al.*, 1979; Tang et young, 1982). Perez et Ormeño-Nuñez, (1991) ont pu identifier scopoletine, coumarine, p-hydroxybenzoïque et acide vanillique dans les exsudats racinaires du blé par CLHP.

L'exsudation d'un certain nombre d'isoflavones par les racines de *Trifolium pratense* ont été mis en évidence (ononine, génisteine, daidzéine, formononétine), (Tamura et *al.*, 1969).

Le sol de la rhisosphère de deux espèces *Bouteloua gracilis* et *Artemisia frigida* contient plus de polyphénols que le sol non rhisosphérique et des traces de terpènes ont été trouvées dans le sol associé à *A. frigida* (Bokhari et *al.*, 1979).

Burdun et *al.*, (1974) signale l'exsudation de phytoalexines par les racines de plantes cultivées en conditions non stériles, pour *Pisum sativum* le composé est la pisatine et pour *Phaseolus vulgaris* les composés identifiés sont la phaséolline, phaséollidine, la phaséollinisoflavane et la kivetone. Trois flavones dans les racines de lentille ont été identifiées (4'-dihydroxy-flavone, 3', 4', 7-trihydroxy-flavone et la 4', 7-dihydroxy-flavone et deux isoflavonoïdes ont également été caractérisés pour le soja : le coumestrol et la daidzeine (D'Arcy-Lameta, 1986).

2.3 Facteurs influençant l'exsudation racinaire

Tous les facteurs d'origine extérieure influencent l'exsudation racinaire qu'ils soient physiques (force mécanique, contrainte hydrique, concentration ionnique, pH), ou biologiques (micro-organismes saprophytes, symbiotiques ou pathogènes). Enfin, l'exsudation est d'autant plus grande que les racines sont

endommagées : tous les facteurs précités peuvent créer des blessures ou les augmenter.

D. Relation *Rhizobium* - légumineuse

1. Généralités sur la symbiose *Rhizobium*-légumineuse

Les *Rhizobium* se multiplient dans la rhizosphère au contact de la graine et à la surface de la racine des légumineuses. Le processus d'infection débute par une augmentation du nombre de bactéries au niveau de la racine, il s'ensuit que le poil se recourbe d'une façon caractéristique et comprime la bactérie engagée dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi (1 sur figure 7). Il se forme alors dans le poil absorbant, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectueux (2 sur figure 7). Les *Rhizobium* ssp. pénètrent ensuite dans la plante par le biais d'un cordon d'infection. Ce cordon permet aux microorganismes de gagner les cellules corticales qui formeront la future nodosité (2 et 3 sur figure 7). Les autres étapes de l'infection sont:

- la croissance du cordon d'infection contenant les cellules de *Rhizobium* spp. vers le péricycle de la racine.
- la ramification du cordon d'infection afin d'infecter un plus grand nombre de cellules du primodium.
- la libération des bactéries du cordon d'infection dans le cytoplasme des cellules végétales.
- Les bactéries se multiplient dans le cordon d'infection et sont relarguées dans les cellules de la plante où elles se différencient en bactéroïdes fixateurs d'azote (4 sur figure 7).

Le nodule achevé peut prendre 2 formes: soit cylindrique avec un méristème apical, une croissance indéterminée et un système de faisceaux conducteurs ramifiés (*Vicia*, *Trifolium*), soit sphérique avec une croissance définie et des éléments conducteurs en forme d'arc ayant un débouché commun dans le système conducteur de la racine (*Phaseolus*, *Glycine*).

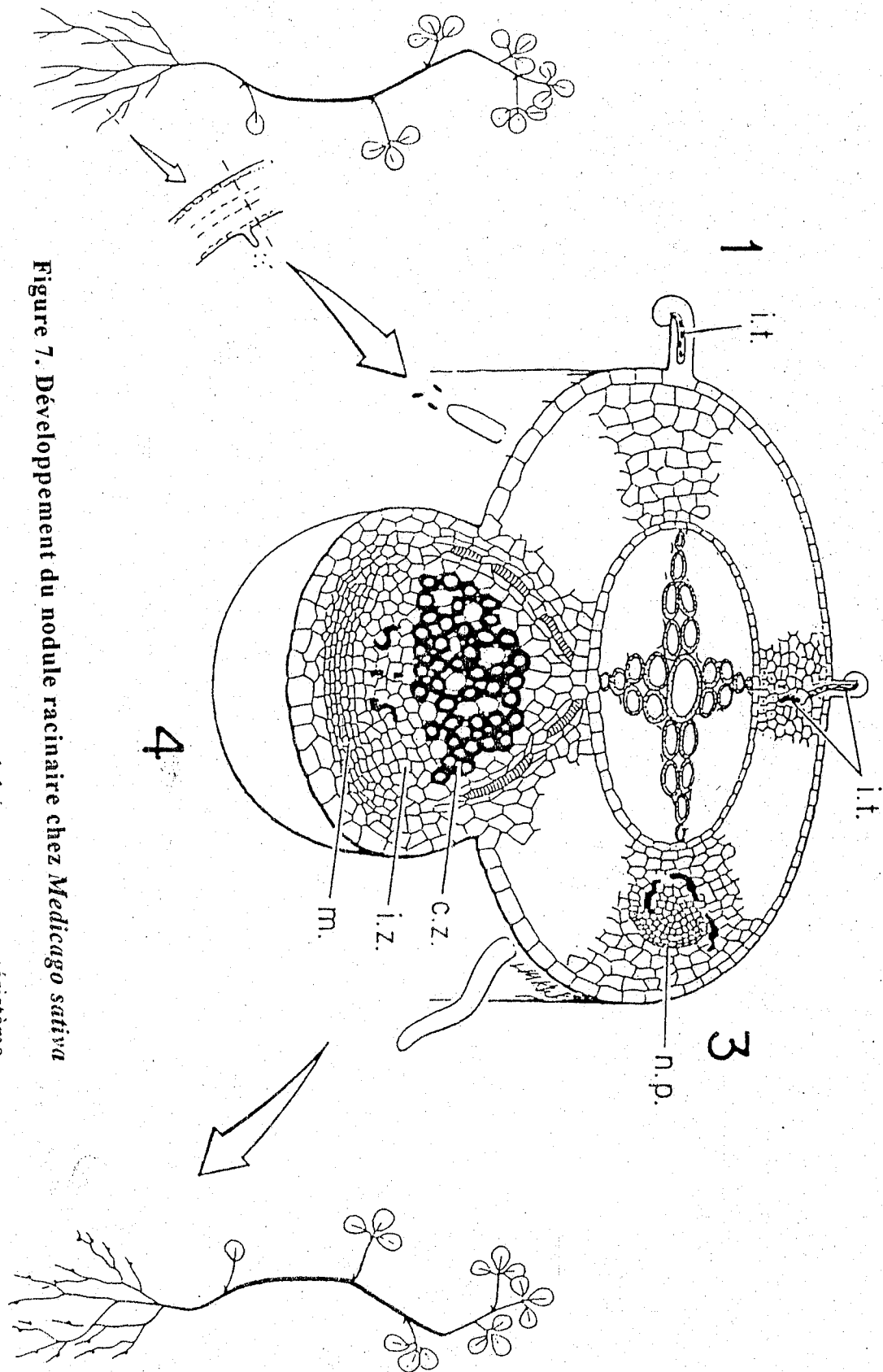


Figure 7. Développement du nodule racinaire chez *Medicago sativa*

i.t : cordan d'infection. n.p : primordium nodulaire m : méristème
 i.z : zone d'invasion c.z : zone centrale

(d'après Hirsch et al., 1992)

2. Gènes impliqués dans le processus de la nodulation

L'étude des gènes de nodulation chez un grand nombre de souches et d'espèces a montré que dans toutes les souches de *Rhizobium* testées jusqu'à présent, les gènes *nod* étaient localisés sur des plasmides (appelés pSym, pour plasmide symbiotique) à côté des gènes de fixation d'azote (les gènes *nif*). La taille de ces plasmides varie de 50 à 600 Kb, chez *R. leguminosarum* bv. *trifolii* à 1200 Kb et chez *R. meliloti* à 1500 Kb (Harrison et al.; 1988, Burkhardt et al.; 1987). Dans deux genres, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, les gènes *nod* sont localisés sur le chromosome. Ces gènes sont organisés en plusieurs opérons qui sont régulés de façon coordonnée. L'organisation de ces gènes est présentée dans la figure 8.

On les classe en deux types: les gènes *nod* communs et les gènes *nod* de spécificité d'hôte.

2.1 Les gènes *nod* communs

Les gènes *nod* communs comprennent les gènes *nod* ABC et IJ. Les gènes *nod* ABC ont été trouvés chez tous les *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (Martinez et al., 1990). Ces gènes sont organisés en opéron: un seul pour la plupart des *Rhizobium*, et deux chez *Rhizobium elti* (*nod* A et *nod* BC), (Vasquez, 1991).

2.2 Les gènes de spécificité d'hôte

Les gènes *nod* sont dits de "spécificité d'hôte" lorsqu'une mutation dans l'un de ces gènes ne peut pas être complémentaire par l'ADN d'une autre espèce de *Rhizobium*, et lorsque le spectre d'hôte de la bactérie est modifiée par la mutation. Les *Rhizobium* peuvent acquérir la capacité d'infecter et de noduler d'autres espèces de légumineuses.

Chez *Rhizobium trifolii*, les mutants *nod* H acquièrent la capacité d'infecter et de noduler la vesce (Faucher et al., 1989). Chez *Rhizobium trifolii*, les mutants *nod* FE ne nodulent pas leur plante habituelle, le trèfle blanc ou rouge, mais peuvent noduler le pois. Le *nod* X confère une diversité intra-spécifique à l'espèce

R. leguminosarum : il n'est présent que chez certaines souches appartenant à l'espèce *R. leguminosarum* biovar *viciae* et leur confère la capacité de noduler une lignée particulière de pois: le pois Afghanistan (Firmin et al., 1993).

2.3 Nature et propriétés des gènes *nod* chez les *Rhizobium* spp

En réponse à des signaux chimiques émis par la plante, les gènes *nod* communs et gènes *nod* de spécificité d'hôte sont transcrits. Les produits de ces gènes participent à la synthèse de signaux émis par la bactérie, les facteurs Nod. Nod Rm IV (S), appelé initialement Nod Rm-1, est la molécule produite par *R. meliloti*. Ce fut le premier facteur Nod dont la structure chimique a été déterminée (Truchet et al., 1991), (figure 9).

Ce sont des lipo-chito oligosacharrides dont la structure de base codée par les gènes *nod* ABC, est une chaîne de 4 à 5 oligomères de chitine (N-acétyl-glucosamine) liée à un acide gras à son extrémité non réductrice. Les gènes *nod* ABC sont essentiels dans la synthèse du squelette de base du composé tandis que les gènes de spécificité d'hôte, *nod* H et *nod* P et Q, interviennent dans la sulfatation de la molécule (Roche et al., 1991). Ce sulfate est la base de la spécificité entre *R. meliloti* et la luzerne (Lerouge et al., 1990) (tableau 4).

Nod Rm-1 est obtenu à partir de surnageant de cultures induites par la lutéoline. Il est impliqué dans la déformation et la courbure des poils absorbants, mais aussi dans l'activation des divisions des cellules corticales et provoque même la formation de véritables nodosités en absence totale de la bactérie. Les concentrations d'action de Nod Rm-1 sont la gamme des nanomoles aux micromoles par litre (Truchet et al., 1991).

2.4 Régulation de l'expression des gènes de nodulation

Dans le sol, en absence de la plante hôte, les gènes *nod* communs et les gènes *nod* de spécificité d'hôte ne sont pas exprimés. L'activation des gènes de nodulation requière la présence de molécules signal exsudées par la graine et la racine, et le produit du seul gène exprimé constitutivement, le gène *nod* D (Mulligan et al., 1985). Les gènes *nod* D sont des gènes de régulation trouvés dans

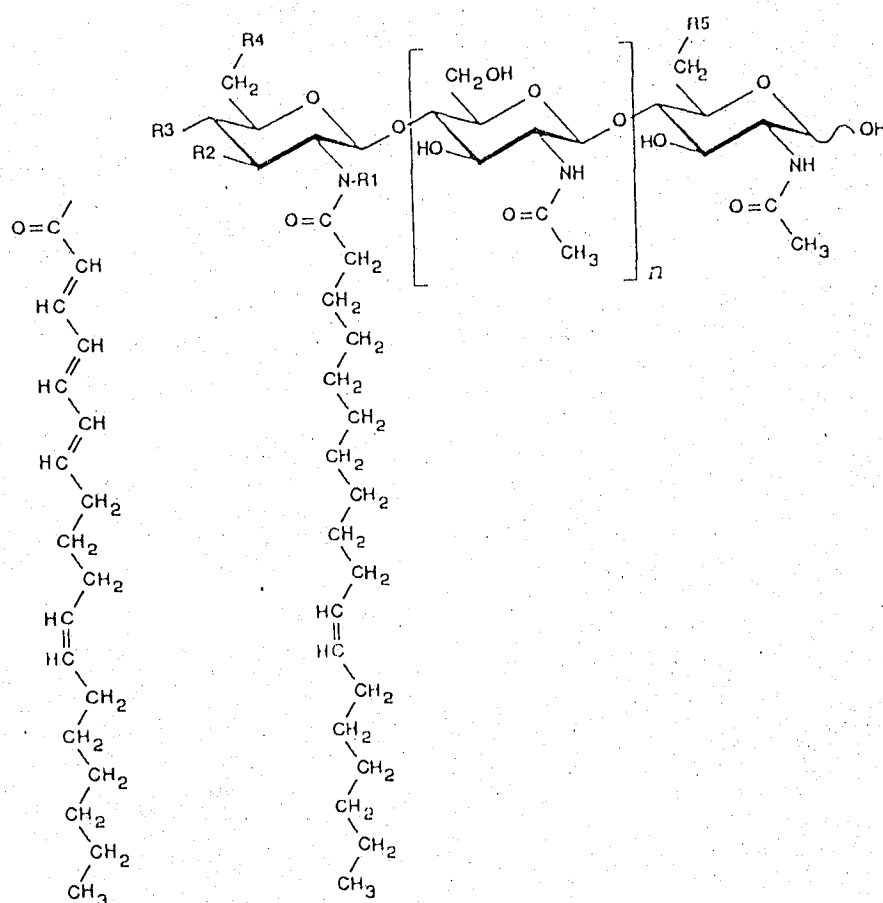


Figure 9. Structure des lipo- oligosaccharides par les *Rhizobium*

La longueur du squelette de l'oligosaccharide varie entre 3 et 5 sucres.

La nature des substituants R1 à R5 est indiquée dans le tableau 4 (Spaink, 1993)

Producing strain	specific lipid	other substituants
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	C18:4	R4, <i>O</i> -acetyl
<i>R. meliloti</i> 2011	C16:2	R4(+/-), <i>O</i> -acethyl, R5,suphate
<i>R. meliloti</i> A K41	C16:2 or C16:3	R5, sulfate
<i>B. japonicum</i> USDA110		R5, 2- <i>O</i> -methylfucose
<i>B. japonicum</i> USDA135		R4(+/-), <i>O</i> -acetyl; R5, 2- <i>O</i> -methylfucose
<i>Rhizobium</i> NGR234		R1, <i>N</i> -methyl, R2 and R3(+/-), <i>O</i> -carbamoyl R5, 2- <i>O</i> -methylfucose or 2- <i>O</i> -methyl-3- <i>O</i> -sulphofucose or 2- <i>O</i> -methyl-4- <i>O</i> -acetylfucose
<i>A. caulinudans</i>		R1, <i>N</i> -methyl, R4, <i>O</i> -carbamoyl, R5, D-arabinose

Tableau 4. Comparaison des structures des lipo-oligosaccharides produits par les *Rhizobium*

(+/-) indique que le groupement n'est pas toujours présents, si aucune indication R1 = hydrogène et R2, R3, R4, R5 = hydroxyl.

toutes les espèces de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*. Des mutants ne contenant pas de gènes *nod* D fonctionnels ne peuvent noduler (Kondorosi, 1992). La partie C terminale de Nod D détermine la spécificité d'hôte puisqu'elle se fixerait aux molécules inductrices de la plante.

2.5 Nature des molécules exsudées par les légumineuses qui contrôlent l'expression de gènes *nod*

Les progrès dans la compréhension de la régulation des gènes *nod* ont été facilités par l'utilisation des fusions de gènes. Ainsi chez *R. meliloti*, le fragment d'ADN contenant le gène *nod* D et l'opéron *nod* ABC a été cloné dans un plasmide fonctionnel chez *R. meliloti* (pRmSL26). Une fusion a été réalisée entre le gène *nod* C et le gène responsable de la synthèse de β -galactosidase (*lac* Z) (figure 10). Ce nouveau plasmide appelé pRmM57, introduit dans *R. meliloti* a été utilisé pour étudier et identifier les inducteurs de gènes de nodulation. Après induction de ces gènes, une activité β -galactosidase peut être détectée (Mulligan et al., 1985).

Il a ainsi clairement été démontré que les molécules responsables de l'induction de gènes *nod* sont des flavonoïdes et des bétaines (Redmont et al., 1986; Phillips et al., 1995), (figure 11). La famille des légumineuses est particulièrement riche en flavonoïdes et produit environ 28% de flavonoïdes connus. Leur rôle est important dans la floraison et la coloration des fruits (Harbonne et al., 1975).

2.5.1 Caractéristiques structurales des composés inducteurs des gènes *nod*

La recherche de composés activateurs ou inhibiteurs de gènes *nod* dans les exsudats racinaires de différentes légumineuses a été facilitée par l'emploi de souches de *Rhizobium* spp modifiées génétiquement. Elles comportent en effet une fusion de gènes entre les promoteurs de différents opérons *nod* et le gène de structure de l'enzyme β -galactosidase (*lac* Z) de *E. coli*. La détection et la quantification de l'expression de gènes *nod* en fonction de différents inducteurs sont réalisées par dosage de l'activité de l'enzyme.

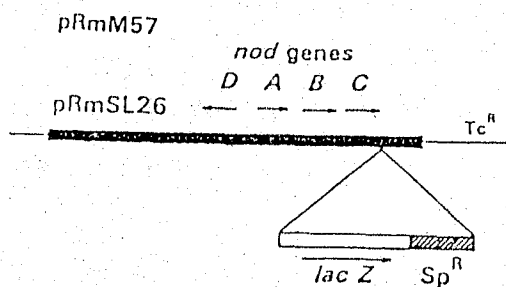


Figure 10. Fusion de gène qui a permis d'identifier les flavonoïdes inducteurs des gènes *nod* chez *Rhizobium*

Marqueurs génétiques : Tc^R : résistance à la tétracycline;
 Sp^R : résistance à la spectinomycine
 (d'après Mulligan et al., 1985)

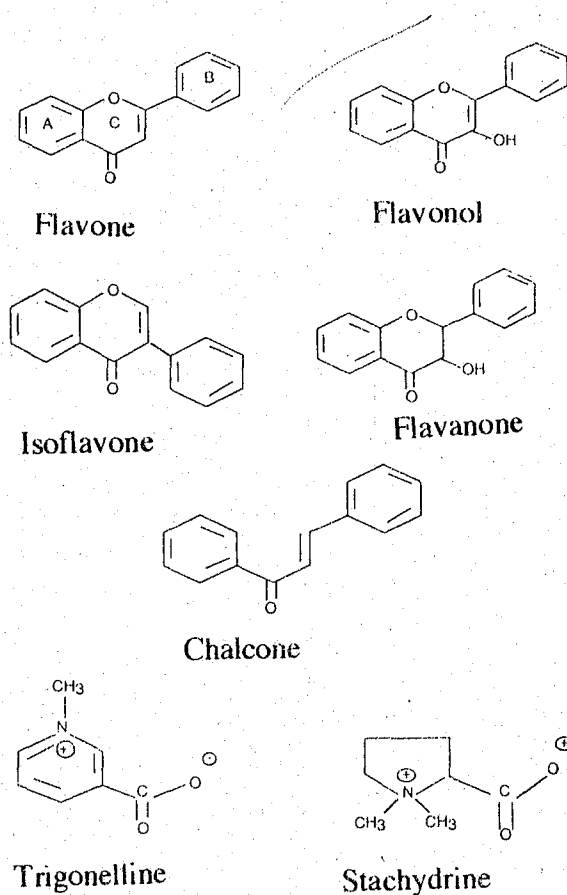


Figure 11. Flavonoïdes (Redmont et al., 1986) et bétaines (Phillips et al., 1995), inducteurs des gènes *nod* des *Rhizobium*

Les expérimentations effectuées avec l'aide de ces souches transformées ont abouti à l'identification de différentes molécules ayant des activités stimulatrices ou inhibitrices de gènes *nod*. Le tableau 5 présente l'action de quelques molécules ayant des activités stimulatrices ou inhibitrices de gènes *nod ABC-lacZ* chez trois espèces de *Rhizobium* illustrant les degrés divers de spécificité entre un inducteur et un microorganisme (Kosslak et al., 1987; Peters et Long, 1988).

On remarque sur ce tableau que les gènes de deux souches de *Bradyrhizobium japonicum* sont activés principalement par des isoflavones. *R. meliloti* est activé par la lutéoline et apigénine et très faiblement par deux flavanones (ériodictyol et naringénine). Les propriétés inhibitrices de certains composés ont été étudiées chez *R. meliloti* (Peters et Long, 1988). L'induction de la fusion *nodABC-lacZ* a été mesurée après un contact avec un mélange équimolaire de lutéoline (inducteur fort) et du composé à tester. Trois types d'effets de ces molécules peuvent être observés:

- aucun effet activateur ou inhibiteur: daidzéine, génistéine, flavone, quercétine.
- effet inhibiteur compétitif avec la lutéoline: chryisine, kaempférol, umbelliférone.
- activateur faible pouvant inhiber l'activation par la lutéoline :naringénine.

3. Relation *Rhizobium*- légumineuse

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse, qui conduit à la formation des nodosités sur les racines des légumineuses, est gouvernée par un échange de signaux moléculaires très spécifiques, entre les deux partenaires. Les plantes initient le dialogue en libérant dans le sol un mélange divers de molécules organiques. Ces molécules (les flavonoides) sont des composés importants de la rhisosphère de la graine et de la jeune racine. Ils contrôlent la transcription des gènes responsables de la réponse symbiotique de la bactérie (Redmont et al., 1986).

COMPOSES	ACTIVITE β -GALACTOSIDASE				
	<i>B. japonicum</i>		<i>R. fredii</i>	<i>R. meliloti</i>	
	USDA110	USDA123	USDA191	1021	
				Activation	Inhibition (1:1Lutéoline)
SRE I	+++	+++	+++	ND	ND
Isoflavones					
Daidzéine	+++	+++	+++	0	0
Génisteine	+++	+++	+++	0	0
7-Hydroxy	+++	+++	+++	ND	ND
5,7-Dihydroxy-	+++	+++	+++	ND	ND
Baptigénine	0	0	ND	ND	ND
3',4',7-Trihydroxy-	0	0	ND	ND	ND
BiochanineA	++	0	+++	ND	ND
Formonétine	+	0	+++	ND	ND
Prunitine	+	+	++	ND	ND
Flavones					
Flavone	ND	ND	ND	0	0
4',7-Dihydroxy	++	++	+++	ND	ND
Apigénine	+	++	+++	++	0
Lutéoline	0	0	+++	+++	-
Chrysin	0	0	+++	0	-
Flavanones/ Flavonols					
Flavanone	ND	ND	ND	0	0
Eriodictyol	ND	ND	ND	+	0
Naringénine	0	0	+++	+	-
Hespéritine	ND	ND	ND	0	0
Quercétine	0	0	+	0	0
Kampférol	+	+	+	0	-
Myrecétine	ND	ND	ND	0	0
Morine	ND	ND	ND	0	-
Fisétine	ND	ND	ND	0	0
Flavonol	ND	ND	ND	0	0
Coumarines					
Coumarine	ND	ND	ND	0	0
Coumestrol	+	0	+++	ND	ND
Umbelliférone	0	0	+	0	-

Tableau 5. Expression de la fusion de gènes nod DABC-Lac Z en réponse à divers composés inducteurs.

SRE I : Extraits racinaires de Soja.

ND : Non déterminé

+: activateur faible; ++ : activateur modéré; +++ : activateur fort.

- : inhibiteur

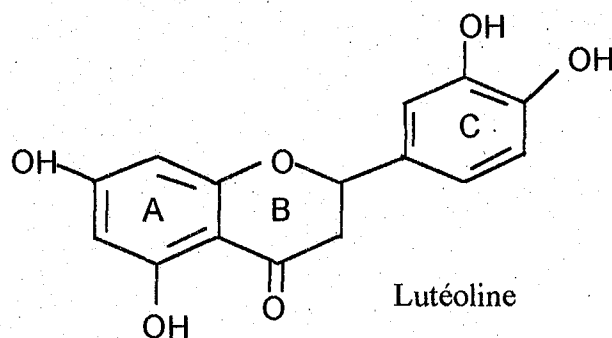
0 : neutre (ou propriétés inhibitrices non étudiées)

(d'après Kossalak et al; 1987; Peters et Long, 1988)

3.1 Les exemples les plus étudiées

Les flavonoïdes inducteurs, exsudés par la graine présentent un intérêt particulier car ce sont les premiers inducteurs des gènes bactériens (ils agissent avant ceux exsudés par la jeune racine), et sont donc en grande partie responsables de la spécificité hôte - bactérie. La nature des inducteurs connus comme activateurs des gènes *nod* est résumée dans le (tableau 6).

La lutéoline (3',4',5,7 tétrahydroxy-flavone) a été le premier inducteur isolé dans les exsudats de graines de *Medicago sativa*. C'est quantitativement l'inducteur le plus important de la graine (Peters et al., 1986). Sa configuration est la suivante:



Un autre inducteur, dérivé de la lutéoline a été décrit, le chrysoeriol (3'-méthoxy-lutéoline), qui est un inducteur beaucoup plus fort que la lutéoline (il agit à des concentrations 4 fois moins importantes que la lutéoline), (Hartwig et al., 1990).

Une grande partie de la lutéoline est en fait présente sous forme de lutéoline-7-O- glucoside, et sous forme minoritaire de 5-méthoxy-lutéoline et de 3',5-diméthoxy-lutéoline. Ces composés méthylés et glycosylés sont présents uniquement dans la graine et représenteraient une forme de stockage dans la graine. Ces formes dérivées ne sont pas activatrices des gènes *nod* (Redmont et al., 1986; Hartwig et al., 1991).

Plantes	Composés inducteurs des gènes <i>nod</i>	Références
<i>Medicago sativa</i> (Luzerne) Exsudats de graines	Lutéoline (3',4',5,7-tétrahydroxyflavone) Chrysoeriol (3'-méthoxylutéoline) Stachydrine Trigonelline 3'-méthoxy-4',5,7-trihydroxy-flavone	Hartwig 1990 Phillips 1992 Peters 1986 Peters 1986 Hartwig 1990 Phillips 1995 Hartwig 1991 Peters 1986
Exsudats de racines	4,4'-dihydroxy-2'-methoxy-chalcone 4',7-dihydroxy-flavone 4',7-dihydroxy-flavanone Formononetin (-7-O-malonylglycoside)	Maxwell 1990 Maxwell 1990 Maxwell 1990 Dakora 1993
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Haricot) Exsudats de graines	Delphinidine Malvidine + Myrecétine + Quercétine Kaempferol	Hungria 1991a Hungria 1991a Hungria 1991a Hungria 1991a Hungria 1991a
Exsudats de racines	Eriodictyol Naringénine Génisteine-7-O-glycoside	Hungria 1991b Hungria 1991b Hungria 1991b
<i>Sesbania rostrata</i> Exsudats de racines	4',7-dihydroxy-flavanone	Messens 1991
<i>Pisum sativum</i> (Pois) Exsudats de graines	Apigenine-7-O-glucoside Eriodyctyol Hesperétine	Firmin 1986 Innes 1985 Innes 1985

Tableau 6. Composés inducteurs des gènes *nod* isolés des légumineuses

Plantes	Composés inducteurs des gènes <i>nod</i>	Références
<i>Glycine max</i> (Soja) Exsudats racinaires	Genisteine (4',5,7-trihydroxy-isoflavone) Daidzeine (4',7-dihydroxy-isoflavone)	Kosslak 1987 Kosslak 1987
<i>Trifolium</i> (trèfle) Exsudats racinaires	4'-7-dihydroxyflavone 4',dihydroxy-3'-methoxy-flavone 4'-hydroxy-7-methoxy-flavone Coumestrol	Redmont 1986 Redmont 1986 Redmont 1986 D'arcy Lameta 1986 Kosslak 1987
<i>Vicia sativa</i> (Vesce) Exsudats de racines	3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxy-flavanone 7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-flavanone 4',7-dihydroxy-isoflavanone 4',7-dihydroxy-3'-methoxy-chalcone 4',5,7-trihydroxy-isoflavone 4',5,7-trihydro-3'-méthoxy-flavanone 4',4-dihydroxy-2'-méthoxy-chalcone 3',5,7-trihydroxy-4'-methoxy-flavanone 2',4',4-trihydroxy-chalcone	Zaat 1989 Zaat 1989 Recourt 1991 Recourt 1991 Recourt 1991 Recourt 1991 Recourt 1991 Recourt 1991 Recourt 1991

Tableau 6 (suite). Composés inducteurs des gènes *nod* isolés des légumineuses

Les exsudats racinaires de la luzerne contiennent trois autres inducteurs de gènes *nod* : le 4,4'-dihydroxy-2'-méthoxy-chalcone, 4',7dihydroxy-flavone et le 4',7 -dihydroxy-flavanone. (Maxwell et al., 1990).

La glycelline I (phytoalexine) exsudée par les jeunes racines de *Glycine max* induit *Bradyrhizobium japonicum* (Schmidt et al., 1992). Isoliquiritigine (2',4',4-trihydroxy-chalcone) est identifiée comme un inducteur fort dans les exsudats racinaires de *Glycine max* (Kape et al., 1992). Les gènes *nod* de *Bradyrhizobium* ont été induits par deux composés majeurs la daidzeine et la génisteine extraits dans les racines de Soja. (Kosslak et al., 1987). Ces mêmes composés agissent comme antagonistes chez le gène *nod* de *R. leguminosarum*. A une concentration supérieure à 5 µM, les deux composés inhibent la croissance des cellules.

3.2 Signaux symbiotiques dans le genre *Vicia*

L'analyse par C.C.M des exsudats racinaires de *Vicia sativa* a révélé 2 classes de flavonoïdes qui sont inducteurs: flavones et flavanones. L'induction du promoteur *nodA* par les exsudats racinaires est similaire à celui de la naringénine (Zaat et al., 1987).

Zaat et al., (1989) ont mis en évidence 7 flavanones dans les exsudats racinaires de *Vicia sativa* qui sont inducteurs de gènes *nodA* de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Deux de ces flavanones ont été identifiées, le premier est le 3,5,7,3' tétrahydroxy-4' méthoxy-flavanone et le deuxième est le 7,3'- dihydroxy-4'-méthoxy-flavanone (Zaat et al., 1989).

Chez *Vicia sativa* sub. *nigra* l'inoculation de *R. leguminosarum* bv *viciae* sur les racines se traduit par la synthèse de 8 nouveaux flavonoïdes (6 flavanones et 2 chalcones) voir tableau 6, ce pool de composés flavoniques ne contient que des molécules inductrices (Recourt et al., 1991).

3.3 *Rhizobium -Vicia faba*

A notre connaissance, aucun travail n'a été réalisé concernant la relation *Rhizobium-Vicia faba*. Pour la première fois le 7, 3', 4' trihydroxy-flavone, 7, 4'- dihydroxy-flavone, quercétine et le kaempférol ont été identifiés dans les exsudats de graines de *Vicia faba* L. En effet, ces substances peuvent jouer un rôle essentiel dans l'activation ou l'inhibition du gènes *nod* de *Rhizobium* (Tomas - Lorente et al., 1990).

Weyrone est l'une des phytoalexines prédominante produite par *Vicia faba* à une concentration de 100 μ M; elle est dégradée par *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (Görge et Werner, 1991).

4. Propriétés biologiques décrites pour les composés flavoniques

Les concentrations efficaces pour obtenir un effet activateur des gènes de la nodulation se situent entre 10^{-9} à 10^{-5} M. Le temps nécessaire pour pouvoir détecter l'expression des gènes *nod* est très court. Chez *R. l.* bv. *trifolii*, la 7,4'-

dihydroxy-flavone stimule la transcription des gènes *nod* 20 minutes seulement après le contact avec les cellules (Djordjevic et al., 1987).

Pour *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* cinq minutes suffisent pour que l'induction par la naringénine soit détectable (Zaat et al., 1987). Un temps minimum de quatre heures a été donné dans le cas de l'effet de la daidzéine ou de la génistéine sur *Bradyrhizobium japonicum* (Kosslak et al., 1987).

Les composés flavoniques peuvent également posséder des propriétés de toxicité envers la croissance de micro-organismes. Des effets toxiques ont été signalés pour des concentrations de 10^{-5} à 10^{-4} M dans le milieu de culture (d'Arcy-Lameta, 1984), les résultats obtenus de la daidzéine et le coumestrol à différentes concentrations sur la croissance de diverses espèces de bactéries sont présentés dans le (tableau 7).

Certains composés flavoniques peuvent également agir comme chimio-attractants, à très faibles concentrations et avec une grande spécificité vis à vis de l'espèce bactérienne. Cela a été montré par exemple pour la lutéoline à 10^{-8} M à l'égard de *R. meliloti*. Le déplacement des cellules vers la source de lutéoline peut être spécifiquement inhibé par la naringénine (Caetano-Anollès et al., 1988).

Certains auteurs suggèrent que *R. meliloti* migrerait en direction de la graine qui créerait ainsi une zone écochimique favorable à la nodulation (Phillips, 1992). Aucun effet chimioattractant n'est détecté avec l'isoliquiritigine mais l'acide cafeique agit à une concentration de 10 mM, comme un chimioattractant.

Apigénine et lutéoline sont des chimioattractants efficaces envers *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* mais ils jouent le rôle d'inducteurs chez *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viceae* et *R. trifolii* (Peters et al., 1986; Firmin et al., 1986; Zaat et al., 1987).

Des composés inhibiteurs des gènes *nod* ont été retrouvés dans les exsudats racinaires de légumineuses. La plante peut donc réguler sa nodulation par le biais de la synthèse et de l'exsudation de composés activateurs ou inhibiteurs de l'activation des gènes *nod*. Ces molécules inhibitrices qui contrôlent étroitement l'expression des gènes *nod* sont appelées molécules « nod-off », par opposition avec les molécules « nod-on », activatrices (tableau 8).

SOJA							
	Graines Extrait total 70mg/ml	Racines + Bactéries	Racines				
			Coumestrol			Daidzeine	
			10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M
Bactéries Gram -							
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 311b138	0	+	+30%	+30%	+	+20%	0
<i>Rhizobium fredii</i> W505	0	ND	0	0	ND	0	0
<i>Rhizobium leguminosarum</i> (bv. <i>viciae</i>)	ND	ND	+15%	0	ND	0	0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> RiI	ND	ND	0	-50%	-25%	0	0
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	ND	ND	0	0	ND	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	-20%	ND	ND	-20%	ND
Bactéries Gram +							
<i>Micrococcus luteus</i>	ND	ND	ND	0	ND	0	ND
Levures							
<i>Cryptococcus albidus</i>	ND	ND	ND	-20%	ND	ND	0
<i>Cryptococcus laurentii</i>	ND	ND	ND	0	ND	ND	0
<i>Cryptococcus luteolis</i>	ND	ND	ND	-10%	ND	ND	0

Tableau 7. Action des exsudats bruts de graines et de racines de Soja ainsi que de molécules isolées de ces organes sur quelques microorganismes du sol.

(+X%) : Activités stimulatrices

(-X%) : Activités inhibitrices

0 : Neutre

ND : Non déterminés

(D'après d'Arcy-Lameta, 1984)

Espèces	Activateurs	Inibiteurs
<i>R. trifolii</i>	Flavones avec OH en position 7 comme la 7,4' diOH flavone	Coumarines (l'umbelliférone); Isoflavones (formononetine)
<i>R. leguminosarum</i>	Flavones (apigénine) Flavanone (Hesperitine)	Isoflavone (daidzeine, génisteine); Flavonols (Kaempferol) Acetophenones (acetovanillone, acetosyringone)
<i>B. japonicum</i>	Isoflavone (daidzeine, génisteine) Coumarines (coumestrol) Chalcones (isoliquiritigénine)	Flavines, Riboflavines, Flavone (7-hydroxy 5-méthyl flavone)
<i>R. meliloti</i>	Flavones (lutéoline, apigénine)	Coumarines (umbelliférone) Flavonols (morin, quercétine)

Tableau 8. Composés activateurs et inhibiteurs des gènes *nod*.

(d'après Mellor et al., 1995)

Il est intéressant de noter que certaines molécules agissant comme inhibiteur dans un système symbiotique peuvent agir comme activateur dans un autre système (ex: la daidzeine). Il s'avère qu'à 1.0 μM , le kaempférol inhibe effectivement l'expression de gène *nod* en présence de 0.25 μM d'inducteur la naringénine (Recourt et al., 1992).

Dans l'environnement proche de la racine le rapport des concentrations entre les substances stimulatrices et les substances inhibitrices peut modifier l'intensité de la nodulation. Tous les facteurs environnementaux (pH, Ca^{++} , autres stress physico-chimiques) faisant varier ce rapport peuvent donc influencer positivement ou négativement sur la nodulation de la plante (Richardson et al., 1988).

Un pH acide dans les sols, est un facteur majeur limitant la nodulation et la fixation d'azote chez *Phaseolus vulgaris* et affecte aussi plusieurs étapes de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse (Wolff et al., 1991). Les mêmes résultats ont

été retrouvés dans le cas d'une déficience en Ca^{++} , Al et Mn (Keyser et Munns, 1979a; Keyser et Munns, 1979b ; Bushby, 1982; Graham *et al.*, 1982; Kvien et Ham, 1985; Vargas et Graham, 1989). Aucune corrélation n'est trouvée entre les phytoalexines et la formation du nodule (Wolff *et al.*, 1991). En générale, les phytoalexines jouent un rôle important contre le stress et certaines infections par les pathogènes (Recourt *et al.*, 1991). La biosynthèse et la libération de la méthoxy-chalcone répond au stress des jeunes plantules de *Vicia sativa* inoculées par *R. leguminosarum* bv *viceae*.

Pankhurst et Jones (1979) ; Rao et Cooper (1988) ont constaté que les tannins sont impliqués dans la relation hôte-microsymbiote, ils sont aussi connus dans l'inhibition de la nodulation chez le haricot et autres légumes (Blum et Rice, 1969; Muthukumar *et al.*, 1985). Une élévation de tannins dans les racines de *Phaseolus vulgaris* a provoqué la réduction du nombre de nodule. Ces tannins ont été toxiques pour les *Rhizobium* (Wolff *et al.*, 1993).

5. Caractéristiques structurales des composés inducteurs des gènes de la nodulation de *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhizobium leguminosarum*

5.1 *Bradyrhizobium japonicum*

A partir du tableau 5, certaines structures communes aux inducteurs de gènes *nod* de *B. japonicum* peuvent être définies, on constate que:

- le squelette isoflavonique comportant un hydroxyle en position 7 est suffisant pour activer les gènes *nod*.
- l'induction par une flavone nécessite l'hydroxylation des cycles A et B. Par exemple, la 4',7 dihydroxy-flavone et la 4',5,7 trihydroxy-flavone (apigénine) sont des activateurs alors que la 5,7 dihydroxy-flavone (chrysin) n'est pas activatrice.
- la méthylation du groupement hydroxyl (O-CH₃) en position 7 (ex: la prunétine) ou en position 4' (ex: la formonétine) diminue significativement l'expression des gènes *nod*.

- l'hydroxylation des carbones en position 3' ou 5' du noyau B conduit à une perte de l'activation par les isoflavones (ex: la baptigénine) et les flavones (ex: la lutéoline), (Kosslak *et al.*, 1987; Peters et Long., 1988).

5.2 *Rhizobium leguminosarum*

- l'hydroxylation des carbones en 3 conduit à une perte de l'activation par les flavonoides du gène *nod* de *R. leguminosarum* bv *viciae*, *R. trifolii* et *R. meliloti*.
- tous les flavonols testés sont inactives.
- l'hydroxylation du carbone en 3 par les flavanones ne rend pas les molécules inactives puisque les meilleurs inducteurs portant le gène *nod D* chez *R. leguminosarum* bv *viciae* et bv *trifolii* sont des dihydroflavonols.
- l'hydroxylation du carbone 7 active le gène *nod* (Zaat *et al.*, 1989).

6. Pénétration des flavonoides dans les cellules

L'accumulation de naringénine dans la membrane cytoplasmique de *R. leguminosarum* bv *viciae* sans conversion métabolique apparente a été observée par Recourt *et al.* (1989). La liaison de la naringénine est hautement réversible et des expériences in-vitro montrent que la naringénine a une affinité pH-dépendante pour la membrane cytoplasmique.

Pour *R. meliloti*, les travaux de Hubac *et al.* (1993) montrent que l'absorption de la lutéoline par *R. meliloti* est spécifique car d'autres espèces de *Rhizobium*, de *Pseudomonas* et d'*Agrobacterium*, n'incorporent pas cette molécule au même taux. La première partie de l'absorption est un équilibre rapide et réversible entre la lutéoline du milieu de culture et la surface cellulaire, comme chez *R. leguminosarum* bv *viciae*. La deuxième partie est une accumulation lente dans les membranes cellulaires et en particulier dans les membranes externes.

6.1 Dégradation des flavonoides par les *Rhizobium*

Rhizobium loti dégrade la quercétine en produisant de l'acide protocatéchique et du phloroglucinol. L'acide protocatéchique sert comme unique

source de carbone chez quelques *Rhizobium* (Rao et al., 1991), ainsi que la catéchine chez *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhizobium* sp, ces deux bactéries dégradent la catéchine en acide protocatéchique et en acide phloroglucinolcarboxylique figure 12, (Gajendiran et Mahadevan, 1988; Hopper et Mahadevan, 1991).

Il est intéressant de remarquer que la voie de dégradation des flavonoïdes par les *Rhizobium* fait apparaître, dans tous les cas, des chalcones. *R. leguminosarum* bv. *viciae* et *R. meliloti* font apparaître de nouvelles chalcones, flavones, et flavanones qui peuvent être potentiellement inductrices des gènes *nod* D, chez ces bactéries, (figure 13).

E. Mutants végétaux pour les caractères symbiotiques

1. Introduction

La formation d'une nodosité fonctionnelle est le résultat de l'expression des gènes des deux partenaires symbiotiques. Si la bactérie est responsable de la fixation, la plante, elle, procure pendant la symbiose l'environnement, l'énergie et les puits pour l'azote. Ceci a amené de nombreuses équipes de recherches à s'intéresser maintenant également, même si le problème est complexe, à l'étude des gènes symbiotiques végétaux. Là encore, l'analyse sera facilitée par l'obtention d'une variabilité génétique pour les caractères symbiotiques. Cette variabilité a d'abord été constituée par des mutants naturels, plus récemment, et afin de se placer dans des contextes d'isogénie, la variabilité a été créée par mutagenèse.

2. Les mutants naturels

Ces mutants concernent quelques espèces d'intérêt agronomique. Ils ont été découverts dans les centres d'origine et de diversification de ces espèces ou, par hasard, au sein du matériel des programmes de sélection.

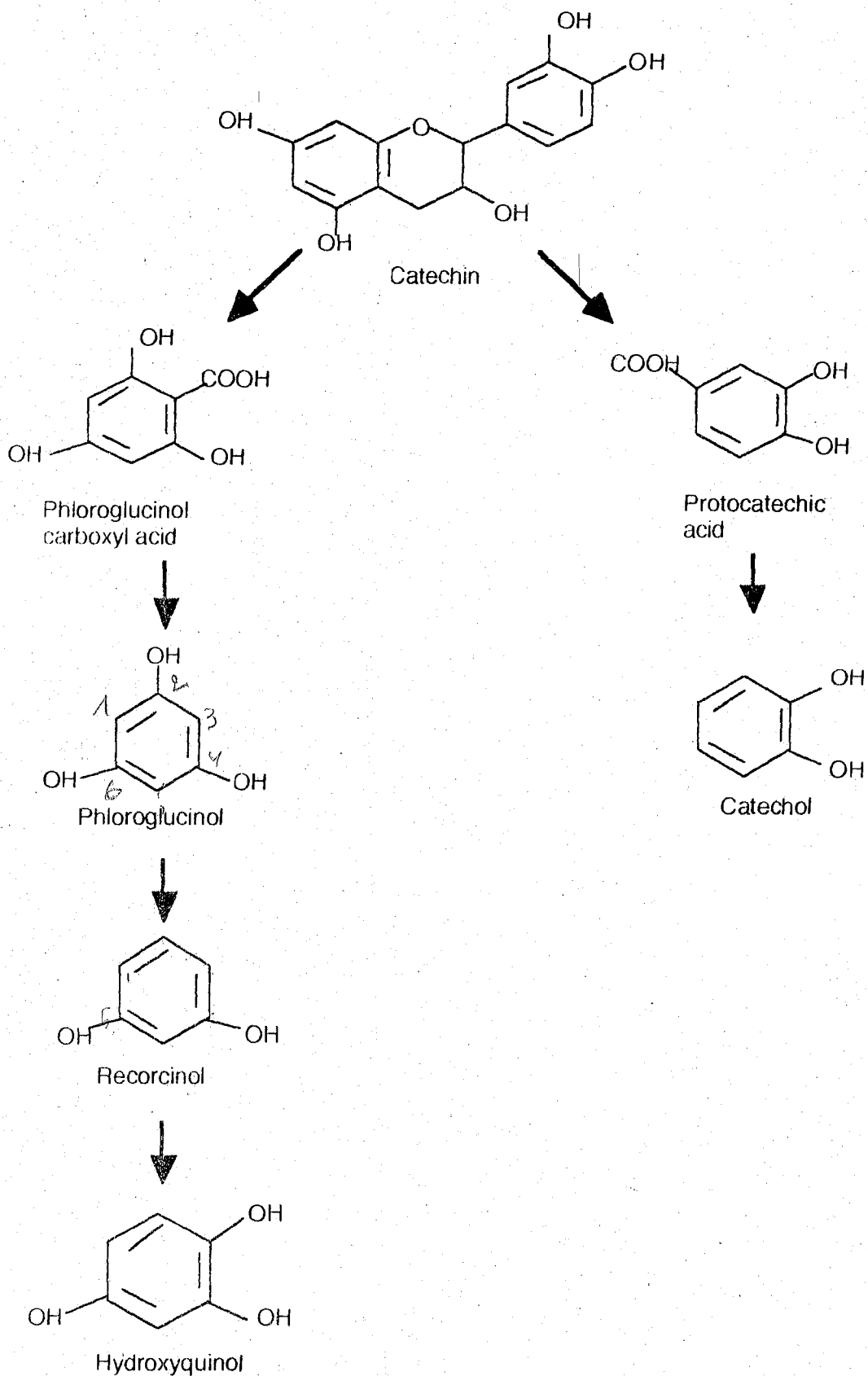


Figure 12. Utilisation de la catéchine par les *Rhizobium*
(Gajendiran et Mahadevan, 1988)

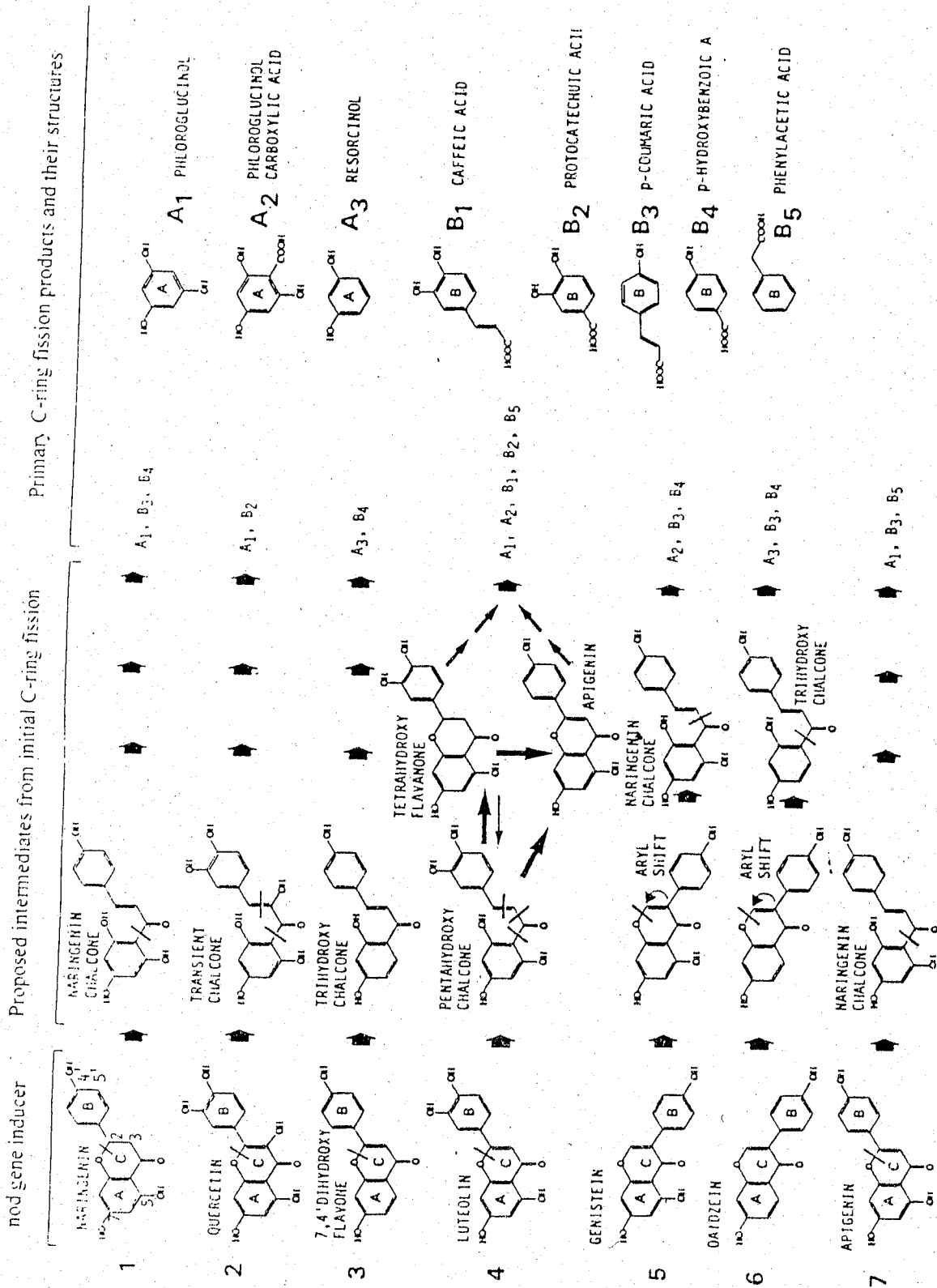


Figure 13. Voie de dégradation pour 7 flavonoïdes incubés avec *Rhizobium* (Rao et al., 1994)

(1) *R. leguminosarum* bv ; *viciae* ; (2) *R. leguminosarum* bv *trifolii* ;
 (4) *R. meliloti* ; *R. fredii* ; (6,7) *Rhizobium* sp. NGR234

2.1 La luzerne (*Medicago sativa* L.)

Six gènes, tous issus d'un même programme d'amélioration de la fixation de l'azote, ont été identifiés (Viands et al., 1979; Peterson et Barnes, 1981). Cinq d'entre eux conduisent à un phénotype non fixateur (fix-), ce dernier étant non nodulant (*nod*⁻).

2.2 Le Soja (*Glycine max* L. Merr)

Quatre gènes entraînant une absence de nodulation ou une nodulation inefficace ont été mis en évidence chez le soja. Le plus étudié est le gène *rj1*, qui, après avoir été découvert par Williams et Lynch (1954), a été introduit par croisement dans plusieurs variétés. Ce gène entraîne un phénotype (*nod*⁻) avec la majorité des souches de *Bradyrhizobium* mais l'utilisation en masse de certaines souches très compétitives peut provoquer la formation de quelques nodosités (LaFavre et Eaglesham, 1984).

2.3 Le pois (*Pisum sativum* L.)

Gelin et Blixt, (1964) ont mis en évidence pour la première fois, l'existence de gènes (*nod1* et *nod2*) qui entraînaient une hypernodulation chez une légumineuse. Cinq autres gènes symbiotiques ont été détectés dans du matériel végétal issu de prospections dans le centre d'origine et de diversification du pois. Le cultivar (cv) Afghanistan porte un gène, *sym2*, qui entraîne une résistance à la nodulation ou une nodulation inefficace quand il est cultivé en présence de souches de *Rhizobium* des sols européens, mais nodule efficacement avec les souches des sols dont il est originaire (Lie, 1978).

2.4 La fève (*Vicia faba* L.)

Un mutant spontané de fève (*Vicia faba* L.) a été décrit par Duc et Picard (1986). Il s'agit d'un cultivar d'origine indienne qui, comme le pois afghan, ne nodule pas ou inefficacement avec les souches de *Rhizobium* des sols européens. Ce caractère est gouverné par un gène récessif *sym 1*.

3. Les mutants induits

La mutagenèse se révèle un outil performant pour créer de la variabilité génétique pour les caractères symbiotiques. Elle a permis de multiplier le nombre des lignées mutantes et de travailler dans des contextes génétiques fixés. Selon les procédés de criblage utilisés, trois grandes classes de mutants peuvent être obtenus: mutants non nodulants, mutants non fixateurs et mutants nitrate tolérants qui montrent jusqu'à présent un caractère d'hypernodulation.

En 1981, a débuté, à la Station de Génétique et d'Amélioration des plantes de Dijon, un programme de sélection de mutants pour la fixation symbiotique de l'azote chez le pois cv Frisson. Ce travail a permis l'obtention, après mutagenèse chimique, d'une série de génotypes mutés. L'analyse génétique des mutants a montré que 6, 7 et 1 gènes distincts et récessifs détermineraient respectivement des phénotypes (nod^-), ($nod^+ fix^-$) et (nod^{++} , nts), (Duc et Messager, 1989).

Les agents mutagènes sont divers, le plus utilisé est le MSE (méthane sulfonate d'éthyle), agent mutagène chimique qui induit essentiellement des mutations ponctuelles.

L'utilisation de la mutagenèse chez *Vicia faba* L a révélé trois mutants (f13, f73, f245) avec une nodulation inefficace ($nod^+ fix^-$), un mutant f48 non nodulant (nod^-) et un hypernodulant f32. Tous les phénotypes de ces mutants sont contrôlés par un seul gène récessif représenté respectivement par sym1, sym2, sym3, sym4, sym5 (Duc, 1995).

CHAPITRE II

Matériel

et

Méthodes

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Introduction

Selon Hale et Moore, (1979) les constituants du métabolisme primaire présents dans les graines peuvent être libérés dans le milieu extérieur et venir en contact avec les micro-organismes du sol par un processus physiologique appelé "exsudation". L'exsudation porte également sur les composés du métabolisme secondaire (les flavonoïdes). Il nous a donc paru important d'étudier l'exsudation de ces flavonoïdes dans les graines des cultivars de *Vicia faba* et ses mutants (f123⁺⁺⁺, f48⁻). Nous avons aussi étudié le déroulement de ce phénomène qui est "l'exsudation" au niveau des racines du 1er jour au 21 jour de germination chez le cultivar Blandine.

Nous avons utilisé trois méthodes de dosages des composés phénoliques pour évaluer la teneur en phénols et tannins condensés :

- la méthode au bleu de Prusse pour le dosage des phénols totaux
- la méthode du test de vanilline pour le dosage des tannins condensés
- la méthode de production d'anthocyanidines par oxydation à chaud pour le dosage de tannins condensés.

D'autres méthodes ont été éprouvées pour l'identification des molécules inductrices de gènes *nod* : le couplage CLHP/UV et CLHP/SM.

L'induction de gènes *nod* est étudiée en mesurant l'activité β -galactosidase qui traduit l'expression de gènes *nod* communs.

A. Matériel biologique

1. Matériel végétal

Les graines des cultivars de la féverole et ses mutants ont été fournies par le Dr Duc Gérard de la station génétique et d'amélioration des plantes de l'INRA de Dijon, (Annexe 2).

1.1 Cultivars de *Vicia faba*

1.1.1 Cultivar Blandine

La population Blandine est un cultivar avec zéro tannins, à fleurs blanches et graines blanches.

1.1.2 Cultivar Alfred

La population Alfred est un cultivar avec tannins, à fleurs colorées et graines colorées.

1.2 Mutants de *Vicia faba*

Les deux mutants utilisés sont le nodulant précoce f123 ($\text{nod}^{+++}\text{fix}^{+++}$), l'hypernodulant f32 ($\text{nod}^{++}\text{fix}^{++}$) et le non nodulant f48 ($\text{nod}^{-}\text{fix}^{-}$).

B. Méthodes d'obtention des exsudats de graines et de racines

1. Récupération des exsudats de graines

Un premier lot de graines intactes et un deuxième lot où les graines ont été disséquées séparément en téguments seuls et cotylédons seuls; ont été utilisées pour l'analyse des exsudats.

Les graines intactes, les téguments et les cotylédons ont été agités séparément dans 100 ml d'eau pendant 24 heures à une température de 4°C ou 30°C.

Le suivi quantitatif des composés polyphénoliques est réalisé à l'aide de méthodes de dosages suivantes: les phénols totaux (bleu de Prusse), les tannins condensés (BuOH-HCl à chaud) et le test de vanilline.

Pour l'estimation des composés phénoliques contenus dans les graines, cotylédons et téguments, nous avons extrait ces composés à 80°C dans un mélange MeOH/H₂O (7/3) sous reflux pendant (2 x 20 mn). Afin d'éviter le phénomène d'oxydation dans les extraits polyphénoliques nous avons utilisé du métabisulfite

de sodium à 0.2% dans l'eau à raison de 1 ml par 100 ml du mélange de solvant (Brun et al., 1992).

2. Récupération des exsudats de racines

2.1 Stérilisation du matériel

Tout le matériel est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 60 mn. Toutes les manipulations ultérieures sont effectuées en pièce stérile ou sous une hotte à flux laminaire.

2.2 Stérilisation des graines du cultivar Blandine et récupération des exsudats racinaires

Il faut prévoir 2 à 3 fois plus de graines que la quantité nécessaire à l'expérience; leurs téguments doivent être intacts. La stérilisation est réalisée par trempage et agitation manuelle dans une solution de chlorure mercurique $Hg Cl_2$ à 1.5% pendant 3 mn suivie de plusieurs rinçages à l'eau. Après une nuit de trempage dans l'eau, les graines présentant un aspect grisâtre sont éliminées, les autres sans téguments sont mises à germer dans les boîtes de pétri (D=20 cm) contenant 3 à 4 couches de papier filtre imbibé d'eau. Ces cotylédons ont séjourné 3 jours à l'obscurité à une température de 22°C. Chaque cotylédon prégermé est transféré dans un tube de 20 ml contenant du sable humide sur une hauteur de 5 cm. Ces cotylédons ont séjourné 21 jours à 22°C. Les exsudats racinaires de 10 racines au 1er jour, au 3ème jour, 7ème jour, 14ème jour et au 21ème jour ont été récupérés par lavage du sable des 10 tubes avec 20 ml de $d'H_2O$ (3 fois) et 20 ml de MeOH (3 fois).

C. Méthode d'analyse des composés phénoliques

Diverses méthodes chimiques choisies dans la littérature ont été modifiées par Brun (1991), afin d'améliorer leur sensibilité. Ces méthodes sont spécifiques d'une certaine classe de phénols:

a) Phénols totaux : méthode au Bleu de Prusse (Prince et Butler, 1977), elle s'est avérée plus sensible et plus reproductible que celle de Folin-Ciocalteu (Marigo, 1973) ou celle de Folin-Denis (Swain et Hillis, 1959).

b) Tannins condensés

- production d'anthocyanidines (PA) par oxydation au BuOH-HCl (Bate - Smith, 1973) : cette technique dénombre toutes les unités monomères des seuls polymères.
- test vanilline (Va) (Burns, 1971): il est sensible aux unités terminales des molécules, y compris les monomères catéchiques libres.

1. Dosage des phénols totaux utilisant la méthode de bleu de Prusse

Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par les composés phénoliques, qui conduit à la formation d'un complexe de couleur bleu de Prusse d'où le nom de la méthode.

Le protocole de cette méthode est le suivant :

- Une prise d'essai de 7 ml d'extrait est additionnée de 10 ml d'eau distillée
- On ajoute 1 ml de réactif de chlorure ferrique ($FeCl_3$: 0.1 M dans HCl 0.1 N) suivi immédiatement de 1ml d'hexacyanoférate de potassium ($K_3 Fe(CN)_6$: 0.008 M dans l'eau).
- Laisser réagir 10 mn exactement à température ambiante
- Lire l'absorbance à 725 nm et soustraire la valeur du blanc (H_2O + réactifs) dosé après le même temps. Une gamme étalon est établie avec une solution d'acide gallique standard (Sigma). La figure 14 représente la courbe étalon d'acide gallique réalisé avec le réactif de bleu de Prusse

2. Dosage des tannins condensés

Pour le dosage des tannins condensés deux méthodes complémentaires ont été utilisées: le test de vanilline et la production d'anthocyanidines par oxydation en milieu alcool-acide et à chaud.

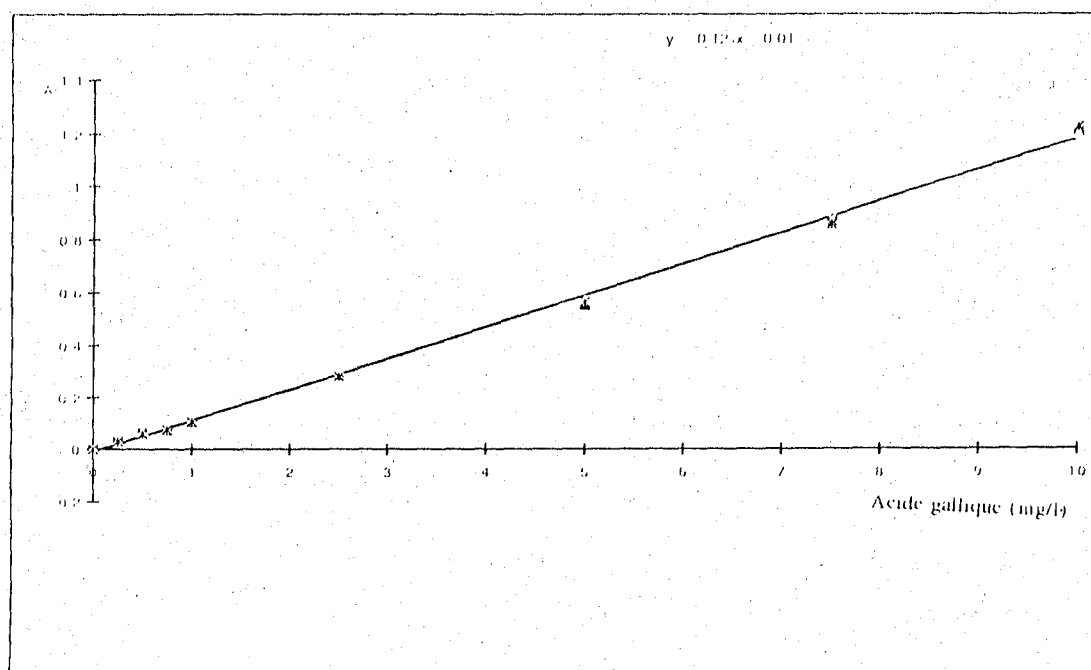


Figure 14. Courbe étalon de l'acide gallique réalisée avec le réactif bleu de Prusse

2.1 Test de vanilline

La vanilline se fixe sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine (polymérisée ou non) pour former un groupement chromophore dont la couleur orangée est lue à 500 nm.

Le protocole utilisé est le suivant :

Le réactif est préparé extemporanément, à volumes égaux, d'une solution de vanilline à 5.8 % dans le méthanol et d'une solution d'acide chlorhydrique à 24% dans le méthanol.

- 5ml de réactif vanilline-HCl sont ajoutés à 1 ml d'extrait phénolique
- la réaction se déroule au bain-marie à 30°C pendant 20 mn;
- l'absorbance est lue à 500 nm;
- la catéchine est le plus souvent utilisée comme standard;
- les calculs de teneurs sont référencés à une droite de calibration réalisée à partir de (+)-catéchine;
- les tannins sont exprimés en équivalents catéchine pour le test vanilline.

Cette méthode mesure le nombre de molécules de polymères quelque soit le degré de polymérisation, et aussi le nombre de molécules de catéchine monomère libre. La figure 15 représente la reproductibilité du test de vanilline sur une solution de (+) catéchine.

2.2 Production d'anthocyanidines par oxydation à chaud

Cette méthode consiste en une oxydation à chaud des tannins condensés en unités monomères anthocyanidines Bate-Smith (1973). La présence d'alcool augmente le rendement de la réaction et permet ainsi de travailler avec une faible quantité d'acide (Brun, 1991).

Le protocole ainsi défini est le suivant :

- 0.5 ml de l'extrait polyphénolique sont ajoutés à 6 ml d'une solution de BuOH-HCl concentré (95/5)
- 0.2 ml de sulfate d'ammonium ferrique ($\text{NH}_4 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) à 2% dans HCl
- la solution est agitée et laissée au bain-marie à 100°C pendant 2 heures.
- l'absorbance des hydrolysats est mesurée à 550 nm.

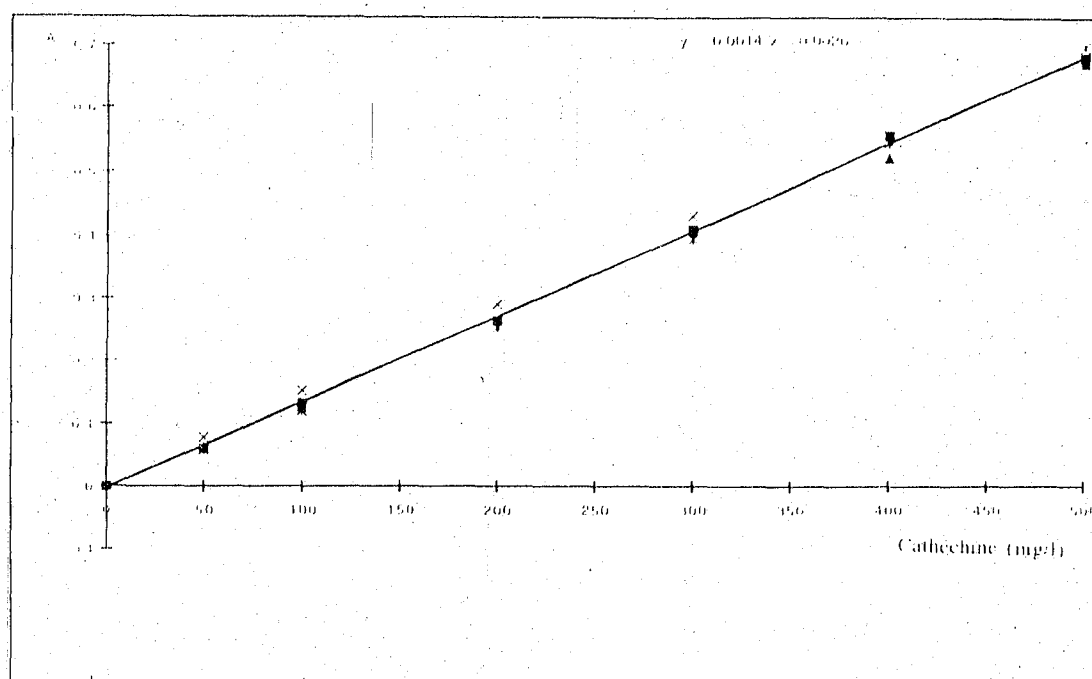


Figure 15. Reproductibilité du test de vanilline sur une solution de (+) catéchine

La densité optique à cette longueur d'onde permet le calcul de la teneur en proanthocyanidines, exprimées en mg/g d'anthocyanidines grâce à la formule suivante :

$$T = A/E.Vd/P.$$

A= Absorbance à la λ max

E1% 1cm= coefficient d'extension massique =150 (Bate-Smith 1973)

V = volume de l'extrait total

d = facteur de dilution

P = poids de la matière sèche.

3. Méthodes de séparation et de détermination des structures chimiques fonctionnelles

3.1 Procédés de séparation

3.1.1 Extraction directe du matériel végétal

3.1.1.1 les graines

Les graines intactes des deux cultivars Blandine et Alfred ainsi que les mutants (f123⁺⁺⁺, f48⁻) ont été agitées dans 200 ml d'H₂O pendant 24 heures à 30°C. La phase aqueuse est réduite à 50 ml puis épuisée successivement par le n-Butanol, cette fraction est évaporée à sec puis reprise dans 1 ml de méthanol.

3.1.1.2 les exsudats racinaires

Pour récupérer les exsudats racinaires nous avons utilisé la même technique citée auparavant. La solution hydrométhanolique est évaporée à sec puis reprise dans l'eau et extraite 3 fois par le n- butanol. Cette fraction butanolique concentrée sous vide à 40°C est reprise dans 1 ml de méthanol pour l'analyse des composés phénoliques.

3.1.1.3 les racines

Les racines qui ont servi à récupérer les exsudats racinaires auparavant sont broyées en présence d'azote liquide, puis mélangées avec méthanol-eau (7:3) à chaud sous reflux pendant 2 x 20 mn. Afin d'éviter le phénomène d'oxydation dans

les extraits polyphénoliques on a utilisé du métabisulfite de sodium à 0.2% dans l'eau à raison de 1 ml par 100 ml de solvant (Brun, 1991; Mergham, 1995).

La solution hydrométhanolique est évaporée à sec puis reprise dans l'eau. Cette phase aqueuse est épuisée successivement avec le n- butanol puis concentrée sous vide et récupérée dans 1 ml de méthanol pour la séparation et l'identification des composés polyphénoliques.

3.1.2 Extraction après hydrolyse

Elle consiste en la libération des aglycones flavoniques de leurs formes hétérosidiques correspondantes par traitement chlorhydrique. Pour cela 3 ml de (HCl 2N) sont mélangés à l'extrait méthanolique des racines puis ce mélange est mis au bain-marie bouillant à 100°C pendant 60 mn. Après refroidissement de la phase aqueuse, cette dernière est épuisée par l'éther éthylique puis reprise dans du méthanol après avoir évaporé à sec l'éther éthylique.

3.2 Procédés de caractérisation

3.2.1 Traitement des différentes fractions par C.C.M

Nous avons surtout utilisé la chromatographie bidimensionnelle pour comparer le pool phénolique des exsudats de graines, racines et les racines des cultivars et des mutants de la féverole. Un extrait préparé selon les techniques précédentes est déposé dans un coin de la couche mince, puis développé dans un premier solvant, puis dans un deuxième perpendiculairement au premier. La visualisation des résultats est réalisée sous lumière UV (365 nm).

Selon les emplois, on fait appel, soit à des couches minces achetées, soit préparées dans le laboratoire avec un étaleur Desaga permettant de faire 5 plaques de 20 x 20 cm. Les supports employés sont les suivants : polyamide, cellulose. Les solvants employés sont les suivants :

t-butanol-acide acétique-eau (3.1.1) et acide acétique à 15%

3.2.2 Analyse des composés phénoliques par CLHP couplée à barrette de diodes (CLHP/UV)

Le couplage de la CLHP à un détecteur à barrette de diodes permet d'obtenir le spectre U.V. visible de chacun des pics du chromatogramme. Cette technique nous donne une première indication sur l'identité des composés détectés.

Les conditions d'utilisation sont les suivantes :

- . Le type d'appareil utilisé : Kontron HPLC System 420
- . détecteur Kontron Instruments 991
- . Colonne de type C18 est à polarité inversée (Nucléosil 5 μ m – 30 cm, Société Française de Chromatographie)
- . Précolonne : SE30, Nucléosil
- . Solvants

Solvant A : Acide acétique 2% dans l'eau

Solvant B : Acétonitrile / eau / acide acétique dans les proportions 800:200:20 pour un débit de 0.8 ml /mn

- . Gradients

Gradient 1 : 2% de A en 10 mn; 15% de B dans A en 15 mn; 50% de B dans A en 62 mn; 2% de B dans A en 15 mn

Gradient 2 : 5% de A en 5 mn; 15% de B dans A en 10 mn; 70% de B dans A en 30 mn; 90% de B dans A en 15 mn; 5% de A en 15 mn

- . Détection : 280 nm

- . Volume injecté : 20 μ l

Chaque pic obtenu est enregistré et une analyse spectrale UV/visible permet de visualiser les spectres d'absorption des produits contenus dans le pic. En général le spectre d'absorption dans le méthanol des composés flavoniques et dérivés, présente deux bandes :

- la bande I située entre 320 et 380 nm

- la bande II située entre 240 et 280 nm

La position de la bande I permet, en général, de distinguer la structure flavone de la structure flavonol :

et $(M+Na)^+$ sont illustrés dans le tableau 9 (Xian-guo He et *al.*, 1996). La même technique a été utilisée dans l'analyse des acides phénoliques et aldéhydes, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10 (Gioacchini et *al.*, 1996).

Conditions d'utilisation sont les suivantes:

Les analyses ont été effectuées au service Central d'analyse du CNRS (Vernaison, Lyon) sur un spectrophotomètre de type Hewlett Packard.

Masse mesurée: 80-500u

Température: 140°C

CE: 110 V

ES: interphase est HP Analytica of Brandfort

Température N2: 250°C

D. Méthode microbiologique

1. Introduction

L'acquisition, ces dernières années, de connaissances précises sur les gènes des *Rhizobium* spp. impliqués dans la nodulation, a montré que l'expression des gènes *nod* communs était une condition nécessaire pour la réussite de l'infection de la racine par la bactérie. L'activation de ces gènes nécessite outre le produit du gène *nod D*, la présence d'un composé de type flavonique émis par la plante. Il a été montré également que la concentration de ce composé dans la rhisosphère pouvait être un facteur limitant de la nodulation, de la fixation d'azote et de la croissance de la plante (Kapulnik et *al.*, 1987; Jain et *al.*, 1990).

Notre objectif est plus spécialement consacré à l'étude de l'action des exsudats de graines, racines et extraits de racines des cultivars Blandine et Alfred et les mutants (f123⁺⁺⁺, f32⁺⁺, f48⁻) sur la croissance de micro-organismes plus particulièrement *Rhizobium leguminosarum*. L'acquisition de connaissances concernant l'expression de gènes *nod* et l'identification des flavonoides activateurs de ces gènes constituent une phase essentielle de ce projet.

N° des pics	Composés	Temps de rétention (mn)	(M+H) ⁺ m/z	(M+Na) ⁺	UY λ _{max} (mn)
1	Daidzin	13.0	414	439	256, 313 e
2	Genistin	14.6	433	455	261, 330 e
3	Isoquercetrin	15.6	465	487	255, 365
4	Daidzein	18.1	255	277	249, 259 sh, 303sh
5	Quercetin	18.6	303	325	255, 370
6	Genistein	19.7	271	293	261, 328 sh
7	Biochanin A	23.7	285	307	261, 330 sh

Tableau 9. Analyse des flavonoïdes standards par CLHP-ES-SM..
(Xian-Guo He et *al.*; 1986)

Acides phénols et aldéhydes	Temps de rétention (mn)	(M-H)-
Acide gallique	6.80	169.1
Acide <i>p</i> -hydrobenzoïque	9.27	137.1
Acide <i>p</i> -hydroxyphenilacétique	10.80	151.2
Acide vanillique	10.53	167.1
Acide syringique	11.66	197.2
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	13.01	121.1
Vanilline	16.16	151.1
Acide <i>p</i> -coumarique	16.20	163.2
Syringaldehyde	19.00	181.2
Acide ferulique	18.95	193.2

Tableau 10. Analyse des acides phénols et aldéhydes par CLHP-ES-SM.
(Gioacchini et *al.*; 1996)

2. Matériel et méthodes

2.1 Souche utilisée

La souche *Rhizobium leguminosarum* est 8401pRL1JI (fournie par le Dr Allain Downie du centre John Innes, Norwich Research Park). Cette souche porte un plasmide (pIJ1477) sur lequel une fusion entre le promoteur des gènes *nod* communs et le gène de structure, *lac Z*, d'*Escherichia coli* codant pour l'enzyme β -galactosidase a été réalisée (*nod C* - *lac Z*).

2.2 Milieux de culture

- milieu TY :

Bactron-trypton	5g
Yeast extract	3g
H ₂ O	1000 ml

Faire une solution mère de 6000 mM de :

CaCl ₂ , 2H ₂ O	1.3 g/10 ml
ou CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.882g/10 ml

rajouter à raison de 6 mM soit 50 μ M/ml

Le milieu solide correspondant est obtenu par addition de 15g/l d'agar (Difco).

- tampon Z

KCL	0.01 M
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	0.04 M
Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O	0.04 M
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.001 M
β -mercaptoéthanol	0.05 M

additionné extemporanément; pH à 7.

2.3 Origine des composés phénoliques testés

Les extraits phénoliques testés sur la bactérie *nod C* - *lac Z* sont les suivants:

- les exsudats de graines et de racines des cultivars et des mutants de *Vicia faba* :

- cultivars
 - cv Blandine nodulant
 - cv Alfred nodulant
- Mutants
 - f123⁺⁺⁺ nodulant précoce
 - f32⁺⁺ hypernodulant
 - f48⁻ non nodulant

- Les molécules de référence

Les molécules de référence utilisées dans les différentes expérimentations ont été la naringénine, la (+) Catéchine, et D catéchine et apigénine.

2.4 Méthodes d'étude de l'expression des gènes *nod* communs

2.4.1 Criblage des inducteurs

L'induction des gènes de la nodulation de la souche 8401pRL1JI est étudiée en mesurant l'activité β -galactosidase qui traduit l'expression des gènes *nod* communs.

La souche 8401pRL1JI est cultivée jusqu'en phase exponentielle de croissance (3j) dans le milieu TY additionné de 2 μ l de tétracycline à 28°C (l'absorbance est mesurée à 600 nm comprise entre 0.4 et 0.6).

Une série de tubes contenant 4.5 ml de milieu TY sans antibiotique estensemencée avec 0.5 ml de culture de la souche 8401pRL1JI. Les bactéries sont cultivées 8 h supplémentaires puis les molécules à tester et les flavonoïdes de référence sont ajoutées.

Chaque série comporte également des témoins non induits, additionnés uniquement de méthanol. L'induction est réalisée sur une période de 12 à 14 h (l'activité β -galactosidase atteint son maximum après 6 h à 8 h de culture puis se maintient constante; Sutherland et *al.*, 1990; Smit et *al.*, 1992) et les tubes sont déposés dans la glace fondante pour stopper la synthèse de l'enzyme et la croissance des souches. L'activité β -galactosidase est ensuite mesurée par des parties aliquotes des cultures.

2.4.2 Détermination de l'activité β -galactosidase

- l'absorbance de la culture est mesurée à 600 nm.
- 0.5 ml de culture (3 répétitions) est mélangé à 0.5 ml de tampon Z.
- 100 μ l de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont agités rapidement puis placés dans un bain-marie à 30°C, 10 minutes.
- la réaction débute après l'addition de 150 μ l du substrat de la β -galactosidase, une solution de rouge de chloro-phénol β -D-galactopyranoside (RCPG, Boehringer Mannheim) dans le tampon Z (RCPG à 4 mg/ml de Tampon Z). La suspension est homogénéisée puis laissée à incuber à 30°C.
- lorsque la réaction est suffisamment développée (apparition d'une coloration rouge due au rouge de chloro-phénol libéré par l'hydrolyse du substrat par la β -galactosidase) elle est arrêtée par immersion des tubes 5 min dans un bain-marie à 60°C.
- Après centrifugation des tubes 5 min à 11 000 g, l'absorbance du surnageant est mesurée à 574 nm, correspondant à la longueur d'onde optimum d'absorbance du rouge de chloro-phénol.
- l'activité β -galactosidase est calculée selon la formule suivante:

$$1 \text{ unité } \beta\text{-galactosidase (U)} = 1000 \frac{A_{574}}{A_{600} \cdot t \cdot V}$$

-avec :

A 574 : absorbance du rouge de chloro-phénol produit par hydrolyse.

A 600 : absorbance de la culture de la souche 8401 pRL1J1 testée.

t : durée de la réaction enzymatique (min)

V : volume de culture utilisé (ml)

Les modifications, par rapport au protocole de Miller (1972), sont les suivantes:

- absence de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 0.1%: en présence de SDS les activités β -galactosidases sont diminuées de 2 à 5 fois

- le RCPG a été utilisé à la place de l'ortho-nitro-phényl β -D galactopyranoside (ONPG) car il permet une sensibilité 8 fois plus importante (Banfalvi et *al.*, 1988)
- la réaction est stoppée par chauffage et non par alcalinisation du milieu avec le carbonate de sodium qui provoque une hydrolyse du RCPG.

CHAPITRE III

Physiologie de l'exsudation
et métabolisme phénolique
de *Vicia faba* aux premiers
stades de la croissance

CHAPITRE III. PHYSIOLOGIE DE L'EXSUDATION ET MÉTABOLISME PHÉNOLIQUE DE *VICIA FABA* AUX PREMIERS STADES DE LA CROISSANCE

1. Introduction

Il existe peu de travaux portant sur l'exsudation phénolique des différents tissus de la graine et l'exsudation racinaire chez les cultivars de *Vicia faba* "Blandine" et "Alfred" ainsi que ses mutants qui sont représentés par le nodulant précoce f123⁺⁺⁺, le non nodulant f48⁻ et l'hypernodulant f32⁺⁺.

Une seule étude a été faite par Tomas-Lorente et *al.*, (1990) qui ont mis en évidence dans les exsudats de graines de *Vicia faba* deux flavones 7,4'-dihydroxyflavone, 7, 3', 4'-trihydroxyflavone, des flavonols quercétine, kaempferol et des flavonols glycosylés quercetin 7-glucoside, kaempferol 7-glucoside. D'autres travaux ont été surtout focalisés sur l'étude des facteurs antinutritionnels (FAN) phénoliques de *Vicia faba* cités dans le chapitre I.

Dans cette première partie, nous allons déterminer dans quelle partie de la graine (téguments ou cotylédons) sont localisés les composés phénoliques et quelles sont les parties impliquées dans l'exsudation phénolique après 24 h d'imbibition dans l'eau à deux températures 4°C et 30°C pour les deux cultivars de *Vicia faba*, l'une nommée cv Blandine et l'autre nommée cv Alfred et ses mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻ et f32⁺⁺.

Parmi les constituants des exsudats racinaires définis au chapitre I, les substances diffusibles solubles ont une importance considérable sur la croissance des microorganismes de la rhisosphère et, entre autres, des *Rhizobium*. Il nous a donc paru intéressant d'étudier la cinétique de l'exsudation racinaire pendant le 1^{er}, 3, 7, 14 et 21^{ème} jours de la croissance racinaire de *Vicia faba* cv Blandine.

L'analyse par CLHP et les techniques phytochimiques ont été utilisées pour l'étude de la nature des composés phénoliques exsudés par les différentes parties de la graine (téguments et cotylédons), exsudats racinaires et les racines.

2. Rôle de la température sur l'exsudation phénolique potentielle des divers compartiments de la graine

2.1 Cas des phénols totaux

La quantité de composés phénoliques exsudée par la graine entière, les téguments et les cotylédons après 24 h d'imbibition dans l'eau distillée est représentée dans le tableau 11. La quantité de phénols totaux contenue essentiellement dans chaque partie de la graine et la graine intacte est évaluée après extraction à chaud dans une solution hydrométhanolique, ces résultats sont indiqués dans le tableau 11.

A une température de 4°C, les graines entières de cv Blandine et cv Alfred exsudent respectivement 0.7 mg/g et 0.2 mg/g comparé à la quantité totale contenue dans la graine entière 2.41 mg par unité de graine pour cv Blandine et 2.71 mg par unité de graine pour cv Alfred.

Les différences étaient observées quand l'exsudation des parties de la graine sont analysées séparément. Cependant les cotylédons et téguments de cv Blandine exsudent presque la totalité des composés phénoliques.

Pour les cotylédons de cv Blandine, nous obtenons une quantité de 3.14 mg par cotylédon comparé à la quantité totale de phénols de l'ordre de 2.71 mg par cotylédon, les téguments contiennent une quantité de 0.52 mg par tégument comparé à celle des phénols totaux de l'ordre de 0.61 mg par tégument.

Inversement, les téguments de cv Alfred exsudent seulement 25% de la quantité totale des composés phénoliques, ils contiennent ainsi 3.07 mg contre 12.07 mg par tégument. Les cotylédons de ce cultivar exsudent aussi moins de composés phénoliques 2.96 mg par unité de cotylédon contre 4.13 mg pour la quantité totale contenu dans cet organe.

A 30°C, l'exsudation phénolique est plus importante qu'à 4°C (tableau 11), pour cv Blandine 3.41 mg par unité de graine contre 0.7 mg par unité de graine à 4°C et pour cv Alfred 3.33 contre 0.22 mg par unité de graine. Des différences ont été obtenues aussi à 30°C pour les deux cultivars quand les cotylédons et téguments sont analysés séparément; par exemple les téguments de cv Blandine

Cultivars	Températures (°C)	Graine		Cotylédon		Tégument	
		A	B	A	B	A	B
<i>Vicia faba</i>	4	0.70 ± 0.27	0.70	3.77 ± 0.00	3.14	2.98 ± 0.04	0.52
	30	3.41 + 0.46	3.41	4.46 + 0.03	3.807	3.49 + 0.08	0.7
Blandine	4	2.41 (1) + 0.29	2.41	3.25 + 0.17	2.71	4.13 + 0.29	0.61
	30	0.22 ± 0.01	0.22	3.55 ± 0.39	2.96	17.54 ± 0.12	3.07
Alfred	4	3.33 + 0.25	3.33	5.72 + 0.07	4.77	46.16 + 0.1	8.07
	30	2.71 + 0.42	2.71	4.95 + 0.11	4.13	69.00 + 3.43	12.07

Tableau 11. Quantité de composés phénoliques exsudée après 24 h à 4°C et 30°C des graines de *Vicia faba* cv. Blandine et Alfred.

(A) Quantité des composés phénoliques exsudée par les graines, téguments et cotylédons (en éqs ac. gallique) exprimée en mg /g de matière sèche; (B) Quantité des composés phénoliques exsudée par les graines, téguments, cotylédons exprimée en mg par unité de graine, mg par unité de tégument et en mg par unité de cotylédon; (1) En caractères gras, teneur en phénols contenue dans les différents tissus de la graine par extraction à 80°C, exprimée comme en (A) et (B).
Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions.

exsudent 100% de phénols de l'ordre de 0.7 mg par unité de tégument comparé à la quantité totale 0.61 mg par tégument tandis que les téguments de cv Alfred exsudent seulement 67% près de 8.07 mg comparé à 12.07 mg pour la quantité totale de ces téguments.

2.2 Cas des polymères proanthocyanidines

Comme nous le montre le tableau 12, l'exsudation des tannins est faible dans les cotylédons de l'ordre de 0.108 mg par unité de cotylédon par rapport à la quantité élevée dans les téguments 4.9 mg par tégument et 7.63 mg par tégument respectivement à 4°C et 30°C. Ces composés polymères sont surtout localisés dans les téguments avec 11.37 mg par tégument. L'exsudation des tannins condensés des téguments est seulement de 43% à 4°C comparés à celle de 30°C où nous obtenons 67%. A 4°C, il en est de même pour la graine où l'exsudation atteint 31% de la quantité totale; tandis qu'à 30°C elle est quatre fois plus élevée que la quantité estimée par extraction à chaud.

Le dosage au BuOH-HCL nous amène aux mêmes conclusions que ceux obtenues avec le test de vanilline c'est à dire qu'à 30°C les graines exsudent plus de tannins condensés comparés à celles de 4°C; nous obtenons ainsi 5.14 mg par unité de graine contre 1.25 mg par unité de graine (tableau 12). L'exsudation des tannins condensés dans les cotylédons reste toujours faible de l'ordre de 0.15 et 0.56 mg par unité de cotylédon respectivement. La quantité en tannins condensés est très élevée dans les téguments seuls de l'ordre de 6.24 mg par unité de tégument à 4°C et 20.47 mg par unité de tégument à 30°C.

3. Comparaison des capacités globales d'exsudation des cultivars Blandine et Alfred et des mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻, f32⁺⁺

3.1 Intérêt génétique de ces mutants

Le nombre de mutants symbiotiques naturels chez la plante hôte reste faible. Pour pallier ce manque de variabilité, différents laboratoires sont passés au début des années 1980, à une nouvelle stratégie: l'utilisation de la mutagenèse.

Températures (°C)	Graine		Cotylédon		Tégument	
	Test vanilline					
	A	B	A	B	A	B
4	0.24 ± 0.02	0.24	0.13 ± 0.04	0.108	28.1 ± 1.14	4.9
30	3.04 ± 0.57	3.04	0.13 ± 0.04	0.108	43.62 ± 1.14	7.63
	0.77⁽¹⁾ ± 0.4	0.77	0.14 ± 0.03	0.11	65.02 ± 3.19	11.37

(A) Quantité de tannins condensée exsudée par les graines, téguments et cotylédons (en éqs catéchine) exprimée en mg/g de matière sèche; (B) Quantité de tannins condensés exsudée par les graines, téguments et cotylédons exprimée en mg par unité de graine, mg par unité de tégument et en mg par unité de cotylédon; ⁽¹⁾ En caractères gras, tannins condensés présents initialement dans les différents tissus par extraction à 80°C, exprimée comme en (A) et (B).

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

Températures (°C)	Graine		Cotylédon		Tégument	
	BuOH/HCL					
	A	B	A	B	A	B
4	1.25 ± 0.041	1.25	0.18 ± 0.002	0.15	35.7 ± 0.42	6.24
30	5.14 ± 0.008	5.14	0.68 ± 0.017	0.56	117 ± 0.32	20.47
	6.14⁽¹⁾ ± 0.05	6.14	0.33 ± 0.006	0.27	81.38 ± 0.29	14.25

(A) Quantité de tannins condensés exsudée par les graines, téguments et cotylédons (en mg/g d'après le E 1% = 150 de Bate-Smith pour le BuOH-HCl) exprimée en mg/g de matière sèche; (B) Quantité de tannins condensés exsudée par les graines, téguments et cotylédons exprimée en mg par unité de graine, mg par unité de tégument et par unité de cotylédon ; ⁽¹⁾ En caractères gras, tannins condensés présents initialement dans les différents tissus par extraction à 80°C, exprimée comme en (A) et (B).

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

Tableau 12. Quantité des tannins condensés exsudée après 24 h à 4°C et 30°C des raines de *Vicia faba* cv. Alfred

La création de mutants par cette technique offre deux avantages: d'une part, elle augmente la fréquence de mutation, et d'autre part, elle permet de travailler dans des contextes génétiques fixés (lignées pures).

Dans cette étude nous avons utilisé 3 mutants: absence de nodules (nod⁻) le f48⁻, un hypernodulant (nod⁺⁺) le f32⁺⁺ et le nodulant précoce (nod⁺⁺⁺) le f123⁺⁺⁺.

Les résultats obtenus auparavant chez les deux cultivars Blandine et Alfred nous ont montré que la température 30°C est favorable pour l'exsudation des composés phénoliques, pour cela nous avons estimé nécessaire d'utiliser cette température d'imbibition (30°C) pour évaluer le potentiel phénolique des exsudats libérés par les graines de ces mutants.

3.2 Exsudation des phénols et tannins

Les résultats de la quantité des composés phénoliques sont résumés dans le tableau 13. En effet, l'exsudation phénolique de la graine entière est la même chez les deux mutants f123⁺⁺⁺ et f48⁻ de l'ordre de 2 mg par unité de graine et de l'ordre de 1.32 chez le mutant f32⁺⁺.

En ce qui concerne l'exsudation des tannins condensés, la graine des deux mutants f123⁺⁺⁺ et f32⁺⁺ exsude très peu de tannins condensés par rapport au mutant f48⁻, elles contiennent respectivement 1.82 et 0.87 mg par unité de graine (tableau 13). Le mutant f48⁻ exsude plus de tannins que les deux autres mutants (3,35 mg par unité de graine). Nous remarquons que les tannins condensés sont toujours localisés dans les téguments et que la quantité totale est de 3,52 mg par unité de tégument chez le mutant f123⁺⁺⁺, 3.73 mg par unité de tégument chez le f32⁺⁺ et 3,50 par unité de graines chez le f48⁻.

L'exsudation des composés phénoliques à 30°C des graines des cultivars Blandine, Alfred et les mutants f123⁺⁺⁺, f32⁺⁺, f48⁻ varie entre 2 et 3 mg par unité de graine. Nous constatons que les téguments de cv Alfred est plus riche en composés phénoliques que le cv Blandine et les mutants, nous obtenons ainsi 8.07 mg par unité de tégument chez Alfred contre 0.7 mg par unité de tégument chez Blandine, 2 mg pour f123⁺⁺⁺, 1.44 mg pour f32⁺⁺ et 2.36 mg pour f48⁻ (tableaux 11, 13).

<i>Vicia faba</i> Mutants	Graine		Tégument	
	Phénols			
	A	B	A	B
F123 ⁺⁺⁺	2.00 ± 0.09	2	20 ± 1.38	2
F32 ⁺⁺	1.32 ± 0.05	1.32	16 ± 1.05	2.36
F48 ⁻	2.20 ± 0.2	2.2	16 ± 1.71	1.44

(A) Quantité des composés phénoliques exsudée par la graine et tégument (en eqs acide gallique) exprimée en mg/g de matière sèche.

(B) Quantité de phénol exsudée par la graine et téguments exprimée en mg par unité de graine et par unité de tégument.

Chaque résultat est la moyenne de 3 répétitions

<i>Vicia faba</i> Mutants	Graine		Tégument	
	Tannins condensés			
	A	B	A	B
F123 ⁺⁺⁺	1.82 ± 0.43	1.82	37,75 ± 1.01	3,52
F32 ⁺⁺	0.87 ± 0.03	0.87	25,22 ± 1.1	3,73
F48 ⁻	3,35 ± 0.03	3,35	33,58 ± 0.34	3,50

(A) Quantité en tannins condensés exsudée par la graine et tégument (en eqs catéchine) exprimée en mg par g de matière sèche.

(B) Quantité en tannins condensés exsudée par la graine et tégument exprimée en mg par unité de graine et par unité de tégument.

Chaque résultat est la moyenne de 3 répétitions.

Tableau 13. Quantité en phénols et de tannins condensés exsudée après 24 h à 30°C par la graine entière et tégument des mutants de *Vicia faba* f123⁺⁺⁺, f48⁻, f32⁺⁺.

Les tannins condensés sont toujours stockés dans les téguments de cv Alfred de l'ordre de 7.63 mg par unité de tégument et en moyenne de 3 mg par unité de tégument chez les 3 mutants. Le cultivar Alfred reste toujours un génotype riche en phénols et tannins condensés par rapport aux autres génotypes étudiés le cv Blandine et les mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻, f32⁺⁺ (tableau 12, 13).

4. Cinétique de l'exsudation chez cv Blandine

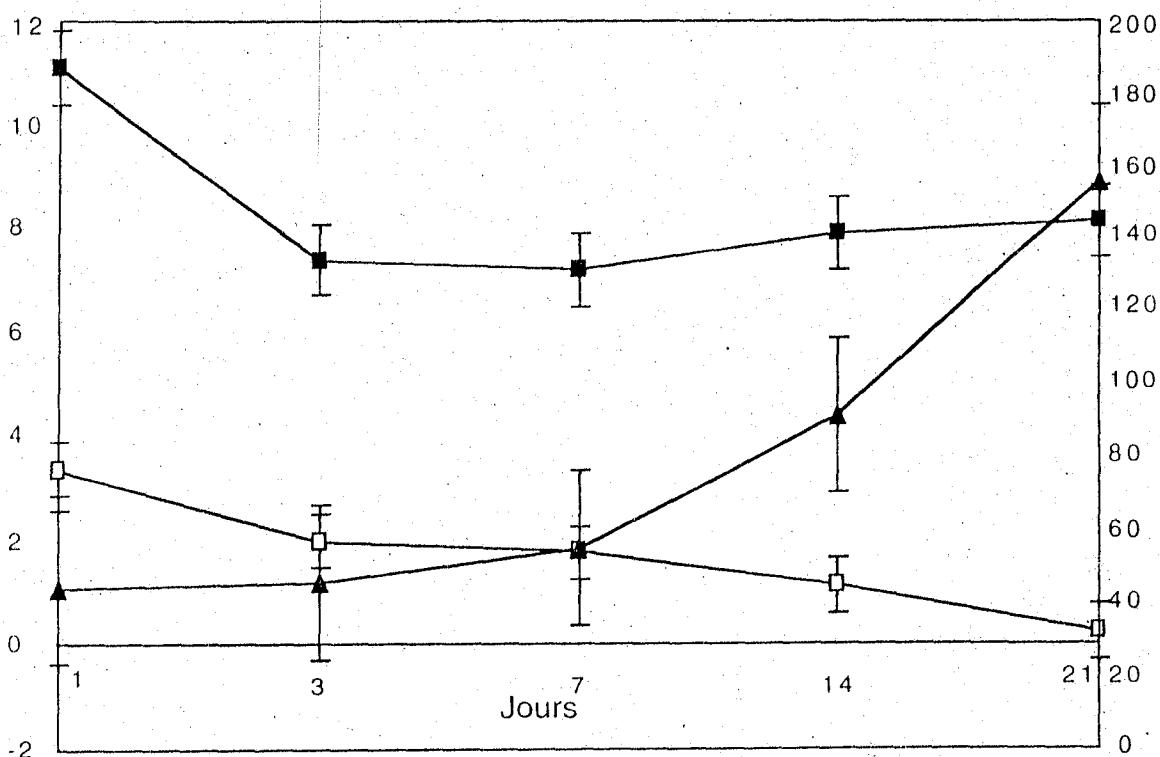
Parmi les composés exsudés figurent en premier lieu, des constituants du métabolisme primaire des végétaux et principalement des sucres et des acides aminés, nous ne les avons pas dosés, par contre nous avons dosé les composés phénoliques de ces exsudats racinaires et racines qui font partie du métabolisme secondaire (voir Chapitre I).

Divers facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer l'exsudation racinaire, les conditions expérimentales détaillées dans le chapitre II doivent être bien contrôlées par exemple axénie totale afin d'éviter toute influence des microorganismes indésirables, les facteurs externes (lumière, température et humidité standardisées) et les milieux simples (eau distillée stérile, sable imbibé d'eau stérile), toutes ces conditions de milieu sont en effet connues pour faciliter l'exsudation racinaire (Hale et Moore, 1979).

Le dosage des composés phénoliques des exsudats racinaires et racines est réalisé par la méthode de Bleu de Prusse citée auparavant dans le chapitre II, les résultats sont présentés dans la figure 16.

La composition phénolique des exsudats racinaires et racines était déterminée pendant les 21 jours de la croissance de racine (1, 3, 7, 14, et 21 jours). Les plantes sont cultivées dans du sable humide pour faciliter l'exsudation racinaire, et de plus celle-ci est 10 fois plus élevée par rapport à l'exsudation sur l'eau distillée (Hale et Moore, 1979; D'Arcy-Lameta, 1982).

La teneur en composés phénoliques des racines est plus élevée au premier jour de l'ordre de 187 mg/g. Cette teneur diminue alors du 1^{er} jour au 3^{ème} jour puis devient stable du 3^{ème} jour de l'ordre de 145 mg/g. De la même façon,



- Teneur en composés phénoliques dans les exsudats racinaires exprimés (en eqs ac. gallique) par g de matière sèche
- Teneur en composés phénoliques dans l'extrait de racines exprimés (en eqs ac. gallique) par g de matière sèche
- ▲ Quantité de phénols exprimée en mg par unité de racine

Figure 16. Cinétique des composés phénoliques des exsudats racinaires de *Vicia faba* cv Blandine

Chaque point représente la moyenne de 3 répétitions

l'exsudation phénolique des racines est très importante le 1^{er} jour 3.5 mg/g et diminue alors, lentement jusqu'au 21 jour 0.26 mg/g.

La quantité de phénols par racine est faible pendant le 1^{er} jour 1.6mg/g et augmente fortement du 3^{ème} jour au 21^{ème} jour et atteint 8.8 mg/g par racine.

5. Nature chimique de produits d'exsudation

L'exsudation des composés phénoliques porte sur les molécules flavoniques qui peuvent avoir une relation avec le sol et sa population microbienne. Pour la graine, la flore bactérienne du sol vient tout d'abord en contact avec les téguments qui jouent un rôle de protection. Nous avons étudié et analysé le *pattern* phénolique des différents compartiments de la graine des deux cultivars et mutants de *Vicia faba* et le *pattern* phénolique des exsudats racinaires et racines de cv Blandine.

L'analyse des composés phénoliques a été réalisée par CLHP couplée à la spectrométrie UV. Les résultats sont illustrés dans la figure 17 pour les cvs Alfred et Blandine. Les classes phénoliques des échantillons ont été déterminées par comparaison aux temps de rétention et spectres UV des témoins.

5.1 cv Alfred

Le *pattern* phénolique des téguments de cv Alfred est dominé par les tannins condensés et flavones. La graine entière et les cotylédons renferment des acides phénols et catéchines quant aux flavones elles restent des composés mineurs dans ce type de compartiment.

5.2 cv Blandine

Le *pattern* phénolique des téguments de cv Blandine contiennent des flavones, des flavonols, des acides phénols et un dihydroflavonol; Le *pattern* phénolique de la graine entière et des cotylédons est basé essentiellement d'acides phénols.

Du point de vue qualitative, le tableau 14 résume le *pattern* phénolique des exsudats racinaires et racines. Les principaux composés phénoliques mis en évidence appartiennent aux classes chimiques suivantes: acides phénols, dérivés

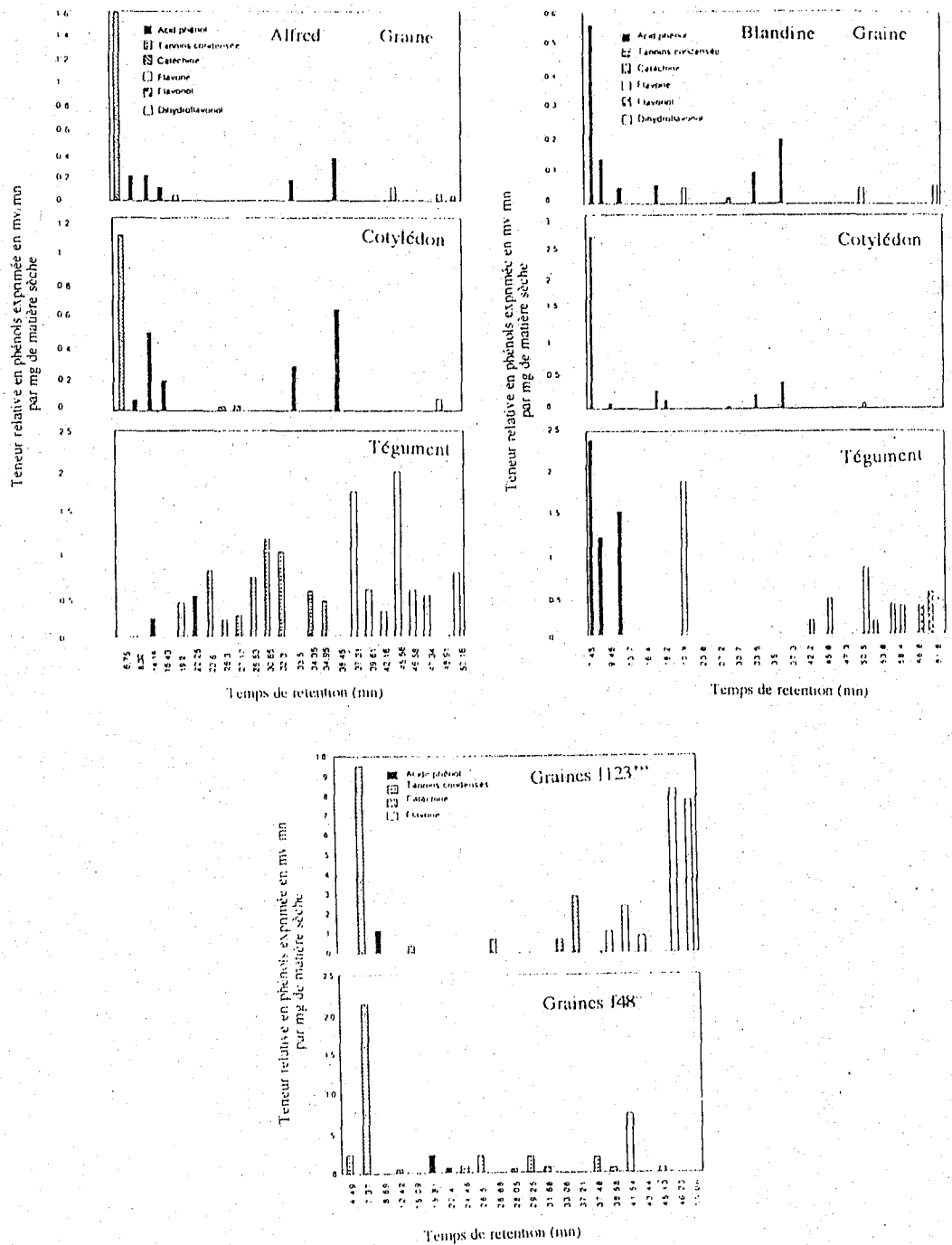
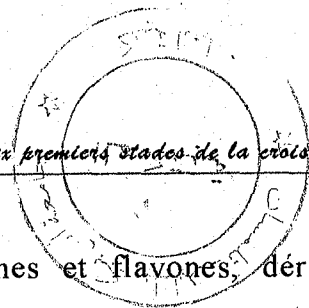


Figure 17. Distribution des composés phénoliques des exsudats de graines, de téguments et cotylédons de *Vicia faba* cv Alfred, Blandine et les exsudats de graines de deux mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻

(λ_{max} = 280 nm, gradient 1)

N° des pics	Temps de retention de chaque pic (mn)	UV λ max (nm)	Composés détectés à 280 nm
Exsudats racinaires			
1	12.4	268	acid phénol
2	13.2	265	acid phénol
3	19.8	275	flavanol
4	23.6	272,354	flavone
5	24.2	272,327	flavone
6	28.3	272	acid phénol
7	33	266	acid phénol
8	34.1	275	flavanol
9	45.7	268	acid phénol
10	46.6	275, 330	
11	54.3	286	flavanone
12	55.7	280	dérivé catéchique
Racines			
1	5.63	275	dérivé catéchique
2	7.75	277	dérivé catéchique
3	10.56	275	dérivé catéchique
4	13.58	256	dérivé catéchique
5	14.38	255	dérivé catéchique
6	23.68	264	dérivé catéchique
7	37.95	276	dérivé catéchique
8	41.00	270,330	flavone
9	43.17	273,330	flavone
10	50.57	284,325	flavanone
11	63.9	295	flavanone

**Tableau 14. Analyse par CLHP des exsudats racinaires
Et racines de *Vicia faba* cv Blandine, (λ max =280nm, gradient 2).**



catéchiques, et flavanones dans les extraits de racines et flavones, dérivés catéchiques et flavanones dans les exsudats racinaires.

5.3 Les mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻

5.3.1 Graines

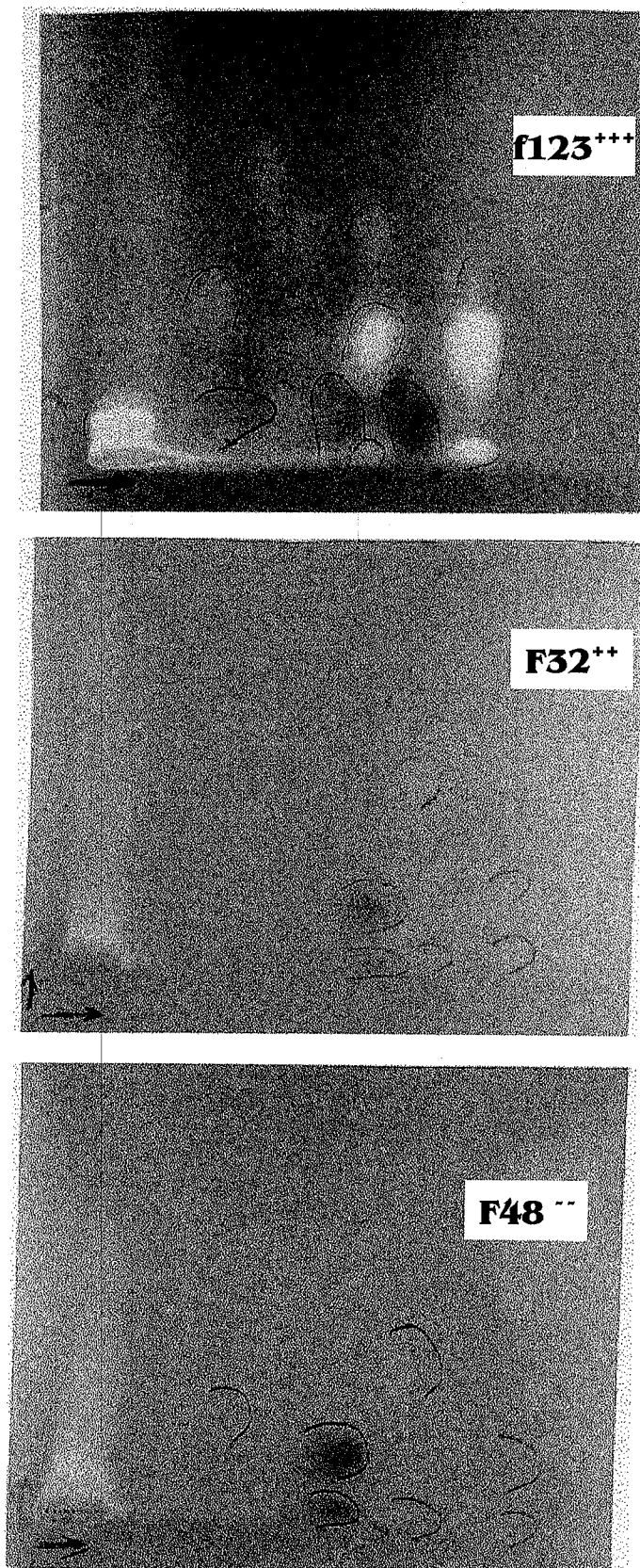
Nous avons réalisé une chromatographie bidimensionnelle pour les 3 mutants dont le premier développement avec un solvant de migration toluène-méthanol-méthyle éthyl cétone (4:3:3) et le second développement avec un solvant de migration eau-méthanol-méthylethylcétone-acétyl acétone (13:3:3:1), les résultats sont présentés dans la figure (18). Ces figures pour les 3 mutants nous révèlent la présence de flavones de couleur brun violet et des acides phénols de couleur fluorescent au bleu pâle, la plupart des composés polymères (les tannins condensés) n'ont pas migré.

L'analyse par CHLP des composés phénoliques des exsudats de graines de ces deux mutants f123⁺⁺⁺ et f48⁻ sont présentés dans la figure 17. Les résultats de cette analyse montrent que le *pattern* phénolique de le f123⁺⁺⁺ renferment 4 classes phénoliques: les acides phénols, les flavones, les dérivés catéchiques et les tannins condensés. En ce qui concerne le f48⁻, le *pattern* phénolique de celle-ci est constitué de flavones, de dérivés catéchiques, d'acides phénols et de tannins condensés.

5.3.2 Cas particulier des téguments

La chromatographie bidimensionnelle pour les téguments des trois mutants nous à révélé des flavones et des acides phénols (figures 19). Les composés du premier développement représente la fraction F1 et les composés du second développement représente la fraction F2.

Le suivi CLHP de la fraction F1 des téguments de f123⁺⁺⁺, f48⁻ et f32⁺⁺ est illustré dans la figure 19. Le *pattern* phénolique de la f123⁺⁺⁺ est constitué principalement d'acides phénols, de dérivés catéchiques et une flavone, celui de la f48⁻ est représenté par les acides phénols et les catéchines alors que la f32⁺⁺ ne renferme que les acides phénols.



Chromatographie bidimensionnelle
 Support : polyamide
 Solvant:
 1^{ère} dimension: toluène-méthanol-
 méthyl-éthyl-cétone 4:3:3
 2^{ème} dimension: eau-méthanol-méthyl
 éthyl cétone-acéthyl acétone 13:3:3:1

Figure 18. Composés phénoliques exsudés par les graines des trois mutants (f123⁺⁺⁺, f32⁺⁺, f48⁻⁻).

a) Phénols totaux : méthode au Bleu de Prusse (Prince et Butler, 1977), elle s'est avérée plus sensible et plus reproductible que celle de Folin-Ciocalteu (Marigo, 1973) ou celle de Folin-Denis (Swain et Hillis, 1959).

b) Tannins condensés

- production d'anthocyanidines (PA) par oxydation au BuOH-HCl (Bate - Smith, 1973) : cette technique dénombre toutes les unités monomères des seuls polymères.
- test vanilline (Va) (Burns, 1971): il est sensible aux unités terminales des molécules, y compris les monomères catéchiques libres.

1. Dosage des phénols totaux utilisant la méthode de bleu de Prusse

Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par les composés phénoliques, qui conduit à la formation d'un complexe de couleur bleu de Prusse d'où le nom de la méthode.

Le protocole de cette méthode est le suivant :

- Une prise d'essai de 7 ml d'extrait est additionnée de 10 ml d'eau distillée
- On ajoute 1 ml de réactif de chlorure ferrique ($FeCl_3$: 0.1 M dans HCl 0.1 N) suivi immédiatement de 1ml d'hexacyanoférate de potassium ($K_3 Fe(CN)_6$: 0.008 M dans l'eau).
- Laisser réagir 10 mn exactement à température ambiante
- Lire l'absorbance à 725 nm et soustraire la valeur du blanc (H_2O + réactifs) dosé après le même temps. Une gamme étalon est établie avec une solution d'acide gallique standard (Sigma). La figure 14 représente la courbe étalon d'acide gallique réalisé avec le réactif de bleu de Prusse

2. Dosage des tannins condensés

Pour le dosage des tannins condensés deux méthodes complémentaires ont été utilisées: le test de vanilline et la production d'anthocyanidines par oxydation en milieu alcool-acide et à chaud.

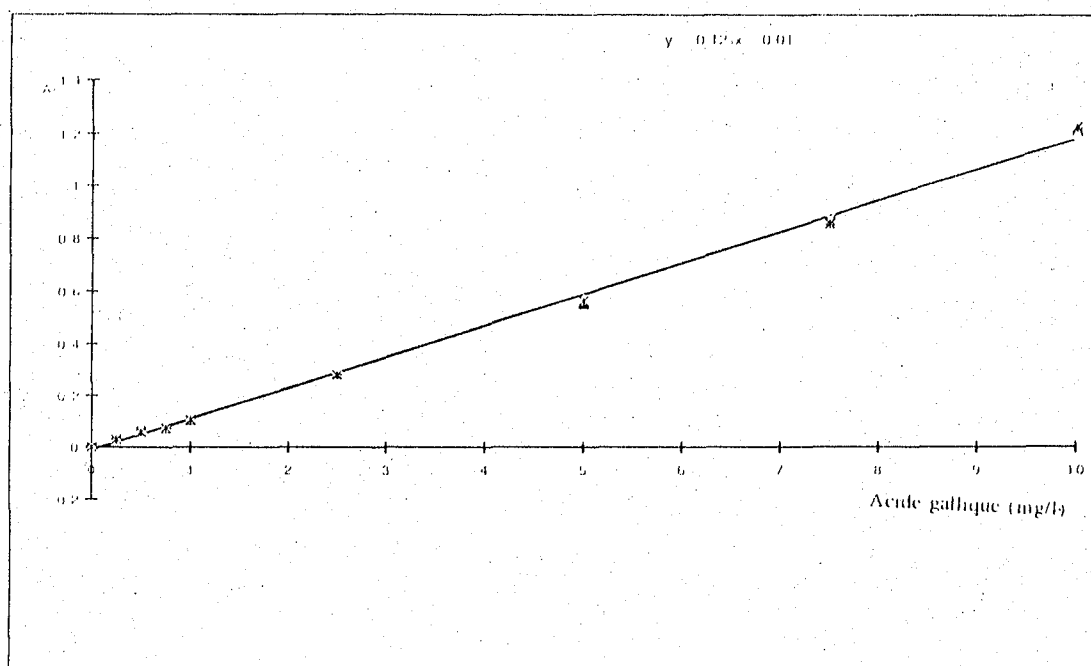


Figure 14. Courbe étalon de l'acide gallique réalisée avec le réactif bleu de Prusse

2.1 Test de vanilline

La vanilline se fixe sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine (polymérisée ou non) pour former un groupement chromophore dont la couleur orangée est lue à 500 nm.

Le protocole utilisé est le suivant :

Le réactif est préparé extemporanément, à volumes égaux, d'une solution de vanilline à 5.8 % dans le méthanol et d'une solution d'acide chlorhydrique à 24% dans le méthanol.

- 5ml de réactif vanilline-HCl sont ajoutés à 1 ml d'extrait phénolique
- la réaction se déroule au bain-marie à 30°C pendant 20 mn;
- l'absorbance est lue à 500 nm;
- la catéchine est le plus souvent utilisée comme standard;
- les calculs de teneurs sont référencés à une droite de calibration réalisée à partir de (+)-catéchine;
- les tannins sont exprimés en équivalents catéchine pour le test vanilline.

Cette méthode mesure le nombre de molécules de polymères quelque soit le degré de polymérisation, et aussi le nombre de molécules de catéchine monomère libre. La figure 15 représente la reproductibilité du test de vanilline sur une solution de (+) catéchine.

2.2 Production d'anthocyanidines par oxydation à chaud

Cette méthode consiste en une oxydation à chaud des tannins condensés en unités monomères anthocyanidines Bate-Smith (1973). La présence d'alcool augmente le rendement de la réaction et permet ainsi de travailler avec une faible quantité d'acide (Brun, 1991).

Le protocole ainsi défini est le suivant :

- 0.5 ml de l'extrait polyphénolique sont ajoutés à 6 ml d'une solution de BuOH-HCl concentré (95/5)
- 0.2 ml de sulfate d'ammonium ferrique ($\text{NH}_4 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) à 2% dans HCl
- la solution est agitée et laissée au bain-marie à 100°C pendant 2 heures.
- l'absorbance des hydrolysats est mesurée à 550 nm.

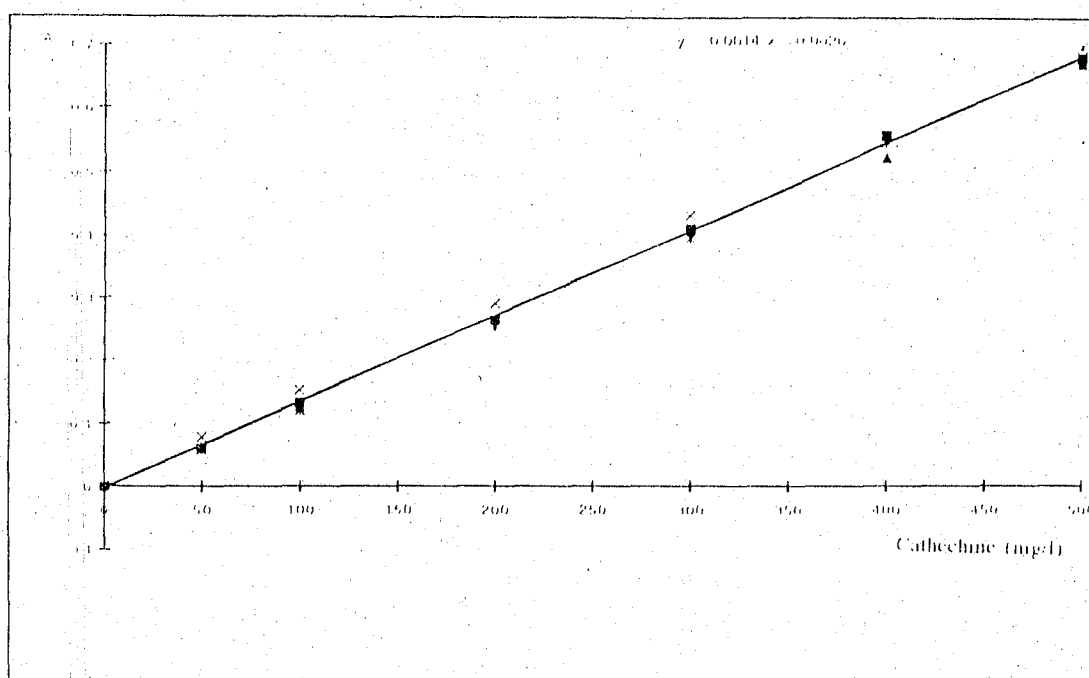


Figure 15. Reproductibilité du test de vanilline sur une solution de (+) catéchine

La densité optique à cette longueur d'onde permet le calcul de la teneur en proanthocyanidines, exprimées en mg/g d'anthocyanidines grâce à la formule suivante :

$$T = A/E.Vd/P.$$

A= Absorbance à la λ max

E1% 1cm= coefficient d'extension massique =150 (Bate-Smith 1973)

V = volume de l'extrait total

d = facteur de dilution

P = poids de la matière sèche.

3. Méthodes de séparation et de détermination des structures chimiques fonctionnelles

3.1 Procédés de séparation

3.1.1 Extraction directe du matériel végétal

3.1.1.1 les graines

Les graines intactes des deux cultivars Blandine et Alfred ainsi que les mutants (f123⁺⁺⁺, f48⁻) ont été agitées dans 200 ml d'H₂O pendant 24 heures à 30°C. La phase aqueuse est réduite à 50 ml puis épuisée successivement par le n-Butanol, cette fraction est évaporée à sec puis reprise dans 1 ml de méthanol.

3.1.1.2 les exsudats racinaires

Pour récupérer les exsudats racinaires nous avons utilisé la même technique citée auparavant. La solution hydrométhanolique est évaporée à sec puis reprise dans l'eau et extraite 3 fois par le n- butanol. Cette fraction butanolique concentrée sous vide à 40°C est reprise dans 1 ml de méthanol pour l'analyse des composés phénoliques.

3.1.1.3 les racines

Les racines qui ont servi à récupérer les exsudats racinaires auparavant sont broyées en présence d'azote liquide, puis mélangées avec méthanol-eau (7:3) à chaud sous reflux pendant 2 x 20 mn. Afin d'éviter le phénomène d'oxydation dans

les extraits polyphénoliques on a utilisé du métabisulfite de sodium à 0.2% dans l'eau à raison de 1 ml par 100 ml de solvant (Brun, 1991; Mergham, 1995).

La solution hydrométhanolique est évaporée à sec puis reprise dans l'eau. Cette phase aqueuse est épuisée successivement avec le n- butanol puis concentrée sous vide et récupérée dans 1 ml de méthanol pour la séparation et l'identification des composés polyphénoliques.

3.1.2 Extraction après hydrolyse

Elle consiste en la libération des aglycones flavoniques de leurs formes hétérosidiques correspondantes par traitement chlorhydrique. Pour cela 3 ml de (HCl 2N) sont mélangés à l'extrait méthanolique des racines puis ce mélange est mis au bain-marie bouillant à 100°C pendant 60 mn. Après refroidissement de la phase aqueuse, cette dernière est épuisée par l'éther éthylique puis reprise dans du méthanol après avoir évaporé à sec l'éther éthylique.

3.2 Procédés de caractérisation

3.2.1 Traitement des différentes fractions par C.C.M

Nous avons surtout utilisé la chromatographie bidimensionnelle pour comparer le pool phénolique des exsudats de graines, racines et les racines des cultivars et des mutants de la féverole. Un extrait préparé selon les techniques précédentes est déposé dans un coin de la couche mince, puis développé dans un premier solvant, puis dans un deuxième perpendiculairement au premier. La visualisation des résultats est réalisée sous lumière UV (365 nm).

Selon les emplois, on fait appel, soit à des couches minces achetées, soit préparées dans le laboratoire avec un étaleur Desaga permettant de faire 5 plaques de 20 x 20 cm. Les supports employés sont les suivants : polyamide, cellulose. Les solvants employés sont les suivants :

t-butanol-acide acétique-eau (3.1.1) et acide acétique à 15%

3.2.2 Analyse des composés phénoliques par CLHP couplée à barrette de diodes (CLHP/UV)

Le couplage de la CLHP à un détecteur à barrette de diodes permet d'obtenir le spectre U.V. visible de chacun des pics du chromatogramme. Cette technique nous donne une première indication sur l'identité des composés détectés.

Les conditions d'utilisation sont les suivantes :

- . Le type d'appareil utilisé : Kontron HPLC System 420
- . détecteur Kontron Instruments 991
- . Colonne de type C18 est à polarité inversée (Nucléosil 5 μ m – 30 cm, Société Française de Chromatographie)
- . Précolonne : SE30, Nucléosil
- . Solvants

Solvant A : Acide acétique 2% dans l'eau

Solvant B : Acétonitrile / eau / acide acétique dans les proportions
800:200:20 pour un débit de 0.8 ml /mn

- . Gradients

Gradient 1 : 2% de A en 10 mn; 15% de B dans A en 15 mn; 50% de B dans A en 62 mn; 2% de B dans A en 15 mn

Gradient 2 : 5% de A en 5 mn; 15% de B dans A en 10 mn; 70% de B dans A en 30 mn; 90% de B dans A en 15 mn; 5% de A en 15 mn

- . Détection : 280 nm

- . Volume injecté : 20 μ l

Chaque pic obtenu est enregistré et une analyse spectrale UV/visible permet de visualiser les spectres d'absorption des produits contenus dans le pic. En général le spectre d'absorption dans le méthanol des composés flavoniques et dérivés, présente deux bandes :

- la bande I située entre 320 et 380 nm

- la bande II située entre 240 et 280 nm

La position de la bande I permet, en général, de distinguer la structure flavone de la structure flavonol :

et $(M+Na)^+$ sont illustrés dans le tableau 9 (Xian-guo He et *al.*, 1996). La même technique a été utilisée dans l'analyse des acides phénoliques et aldéhydes, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10 (Gioacchini et *al.*, 1996).

Conditions d'utilisation sont les suivantes:

Les analyses ont été effectuées au service Central d'analyse du CNRS (Vernaison, Lyon) sur un spectrophotomètre de type Hewlett Packard.

Masse mesurée: 80-500u

Température: 140°C

CE: 110 V

ES: interphase est HP Analytica of Brandfort

Température N2: 250°C

D. Méthode microbiologique

1. Introduction

L'acquisition, ces dernières années, de connaissances précises sur les gènes des *Rhizobium* spp. impliqués dans la nodulation, a montré que l'expression des gènes *nod* communs était une condition nécessaire pour la réussite de l'infection de la racine par la bactérie. L'activation de ces gènes nécessite outre le produit du gène *nod D*, la présence d'un composé de type flavonique émis par la plante. Il a été montré également que la concentration de ce composé dans la rhizosphère pouvait être un facteur limitant de la nodulation, de la fixation d'azote et de la croissance de la plante (Kapulnik et *al.*, 1987; Jain et *al.*, 1990).

Notre objectif est plus spécialement consacré à l'étude de l'action des exsudats de graines, racines et extraits de racines des cultivars Blandine et Alfred et les mutants ($f123^{+++}$, $f32^{++}$, $f48^{-}$) sur la croissance de micro-organismes plus particulièrement *Rhizobium leguminosarum*. L'acquisition de connaissances concernant l'expression de gènes *nod* et l'identification des flavonoïdes activateurs de ces gènes constituent une phase essentielle de ce projet.

N° des pics	Composés	Temps de retention (mn)	(M+H) ⁺ m/z	(M+Na) ⁺	UV λ _{max} (mn)
1	Daidzin	13.0	414	439	256, 313 e
2	Genistin	14.6	433	455	261, 330 e
3	Isoquercetrin	15.6	465	487	255, 365
4	Daidzein	18.1	255	277	249, 259 sh, 303sh
5	Quercetin	18.6	303	325	255, 370
6	Genistein	19.7	271	293	261, 328 sh
7	Biochanin A	23.7	285	307	261, 330 sh

Tableau 9. Analyse des flavonoides standards par CLHP-ES-SM..
(Xian-Guo He et al.; 1986)

Acides phénols et aldéhydes	Temps de retention (mn)	(M-H)-
Acide gallique	6.80	169.1
Acide <i>p</i> -hydrobenzoïque	9.27	137.1
Acide <i>p</i> -hydroxyphenylacétique	10.80	151.2
Acide vanillique	10.53	167.1
Acide syringique	11.66	197.2
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	13.01	121.1
Vanilline	16.16	151.1
Acide <i>p</i> -coumarique	16.20	163.2
Syringaldehyde	19.00	181.2
Acide ferulique	18.95	193.2

Tableau 10. Analyse des acides phénols et aldéhydes par CLHP-ES-SM.
(Gioacchini et al.; 1996)

2. Matériel et méthodes

2.1 Souche utilisée

La souche *Rhizobium leguminosarum* est 8401pRL1JI (fournie par le Dr Allain Downie du centre John Innes, Norwich Research Park). Cette souche porte un plasmide (pIJ1477) sur lequel une fusion entre le promoteur des gènes *nod* communs et le gène de structure, *lac Z*, d'*Escherichia coli* codant pour l'enzyme β -galactosidase a été réalisée (*nod C* - *lac Z*).

2.2 Milieux de culture

- milieu TY :

Bactron-trypton	5g
Yeast extract	3g
H ₂ O	1000 ml
Faire une solution mère de 6000 mM de :	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1.3 g/10 ml
ou CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.882g/10 ml

rajouter à raison de 6 mM soit 50 μ M/ml

Le milieu solide correspondant est obtenu par addition de 15g/l d'agar (Difco).

- tampon Z

KCL	0.01 M
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	0.04 M
Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O	0.04 M
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.001 M
β -mercaptoéthanol	0.05 M

additionné extemporanément; pH à 7.

2.3 Origine des composés phénoliques testés

Les extraits phénoliques testés sur la bactérie *nod C* - *lac Z* sont les suivants:

- les exsudats de graines et de racines des cultivars et des mutants de *Vicia faba* :

- cultivars
 - cv Blandine nodulant
 - cv Alfred nodulant
- Mutants
 - f123⁺⁺⁺ nodulant précoce
 - f32⁺⁺ hypernodulant
 - f48⁻ non nodulant

- Les molécules de référence

Les molécules de référence utilisées dans les différentes expérimentations ont été la naringénine, la (+) Catéchine, et D catéchine et apigénine.

2.4 Méthodes d'étude de l'expression des gènes *nod* communs

2.4.1 Criblage des inducteurs

L'induction des gènes de la nodulation de la souche 8401pRL1JI est étudiée en mesurant l'activité β -galactosidase qui traduit l'expression des gènes *nod* communs.

La souche 8401pRL1JI est cultivée jusqu'en phase exponentielle de croissance (3j) dans le milieu TY additionné de 2 μ l de tétracycline à 28°C (l'absorbance est mesurée à 600 nm comprise entre 0.4 et 0.6).

Une série de tubes contenant 4.5 ml de milieu TY sans antibiotique estensemencée avec 0.5 ml de culture de la souche 8401pRL1JI. Les bactéries sont cultivées 8 h supplémentaires puis les molécules à tester et les flavonoides de référence sont ajoutées.

Chaque série comporte également des témoins non induits, additionnés uniquement de méthanol. L'induction est réalisée sur une période de 12 à 14 h (l'activité β -galactosidase atteint son maximum après 6 h à 8 h de culture puis se maintient constante; Sutherland et *al.*, 1990; Smit et *al.*, 1992) et les tubes sont déposés dans la glace fondante pour stopper la synthèse de l'enzyme et la croissance des souches. L'activité β -galactosidase est ensuite mesurée par des parties aliquotes des cultures.

2.4.2 Détermination de l'activité β -galactosidase

- l'absorbance de la culture est mesurée à 600 nm.
- 0.5 ml de culture (3 répétitions) est mélangé à 0.5 ml de tampon Z.
- 100 μ l de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont agités rapidement puis placés dans un bain-marie à 30°C, 10 minutes.
- la réaction débute après l'addition de 150 μ l du substrat de la β -galactosidase, une solution de rouge de chloro-phénol β -D-galactopyranoside (RCPG, Boehringer Mannheim) dans le tampon Z (RCPG à 4 mg/ml de Tampon Z). La suspension est homogénéisée puis laissée à incuber à 30°C.
- lorsque la réaction est suffisamment développée (apparition d'une coloration rouge due au rouge de chloro-phénol libéré par l'hydrolyse du substrat par la β -galactosidase) elle est arrêtée par immersion des tubes 5 min dans un bain-marie à 60°C.
- Après centrifugation des tubes 5 min à 11 000 g, l'absorbance du surnageant est mesurée à 574 nm, correspondant à la longueur d'onde optimum d'absorbance du rouge de chloro-phénol.
- l'activité β -galactosidase est calculée selon la formule suivante:

$$1 \text{ unité } \beta\text{-galactosidase (U)} = 1000 \frac{A_{574}}{A_{600} \cdot t \cdot V}$$

-avec :

A 574 : absorbance du rouge de chloro-phénol produit par hydrolyse.

A 600 : absorbance de la culture de la souche 8401 pRL1JI testée.

t : durée de la réaction enzymatique (min)

V : volume de culture utilisé (ml)

Les modifications, par rapport au protocole de Miller (1972), sont les suivantes:

- absence de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 0.1%: en présence de SDS les activités β -galactosidases sont diminuées de 2 à 5 fois

- le RCPG a été utilisé à la place de l'ortho-nitro-phényl β -D galactopyranoside (ONPG) car il permet une sensibilité 8 fois plus importante (Banfalvi et *al.*, 1988)
- la réaction est stoppée par chauffage et non par alcalinisation du milieu avec le carbonate de sodium qui provoque une hydrolyse du RCPG.

CHAPITRE III

**Physiologie de l'exsudation
et métabolisme phénolique
de *Vicia faba* aux premiers
stades de la croissance**

CHAPITRE III. PHYSIOLOGIE DE L'EXSUDATION ET MÉTABOLISME PHÉNOLIQUE DE *VICIA FABA* AUX PREMIERS STADES DE LA CROISSANCE

1. Introduction

Il existe peu de travaux portant sur l'exsudation phénolique des différents tissus de la graine et l'exsudation racinaire chez les cultivars de *Vicia faba* "Blandine" et "Alfred" ainsi que ses mutants qui sont représentés par le nodulant précoce f123⁺⁺⁺, le non nodulant f48⁻ et l'hypernodulant f32⁺⁺.

Une seule étude a été faite par Tomas-Lorente et *al.*, (1990) qui ont mis en évidence dans les exsudats de graines de *Vicia faba* deux flavones 7,4'-dihydroxyflavone, 7, 3', 4'-trihydroxyflavone, des flavonols quercétine, kaempferol et des flavonols glycosylés quercetin 7-glucoside, kaempferol 7-glucoside. D'autres travaux ont été surtout focalisés sur l'étude des facteurs antinutritionnels (FAN) phénoliques de *Vicia faba* cités dans le chapitre I.

Dans cette première partie, nous allons déterminer dans quelle partie de la graine (téguments ou cotylédons) sont localisés les composés phénoliques et quelles sont les parties impliquées dans l'exsudation phénolique après 24 h d'imbibition dans l'eau à deux températures 4°C et 30°C pour les deux cultivars de *Vicia faba*, l'une nommée cv Blandine et l'autre nommée cv Alfred et ses mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻ et f32⁺⁺.

Parmi les constituants des exsudats racinaires définis au chapitre I, les substances diffusibles solubles ont une importance considérable sur la croissance des microorganismes de la rhizosphère et, entre autres, des *Rhizobium*. Il nous a donc paru intéressant d'étudier la cinétique de l'exsudation racinaire pendant le 1^{er}, 3, 7, 14 et 21^{ème} jours de la croissance racinaire de *Vicia faba* cv Blandine.

L'analyse par CLHP et les techniques phytochimiques ont été utilisées pour l'étude de la nature des composés phénoliques exsudés par les différentes parties de la graine (téguments et cotylédons), exsudats racinaires et les racines.

2. Rôle de la température sur l'exsudation phénolique potentielle des divers compartiments de la graine

2.1 Cas des phénols totaux

La quantité de composés phénoliques exsudée par la graine entière, les téguments et les cotylédons après 24 h d'imbibition dans l'eau distillée est représentée dans le tableau 11. La quantité de phénols totaux contenue essentiellement dans chaque partie de la graine et la graine intacte est évaluée après extraction à chaud dans une solution hydrométhanolique, ces résultats sont indiqués dans le tableau 11.

A une température de 4°C, les graines entières de cv Blandine et cv Alfred exsudent respectivement 0.7 mg/g et 0.2 mg/g comparé à la quantité totale contenue dans la graine entière 2.41 mg par unité de graine pour cv Blandine et 2.71 mg par unité de graine pour cv Alfred.

Les différences étaient observées quand l'exsudation des parties de la graine sont analysées séparément. Cependant les cotylédons et téguments de cv Blandine exsudent presque la totalité des composés phénoliques.

Pour les cotylédons de cv Blandine, nous obtenons une quantité de 3.14 mg par cotylédon comparé à la quantité totale de phénols de l'ordre de 2.71 mg par cotylédon, les téguments contiennent une quantité de 0.52 mg par tégument comparé à celle des phénols totaux de l'ordre de 0.61 mg par tégument.

Inversement, les téguments de cv Alfred exsudent seulement 25% de la quantité totale des composés phénoliques, ils contiennent ainsi 3.07 mg contre 12.07 mg par tégument. Les cotylédons de ce cultivar exsudent aussi moins de composés phénoliques 2.96 mg par unité de cotylédon contre 4.13 mg pour la quantité totale contenu dans cet organe.

A 30°C, l'exsudation phénolique est plus importante qu'à 4°C (tableau 11), pour cv Blandine 3.41 mg par unité de graine contre 0.7 mg par unité de graine à 4°C et pour cv Alfred 3.33 contre 0.22 mg par unité de graine. Des différences ont été obtenues aussi à 30°C pour les deux cultivars quand les cotylédons et téguments sont analysés séparément; par exemple les téguments de cv Blandine

Cultivars	Températures (°C)	Graine		Cotylédon		Tégument	
		A	B	A	B	A	B
<i>Vicia faba</i>	4	0.70 ± 0.27	0.70	3.77 ± 0.00	3.14	2.98 ± 0.04	0.52
	30	3.41 + 0.46	3.41	4.46 + 0.03	3.807	3.49 + 0.08	0.7
		2.41 (1) + 0.29	2.41	3.25 + 0.17	2.71	4.13 + 0.29	0.61
Blandine	4	0.22 ± 0.01	0.22	3.55 ± 0.39	2.96	17.54 ± 0.12	3.07
	30	3.33 + 0.25	3.33	5.72 + 0.07	4.77	46.16 + 0.1	8.07
		2.71 + 0.42	2.71	4.95 + 0.11	4.13	69.00 + 3.43	12.07
Alfred	4	0.22 ± 0.01	0.22	3.55 ± 0.39	2.96	17.54 ± 0.12	3.07
	30	3.33 + 0.25	3.33	5.72 + 0.07	4.77	46.16 + 0.1	8.07
		2.71 + 0.42	2.71	4.95 + 0.11	4.13	69.00 + 3.43	12.07

Tableau 11. Quantité de composés phénoliques exsudée après 24 h à 4°C et 30°C des graines de *Vicia faba* cv. Blandine et Alfred.

(A) Quantité des composés phénoliques exsudée par les graines, téguments et cotylédons (en éqs ac. gallique) exprimée en mg /g de matière sèche; (B) Quantité des composés phénoliques exsudée par les graines, téguments, cotylédons exprimée en mg par unité de graine, mg par unité de tégument et en mg par unité de cotylédon; (1) En caractères gras, teneur en phénols contenue dans les différents tissus de la graine par extraction à 80°C, exprimée comme en (A) et (B).
Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions.

exsudent 100% de phénols de l'ordre de 0.7 mg par unité de tégument comparé à la quantité totale 0.61 mg par tégument tandis que les téguments de cv Alfred exsudent seulement 67% près de 8.07 mg comparé à 12.07 mg pour la quantité totale de ces téguments.

2.2 Cas des polymères proanthocyanidines

Comme nous le montre le tableau 12, l'exsudation des tannins est faible dans les cotylédons de l'ordre de 0.108 mg par unité de cotylédon par rapport à la quantité élevée dans les téguments 4.9 mg par tégument et 7.63 mg par tégument respectivement à 4°C et 30°C. Ces composés polymères sont surtout localisés dans les téguments avec 11.37 mg par tégument. L'exsudation des tannins condensés des téguments est seulement de 43% à 4°C comparés à celle de 30°C où nous obtenons 67%. A 4°C, il en est de même pour la graine où l'exsudation atteint 31% de la quantité totale; tandis qu'à 30°C elle est quatre fois plus élevée que la quantité estimée par extraction à chaud.

Le dosage au BuOH-HCL nous amène aux mêmes conclusions que ceux obtenues avec le test de vanilline c'est à dire qu'à 30°C les graines exsudent plus de tannins condensés comparés à celles de 4°C; nous obtenons ainsi 5.14 mg par unité de graine contre 1.25 mg par unité de graine (tableau 12). L'exsudation des tannins condensés dans les cotylédons reste toujours faible de l'ordre de 0.15 et 0.56 mg par unité de cotylédon respectivement. La quantité en tannins condensés est très élevée dans les téguments seuls de l'ordre de 6.24 mg par unité de tégument à 4°C et 20.47 mg par unité de tégument à 30°C.

3. Comparaison des capacités globales d'exsudation des cultivars Blandine et Alfred et des mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻, f32⁺⁺

3.1 Intérêt génétique de ces mutants

Le nombre de mutants symbiotiques naturels chez la plante hôte reste faible. Pour pallier ce manque de variabilité, différents laboratoires sont passés au début des années 1980, à une nouvelle stratégie: l'utilisation de la mutagenèse.

Températures (°C)	Graine		Cotylédon		Tégument	
	Test vanilline					
	A	B	A	B	A	B
4	0.24 ± 0.02	0.24	0.13 ± 0.04	0.108	28.1 ± 1.14	4.9
30	3.04 ± 0.57	3.04	0.13 ± 0.04	0.108	43.62 ± 1.14	7.63
	0.77⁽¹⁾ ± 0.4	0.77	0.14 ± 0.03	0.11	65.02 ± 3.19	11.37

(A) Quantité de tannins condensée exsudée par les graines, téguments et cotylédons (en éqs catéchine) exprimée en mg/g de matière sèche; (B) Quantité de tannins condensés exsudée par les graines, téguments et cotylédons exprimée en mg par unité de graine, mg par unité de tégument et en mg par unité de cotylédon; ⁽¹⁾ En caractères gras, tannins condensés présents initialement dans les différents tissus par extraction à 80°C, exprimée comme en (A) et (B).

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

Températures (°C)	Graine		Cotylédon		Tégument	
	BuOH/HCL					
	A	B	A	B	A	B
4	1.25 ± 0.041	1.25	0.18 ± 0.002	0.15	35.7 ± 0.42	6.24
30	5.14 ± 0.008	5.14	0.68 ± 0.017	0.56	117 ± 0.32	20.47
	6.14⁽¹⁾ ± 0.05	6.14	0.33 ± 0.006	0.27	81.38 ± 0.29	14.25

(A) Quantité de tannins condensés exsudée par les graines, téguments et cotylédons (en mg/g d'après le E 1% = 150 de Bate-Smith pour le BuOH-HCl) exprimée en mg/g de matière sèche; (B) Quantité de tannins condensés exsudée par les graines, téguments et cotylédons exprimée en mg par unité de graine, mg par unité de tégument et par unité de cotylédon ; ⁽¹⁾ En caractères gras, tannins condensés présents initialement dans les différents tissus par extraction à 80°C, exprimée comme en (A) et (B).

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

Tableau 12. Quantité des tannins condensés exsudée après 24 h à 4°C et 30°C des raines de *Vicia faba* cv. Alfred

La création de mutants par cette technique offre deux avantages: d'une part, elle augmente la fréquence de mutation, et d'autre part, elle permet de travailler dans des contextes génétiques fixés (lignées pures).

Dans cette étude nous avons utilisé 3 mutants: absence de nodules (nod⁻) le f48⁻, un hypernodulant (nod⁺⁺) le f32⁺⁺ et le nodulant précoce (nod⁺⁺⁺) le f123⁺⁺⁺.

Les résultats obtenus auparavant chez les deux cultivars Blandine et Alfred nous ont montré que la température 30°C est favorable pour l'exsudation des composés phénoliques, pour cela nous avons estimé nécessaire d'utiliser cette température d'imbibition (30°C) pour évaluer le potentiel phénolique des exsudats libérés par les graines de ces mutants.

3.2 Exudation des phénols et tannins

Les résultats de la quantité des composés phénoliques sont résumés dans le tableau 13. En effet, l'exsudation phénolique de la graine entière est la même chez les deux mutants f123⁺⁺⁺ et f48⁻ de l'ordre de 2 mg par unité de graine et de l'ordre de 1.32 chez le mutant f32⁺⁺.

En ce qui concerne l'exsudation des tannins condensés, la graine des deux mutants f123⁺⁺⁺ et f32⁺⁺ exsude très peu de tannins condensés par rapport au mutant f48⁻, elles contiennent respectivement 1.82 et 0.87 mg par unité de graine (tableau 13). Le mutant f48⁻ exsude plus de tannins que les deux autres mutants (3,35 mg par unité de graine). Nous remarquons que les tannins condensés sont toujours localisés dans les téguments et que la quantité totale est de 3,52 mg par unité de tégument chez le mutant f123⁺⁺⁺, 3.73 mg par unité de tégument chez le f32⁺⁺ et 3,50 par unité de graines chez le f48⁻.

L'exsudation des composés phénoliques à 30°C des graines des cultivars Blandine, Alfred et les mutants f123⁺⁺⁺, f32⁺⁺, f48⁻ varie entre 2 et 3 mg par unité de graine. Nous constatons que les téguments de cv Alfred est plus riche en composés phénoliques que le cv Blandine et les mutants, nous obtenons ainsi 8.07 mg par unité de tégument chez Alfred contre 0.7 mg par unité de tégument chez Blandine, 2 mg pour f123⁺⁺⁺, 1.44 mg pour f32⁺⁺ et 2.36 mg pour f48⁻ (tableaux 11, 13).

<i>Vicia faba</i> Mutants	Graine		Tégument	
	Phénols			
	A	B	A	B
F123 ⁺⁺⁺	2.00 ± 0.09	2	20 ± 1.38	2
F32 ⁺⁺	1.32 ± 0.05	1.32	16 ± 1.05	2.36
F48 ⁻⁻	2.20 ± 0.2	2.2	16 ± 1.71	1.44

(A) Quantité des composés phénoliques exsudée par la graine et tégument (en eqs acide gallique) exprimée en mg/g de matière sèche.

(B) Quantité de phénol exsudée par la graine et téguments exprimée en mg par unité de graine et par unité de tégument.

Chaque résultat est la moyenne de 3 répétitions

<i>Vicia faba</i> Mutants	Graine		Tégument	
	Tannins condensés			
	A	B	A	B
F123 ⁺⁺⁺	1.82 ± 0.43	1.82	37,75 ± 1.01	3,52
F32 ⁺⁺	0.87 ± 0.03	0.87	25,22 ± 1.1	3,73
F48 ⁻⁻	3,35 ± 0.03	3,35	33,58 ± 0.34	3,50

(A) Quantité en tannins condensés exsudée par la graine et tégument (en eqs catéchine) exprimée en mg par g de matière sèche.

(B) Quantité en tannins codensés exsudée par la graine et tégument exprimée en mg par unité de graine et par unité de tégument.

Chaque résultat est la moyenne de 3 répétitions.

Tableau 13. Quantité en phénols et de tannins condensés exsudée après 24 h à 30°C par la graine entière et tégument des mutants de *Vicia faba* f123⁺⁺⁺, f48⁻⁻, f32⁺⁺.

Les tannins condensés sont toujours stockés dans les téguments de cv Alfred de l'ordre de 7.63 mg par unité de tégument et en moyenne de 3 mg par unité de tégument chez les 3 mutants. Le cultivar Alfred reste toujours un génotype riche en phénols et tannins condensés par rapport aux autres génotypes étudiés le cv Blandine et les mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻, f32⁺⁺ (tableau 12, 13).

4. Cinétique de l'exsudation chez cv Blandine

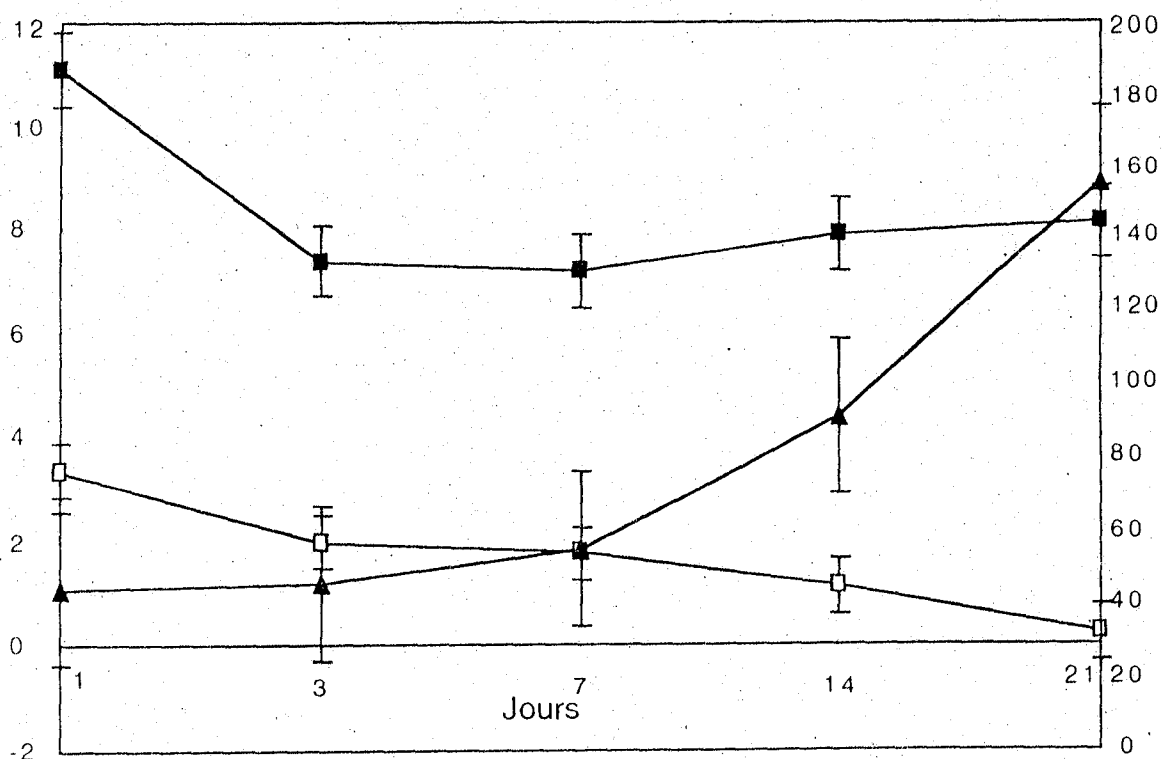
Parmi les composés exsudés figurent en premier lieu, des constituants du métabolisme primaire des végétaux et principalement des sucres et des acides aminés, nous ne les avons pas dosés, par contre nous avons dosé les composés phénoliques de ces exsudats racinaires et racines qui font partie du métabolisme secondaire (voir Chapitre I).

Divers facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer l'exsudation racinaire, les conditions expérimentales détaillées dans le chapitre II doivent être bien contrôlées par exemple axénie totale afin d'éviter toute influence des microorganismes indésirables, les facteurs externes (lumière, température et humidité standardisées) et les milieux simples (eau distillée stérile, sable imbibé d'eau stérile), toutes ces conditions de milieu sont en effet connues pour faciliter l'exsudation racinaire (Hale et Moore, 1979).

Le dosage des composés phénoliques des exsudats racinaires et racines est réalisé par la méthode de Bleu de Prusse citée auparavant dans le chapitre II, les résultats sont présentés dans la figure 16.

La composition phénolique des exsudats racinaires et racines était déterminée pendant les 21 jours de la croissance de racine (1, 3, 7, 14, et 21 jours). Les plantes sont cultivées dans du sable humide pour faciliter l'exsudation racinaire, et de plus celle-ci est 10 fois plus élevée par rapport à l'exsudation sur l'eau distillée (Hale et Moore, 1979; D'Arcy-Lameta, 1982).

La teneur en composés phénoliques des racines est plus élevée au premier jour de l'ordre de 187 mg/g. Cette teneur diminue alors du 1^{er} jour au 3^{ème} jour puis devient stable du 3^{ème} jour de l'ordre de 145 mg/g. De la même façon,



- Teneur en composés phénoliques dans les exsudats racinaires exprimées (en eqs ac. gallic) par g de matière sèche
- Teneur en composés phénoliques dans l'extrait de racines exprimées (en eqs ac. gallic) par g de matière sèche
- ▲ Quantité de phénols exprimée en mg par unité de racine

Figure 16. Cinétique des composés phénoliques des exsudats racinaires de *Vicia faba* cv Blandine

Chaque point représente la moyenne de 3 répétitions

l'exsudation phénolique des racines est très importante le 1^{er} jour 3.5 mg/g et diminue alors, lentement jusqu'au 21 jour 0.26 mg/g.

La quantité de phénols par racine est faible pendant le 1^{er} jour 1.6mg/g et augmente fortement du 3^{ème} jour au 21^{ème} jour et atteint 8.8 mg/g par racine.

5. Nature chimique de produits d'exsudation

L'exsudation des composés phénoliques porte sur les molécules flavoniques qui peuvent avoir une relation avec le sol et sa population microbienne. Pour la graine, la flore bactérienne du sol vient tout d'abord en contact avec les téguments qui jouent un rôle de protection. Nous avons étudié et analysé le *pattern* phénolique des différents compartiments de la graine des deux cultivars et mutants de *Vicia faba* et le *pattern* phénolique des exsudats racinaires et racines de cv Blandine.

L'analyse des composés phénoliques a été réalisée par CLHP couplée à la spectrométrie UV. Les résultats sont illustrés dans la figure 17 pour les cvs Alfred et Blandine. Les classes phénoliques des échantillons ont été déterminées par comparaison aux temps de rétention et spectres UV des témoins.

5.1 cv Alfred

Le *pattern* phénolique des téguments de cv Alfred est dominé par les tannins condensés et flavones. La graine entière et les cotylédons renferment des acides phénols et catéchines quant aux flavones elles restent des composés mineurs dans ce type de compartiment.

5.2 cv Blandine

Le *pattern* phénolique des téguments de cv Blandine contiennent des flavones, des flavonols, des acides phénols et un dihydroflavonol; Le *pattern* phénolique de la graine entière et des cotylédons est basé essentiellement d'acides phénols.

Du point de vue qualitative, le tableau 14 résume le *pattern* phénolique des exsudats racinaires et racines. Les principaux composés phénoliques mis en évidence appartiennent aux classes chimiques suivantes: acides phénols, dérivés

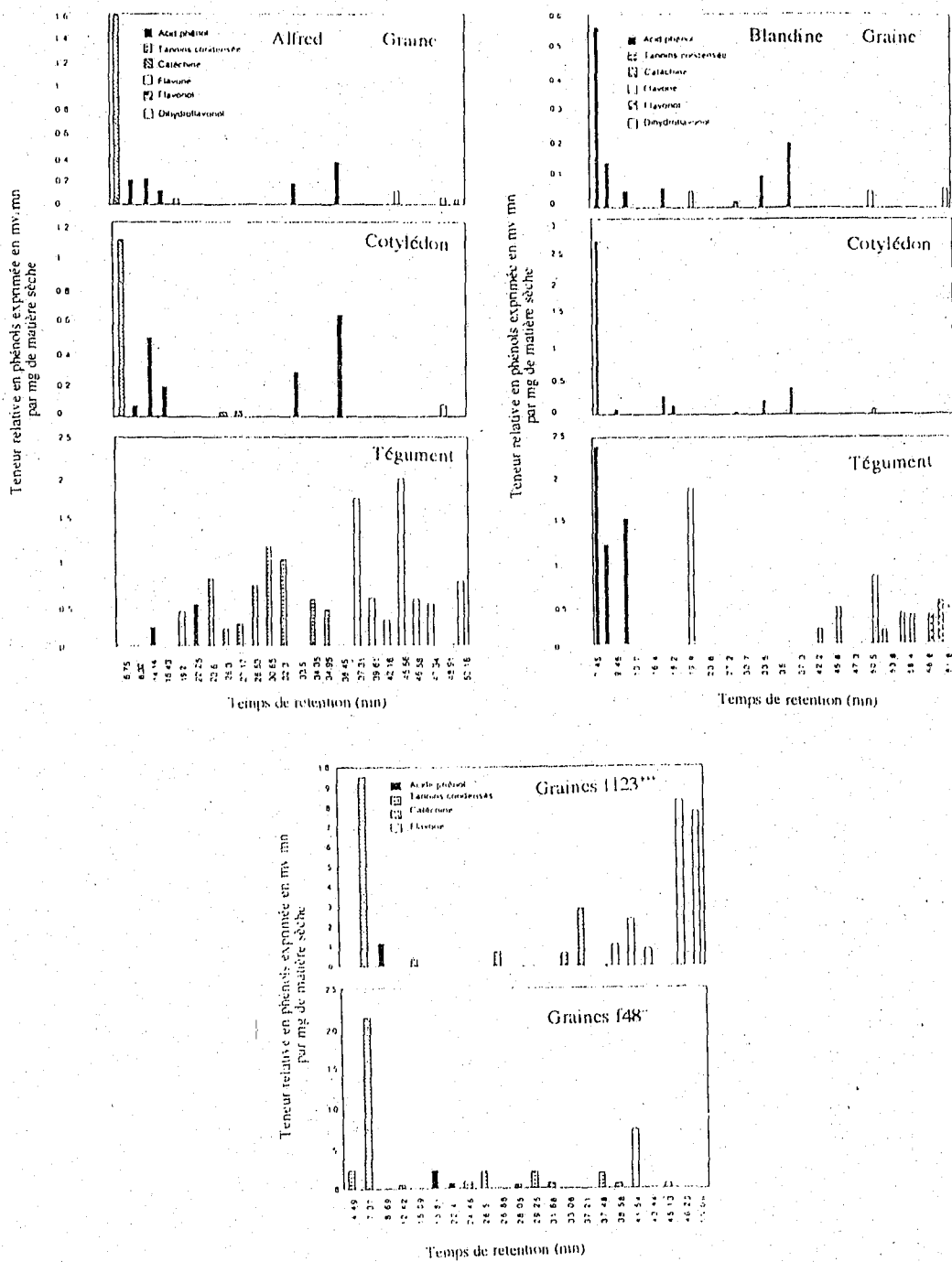
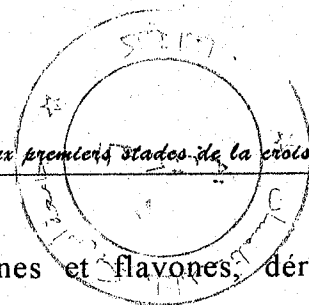


Figure 17. Distribution des composés phénoliques des exsudats de graines, de téguments et cotylédons de *Vicia faba* cv Alfred, Blandine et les exsudats de graines de deux mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻

(λ_{max} = 280 nm, gradient 1)

N° des pics	Temps de retention de chaque pic (mn)	UV λ max (nm)	Composés détectés à 280 nm
Exsudats racinaires			
1	12.4	268	acid phénol
2	13.2	265	acid phénol
3	19.8	275	flavanol
4	23.6	272,354	flavone
5	24.2	272,327	flavone
6	28.3	272	acid phénol
7	33	266	acid phénol
8	34.1	275	flavanol
9	45.7	268	acid phénol
10	46.6	275, 330	
11	54.3	286	flavanone
12	55.7	280	dérivé catéchique
Racines			
1	5.63	275	dérivé catéchique
2	7.75	277	dérivé catéchique
3	10.56	275	dérivé catéchique
4	13.58	256	dérivé catéchique
5	14.38	255	dérivé catéchique
6	23.68	264	dérivé catéchique
7	37.95	276	dérivé catéchique
8	41.00	270,330	flavone
9	43.17	273,330	flavone
10	50.57	284,325	flavanone
11	63.9	295	flavanone

**Tableau 14. Analyse par CLHP des exsudats racinaires
Et racines de *Vicia faba* cv Blandine, (λ max =280nm, gradient 2).**



catéchiques, et flavanones dans les extraits de racines et flavones, dérivés catéchiques et flavanones dans les exsudats racinaires.

5.3 Les mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻

5.3.1 Graines

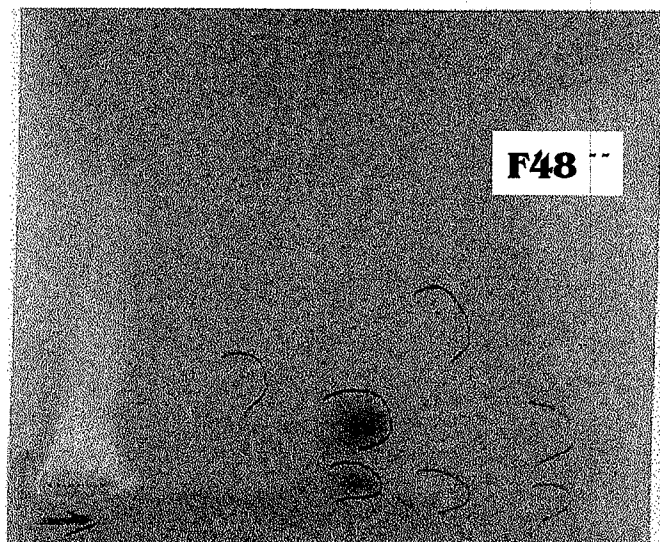
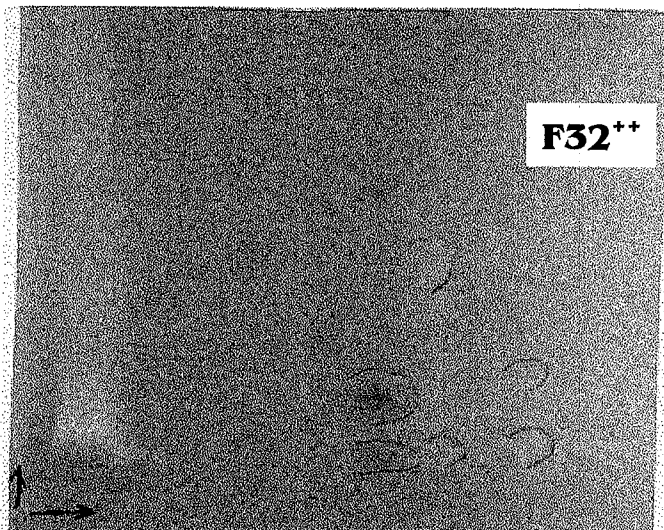
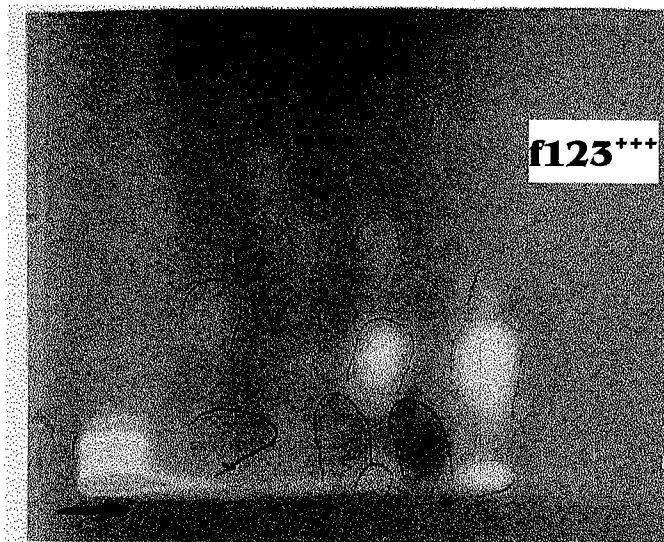
Nous avons réalisé une chromatographie bidimensionnelle pour les 3 mutants dont le premier développement avec un solvant de migration toluène-méthanol-méthyl éthyl cétone (4:3:3) et le second développement avec un solvant de migration eau-méthanol-méthylethylcétone-acétyl acétone (13:3:3:1), les résultats sont présentés dans la figure (18). Ces figures pour les 3 mutants nous révèlent la présence de flavones de couleur brun violet et des acides phénols de couleur fluorescent au bleu pâle, la plupart des composés polymères (les tannins condensés) n'ont pas migré.

L'analyse par CHLP des composés phénoliques des exsudats de graines de ces deux mutants f123⁺⁺⁺ et f48⁻ sont présentés dans la figure 17. Les résultats de cette analyse montrent que le *pattern* phénolique de le f123⁺⁺⁺ renferment 4 classes phénoliques: les acides phénols, les flavones, les dérivés catéchiques et les tannins condensés. En ce qui concerne le f48⁻, le *pattern* phénolique de celle-ci est constitué de flavones, de dérivés catéchiques, d'acides phénols et de tannins condensés.

5.3.2 Cas particulier des téguments

La chromatographie bidimensionnelle pour les téguments des trois mutants nous à révélé des flavones et des acides phénols (figures 19). Les composés du premier développement représente la fraction F1 et les composés du second développement représente la fraction F2.

Le suivi CLHP de la fraction F1 des téguments de f123⁺⁺⁺, f48⁻ et f32⁺⁺ est illustré dans la figure 19. Le *pattern* phénolique de la f123⁺⁺⁺ est constitué principalement d'acides phénols, de dérivés catéchiques et une flavone, celui de la f48⁻ est représenté par les acides phénols et les catéchines alors que la f32⁺⁺ ne renferme que les acides phénols.



Chromatographie bidimensionnelle
 Support : polyamide
 Solvant:
 1^{ère} dimension: toluène-méthanol-
 méthyl-éthyl-cétone 4:3:3
 2^{ème} dimension: eau-méthanol-méthyl
 éthyl cétone-acéthyl acétone 13:3:3:1

Figure 18. Composés phénoliques exsudés par les graines des trois mutants (f123⁺⁺⁺, f32⁺⁺, f48⁻⁻).

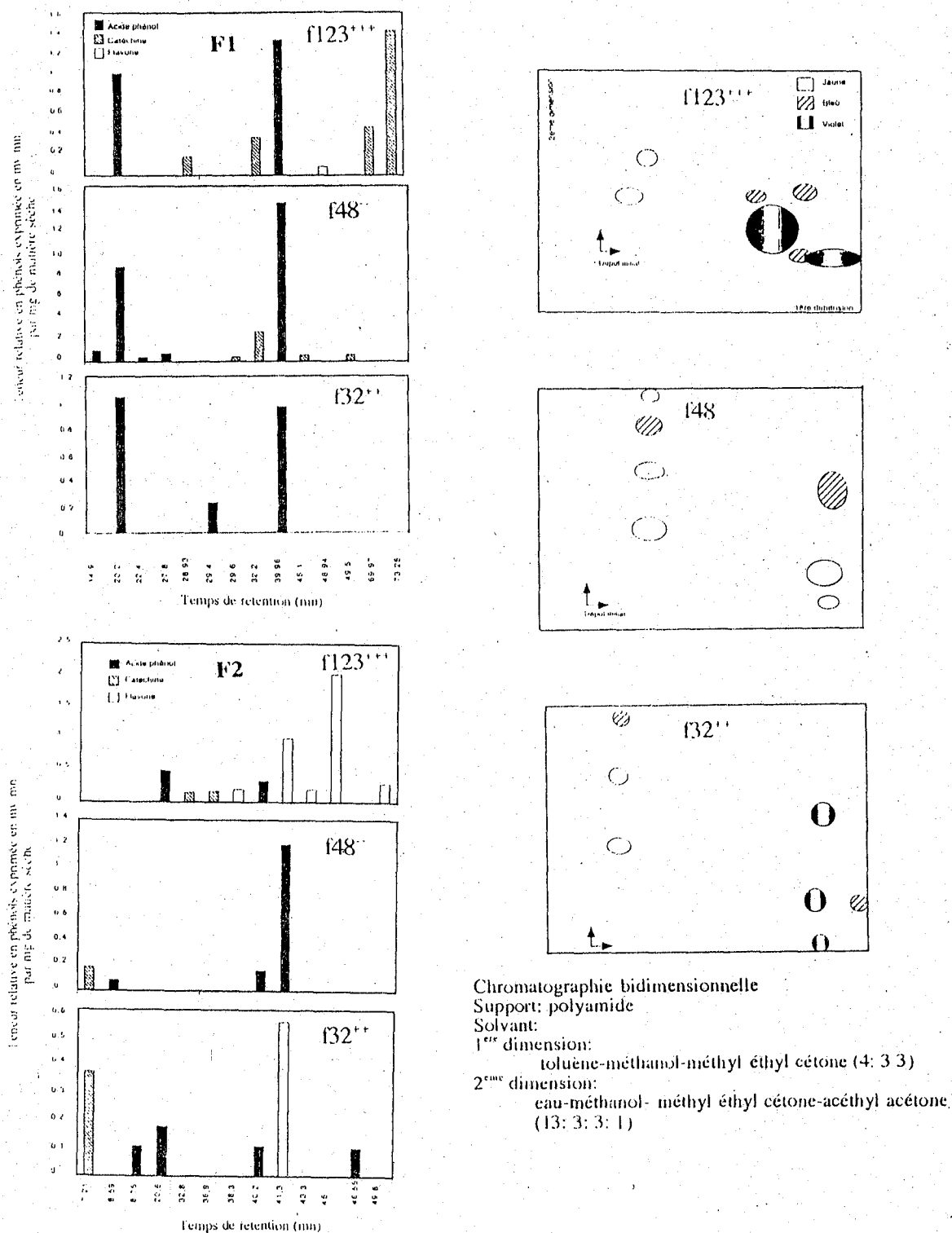


Figure 19. Distribution des composés phénoliques de la fraction F1 et F2 des téguments des mutants de *Vicia faba* (f123⁺⁺⁺, f48⁻, f32⁺⁺) ($\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$, gradient 1)

Le suivi CLHP de la fraction F2 des téguments des 3 mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻, f32⁺⁺ est représenté dans la figure 19. Le *pattern* phénolique de ces trois mutants est dominé par les acides phénols, catéchines et flavones.

L'ensemble des résultats concernant la nature chimique de l'exsudation des composés phénoliques, et plus particulièrement les flavonoïdes nous permet d'apporter quelques précisions sur le métabolisme phénolique des graines des cultivars (Blandine, Alfred) et mutants de *Vicia faba* (f123⁺⁺⁺, f32⁺⁺, f48⁻).

Le *pattern* phénolique de la graine des deux cultivars est constitué de flavones, acides phénols et dihydroflavonol comparé à celui de la graine du mutant nodulant précoce f123⁺⁺⁺ qui est plus riche en flavones et catéchines.

Au niveau tégumentaire, le *pattern* phénolique des cultivars est riche en composés phénoliques de type flavone, flavonol, acide phénol chez Blandine et de type flavone, acide phénol et tannins condensés chez Alfred. En ce qui concerne les mutants f123⁺⁺⁺, f48⁻ et f32⁺⁺, les téguments de la fraction F1 (représente les composés de la 1^{ère} dimension) sont dominés surtout par la présence de flavones, acide phénols et catéchines pour f123⁺⁺⁺ et f48⁻ alors que la fraction 1 de la f32⁺⁺ est constituée uniquement d'acides phénols. Les téguments de la fraction F2 (représente les composés de la 2^{ème} dimension) renferment des flavones, acide phénols et catéchines pour f123⁺⁺⁺ et f32⁺⁺ et acide phénols et catéchine pour le f48⁻. Les tannins condensés restent absents dans les deux fractions F1 et F2, ils n'ont pas migré et sont restés accrochés dans la ligne de départ.

6. Discussion

Les graines de *Vicia faba* L constituent une source essentielle pour l'alimentation animale. Depuis la découverte de deux gènes récessifs éliminant les tannins condensés des téguments (Picard, 1976) peu de cultivars sans tannins ont été sélectionnés. Dans cette étude, chaque génotype a été étudié pour l'analyse de la répartition des composés phénoliques et l'étude de l'exsudation phénolique dans les différents tissus de la graine.

6.1 Signification de la température par rapport à la physiologie biochimique de l'exsudation phénolique

L'effet de températures basses sur l'exsudation des composés phénoliques de la graine entière était étudié en incubant les graines à 4°C. Cette température a été choisie parcequ'elle est proche de la température moyenne à laquelle *Vicia faba* est cultivée (période d'hiver où la température est basse au environ de 4°C). Les résultats obtenus nous ont montré qu'aux basses températures (4°C), l'exsudation phénolique des graines est seulement de 29% pour cv Blandine et 8.12 % pour cv Alfred comparés à 100% lorsque ces graines sont incubées à 30°C.

L'exsudation phénolique des graines a été très peu étudiée tandis que les travaux dans ce domaine sont basés surtout sur les inducteurs de gènes de nodulation. Dans le cas de *Medicago sativa* les flavonoides induisant les gènes de nodulation de *Rhizobium* ne sont pas synthétisés pendant l'imbibition des graines mais sont accumulés durant les premiers stades de la croissance de l'embryon et sont libérées passivement (Phillips et al., 1994).

Si l'influence du facteur lumière sur la biosynthèse des flavonoides a fait l'objet de nombreux travaux, celle par contre du facteur température a été très peu abordée. Paynot et al., (1966) ont souligné que les températures basses favorisent la production des anthocyanes et les flavonols chez *Begonia gracilis*.

Chez *Asplenium trichomonas*, aux basses températures la biosynthèse des flavonols est favorisée par rapport à celle des leucoanthocyanes, apparemment moins sensible à ce facteur de milieu (Voirin et al., 1972).

Dans le cas de *Vicia faba*, les différences d'exsudation entre 4°C et 30°C pouvait être expliquées par un processus de solubilisation plus efficace à haute température qu'à une température basse. Si nous considérons le compartiment de la partie interne et vivante de la graine appelée cotylédon, il s'agit clairement d'un mécanisme actif sur le procédé d'exsudation pour cv Blandine, les cotylédons contiennent initialement 2.7mg de composés phénoliques par unité de graine, tandis qu'après 24 heures d'imbibition dans le milieu, la quantité de phénols

6. Essai d'identification des composés actifs vis à vis de gènes *nod*

6.1 Procédure d'analyse structurale

6.1.1 Approche générale

Nous rappelons que la technique employée pour l'extraction des composés phénoliques des exsudats racinaires et extraits de racines est décrite dans le chapitre II. Pour une identification préliminaire nous avons fait appel au couplage CLHP/UV. L'examen des spectres obtenus par multidétection permet une première approche de l'identité des composés représentés par chacun des pics.

La figure 20 montre le chromatogramme global des exsudats racinaires, des extraits de racines et des hydrolysats de racines. Les pics de chaque extrait détectés à 280 nm, correspondent à différentes classes de molécules chimiques (tableau 18, 19, 20).

6.1.1.1 Exsudats racinaires

Nous avons obtenu 5 classes chimiques dans les exsudats racinaires qui sont les suivants (tableau 18):

- classe des acides phénols: composés en C7 (pics 1, 6, 7, 9)
- classe des flavane 3-ol: composés en C15 (pics 3 et 8)
- classe des flavones: composés en C15 (pics 4 et 5)
- classe des flavanones: composés en C15 (pics 11 et 13)
- classe des isoflavones: composés en C15 (pics 2 et 12)

Les molécules qui présentent la capacité d'induire les gènes *nod* sont représentés par les pics 4, 5, 11 et 13 (figure 23).

N° des pics Exsudats racinaires	Temps de retention (mn)	UV λ_{max} (nm)	Classe phénolique
1	12.4	252 - 310	Acide phénol
2	13.2	265	Isoflavone
3	19.8	275	Flavanol
4	23.6	272 - 354	Flavone
5	24.2	272 - 327	Flavone
6	28.3	272	Acide phénol
7	33	266	Acide phénol
8	34.1	275	Flavanol
9	45.7	268	Acide phénol
10	46.6	275 - 330	-
11	54.3	286	Flavanone
12	55	312	Isoflavone
13	55.7	280	Flavanone

**Tableau 18. Classes phénoliques des exsudats racinaires
de *Vicia faba* cv Alfred**

6.1.1.2 Racines natives

Nous avons mis en évidence une seule classe chimique dans les racines de *Vicia faba* cv Alfred:

- classe des flavanones: composé en C15: (pic 1, molécule active), tableau 19 et figure 23.

N° des pics Racines	Temps de retention (mn)	UV λ_{max} (nm)	Classe phénolique
pic 1	64.3	294	Flavanone

Tableau 19. Classes phénoliques des racines de *Vicia faba* cv Alfred.

exsudés atteinte 3.1 et 3.8 mg à 4°C et 30°C respectivement. Ce résultat doit être lié probablement au réveil d'un métabolisme actif des cellules du cotylédon.

6.2 Origine des composés phénoliques exsudés par les différents compartiments de la graine

Dans cet ordre, graine entière, cotylédons et téguments étaient analysés séparément. Selon les résultats illustrés dans le tableau 11, les composés phénoliques étaient surtout localisés dans les cotylédons pour le cultivar Blandine et dans les téguments pour le cultivar Alfred. Pour le cv Alfred, le profil CLHP des exsudats de graines entières est étroitement similaire à ceux des cotylédons seuls. Inversement, cette composition est complètement différente du *pattern* phénolique des téguments seuls.

Ces résultats suggèrent que les graines intactes de *Vicia faba* pourraient garder la plupart des phénols contenus dans les téguments et libérer essentiellement les phénols contenus dans la partie interne de la graine qui est le cotylédon. Un résultat similaire a été obtenu avec cv Blandine même si les téguments étaient basés sur les flavonols; ce comportement était aussi souligné par Graham (1990) concernant l'exsudation des isoflavones des graines de Soja.

L'exsudation des flavones dans les graines de *Vicia faba* cv Muchamiel a été étudié par Tomas-Lorente et *al.*, (1990), l'une des flavones a été identifiée comme la 7,4-dihydroxyflavone. Cette molécule était auparavant identifiée comme inducteur de nodulation chez *Trifolium repens* (Peters et *al.*, 1986). Il est intéressant d'identifier les flavones dans les exsudats de graines de *Vicia faba*; ces molécules peuvent jouer un rôle important dans la relation plante -*Rhizobium* (Tomas-Lorente et *al.*, 1990).

Nous pouvons conclure que les deux cultivars présentent un *pattern* phénolique différent basé essentiellement sur de phénols simples et flavonols chez cv Blandine et sur des composés de type catéchines chez cv Alfred. Le procédé d'exsudation des graines des deux cultivars donnent des quantités de composés similaires libérées dans le milieu.

Le métabolisme phénolique des exsudats de graines de f123⁺⁺⁺ est différent de celui des deux cultivars Alfred et Blandine; la graine du nodulant f123⁺⁺⁺ exsude surtout des flavones et catéchines alors que les deux cultivars libèrent dans le milieu plus d'acides phénols que de flavones.

Les téguments de tous les génotypes étudiés sont caractérisés surtout par des tannins condensés sauf le génotype Blandine. Le suivi CLHP de la fraction F1 et F2 des mutants nous a révélé des composés de type monomères : les flavones, catéchines et acides phénols. Les composés polymères qui sont les tannins condensés sont absents dans ces fractions puisqu'ils n'ont pas migré en CCM.

Les tannins condensés ou polymères catéchiques sont présents dans les téguments de cv Alfred et les 3 mutants f123⁺⁺⁺, f32⁺⁺, f48⁻. Ces composés jouent un rôle dans la vie de la plante comme la résistance à certaines maladies (Statler, 1970) et empêche l'attaque des champignons pendant la germination (Harris, 1969). Les mécanismes de ces composés sur l'influence de la nodulation restent inconnus (Pankhurt et Jones, 1979).

Nous avons remarqué que ces tannins n'étaient pas libérés dans le milieu mais restent stockés dans les téguments de la graine, seulement les catéchines sont exsudés des graines et racines. Si, le rôle de ces molécules sur les microorganismes reste vague, certains auteurs suggèrent qu'il sont une source de carbone pour les bactéries (Gajendiran et *al.*, 1988).

6.3 Cinétique des composés phénoliques des exsudats racinaires et racines chez *Vicia faba* cv Blandine

Pour mieux comprendre le rôle des composés phénoliques dans la relation *Vicia faba-Rhizobium*, il était intéressant d'étudier la cinétique de l'exsudation des composés phénoliques des racines de cv Blandine. Les résultats présentés dans la figure 16 montrent que les composés phénoliques sont libérés très rapidement dans le milieu, dès l'émergence des racines. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par D'Arcy-Lameta, (1982); D'Arcy-Lameta (1986) montrant ainsi que la quantité des composés phénoliques exsudés des racines de *Lens culinaris* et *Glycine max*

était plus élevée pendant les premiers jours de croissance de la racine. Les racines de cv Blandine exsudent des flavones, flavanones qui sont des molécules importantes dans le phénomène de la symbiose.

Du point de vue qualitative, les principaux composés phénoliques exsudés appartiennent à 5 classes phénoliques: des acides phénols, des flavanols, des flavones, des flavanones et catéchines. En l'occurrence, ces flavones et flavanones ont été aussi signalées dans les exsudats de racines de *Vicia sativa* L subsp *nigra* et *Vicia hirsuta* par Zaat et al., (1987); Zaat et al., (1988). De plus ces composés phénoliques particulièrement les flavones sont des inducteurs de gènes de nodulation chez *Medicago sativa* (Peters et al., 1986) et chez *Pisum sativum* (Firmin et al., 1986). De la même façon les flavanones restent des composés inducteurs de gènes de nodulation chez le genre *Vicia* cités dans le tableau 6.

L'action de ces molécules exsudées par les graines et racines sur *Rhizobium* et l'identification des composés inducteurs de gènes de nodulation chez *Vicia faba* sont traités dans le prochain chapitre.

CHAPITRE IV

Les signaux chimiques
dans la relation *Vicia faba* et
Rhizobium leguminosarum

CHAPITRE IV : LES SIGNAUX CHIMIQUES DANS LA RELATION *VICIA FABAE* ET *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*

1. Introduction

Les légumineuses ont la capacité d'établir une association symbiotique avec des bactéries de type *Rhizobium*. La bactérie *Rhizobium leguminosarum* est la bactérie symbiotique de la féverole. Cette association se traduit par la formation de nodosités au niveau des racines, dans lesquels les *Rhizobium* réduisent l'azote atmosphérique en ammonium, contribuant ainsi à la nutrition azotée de la plante. La mise en place de cette association nécessite un dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante. Les flavonoides produits par les racines vont induire par l'intermédiaire de la protéine régulatrice Nod D de la bactérie, les gènes de nodulation (gènes *nod*). Ces gènes *nod* sont responsables de la synthèse de lipooligosaccharides, signal chimique reconnu par la plante hôte. La partie saccharidique du signal (appelé facteur Nod) est un oligomère de N-acétylglucosamine.

Les flavonoides sont des composés importants de la rhisosphère, et sont exsudés par la graine et la jeune racine. Ils contrôlent la transcription des gènes responsables de la réponse symbiotique de la bactérie (Redmont et *al.*, 1986). Compte tenu du rôle des gènes *nod* dans le déclenchement du processus de nodulation, l'action des inducteurs de ces gènes peut se concrétiser par une amélioration de l'intensité ou de la rapidité de l'infection de bactéries symbiotiques.

Les flavonoides sont des produits du métabolisme secondaire de type polyphénolique très répandus parmi les végétaux. Les flavonoides inducteurs produits par différentes légumineuses appartenant à des sous familles, tribu ou genres différents ne sont pas les mêmes. Ainsi, les inducteurs produits par *Medicago sativa* sont différents de ceux produits par *Trifolium*, *Glycine max* ou *Sesbania* et cette diversité permettrait d'expliquer une partie de la spécificité

symbiotique entre certaines espèces de *Rhizobium* et certaines légumineuses (Phillips, 1992).

L'expression des gènes de nodulation de *Rhizobium leguminosarum* est induite par des flavones excrétées par les racines et les graines des légumineuses (Peters et al., 1986; Redmont et al., 1986; Zaat et al., 1987, Zaat et al., 1989). Cette induction représente une des étapes les plus précoces identifiée dans l'induction plante-*Rhizobium*.

Les exsudats de racines ou de graines de légumineuses contiennent un grand nombre de molécules inductrices des gènes *nod*, leur nature et leur importance relative dépendent de l'espèce considérée (Zaat et al., 1988; Maxwell et al., 1990). Les inducteurs identifiés étaient la lutéoline chez la luzerne (Peters et al., 1986); l'hésperétine et l'ériodictyol chez le pois (Firmin et al., 1986; Spaink et al., 1987); le 7, 4' dihydroxyflavone chez le trèfle (Redmont et al., 1986).

Les produits inducteurs sont excrétés essentiellement dans une région située là où a lieu la majorité des infections bactériennes (Djordjevic et al., 1987).

La lutéoline et le 4, 4'-dihydroxychalcone sont des inducteurs forts libérés par les graines de *Medicago sativa* (Hartwig et al., 1990). Les graines de cette même plante exsudent 3 autres dérivés de la lutéoline qui sont: la lutéoline 7-O glucoside, 5-méthoxy-lutéoline et le 3', 5 - diméthoxy-lutéoline (Hartwig et al., 1990).

Chez *Rhizobium meliloti*, *R. trifolii* et *R. leguminosarum*, flavones et flavanones ont été identifiées comme inducteurs de gènes *nod* dans les exsudats.

Zaat et al., (1987) ont mis en évidence 7 inducteurs dans les exsudats de racines de *Vicia sativa* dont 6 sont des flavanones. En ce qui concerne *Vicia faba* peu de travaux ont été réalisés sur l'induction de gènes *nod*.

Notre sujet d'étude a donc consisté à rechercher et à identifier les flavonoïdes exsudés par *Vicia faba*, qui paraît induire les gènes de nodulation de *R. leguminosarum* bv. *viciae* dans la relation *Vicia faba* - *Rhizobium*.

Dans la première partie nous avons étudié l'action des différents exsudats de graines, racines sur *R. leguminosarum* possédant une fusion *nod C* - *lacZ*. Deux

cultivars "Blandine" et "Alfred" ainsi que le mutant de nodulation précoce f123⁺⁺⁺ et le mutant non nodulant f48⁻ ont été utilisés.

La deuxième partie concerne l'action des différentes fractions (isolées sur CLHP) sur *R. leguminosarum nod C - lac Z*.

Dans la troisième partie nous avons isolé et identifié les molécules inductrices, exsudées par les racines de *Vicia faba* cv "Alfred," par les méthodes phytochimiques classiques (CLHP/UV visible, CLHP/ ES-SM).

2. Résultats

2.1 Action des différents extraits bruts: des exsudats de graines et de racines de *Vicia faba* "cv Blandine", "cv Alfred" et ses mutants f123⁺⁺⁺ et f48⁻ sur *Rhizobium leguminosarum nod C - lacZ*

La recherche de composés activateurs ou inhibiteurs des gènes *nod* dans les exsudats de graines et de racines de différentes légumineuses a été facilitée par l'emploi d'une souche de *Rhizobium leguminosarum nod C - lacZ* modifiée génétiquement. Elles comportent en effet, une fusion de gènes entre les gènes *nod* et le gène de structure de l'enzyme β -galactosidase (*lacZ*) de *E. coli*. La détection et la quantification de l'expression des gènes *nod* en fonction de différents inducteurs sont réalisées par dosage de l'activité de l'enzyme.

Les expériences effectuées avec l'aide de la souche transformée *Rhizobium leguminosarum nod C - lac Z* (8401pRL1J1) ont mis en évidence l'activité stimulatrices ou inhibitrices des différents extraits de graines et de racines des deux cultivars de *Vicia faba* cv "Alfred" et cv "Blandine" et les mutants le nodulant précoce f123⁺⁺⁺ et le non nodulant f48⁻. Le tableau 15 résume les résultats obtenus de l'action de ces extraits sur l'expression de gènes *nod C - lacZ* chez *R. leguminosarum*.

Ces résultats nous ont permis de montrer que les exsudats racinaires et les extraits de racines induisent mieux les gènes de nodulation des bactéries que les exsudats de graines. Les exsudats de graines n'ont pas de molécules inductrices. Le nodulant précoce f123⁺⁺⁺ présente une forte induction avec une activité β -

galactosidase de 606.25 ± 2.20 U. Par contre il n'y a pas de différence d'induction entre les deux cultivars. Il est intéressant de constater que les exsudats racinaires du mutant f48⁻ non nodulant n'induisent pratiquement pas la fusion *nod C* - *lac Z* de *R. leguminosarum*.

L'avantage de ces expériences réalisées sur les deux types d'extraits (exsudats de graines et exsudats de racines) nous ont permis de choisir les exsudats de racines pour l'étude des molécules inductrices de gènes *nod* chez *Vicia faba*.

Exsudats de graines	Activité β-galactosidase *unités
<i>Témoin non induit</i>	40,76 \pm 0,75
<i>Vicia faba</i> cv Alfred	25.53 \pm 1.08
<i>Vicia faba</i> cv Blandine	16.85 \pm 6.08
<i>Vicia faba</i> (f123 ⁺⁺⁺)	26.01 \pm 0.15
<i>Vicia faba</i> (f48 ⁻)	25.00 \pm 0.15
Exsudats racinaires	
<i>Vicia faba</i> cv Alfred	340.43 \pm 0.89
<i>Vicia faba</i> cv Blandine	258.8 \pm 0.64
<i>Vicia faba</i> (f123 ⁺⁺⁺)	606.25 \pm 2.20
<i>Vicia faba</i> (f48 ⁻)	59.25 \pm 1.13
Racines	
<i>Vicia faba</i> cv. Alfred	358.60 \pm 0.84
<i>Vicia faba</i> cv Blandine	479.58 \pm 0.09
<i>Vicia faba</i> (f123 ⁺⁺⁺)	506.55 \pm 1.14

Tableau 15 : Action des extraits bruts des exsudats de graines, exsudats de racines et racines des cultivars et mutants de *Vicia faba* sur l'expression de la fusion de gènes *nod C* - *lacZ* chez *Rhizobium leguminosarum*

Les extraits sont utilisés à 40 μ l/5.5ml, *chaque résultat est la moyenne de 3 analyses.

3. Action des différentes fractions des exsudats de racines, extrait de racines et hydrolysats de racines de *Vicia faba* cv Alfred sur *R. leguminosarum* nod C – lac Z

L'extrait brut des différentes fractions de cv Alfred est analysé par CLHP (figure 20). De nombreux composés ont été détectés à 280 nm. Pour l'étude de l'activité de l'induction de gènes *nod* par les composés exsudés des racines, des composés de l'extrait de racines et les composés de l'hydrolysat de racines, nous avons collecté une fraction de chaque extrait toutes les 10 mn (figure 20).

3.1 Exsudats racinaires (figure 20)

Dix fractions d'exsudats racinaires ont été utilisées pour l'étude de l'activité de gènes *nod*. Nos résultats montrent que les fractions f3, f5, f6 révèlent une activité biologique considérable. Pour la fraction f3 nous obtenons une activité de la β -galactosidase de 176.21 ± 5.87 U. Pour la fraction f5 elle est de 311.68 ± 2.95 U et pour la fraction f6 nous obtenons une activité de 263.88 ± 0.57 U. Aucune activité n'est détectée pour les fractions f1, f2 et f4. La fraction 7 est activée faiblement par les gènes de nodulation, de l'ordre de 135.84 ± 2.17 U.

3.2 Extrait de racines (figure 20)

L'extrait de racines de *Vicia faba* cv Alfred n'a révélé qu'une fraction active (f7) qui présente une forte induction de gènes *nod* de l'ordre de 573.67 ± 5.20 U. Aucune induction de gènes *nod* pour les fractions f2, f5, f6 n'a été détectée. Les fractions f3 et f4 ne sont pas non plus activatrices de gènes *nod*: nous obtenons respectivement 45.88 ± 5.7 U et 62.43 ± 0.76 U.

3.3 Hydrolysat de racines (figure 20)

La figure 20 montre le profil CLHP des racines hydrolysées avec l'activité de la β -galactosidase des dix fractions collectées toutes les 10 mn. Deux fractions f1 et f6 de cet hydrolysat ont induit les gènes bactériens. La fraction f6 a révélé une capacité inductrice plus importante de l'ordre de 485.12 ± 1.94 U que la fraction f1 de l'ordre de 252.46 ± 3.77 U.

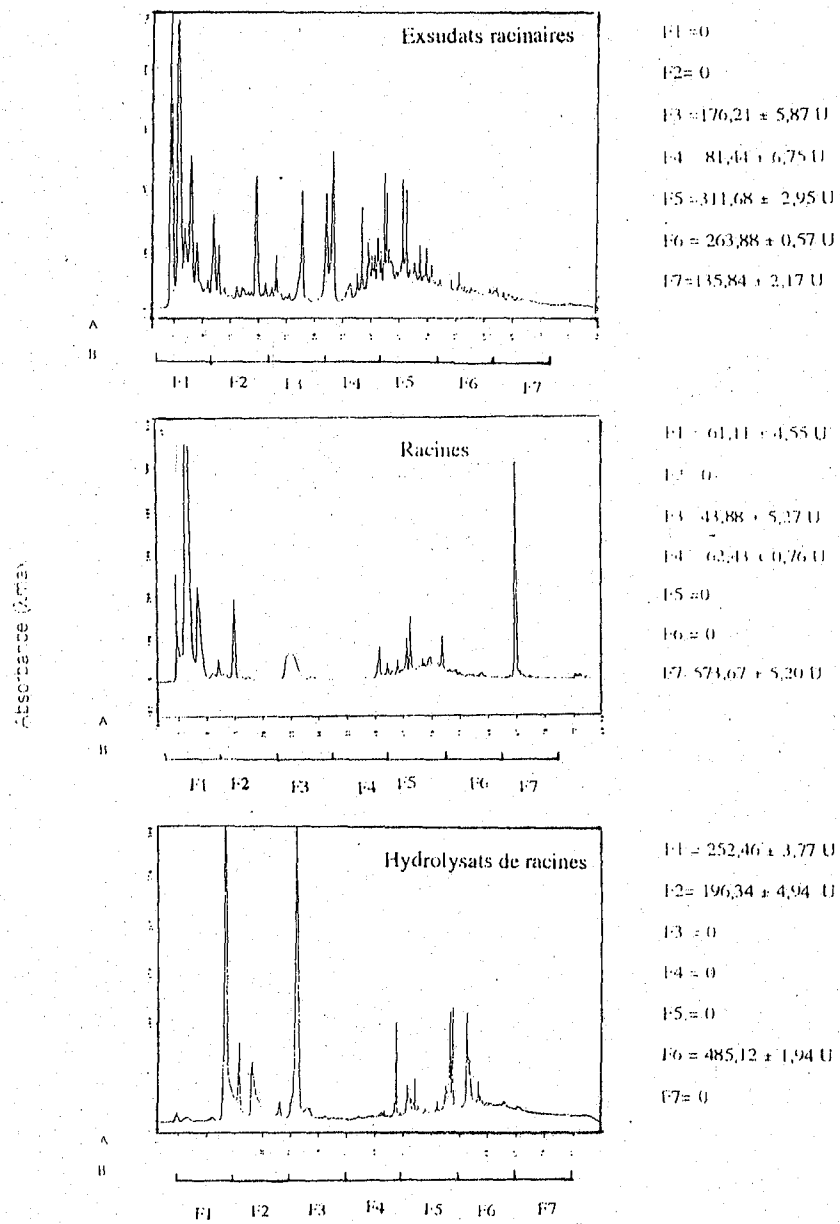


Figure 20. Analyse par CLHP et induction de gènes *nod* des exsudats racinaires, racines et hydrolysats de racines de *Vicia faba*

A : Temps de retention

B : Activité de la β -galactosidase des fractions piégées sur le chromatogramme (chaque valeur représente la moyenne de 3 analyses)

4. Etude du pouvoir d'induction des gènes de nodulation de *Rhizobium leguminosarum* des différentes molécules isolées soit des exsudats racinaires soit des extraits des racines et des hydrolysats de racines

Une étude plus approfondie a été réalisée en piégeant une 2^{ème} fois des pics montrant une capacité inductrice dans les 3 extraits précédents. Les résultats obtenus concernant l'induction de gènes *nod* des différents extraits sont illustrés dans le tableau 16 et figure 21.

Nous avons mis en évidence 6 molécules inductrices de gènes *nod* de *R. leguminosarum* dans les différents extraits de *Vicia faba* cv Alfred. Deux composés phénoliques inducteurs, isolés des exsudats racinaires représentés par 3a (Tr = 23.6 mn) et 3b (Tr = 24.2 mn) ont induit la β -galactosidase (156.65 ± 5.85 U).

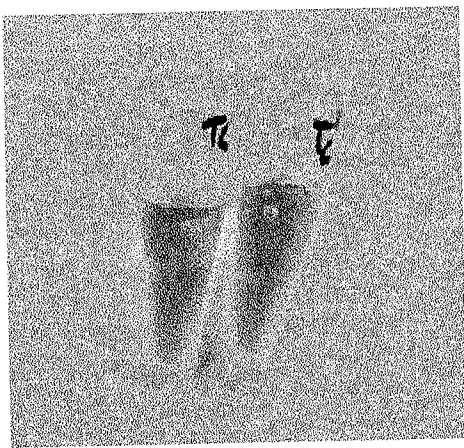
Une seule molécule isolée des racines de l'extrait natif nommé 1 (tr = 64.3 mn) a induit fortement les gènes *nod* avec une activité de 426.13 ± 0.26 U comparée aux témoins la naringénine et l'apigénine.

Quatre composés inducteurs de gènes *nod*, contenus dans les hydrolysats de racines correspondent aux pics suivants 1b (Tr = 13.2) avec une activité de 291.12 ± 3.21 U, au pic 2a (Tr = 55.4 mn) avec une activité de 155.21 ± 2.09 U et aux deux pics 2b (Tr = 56.3 mn et Tr = 57 mn) ayant une forte activité de l'ordre de 445.29 ± 0.98 U.

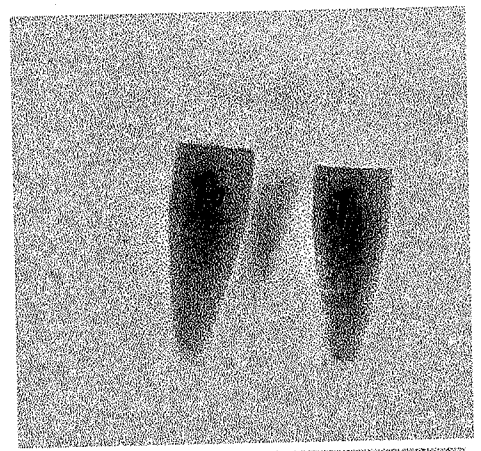
	Molécules Inductrices	Temps de rétention (mn)	Activité de la β-galactosidase (U)
RH	1b	13.2	291.12 \pm 3.21
	2a	55.4	155.21 \pm 2.09
	2b	56.3	445.29 \pm 0.98
		57	
ER	3a	23.6	156.65 \pm 5.85
	3b	24.2	
RN	1	64.3	426.13 \pm 0.26
Témoins de référence	Naringénine	54.3	421.01 \pm 1.24
	Apigénine		744.25 \pm 2.55
	(+) Catéchine		206.86 \pm 0.3
	D Catéchine		31.02 \pm 1.57

Tableau 16. Molécules inductrices des gènes *nod*, isolées des exsudats racinaires (ER), de racines (RN) et de racines hydrolysées (RH) de *Vicia faba* cv Alfred.

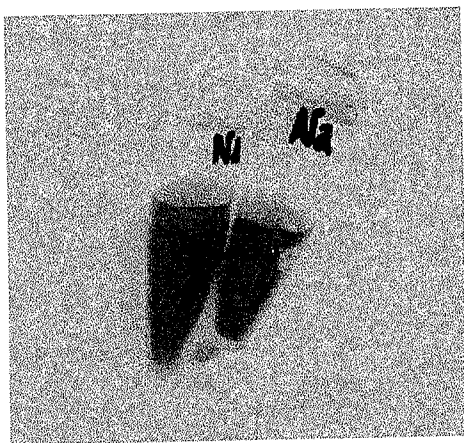
Les extraits sont utilisés à 40 μ l/5,5ml, chaque résultat est la moyenne de 3 analyses.



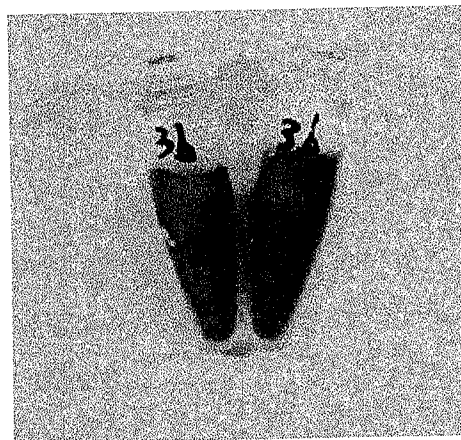
Témoin (T0)



Tc (Témoin non induit)



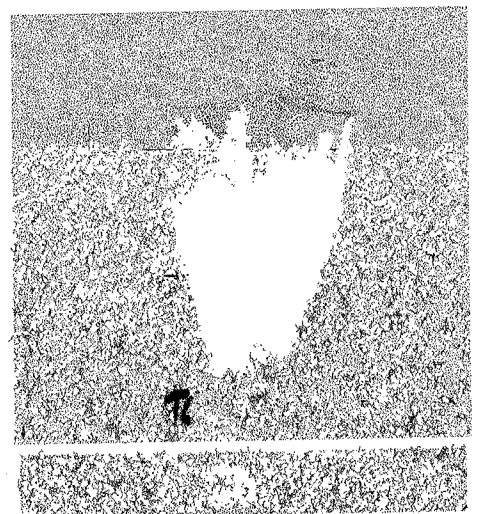
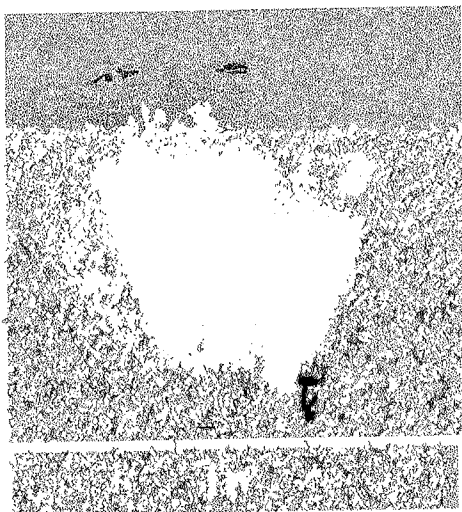
Na (Naringénine)



3b



J2



[Faint, illegible handwritten text at the bottom of the page]

5. Caractérisation par CCM des composés responsables de l'activité des gènes *nod* de l'extrait et de racines sur *Rhizobium leguminosarum nod C* – lac Z (figure 22)

Nous avons effectué une chromatographie bidimensionnelle avec l'extrait de racine (figure 22), et nous avons ainsi mis en évidence 9 composés majeurs et 6 mineurs. La recherche des composés inducteurs de la fusion de gènes *nod C* – lac Z a été réalisée avec certains composés J1, J2, J3, B1, JP4, V3. Les résultats présentés dans le tableau 17 montrent que seul le composé J2 révèle une forte activité inductrice (526.17 ± 2.54 U). Les composés jp4 et j3 ont aussi une activité inductrice mais moins forte que le composé J2 (253.86 ± 0.30 U et 159.97 ± 3.94 U, respectivement). Les autres composés J1, B1 et V3 n'ont aucun effet sur l'induction de gènes *nod*.

Racines cv Alfred	
Composés	Activité de la β -galactosidase
J1	0
J2	$526,17 \pm 2,54$
J3	$159,97 \pm 3,44$
B1	38,77
JP4	$253,86 \pm 0,30$
V3	37,84

Tableau 17. Etude de l'induction de gènes *nod* de *Rhizobium leguminosarum* par des molécules extraites des racines de *V. faba* cv Alfred et isolées sur CCM.

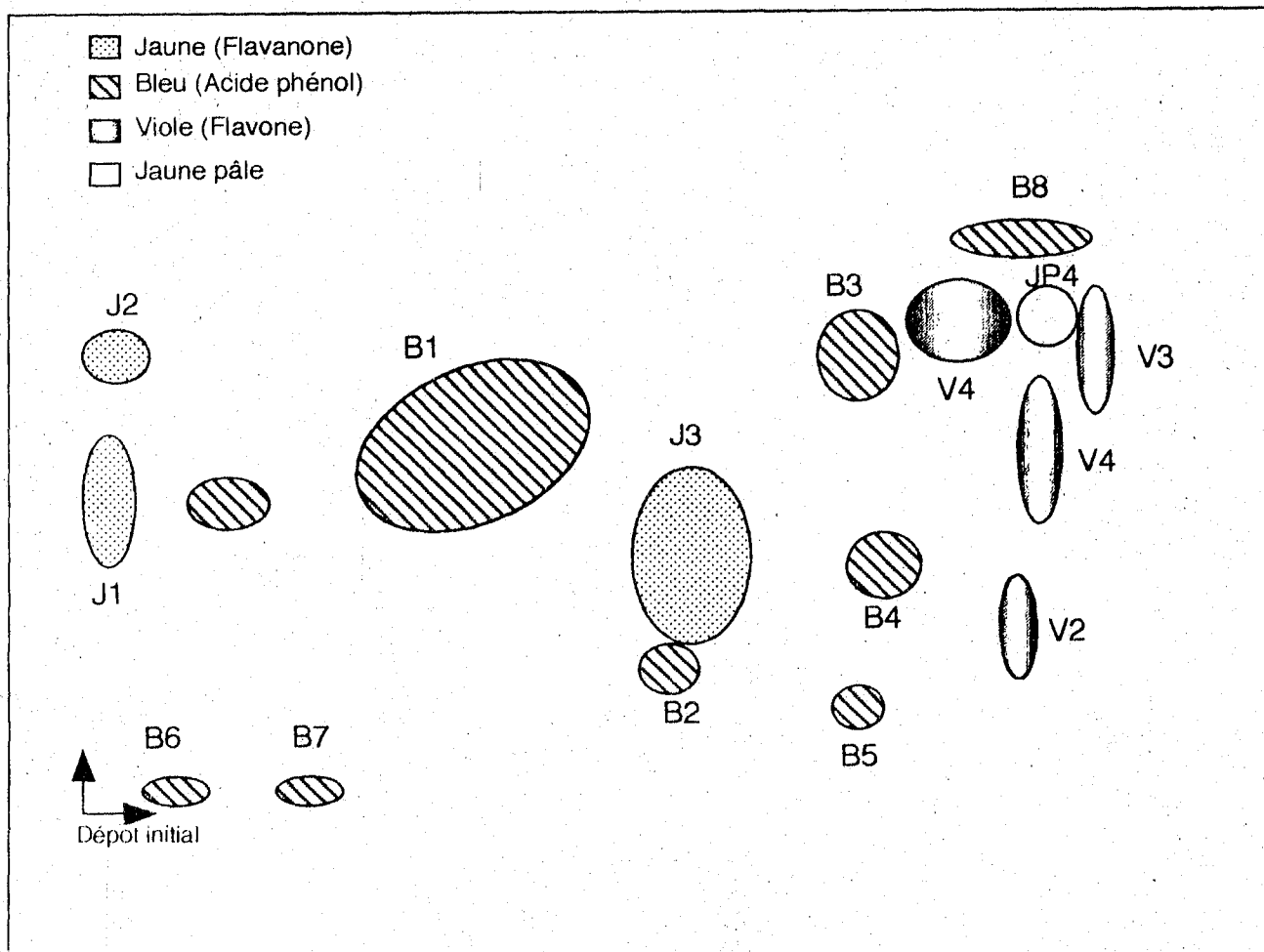


Figure 22. Composés phénoliques des racines de *Vicia faba* cv Alfred

Chromatographie bidimensionnelle

Support : cellulose

Solvant : 1^{ère} dimension : tButanol, acide acétique 3:1:1

2^{ème} dimension : Acide acétique 15%

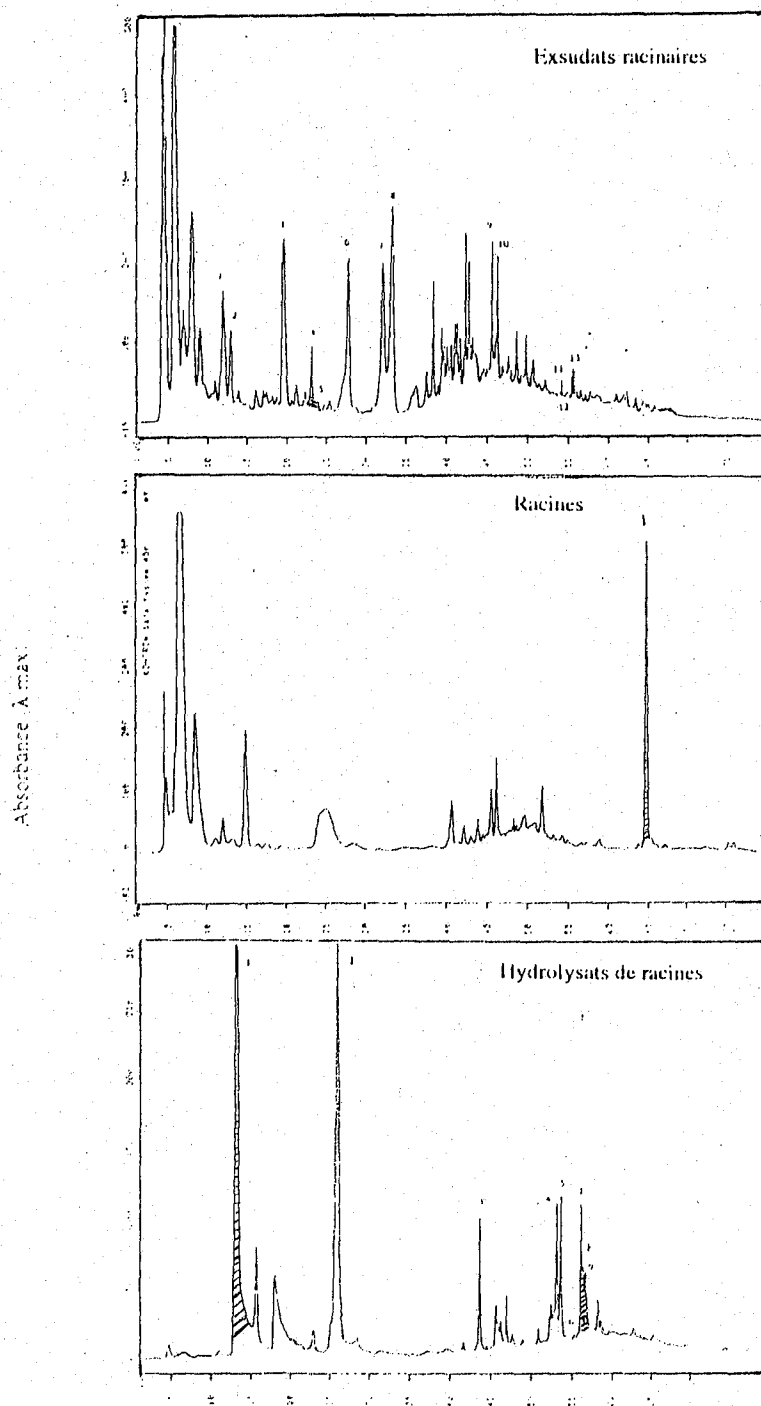


Figure 23. Analyse par CLHP et molécules activatrices de gènes *nod* des exsudats racinaires, racines et hydrolysats de racines de *Vicia faba* cv Alfred
(Trait hachuré : Activité de la β -galactosidase des pics piégés sur le chromatogramme)

flavones et surtout flavanones. Cette dernière classe a été mise en évidence dans les exsudats racinaires de *Vicia sativa* (Zaat et al., 1989; Recourt et al., 1991).

6.2 Identification des molécules inductrices de gènes *nod* des exsudats racinaires, extraits de racines et racines hydrolysées

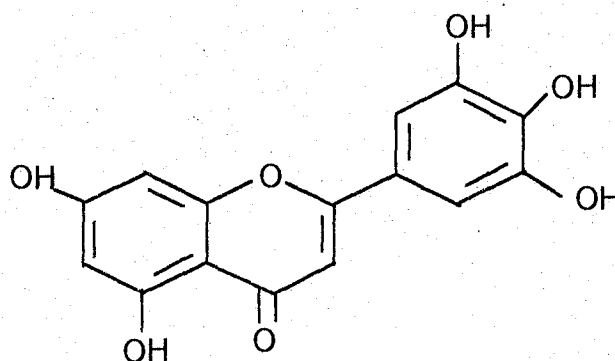
Pour identifier et confirmer l'identité des molécules inductrices nous avons utilisé la co-chromatographie et pratiqué le couplage CLHP/ES-SM (Annexe 4). Cette spectrométrie de masse utilisant la méthode d'ionisation par électrospray (ES-SM) constitue une technique de choix en raison de la douceur de l'ionisation. Cette technique permet d'accéder à la masse moléculaire de chaque composé moléculaire.

6.2.1 Molécules inductrices de gènes *nod* chez *Vicia faba* cv Alfred

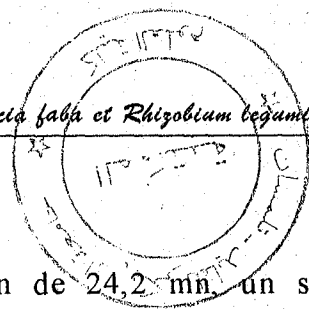
6.2.1.1 Exsudats racinaires: Molécules de la famille des flavones

a) ER4 (Composé 4 des exsudats racinaires)

Le composé 4 présente un temps de rétention de 23,6 mn, un spectre UV/visible de 272-354 nm et un spectre de masse avec un pic moléculaire m/e de 302. Ces données nous orientent vers la molécule suivante: la tricétine (5,7, 3', 4', 5' penta-hydroxyflavone), (figure 24).



5, 7, 3', 4', 5'-penta-hydroxyflavone (Tricétine)



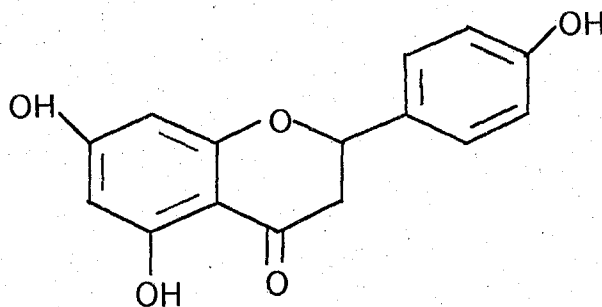
b) ER5 (Composé 5 des exsudats racinaires)

Le composé 5 présente un temps de rétention de 24,2 mn, un spectre UV/visible de 272-327 nm et un spectre de masse avec un pic moléculaire m/e de 246. Aucune hypothèse d'identification ne peut être donnée à ce composé; (figure 25)

6.2.1.2 Exsudats racinaires: Molécules de la famille des flavanones

a) ER11 (Composé 11 des exsudats racinaires)

Le composé 11 présente un temps de rétention égal à 54,3 mn, nous avons pratiqué une cochromatographie avec la naringénine comme témoin. Ce composé 11 est une molécule de type flavanone qui est : la naringénine

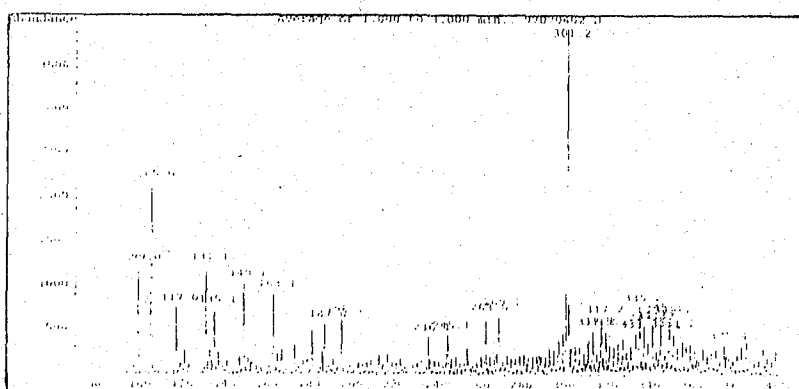


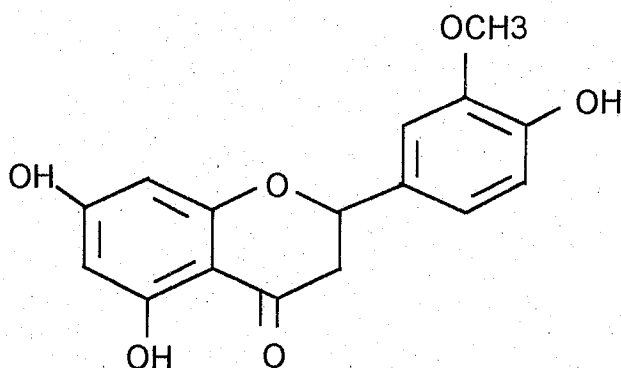
5, 7, 4' trihydroxyflavanone (naringénine)

6.2.1.3 Racines: Molécules de la famille des flavanones

a) RN1 (composé 1 de l'extrait de racine)

Le composé 1 présente un temps de rétention de 64,3 mn, un spectre UV/visible de 294 nm et un spectre de masse avec un pic moléculaire m/e de 302. Ces données nous orientent vers le Me- 3' ériodictyol (4', 5, 7-triOH, 3'-OMe flavanone), (figure 26).





4', 5, 7 triOH, 3'-OMe flavanone

(Me-3' ériodictyol)

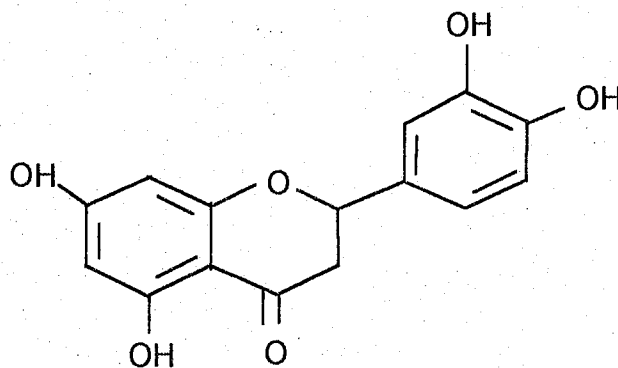
6.2.1.4 Hydrolysats de racines: Molécules de la famille des flavanones

a) RH.1 (composé 1 des hydrolysats de racines)

Le composé 1 présente un temps de retention de 13,2 mn, un spectre UV/visible de 284 nm et un spectre de masse avec un pic moléculaire m/e de 302. Ce composé est le Me-3' ériodictyol, (figure 27).

b) RH.7 (composé 7 des hydrolysats de racines)

Le composé 7 présente un temps de retention de 56,96 mn, un spectre de masse avec un pic moléculaire m/e de 288, ce composé est identifié à l'ériodictyol. (figure 28).



3', 4', 5, 7 tétrahydroxy-flavanone

(ériodictyol)

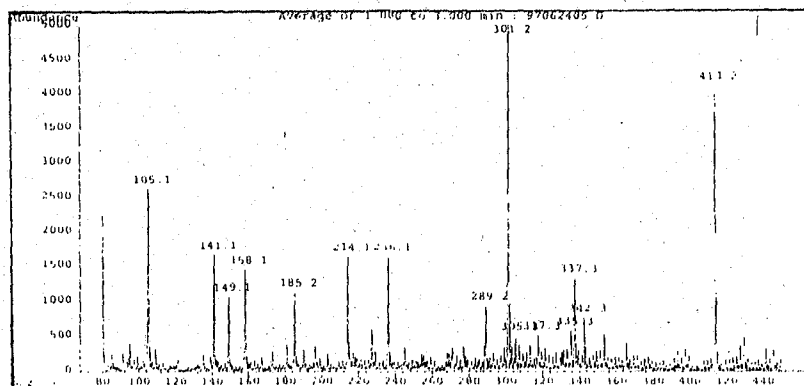


Figure 27. Spectre de masse LC/SM du composé RH1 (Me-3' ériodictyol)

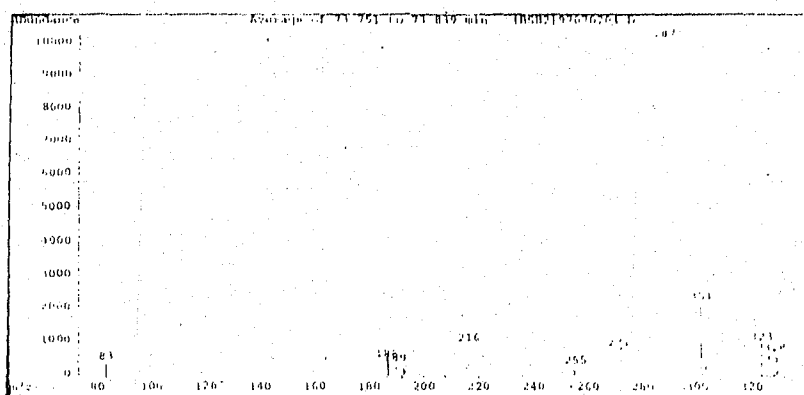


Figure 28. Spectre de masse LC/SM du composé RH7 (ériodictyol)

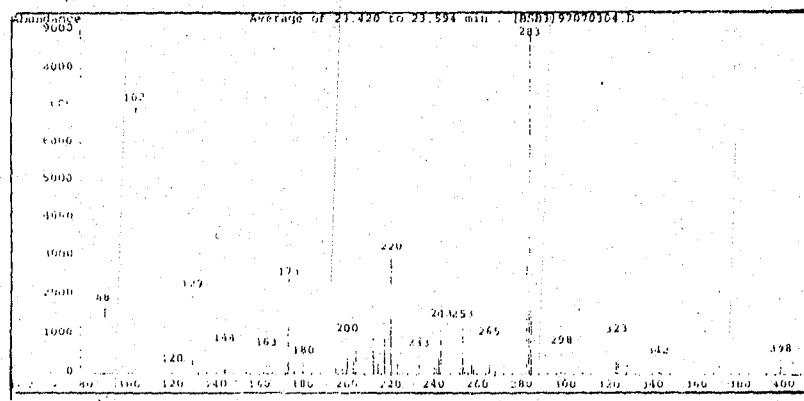


Figure 29. Spectre de masse LC/SM du composé ER2 (5,7 diOH, 4' OMe isoflavone).

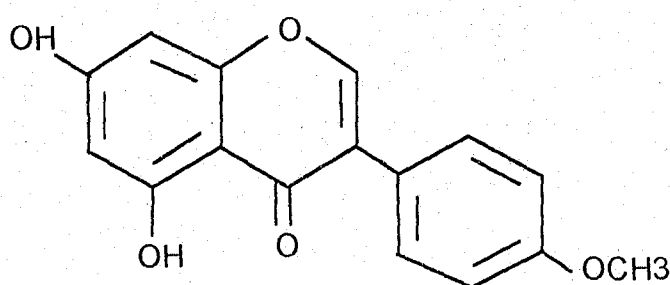
7. Composés non inducteurs de gènes *nod* chez *Vicia faba* cv Alfred

Comme nous l'avons déjà signalé dans la partie bibliographique, que la plante contrôle le niveau d'activité de gènes *nod* en exsudant aussi des composés inhibiteurs de gènes *nod* ceci a été démontré chez la Luzerne (Peters et al, 1986). Chez *Vicia faba* cv Alfred, des acides phénols, isoflavones, flavonol et catéchines n'ont pas induit les gènes *nod* de *R. leguminosarum*.

7.1 Exsudats racinaires

a) ER.2 (composé 2 des exsudats racinaires)

Le composé 2 présente un temps de retention de 13,2 mn, un spectre UV/visible de 265nm et un spectre de masse ayant un pic moléculaire m/e de 284. Nous proposons une molécule de type isoflavone(5,7-diOH,4'-OMe isflavone), (figure 29).



5,7 diOH,4'OMe isoflavone

b) ER.6 (composé 6 des exsudats racinaires)

Le composé 6 présente un temps de retention de 28,3 mn, un spectre UV/visible de 272nm. Le spectre de masse nous donne un pic moléculaire de 162. C'est une molécule de type acide phénol, (figure 30).

c) ER.8 (composé 8 des exsudats racinaires)

Le composé 8 présente un temps de retention de 34,1 mn, un spectre UV/visible de 275nm. Le spectre de masse a un pic moléculaire m/e de 284. Ce composé est identifié au 5, 7 diOH-4'OMe isoflavone, (figure 31).

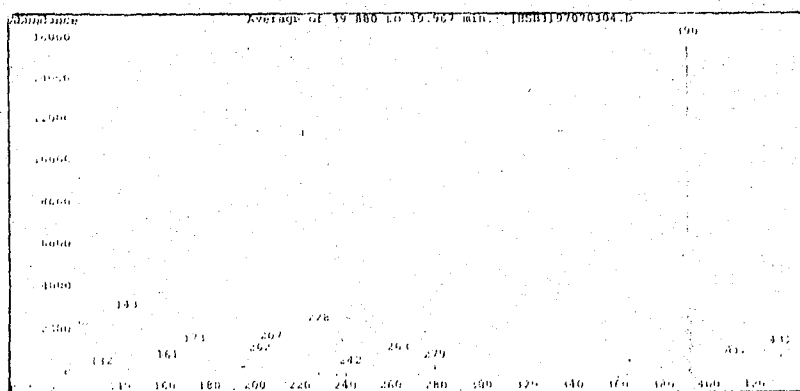


Figure 30. Spectre de masse LC/SM du composé ER6

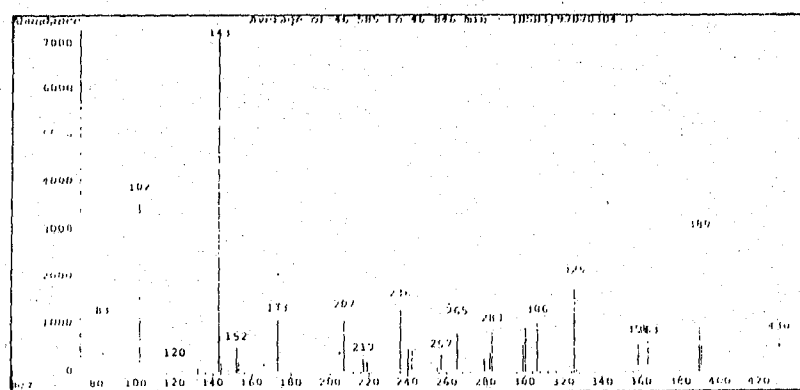


Figure 31. Spectre de masse LC/SM du composé ER8 (5,7 diOH, 4' OMe isoflavone)

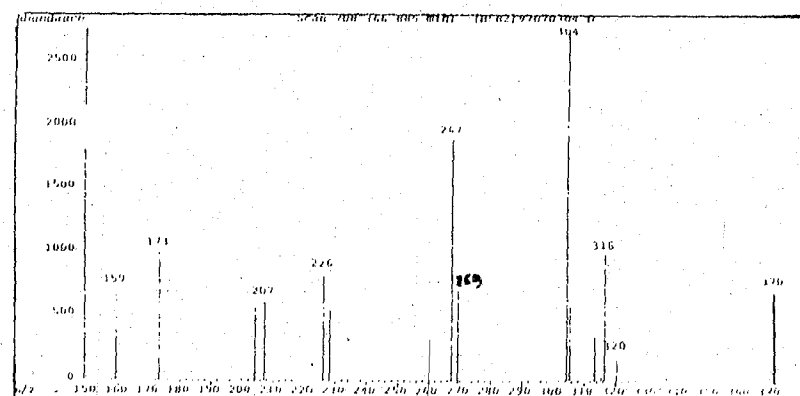


Figure 32. Spectre de masse LC/SM du composé ER12

d) ER.12 (composé 12 des exsudats racinaires)

Le composé 12 présente un temps de retention de 55,3 mn, un spectre UV/visible de 312 nm. Le spectre de masse a un pic moléculaire m/e de 270. Ce composé 12 est une molécule de type isoflavone, (figure 32).

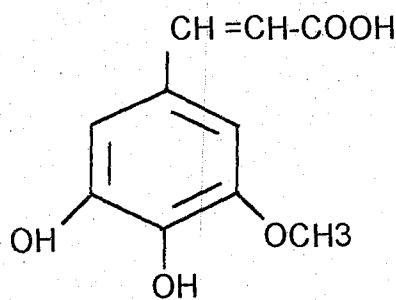
7.2 Hydrolysats de racines

a) RH.2 (composé 2 des hydrolysats de racines)

Le composé 2 présente un temps de retention de 26 mn, un spectre UV/visible de 280 nm. Le spectre de masse nous donne un pic moléculaire m/e de 258, c'est une molécule de type catéchine, (figure 33).

b) RH.3 (composé 3 des hydrolysats de racines)

Le composé 3 présente un temps de retention de 43,9 mn, un spectre UV/visible de 323-285nm. Le spectre de masse nous donne un pic moléculaire m/e de 196, il s'agit de l'acide férulique, (figure 34).



Acide férulique

c) RH.4 (composé 4 des hydrolysats de racines)

Le composé 4 présente un temps de retention de 53,8 mn, un spectre UV/visible de 324-287nm. Le spectre de masse a un pic moléculaire m/e de 200, il s'agit de l'acide syringique (figure 35).

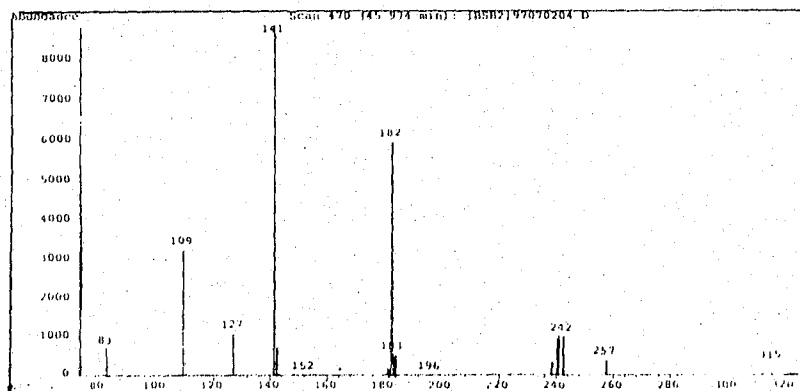


Figure 33. Spectre de masse LC/SM du composé RH2

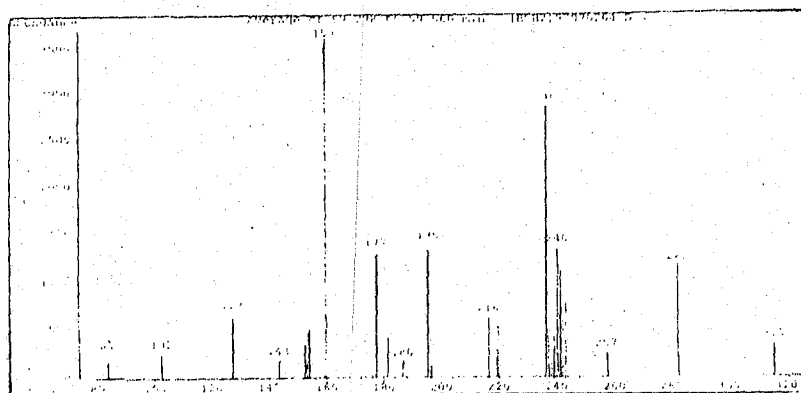


Figure 34. Spectre de masse LC/SM du composé RH3 (acide férulique)

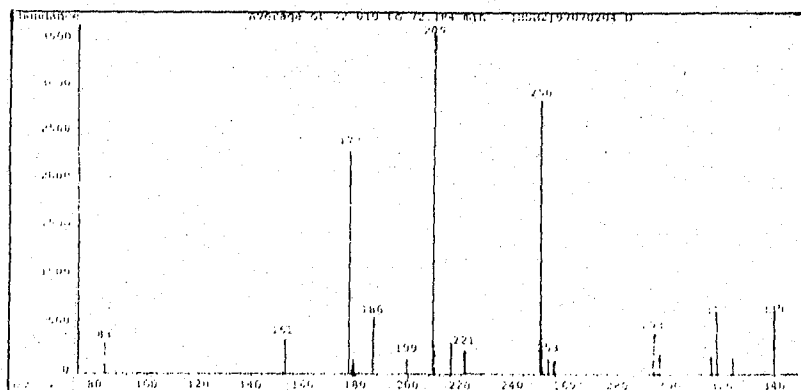
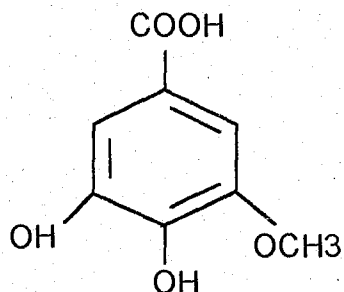
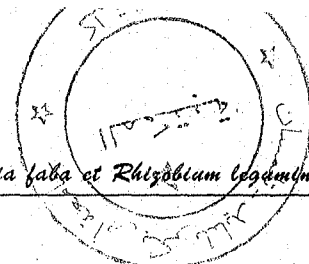


Figure 35. Spectre de masse LC/SM du composé RH4 (acide syringique)



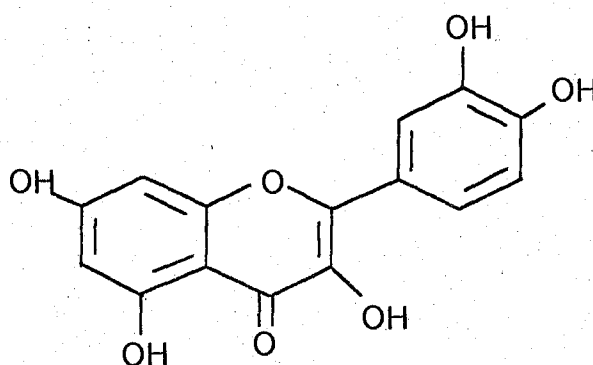
Acide syringique

d) RH.5 (composé 5 des hydrolysats de racines)

Le composé 5 présente un temps de retention de 54 mn, un spectre UV/visible de 263 nm. Le spectre de masse avec un pic moléculaire m/e de 270 nous oriente vers une isoflavone, (figure 36).

e) RH.8 (composé 8 des hydrolysats de racines)

Le composé 8 présente un temps de retention de 57,28 mn, un spectre UV/visible de 266-350 nm. Le spectre de masse nous donne un pic moléculaire m/e de 302, nous sommes en présence d'une flavonol la quercetine (figure 37).



3', 4', 5, 7, pentahydroxyflavone

(quercetine)

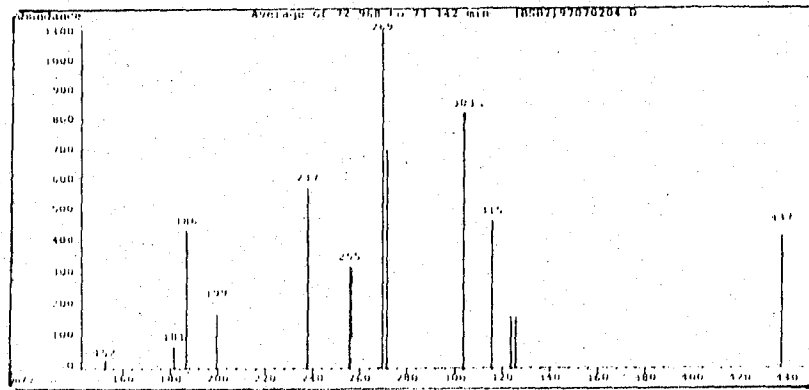


Figure 36. Spectre de masse LC/SM du composé RH5

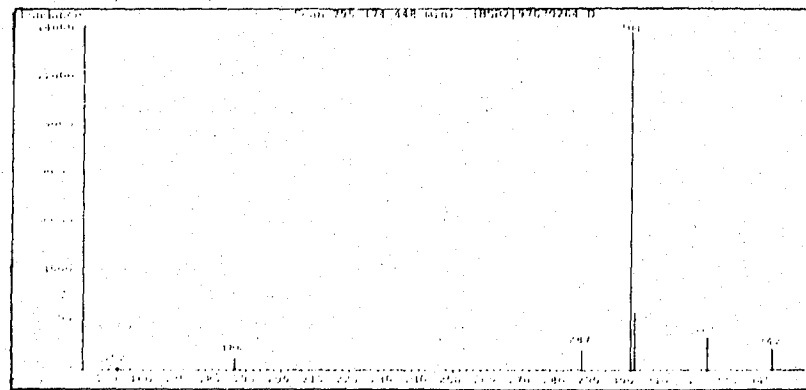


Figure 37. Spectre de masse LC/SM du composé RH8 (quercétine)

Conclusion

Les résultats de l'étude des composés inducteurs de gènes *nod* identifiés dans les exsudats de racines, racines et hydrolysats de racines sont récapitulés dans le tableau 21. Nous avons mis en évidence 5 composés **inducteurs de gènes *nod*** dans les différents extraits de *Vicia faba* de cv Alfred (exsudats racinaires, racines et hydrolysats de racines) parmi eux nous avons:

- Deux composés identifiés comme inducteurs de gènes *nod* dans les exsudats racinaires sont de type flavone: **ER.4** (la **tricétine**) et de type flavanone: **ER. 11** (la **naringénine**).
- Un seul composé inducteur de gènes *nod* est mis en évidence dans les racines: de type flavanone le **RN.1** (Me-3' **ériodictyol**).
- Deux composés inducteurs de gènes ont été identifiés dans les hydrolysats de racines de type flavanone qui sont les suivants: le **RH.1**(Me-3' **ériodictyol**) et le **RH.7** (**ériodictyol**).

Nous remarquons qu'il existe "un mimétisme" de l'extrait des racines en conditions naturelles par rapport au hydrolysats de racines. Ces deux extraits, nous ont révélé dans les deux cas une molécule inductrice de gènes *nod* de type flavanone qui est le Me-3' ériodictyol. Si nous comparons les molécules inductrices de gènes *nod* dans les exsudats racinaires et hydrolysats de racines, nous constatons que ce "mimétisme" de l'exsudation ne figure pas dans ce cas là, puisque la molécule inductrice qui le **Me-3' ériodictyol** ne figure pas dans les exsudats racinaires. Les autres composés appartenant à la classe des acides phénols, flavonol (quercétine) et flavanes 3-ol restent inactifs sur les gènes *nod* de *R. leguminosarum*.

8. Discussion

Les flavonoides sont des molécules importantes dans la relation légumineuse-*Rhizobium* pour l'établissement de la symbiose (Redmont et *al.*, 1986). Notre principal objectif est d'identifier les molécules inductrices de gènes *nod* dans les exsudats de racines, racines et les hydrolysats de racines.

N° des pics	Temps de retention (TR mn)	UV/visible (nm)	Spectre de masse m/e	Activité β -galactosidase	Composés inducteurs de gènes <i>nod</i>
4 (ER.4)	23,6	272-354	302	156,00 \pm 5,85	Tricétine
11 (ER.11) *	54,3	286	—	153,34 \pm 2,09	Naringénine
1 (RN.1)	64,3	294	302	426,13 \pm 0,26	Me-3' ériodictyol
1 (RH.1)	13,2	284	302	291,12 \pm 3,21	Me-3' ériodictyol
7 (RH.7)	56,96		288	445,29 \pm 0,98	Eriodictyol

Tableau 21. Composés inducteurs de gènes *nod* identifiés dans les exsudats racinaires (ER), racine (RN) et racines hydrolysées (RH) chez *Vicia faba* cv Alfred.

* (co-chromatographie)

8.1 Exsudats de graines non inducteurs de gènes *nod* chez *Vicia faba* cv Alfred

Comme nous l'avons déjà signalé dans le chapitre I, les flavonoides exsudés par la graine sont supposés être les premiers inducteurs des gènes *nod*, car ils sont exsudés en premier avant les exsudats de racine, par exemple la lutéoline a été le premier inducteur isolé dans les exsudats de graines de *Medicago sativa* (Peters et al, 1986). Dans notre cas les exsudats de graines des deux cultivars de *Vicia faba* cv "Blandine" et cv "Alfred" ainsi que les deux mutants, le nodulant précoce f123⁺⁺⁺ et le non nodulant f48⁻ n'ont pas induit les gènes *nod* de *R. leguminosarum*. Nous ne pouvons pas mettre en cause les proanthocyanidines (tannins condensés) comme l'ont signalé certains auteurs (Pankhurt et Jones, 1979), puisque "Blandine" est un cultivar sans tannins. Si, les exsudats de graines n'ont pas induit les gènes *nod* de la bactérie *R. leguminosarum*, en revanche, les exsudats de racines et racines des deux cultivars "Blandine", "Alfred" et le nodulant précoce f123⁺⁺⁺ l'ont induit.

8.2 Molécules inductrices de gènes *nod* chez *Vicia faba* cv Alfred: Flavones et flavanones (tableau 22)

8.2.1 Exsudats racinaires

Les exsudats racinaires de cv Alfred libèrent de nombreuses molécules parmi elles flavones, flavanones, catéchines et acides phénols. Mais les molécules qui induisent le mieux les gènes *nod* de *R. leguminosarum* sont surtout de type flavone, comme la tricétine (5, 7, 3', 4', 5' pentahydroxy-flavone) et de type flavanone, comme la naringénine (5, 7, 4' trihydroxy-flavanone). Nos résultats sont en accord avec ceux de (Zaat et al., 1989; Recourt et al., 1991) qui ont identifié des molécules surtout type flavanone comme inducteur de gènes *nod* dans les exsudats racinaires de *Vicia sativa*.

8.2.2 Racines

Un seul composé le Me-3' ériodictyol qui est majoritaire dans l'extrait de racine, a induit fortement *R. leguminosarum*. Chez d'autres espèces végétales

Extraits	<i>Vicia faba</i>	<i>Vicia sativa</i> (1)	<i>Medicago sativa</i> (2)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (3)	<i>Glycin max</i> (4)	<i>Trifolium Repens</i> (5)	<i>Pisum sativum</i> (6)
Exsudats de graines			Lutéoline Chrysoérol Stachydrine Trigonelline 3'-méthoxy-4', 5, 7 trihydroxyflavone	Delphinidine Malvimidine Myricétine Quercétine Kaempferol	Genistéine Daidzéine		Apigénine-7-O-glycoside Eriodictyol Hespérintine
Exsudats racinaires	Tricétine Naringénine	7, 4'-dihydro-flavone Naringéine Liquiritigénine 7, 4'-dihydroxy-4-méthoxyflavone Homoériodictyol Hespérintine 4', 4-dihydroxy-2'-méthoxychalcone Isoliquiritigénine 3, 5, 7, 3-tétrahydroxy-4'-méthoxyflavanone	4, 4'-dihydroxy-2'-méthoxychalcone 4', 7-dihydroxyflavone 4', 7dihydroxyflavanone Formononetin-7-O-glycoside	Eriodictyol Naringénine Genistéine-7-O-glycoside	Genistéine Daidzéine	4', 7-dihydroxyflavone 4'-dihydroxy-3-méthoxyflavone 4'-hydroxy-7-méthoxyflavone	
Racines natives	Me-3' ériodictyol						
Hydrolysats de Racines	Me-3' ériodictyol Eriodictyol						

Tableau 22. Molécules inductrices des gènes *nod* de *Vicia faba* cv Alfred et autres légumineuses

1. Zaat et al, 1987; Recourt et al, 1991
2. Hartwig, 1990 ; Hartwig, 1991; Phillips, 1993; Peters et al, 1986; Maxwell, 1990; Dakora, 1993
3. Hungria, 1991
4. Kosslak, 1987
5. Redmont et al, 1986
6. Firmin, 1986; Innes 1985

comme le trèfle, un très fort inducteur le 4', 7-dihydroxy-flavone a été isolé de l'extrait de racine. Deux isoflavones, la daidzeine et la génisteine sont les composés majeurs dans les extraits de racines de Soja (*Glycine max*), ils sont responsables de l'induction de gènes *nod* chez *B. japonicum* (tableau 22), (Kosslak et al., 1987).

8.2.3 Hydrolysats de racines

Deux flavanones ont la capacité d'induire les gènes bactériens dans les hydrolysats de racines de cv Alfred. Le composé **RH.1** qui est **Me-3 ériodictyol** et le composé **RH.7** qui est l'**ériodictyol**, (tableau 22). Les flavonoides suivants (ériodictyol et hespéritine) restent de meilleurs inducteurs de *R. leguminosarum* chez *Vicia sativa* et le pois (Zaat et al., 1987; Firmin et al., 1986).

9. Molécules non inductrices de gènes *nod* chez *Vicia faba* cv Alfred: Isoflavones et acide phénols

9.1 Exsudats racinaires

Deux composés de type isoflavone le ER.2 (5,7-diOH, 4'OMe -isoflavone) et le ER12 et un composé de type acide phénol le ER.6 n'ont pas induit les gènes *nod* de *R. leguminosarum*.

D'autres familles de flavonoides, les flavonols restent des composés non inducteurs de gènes *nod* chez d'autres espèces végétales, comme par exemple le kaempferol qui inhibe complètement l'induction de gènes *nod* des exsudats racinaires de *Vicia sativa* (Recourt et al., 1992).

D'après certains auteurs (Kosslak et al., 1987), deux isoflavones la daidzeine et la génisteine sont identifiés comme des signaux chimiques chez *B. Japonicum* et *R. fredii*. Dans notre cas, les isoflavones du cv Alfred ont été inhibiteurs de gènes *nod* de *R. leguminosarum*.

9.2 Hydrolysats de racines

Les Composés de type catéchique (RH2, RH3, RH4), les composés de type acides phénols et les molécules de type flavonols RH8 (quercétine) n'ont pas induit les gènes *nod* de *R. leguminosarum*.

De nombreux travaux ont montré que tous les flavonols testés sur *R. leguminosarum* biovar *viciae*, *trifolii* et *R. meliloti* restent inactifs (Djordjevic et al., 1988; Redmont et al., 1986; Rolfe et al., 1988; Zaat et al., 1987; Zaat et al., 1988). Quatre glycosides de flavonols (kampférol 3-O glycoside) identifiés dans les racines de *Vicia sativa* étaient incapable d'induire *R. leguminosarum* bv *viciae*.

Il est intéressant de noter que certaines molécules agissent comme inhibiteur dans un système symbiotique peuvent agir comme activateur dans un autre système. Comme par exemple la quercétine inhibitrice de gène *nod* chez *Vicia faba* et activatrice chez *Phaseolus vulgaris* (tableau 22); (Hungria et al., 1991a).

10. Catéchine et *Rhizobium*

Nous avons testé deux témoins de type catéchique la (+) catéchine et la D catéchine sur *R. leguminosarum nod C - lac Z*. Les gènes *nod* de *R. leguminosarum nod C - lac Z* sont activés faiblement par la (+) catéchine alors que la D catéchine inhibait complètement les gènes *nod* de cette bactérie (tableau 16). Dans les exsudats racinaires et extraits de racines aucun dérivé catéchique n'a induit *R. leguminosarum nod C - lac Z*.

Cooper et al., (1992) ont mis en évidence de la catéchine dans les nodules Fix^+ du *Lotus pendunculatus* et non dans les nodules Fix^- . Les tannins condensés sont absents chez les nodules Fix^+ mais ils sont présents dans les nodules Fix^- .

Nous pouvons supposer que la catéchine peut présenter une certaine activité envers les gènes *nod* de la bactérie.

Les tannins appliqués dans le sol sont révélés comme des inhibiteurs de la nodulation chez les haricots et autres légumineuses (Blum et Rice, 1969; Muthukumar et al., 1985). Les tannins inhibent la croissance des *Rhizobium* (Pankhurt et Jones, 1979). Cependant le mécanisme par lequel les tannins réduisent la nodulation reste un phénomène à éclaircir.

Les résultats trouvés auparavant nous ont montré que les exsudats de graines de *Vicia faba* cv Alfred et le nodulant précoce f123⁺⁺⁺ avec tannins et le cultivar cv Blandine sans tannins n'ont pas induit les gènes *nod* de *R.*

leguminosarum nod C – lac Z. Ceci n'est pas dû à la présence de tannins condensés dans ces graines mais peut être aux composés antagonistes de l'induction de gènes *nod* existant dans les graines de *V. faba*.

D'après Djordjevic et al, (1987), les légumineuses exsudent également des composés antagonistes de l'induction de gènes *nod*. Ce sont des isoflavones et des coumarines et que l'induction finale dépend du rapport composés inducteurs / composés antagonistes.

Dans notre cas nous supposons que l'inhibition de gènes *nod* dans les exsudats de graines des cultivars et mutants est dû probablement à certains composés antagonistes présents dans les graines.

Conclusion

Les exsudats de graines n'ont pas été les principaux inducteurs de gènes *nod* chez les cultivars Blandine, Alfred et les deux mutants f123¹¹⁴, f48¹¹⁴ de *Vicia faba*. Ce sont les exsudats racinaires et racines hydrolysées qui ont répondu le mieux aux tests de l'induction de gènes *nod*.

Nous avons trouvé que les inducteurs de gènes *nod* issus des exsudats racinaires de cv Alfred sont la tricétine et la naringénine.

Les inducteurs de gènes *nod* mis en évidence dans les hydrolysats de racines sont de type flavanone: le Me-3' ériodictyol et l'ériodictyol. Une seul composé inducteur de gènes *nod* le Me-3' ériodictyol a été identifié dans les racines de *Vicia faba* cv Alfred.

C O N C L U S I O N
G E N E R A L E

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les légumineuses ont la capacité d'assurer une grande partie de la nutrition azotée grâce à une symbiose avec des bactéries du sol du groupe *Rhizobium*. Cette symbiose s'effectue au sein d'organes particuliers, les nodosités, siège de la fixation biologique de l'azote atmosphérique.

Des travaux concernant la fixation biologique de l'azote par la symbiose *Rhizobium*-légumineuses sont conduits dans de nombreux laboratoires travaillant dans des disciplines diverses. En outre le laboratoire d'amélioration des plantes de Dijon a débuté il y a dix ans, une étude génétique des caractères symbiotiques chez la plante hôte.

Notre étude sur la relation plante- *Rhizobium* avait pour double objectif, d'une part d'étudier la physiologie du métabolisme phénolique chez les cultivars et mutants de *Vicia faba* en se basant surtout sur l'exsudation des composés phénoliques des graines et racines de cette espèce, d'autre part d'analyser et identifier les signaux symbiotiques dans la relation *Vicia faba*- *Rhizobium*. Nous avons abordé tout d'abord l'exsudation des composés phénoliques dans les différents compartiments de la graine et au niveau de la racine.

En effet, l'exsudation des composés phénoliques de la graine entière était favorable à 30 °C qu'à 4 °C chez les deux cultivars Blandine et Alfred.

Nous avons montré que les composés phénoliques étaient surtout localisés dans les cotylédons pour le cv Blandine et dans les téguments chez le cv Alfred et que ces deux cultivars présentent un *pattern* phénolique différent basé essentiellement sur des phénols simples et flavonols chez cv Blandine et sur des composés de types catéchiques chez cv Alfred. Le *pattern* phénolique des exsudats de graines du nodulant précoce f123¹¹¹ est dominé surtout par des flavones et catéchines. Au niveau tégumentaire, tous les géotypes étudiés sont caractérisés surtout par les tannins condensés sauf le géotype Blandine. Cependant, ces tannins condensés ne sont pas exsudés dans le milieu mais restent

stockés dans les téguments de la graine, seules les molécules de type catéchique sont exsudées des graines de *Vicia faba*.

Les exsudats de racines de légumineuses contiennent un grand nombre de molécules inductrices de gènes *nod* (Firmin et al., 1986; Redmont et al., 1986). Cette induction représente une des étapes les plus précoces dans l'interaction plante-*Rhizobium*. Ceci nous a amené à étudier la cinétique des composés phénoliques (flavonoïdes) des racines de cv Blandine pendant les premiers 21 jours de croissance. Les résultats obtenus nous ont révélé que les composés phénoliques sont libérés dès les premiers jours de la vie des plantules et que les racines exsudent des flavanones et flavones, ces molécules jouent un rôle important dans le phénomène de la symbiose.

Les signaux chimiques émis par les exsudats racinaires et racines de *Vicia faba* cv Alfred étaient les flavones et les flavanones. Les composés inducteurs de gènes *nod* identifiés dans les exsudats racinaires sont la **tricétine** (5, 7, 3', 4' pentahydroxy-flavone) et la **naringénine** (5, 7, 4' trihydroxy-flavone). Dans l'extrait de racines un seul composé a induit les gènes *nod* de la bactérie c'est le **Me-3' ériodictyol**. L'hydrolyse de cet extrait de racines nous a révélé deux molécules inductrices de gènes *nod* qui sont: le **Me-3' ériodictyol** et l'**ériodictyol**. Les autres composés mis en évidence: les acides phénols, flavonols, isoflavones et dérivés catéchiques ont une action inhibitrice des gènes *nod* envers *R. leguminosarum nod C - lac Z*.

Compte tenu du rôle des gènes *nod* dans le déclenchement du processus de nodulation, l'action des inducteurs de ces gènes peut se concrétiser par une amélioration de l'intensité ou de la rapidité de l'infection de bactéries induites.

Certains auteurs ont réussi à mettre en évidence une augmentation de l'un ou de l'autre de ces paramètres chez des cellules traitées avec un inducteur des gènes de nodulation. L'application de la lutéoline (Kapulnik et al., 1987) ou de la

naringénine (Jain et al., 1990) dans la rhisosphère de plantes de Luzerne élève le nombre et la masse de nodosités par plante.

La préincubation de la souche de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANV8483 avec la 4'-dihydroxy-flavone accroît sa vitesse d'initiation de l'infection par conséquent sa compétitivité (Rolfe et al., 1987).

Dans notre étude nous nous sommes intéressés surtout aux signaux chimiques dans la relation *Vicia faba* cv Alfred -*Rhizobium leguminosarum*. Les études futures devront dans un premier temps compléter l'identification des composés inducteurs de gènes *nod* des exsudats racinaires et racines des mutants de *Vicia faba* f123⁺⁺⁺ et f48⁻, et dans un deuxième temps, s'intéresser à l'inoculation des exsudats racinaires d'une super nodulante f123⁺⁺⁺ sur une non nodulante f48⁻, pour voir si on restaure la capacité des bactéries à noduler; ou si seulement un problème d'exsudats.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bate-Smith EG** 1973. Tannins of herbaceous Leguminosae. *Phytochemistry* 12, 1809-1812.
- Benfalvi Z., Nicuwoop MS., Best L., Staley G.** 1988. Régulation of *nod* gene expression in *B. Japonicum*. *Mol. Gen. Genet* 214, 420-424.
- Beijerinck M.V.** 1888. Die Bactérien des Papilioacckenknöllchen. *Bot. Ztg.* 46, 26-804.
- Beynon J.L., et Josey D.P.** 1980. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.* 118, 437-442.
- Bleicher K and Bayer E.** 1994. *Chromatographia.* 39, 405.
- Blum V et Rice E.L.** 1969. Inhibition of symbiotic nitrogen fixation by gallic acids and possible roles in old field successions. *Bulletin of the Torrey Botanical Club.* 96, 531-544.
- Bond DA** 1976. In vitro digestibility of the testa in tannin free field beans (*Vicia faba* L.). *J. Agric. Sci (Camb)* 86, 561-566.
- Bond D., Toyneeb-Clerke G., Pope M., Hall J A.** 1986. Comparaison between white and colored flower plants and between near-isogenic tannin free and tannin containing lines of *Vicia faba*. *Vortage für plansenzuchtung.* 1, 137-150.
- Bond D.A., Smith T.K.** 1989. Possibilities for the reduction of antinutritional factors in rain legumes. In: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds* (Huisman J, A.F.B. Van der Poel and I.E. Liener, Editors) PUDOC Wageningen, the Netherlands, 285-296.
- Bond DA., Duc G.** 1993. Plant breeding as a means of reducing antinutritional factors in grains legumes. In: *cd A. F. B van der Poel, J. Huisman and H.S Saini, Recent Advances of research in Antinutritional Factors in Legume Seeds.* Wageningen Pers. pp. 359-367.
- Boukhari U.G., Coleman D.C., et Rubink A.** 1979. Chemistry of root exudates and rhizosphere soils of prairie plants. *Can. J. Bot.* 57, 1473-1477.
- Brun N.** 1991. Les Tannins de la fèveole (*Vicia faba* L., Leguminosae). Diversité chimique et variétale. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon I. France.

- Brun N., Jay M., Merghem R. 1992. A proposition for the study of phenolic and legumes. 1^{ère} conférence Européenne sur les protéagineux; Angers-France, 393-394.
- Burden R.S., Rogers P.M., et Wain R.L. 1974. Investigations on fongicides. XVI. Natural resistance of plant roots to fungal pathogens. Ann. Appl. Biol. 78, 59-63.
- Burns RE. 1971. Method for estimation of tannin in grain Sorghum. Agron. J. 63, 511-512.
- Burkhardt B., Schillik D., et Pühler A. 1987. Physical characterisation of *Rhizobium meliloti* megaplasmids. Plasmid. 17, 13-25.
- Bushby HVA. 1982. Ecology. In: Broughton JW (ed). 1982. Nitrogen fixation, vol 2. *Rhizobium*. Clarendon Press, Oxford, pp 35-76.
- Cabrera A., Martin A. 1986. Variation in tannin content in *Vicia faba* L. J. Agric. Sci. Camb. 106, 377-382.
- Cadahia E., Leyvar A., Ruiz-Argueso T. 1986. Indigenous plasmids and cultural characteristics of rhizobia nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Arch. of Microbiol. 146, 239-244.
- Caetano-Anolles G., Crist-Estes., et Bauer W. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. J. Bacteriol. 170, 3164-3169.
- Chaboud A., et Rougier M. 1981. Sécrétions racinaires mucilagineuses et rôle dans la rhizosphère. Année Biologique. 20, 313-326.
- Chen W.X., Han G.H., et Li J.L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 392-397.
- Chen W.X., Li G.S., Qi Y.L., Wang E.T., Yuan H.L., et Li J.L. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 275-280.
- Chen W., Wang E., Wang S., Li Y., Chen X., et Li Y. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang People's Republic of China. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 153-159.
- Cooper JE and Rao JR 1992. Localized changes in flavonoid biosynthesis in roots of *Lotus pendunculatus* after infection by *Rhizobium loti*. Plant physiol. 100, 444-450.
- Conn. 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. J. Bacteriol. 44, 1424-1427.

Constant HL., Slowing K., Graham JG., Pezzuto JM., Cordell GA and Beecher C.W .W. 1997. A General Method for the Dereplication of flavonoid glycosides utilizing High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometric. Analysis. 8, 176-180.

Crow VL., Jarvis BDW et Greenwood RM 1981. Desoxyribonucleic acid homologies among acid producing strains of *Rhizobium*. Int. J.Syst. Bacteriol. 31, 152-172.

Cruickshank IAM, Perrin D.R. 1960. Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. Nature. 187, 799-800.

Dakora FD, Joseph CM et Phillips 1993. Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. Mol. Plant. Microb. Interact. 6, 665-668.

D'Arcy Lameta A 1982. Etude des exsudats racinaires de Soja et de Lentille. I. Cinétique d'exsudation des composés phénoliques des amino acides et des sucres au cours des premiers jours de la vie des plantules. Plant and Soil. 68, 359-403.

D'Arcy Lameta A. 1984. Recherches sur quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes des exsudats racinaires chez deux légumineuses (Lentille et soja) en relation avec les *Rhizobium* spp. et d'autres micro-organismes du sol. Thèse de Doctorat d'Etat. Paris VI.

D'Arcy Lameta A. 1986. Study of Soybean and lentil root exudates. Plant and Soil. 92, 13-123.

De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M. D., Dreyfus B., Kersters K., Gillis M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia; emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int. Syst. Bacteriol. 44, 715-733.

De Ley J., et Rassel A. 1965. DNA base composition, flagellation, and taxonomy of the genus *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 41, 85-91.

De Pascual-Teresa S., Gutiérrez-Fernández Y., Rivas-Gonzalo J C and Santos-Buegla C. 1998. Characterisation of Monomeric and oligomeric flavan-3-ols from Unripe Almond Fruits. Phytochemical analysis. 9, 21-27.

Dénarié J., Debelle F., et Rosenberg C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. Annu. Rev. Microbiol. 46, 497-531.

Djordjevic M.A., Redmont J.M., Batley M., et Rolfe B.G. 1987. Clovers secrete specific phenolic compound which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. EMBO J. 6, 1173-1179.

- Djordjevic MA., Mc Iver J., Bender JL., Weinmann JJ., Rolfe BG.** 1988. Point mutations in nod D alters function and confers extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to ParaSponia. In Palacios R, Verna DPS(eds) Molecular genetics of Plant Microbe Interactions, pp101-102. Aps press, St Paul, MN.
- Dreyfus B.L., Garcia G.L., et Gillis M.** 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem- nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 89-98.
- Duc G., et Picard J.** 1986. Note of the presence of the sym1 gene in *Vicia faba* L. hampering its symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. Euphytica. 35, 61-64.
- Duc G. et Messager A.** 1989. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. Plant Sci, 60. 207-213.
- Duc G., Brun N., Mergham R., et Jay M.** 1995. Genetic variation in tanning related characteristics in Faba bean seeds (*Vicia faba* L.) and their relationship with seed coat colour. Plant Breed. 114, 272-274.
- Duc G.** 1995. Mutagenesis of faba bean (*Vicia faba* L) and the identification of five different genes controlling no nodulation , ineffective nodulation or supernodulation. Euphytica. 83, 147-152.
- Duc G.** 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). (Field Crops Research. 1-11, in press).
- Duke JA.** 1981. a Handbook of legumes of world Economic importance plenum Press, New York.
- Eurostat** 1991. Agricultural statistical yearbook. Luxenbourg.
- Faucher C., Camut H., Dénarié J., et Truchet G.** 1989. The *nod* H and *nod* Q host range genes of *Rhizobium meliloti* behave as avirulence genes in *R. leguminosarum* bv. *viciae* and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals. Mol. Plant-Microbr interact. 2, 291-300.
- Firmin J.L., Wilson K.E, Rossen L., et Johnston A.W.B.** 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. Nature (London). 324, 351-360.
- Firmin J.L., Wilson R.W., Davies A.E., et Downie J.A.** 1993. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nod* X, which mediates an *O*-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipooligosaccharid nodulation factor. Mol. Microbiol. 10, 351-360.

- Franck B 1889.** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Dtssch. Bot. Ges. 7, 332-346.
- Gajendiran N and Mahadevan A 1988.** Utilisation of catechin by *Rhizobium* sp. Plant and Soil. 108,263-266.
- Gelin O. et Blixt S. 1964.** Root nodulation in peas. Agric. Hort. Genetica, 22, 149-159.
- Gioacchini AM., Roda A., Galleti Gc., Bocchini P., Mametta AC., Baraldini M. 1996** High performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of phenolic acids and aldehydes. Journal of chromatography A. 730, 31-37.
- Görge E., et Werner D. 1991.** Degradation of wycerone, the phytoalexin of faba beans by *Rhizobium leguminosarum*. Curr. Microbiol. 23, 153-157.
- Göffert M. 1993.** Regulation and function of rhizobial nodulation genes. FEMS Microbiol. Reviews. 104, 39-64.
- Graham P. H. 1963** Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 29, 281-291.
- Graham P.H. 1964.** The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol. 35, 511-517.
- Graham P.H., Viteri SE, Mackie F, Vargas A. T, Palacios R. 1982** Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*; Field Crops Res. 5, 121-128.
- Graham TL. 1990.** Flavonoid and isoflavonoid distribution indevelopping Soybean seedling tissues and in seed and root exudates. Plant physiol. 95, 594-603.
- Graham P. H., Sadowsky M J., Keyser H. H., Barnet Y. M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley D. J., Jarvis B. D. W., Roslycky E.B., Strijdom B. W., Young J. P. W. 1991.** Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 582-587.
- Guinochet M., De Vilmorin R. 1984.** Flore de France, Editions du CNRS. Paris.
- Hale MG et Moore LD. 1979.** Factors affecting root exudation. II-1970-1978. Adv. Agron. 31, 93-124.
- Harbonne J.B., Mabry T.J., et Mabry H. 1975** The flavonoids. Chapman et Hall. Londres, p1204.

- Harborne J.B.** 1988. The flavonoids: Advances in research since 1980. Chapman; Hall, London.
- Harrison S.P., Jones D.J., Schönmann P.H.D., Forster J.W., et Young J.P.** 1988. Variation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sym plasmids and the association with effectiveness of nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2721-2730.
- Harvis HB** 1969. Bird resistance in Sorghum. Proceedings of the 24 h Annual Corn and Sorghum Research Conferance (Chicago) pp 113-122.
- Hartwig U.A., Maxwell C.A., Joseph C.M and Phillips D.A.** 1990 Chrysoeriol and lutéolin released from Alfalfa Seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant physiol.* 92, 116-122.
- Hartwig UA. Et Phillips DA** 1991. Release and modification of nod gene inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant physiol.* 95, 804-807.
- Hopper W and Mahadevan A** 1988. Utilisation of catechin and its metabolites by *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 35, 411-415.
- Hungria M., Joseph C.M and Phillips D.A.** 1991a. Anthocyanidins and flavonols, Major nod gene inducers from seeds of a Black-Seeded Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant physiol.* 97, 751-758.
- Hungria M., Joseph C.M and Phillips D.A.** 1991b. *Rhizobium* nod gene inducers Exuded Naturally from Roots of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L). 97, 759-764.
- Helsper J. P. F. G., Van Norel, Burger-Meyer K., Koogendijk J. M.** 1994. Effect of the absence of condensed tannins in faba beans (*Vicia faba*) on resistance to foot rot, Ascochyta blight and chocolate spot. *J. Agric. Sci. Camb.* 123: 349-355.
- Hellriegel H et Wilfarth N** 1988. Untersuchungen Über die stickstoffnahrung des Gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Zeitschrift des verein Rue benzucker; Industrie, Deushen Reichs.
- Herberlein G.T., De Ley J., Tijtgat R.** 1967. Desoxyribonucleic acid homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium* et *Chromobacterium*. *J. Bacteriol.* 94, 116--124.
- Hernandez G, Ramirez M, Suarez M and Fuentes SI.** 1995. Root exudates nod gene inducing signals limit the nodulation capacity of different alfalfa varieties with *Rhizobium meliloti*. *Plant cell Rep.* 14, 626-689.
- Heywood V.H., Richardson IBK** 1964. The genera of flowering plants. Clarendon press, Oxford.

- Hirsch A. M., McKhann H. I; Löbler M.** 1992. Bacterial-induced changes in plant form and function. *Int. J. Plant. Sci.* 153:172-181.
- Hubac C., Ferran J., Guerrier D., Trémolières A et Kondorosi A** 1993. Luteolin absorption in *Rhizobium meliloti* wild-type and mutant strains.
- Innes R.W., Kuempel P.L., Plazinski J., Canter -Cremers H., Rolfe B.G., Djordjevic M.A** 1985. Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *Rhizobium trifolii*. *Mol. Gen. Genetic.* 201, 426-432.
- Jain V., Garg N. and Nainawatee. H.S.** 1990. Naringenin enhanced efficiency of *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *World J. Microbiol and Biotechnol.* 6, 434-436.
- Jarvis B. D. W., Dick A.G et Greenwood R.M.** 1980. Deoxyribonucleic acid homology among of strains of *Rhizobium trifolii* and related species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 42-52.
- Jarvis B. D. W., Pankhurst C. E., et Patel J.J.** 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 3, 378-380.
- Jarvis B. D. W., Gillis M., et De Ley J.** 1986. Intra-and intergeneric similarities between ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 129-138.
- Jarvis B. Downer H. L., Young J. P. W.** 1992. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 93-96.
- Johnston A. W. B., Beynon J.L., Buchanan-Wollaston A. V., Setchell S. M., Hirsch P.R., et Beringer J.E.** 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature (London).* 276, 634-636.
- Jordan DC** 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. Nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Ints. J. System. Bacteriol.* 32, 136-139.
- Jordan D.C.** 1984 Family III. *Rhizobiaceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. N. R. Krieg and J.G. Holt (eds). William and Wilkins Co., Baltimore, Md. PP. 234-244.
- Kapulnik Y., Joseph C.M., Phillips D.A.** 1987 Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in Alfalfa. *Plant physiol* 84:1193-1196

- Kape R, Parniske M, Brandt S, Werner D.** 1992. Isoliquiritigin, a strong nod gene and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1705-1710.
- Keysser HH., Munns D.N.** 1979 a. Effects of calcium, manganese, and aluminium on growth of rhizobia in acid media. *Soil Sci Soc Am J.* 43, 500-503.
- Keysser HH., Munns D.N.** 1979 b. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium and phosphate. *Soil Sci Soc Am J.* 43, 519-523.
- Kolodziej H and Helsper J. P. F. G.** 1993. Proanthocyanidins from *Vicia faba* and their Trypsin Inhibitor Activity. *Planta Med.* 59, Suppl A689-A690.
- Kondorosi A.** 1992. Regulation of nodulation genes in Rhizobia. Dans *Molecular signals in plant microbe communication*; Verma D.P.S., ed, Boca Raton. CRC Press.
- Kossa A.** 1977. Structure chimique des tannins condensés ou proanthocyanidines de la fève graine (*Vicia faba*). Importance sur la valeur nutritive de la fève chez la volaille. Thèse Doctorat. Dijon.
- Kosslak R.M., Bookland R., Barkei J., Paaren H.E., et Appelbaum E.R.** 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 8, 7428-7432.
- Kuykendall LD., Roy MA., O'NEILL JJ et Devine TE** 1988. Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 358-361.
- Kuykendall L. D., Saxena B., Devine T. E., et Udell S. E.** 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38, 501-505.
- Kvien C.S., Ham G.** 1985. Effect of soil temperature and inoculum rate on the recovery of three introduced strains of *Rhizobium japonicum*. *Agron J* 77, 484-489.
- Laguerre G., Fernandez M.P., Edel V., Normand P., et Amarger N.** 1993. Genomic heterogeneity among french *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 761-767.
- La Favre J.S., et Eaglesham A. R. J.** 1984. Increased nodulation of non nodulating (rj1 rj1) soybeans by high dose inoculation; *Plant and soil.* 80, 297-300.

- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.C., et Dénarié J.** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide. *Nature (London)*. 344, 781-784.
- Lindström K.** 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 365-367.
- Lie T.A.** 1978 Symbiotic specialization in pea plants: the requirement of specific *Rhizobium leguminosarum* strains. *Plant Soil*. 82, 415-425.
- Liener IE** 1989. Antinutritional factors in legume seeds. State of the art. In *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in legume seeds*, Herisman J, Van der Poel AFB, Liener IE. Eds, Pudoc. Wageningen. The Netherlands, p6-13.
- Long S.R.** 1989 a. *Rhizobium* genetics. *Ann. Rev. Genet.* 23, 483-506.
- Long S.R.** 1989 b. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56: 203-814.
- Mac Dougall B.M et Rovira A.D.** 1970. Sites of exudation of C¹⁴ substances from wheat roots. *New Phytol.* 69, 999-1003.
- Mansfield J.W.** 1982. The rôle of phytoalexins in diseases resistance. In *phytoalexins*, JA Bagly *JW Mansfield, eds, Blackie, Glasgow and London. pp 253-288.
- Marigo G** 1973. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analysis*. 2, 10-110.
- Martin-Tanguy J., Guillome J., Kossa A.** 1977. Condensed tannins of horse bean seeds: chemical structure and apparent effects on poultry. *J. Sci. Food Agric.* 28, 757-765.
- Martinez E., Flores M., Brom S., Romero D., Davilla G., et Palacios R.** 1988. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. *Plant Soil*. 108: 179-184.
- Martinez E., Pardo M. A., Palacios R., et Cevallos M. A.** 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1779-1786.
- Martinez E., Romero D., et Palacios R.** 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9, 59-93.

- Martinez E., Segonia L., Mercanthe FM., Franco AA., Graham P et Pardo MA 1991. *Rhizobium tropicii*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and Leucaena sp. Trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 3, 417-426.
- Masterson R.V., Russel P.R., Atherly A.G. 1982. Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 152, 928-931.
- Maxwell C.A A and Phillips. 1990. Concurrent synthesis and release of nod gene inducing flavonoids from Alfalfa roots. Plant physiol. 93, 1552-1558.
- Mellor RB et Collinge DB 1995. A simple model based on know plant defence reaction is sufficient to explain most aspects of nodulation. J. Exp. Bot. 282, 1-18.
- Mench M., Morel J. L., Guckert A., Guillet B .1988. Metal binding with root exudates of low molecular weight. J. Soil Sc. 39, 521-527.
- Mergham R. 1995. Les facteurs antinutritionnels (F.A.N) phénoliques de *Pisum sativum* L. et de *Vicia faba* L. (*Leguminosae*): Aspects structuraux, génétiques et phénotypiques. Thèse de Doctorat- Université Claude Bernard Lyon I. France.
- Messens E., Geelend D., Van Montagu M et Holsters M 1991. 7, 4'-dihydroxy-flavanone is the major *Azorhizobium* nod gene inducing factor present in *Sesbania rostrata* seedling exudate. M.P.M. I. 4, 262-267.
- Metche M. 1980. Tannins, nature et propriétés. Journées Internationales du groupe Polyphénol. Neuchâtel, Suisse, 11-32.
- Michiels J.P., et Vanderleyden J. 1994. Molecular basis of the establishment and functioning of a N₂-fixing root nodule. World journal of microbiology and biotechnology. 10, 612-630.
- Middleton E. M, Teramura A. H. 1993. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. Plant physiol. 103, 741-752.
- Minamisawa K. 1989. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Plant. Cell. Physiol. 30, 877-884.
- Mo Y., Nagel C., Taylor L.P. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 7213-7217.
- Moffet M.L., et Colwell R. R. 1968. Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*. J. Gen. Microbiol. 51, 245-266.

- Müller K.O., Borger H. 1940. Experimentale untersuchungen über die Phytophthora-resistenz der kartoffel; Zugleich ein beitrag zum problem der "erworben resistenz" im pflanzenreich; Arb. Biol; Reichsanst. 23, 189-231, cité par Roussel, 1989.
- Mulligan S.T., Long S.R. 1985. Induction of *Rhizobium meliloti* nod C expression by plant exudate requires nod D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 6609-6613.
- Murooka Y., Xu Y., Sanada K., Araki M., Morinaga T., et Yokata A. 1993. Formation of root nodules by *Rhizobium huakuii* biovar renga bv. nov. on *Astragalus sinicus* cv. Japan, J. Ferment. Bioeng. 76, 38-44.
- Muthukumar G., Siivaramakrishnan R and Mahadevan A. 1985. Effects on tannins on plants and on their productivity. Proceeding of the Indian National Science Academy. B51, 1109 -1118.
- Nour S., Cleyet-Marel J. C., Beck D., et Fernandez M.P. 1994 a. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from Chickpea (*Cicer arietinum*). Can. J. Microbiol. 40, 345-354.
- Nour S., Fernandez M.P., Normand P., et Cleyet-Marel J.C. 1994b. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int.J. Syst. Bacteriol. 511-522.
- Nour S., Cleyet-Marel J.C., Normand P., et Fernandez M.P. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) and description of *Rhizobium mediterraneum*, sp. nov. Int. Syst. Bacteriol. 4, 640-648.
- Nozzolillo C., Ricciardi L., Lattanzio V. 1989. Flavonoids constituents of seed coat of *Vicia faba* (Fabaceae) in relation to genetic control of their color. Can. J. bot. 67-1600-1604.
- Pankhurst C.E., Jones W.T. 1979. Effectiveness of lotus root nodules. III. Effect of combined nitrogen on nodule effectiveness and flavolan synthesis in plant root. J. Exp Bot. 30 (119), 1109-1118.
- Paynot M et Martin C 1968. Compt. Rend. 266-680.
- Paxton J.D. 1981. Phytoalexins. A working redefinition. Phytopathol. Z. 101. 106-109. cité par Roussel, 1989.
- Pérez J.F., et Ormeño-Nuñez J. 1991. Roots exudates of wild oats: Allelopathic effect on Spring Wheat. Phytochemistry. 30, 2199-2202.
- Peters N.K., Frost J.W., et Long S.R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science. 233, 977-980.

- Peters N.K., et Long S.R.** 1988. Alfalfa roots exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol.* 88, 396-400.
- Peters N.K., et Verna D.P.S.** 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5, 33-37.
- Peterson M.A et Barnes D.K.** 1981. Inheritance of ineffective nodulation and non nodulation traits in Alfalfa. *Crop Sci.* 21, 611-616.
- Picard J** 1976. Aperçu sur l'hérédité de caractère absence de tannins dans les graines de fève (*Vicia faba* L). *Ann. Amélior. Plantes.* 26, 101-106.
- Prince ML., Buther LG** 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of Sorghum Grain. *J. Agric. Food chem.* 26, 1214-1218.
- Phillips D.A.** 1992. Flavonoids: plant signals to soil microbes. *Recent Adv. Phytochem.* 26, 201-231.
- Phillips DA., Dakora FD., Sande E, Joseph CM and Zou** 1994. Synthesis release and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbiots. *Plant and Soil.* 161, 69-80.
- Phillips DA., Wery J., Joseph CM., Jones AD et Teuber LR** 1995. Release of flavonoids and betaines from seeds of seven *Medicago* species *crop Sci.* 35, 805-808.
- Quinto C., de la Vega H., Flores M., Fernandez L., Ballado T., Soberon G., Palacios R.** 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature.* 299, 724-726.
- Rao J.R., Cooper J.E.** 1988. Flavonoid -*Rhizobium* interactions. In: O' Gara F., Manian S, Drevon JJ (eds) *Physiological limitations and genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation.* Kluwer Academic Press, Dordrecht Boston London, pp 57-64.
- Rao J.R., Sharma N.D., Hamilton J.T.G., Boyd D.R and Cooper J.E.** 1991. Biotransformation of the pentahydroxy-flavone quercetin by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium* strains (Lotus). *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1563-1565.
- Rao J.R and Cooper J.E.** 1994. Rhizobia catabolize nod gene- inducing flavonoids via c-ring fission mechanisms. *Journal of Bacteriology.* 176 (17), 5409-5413.
- Recourt K., van Brussel A. A. N., Driessen A. J. M and Lugtenberg Ben J.J.** 1989. Accumulation of a nod gene inducer, the flavonoid naringenin, in cytoplasmic membrane of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringenin. *Journal of bacteriology;* 171, 4370-4377.

- Recourt K., Schripsema J., Kijne J.W., Van Brussel A.A.N et Lugtenberg B.J.J.** 1991. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones. *Plant Mol. Biol.* 16, 841-852.
- Recourt K., Verkerke M., Schripsema J., Van Brussel A.A.A., Lugterberg RJJ and Kijne JW** 1992. Major flavonoids in uninoculated and inoculated roots of *Vicia sativa* subsp *nigra* are four conjugates of the nodulation gene inhibitor kampferol. *Plant Mol. Biol.* 18, 505-513.
- Reddy N.R., Pierson M.D., Sathe S. K., Salunke D.K.** 1985. Dry bean tannins: a review of nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 541-549.
- Redmont J.W., Batley M., Djordjevic M.A., Innes R.W., Kuempel P. L., et Rolfe B.G.** 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature (London)*. 323, 632-635.
- Rice E.L.**, 1979. Allelopathic. an update. *Bot. Rev.* 45, 15-109.
- Richardson A.E., Djordjevic M.A., Rolfe B.G et Simpson R.J.** 1988. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant and soil.* 109, 37-47.
- Robert F.M., et Schmidt E.L.** 1985. Somatic serogroups among 55 strains of *Rhizobium phaseoli*. *Can. J. Microbiol.* 31, 519-523.
- Roberts G. P., Leps W. T., Silver L.E., Brill W. J.** 1980. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 414-422.
- Robertson B., Aman P., Darwill A. G., McNeil M., Albersheim P.** 1981. Host symbiot interaction V. The structure of the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Pl. Physiol.* 67, 389-400.
- Roche p., Debelle F., Maillet F., Lerouge P., Faucher C., Truchet G., Dénarié J., et Promé J.C.** 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nod H* and *nod PQ* genes encode the sulfatation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell.* 67,1131-1143.
- Rolfe BG et Shine J** 1984. *Rhizobium*- legume symbiosis. In genes Involved in Microbe plant interactions, D.P.S. Verna et T. Hohn (eds), Springer Verlag, Vienne. 95-128.
- Rolfe B. G Redmond J.W., Batley M and Djordjevic M.A.** 1987 Nodulation inducing factors. European patent Application: EP0245931 A2. 26 p.
- Rolfe BG.** 1988. Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactors.* 1, 3-10.

- Rovira A. D.** 1973. Zones of exudation along plants roots and spatial distribution of microorganismes in the rhizosphère. *Pestic. Sci.* 4, 361-366.
- Salunkhe D.K., Chavan J.K., KADDAM S.S.**, 1990. *Dietary Tannins: Consequences and Remedies*. CRC Press. Inc. Boca Raton.FL..
- Schmelzer E., Jahnen W, Hahlbrock K.** 1988. *In situ* localisation of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 2989-2993.
- Schmidt P.E, Parniske M., et Werner D.** 1992. Production of the phytoalexin glyceollin I by soybean roots in response to symbiotic and pathogenic infection; *Bot. Acta.* 105, 18-25.
- Scholla M.H., Moorefield J.A., et Elkan G.H.** 1990. DNA homology between species of the rhizobia. *Syst. Appl. Microbiol.* 13, 288-294.
- Schwedoch J., et Long S.R.** 1990. ATP sulphurylase activity of the nod P and nod Q gene products of *Rhizobium meliloti*. *Nature.* 348, 644-647.
- Slimestad R., and Hostettmann K.** 1996. Characterisation of phenolic constituents from Juvenile and Mature Needles of Norway Spruce by Means of High Performance liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis.* 7, 42-48.
- Smit G., Puvane Sarajah RWC., Barbour WM and Stacey G.** 1992. *Bradyrhizobium japonicum* nod D1 can be specifically induced by Soybean flavonoids that do not induce the nod yABCS4IJ operon. *J. Biol. Chem.* 267, 310-318.
- Smith W.H.** 1976. Character and significance of forest tree exudates. *Ecol.* 57, 324-331.
- Spaink H. P., Wijffelman C. A., Pees., E., Okker R. J. H.; Luternberg B. J. J.** 1987. *Rhizobium* nodulation genes nod D as a determinant of host specificity. *Nature.* 328, 337-340.
- Spaink H.P., Sheeley D.M., van Brussel AAN., Glushka J., York WS., Tak T., Geiger O., Kennedy E.P., Reinhold V.N ., et Lugtenberg B.J.J.** 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature.* 354, 125-130.
- Spaink H. P.** 1993. The molecular basis of the host specificity of *Rhizobium* bacteria. Overdruck Van De Bekroonde Inzending Voor De Kluyver Prijs 1993.
- Stackebrandt E., Murray R.G.E., et Tr,per H.G.** 1988. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 321-325.

- Stadford H.A.** 1991. Flavonoids evolution: an enzymatic approach. *Plant Physiol.* 96, 680-685. *Syst. Bacteriol.* 511-522.
- Statler DG** 1970. Resistance of bean plants to *Fusarium solani* F. *phaseoli*. *Plant Disease Reporter* 54. 698-699.
- Sutherland TD., Bassam BJ., Schuller LJ and Gressshoff PM** 1990. Early nodulation signals of the wild type and Symbiotic mutants of Soybean (*Glycine max*). *Mol. Plant. Microbe Inter.* 3, 122-128.
- Swain T et Hillis WE** 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Agric. Food. Chem.* 10, 63-68.
- Tamura S., Chang C.F., Suzuki A., et Kumai S.** 1969. Chemical studies on "clover sickness". I-Isolation and structural elucidation of two new isoflavonoids in red clover. *Agr. Biol. Chem.* 33, 391-397.
- Tang C.S., et Young C.C.** 1982. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed system of Bigalpa limpogross (*Hemarthria altissima*). *Plant physiol.* 69, 155-160.
- Tomas-Lorente F., Garcia- Grau FM and Tomas-Barberan FA.** 1990. Flavonoids from *Vicia faba* Seed exudates. *Z. Naturforsch.* 45c, 1070-1072.
- Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., de Billy F., Promé J.C et Dénarié J.** 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in Alfalfa. *Nature.* 351,670-673.
- Van der Meer I.M., Stuitje A.R., Mol JNM.** 1993. Regulation of general phenylpropanoid and flavonoid gene expression In Control of plant gene expression. DPS Verma, eds, CRC Press. Boca Raton pp 125-155.
- Vargas A. A. T and Graham P. H.** 1989. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. *Plant and soil.* 117, 195--200.
- Vasilas B.L., et Fuhrmann J.J.** 1993. Field response of soybean to nodulation by a rhizobitoxine-producing strain of *Bradyrhizobium*. *Agron. J.* 85, 302-305.
- Vázquez MA., Davalos A., de las penas A., Sanchez F et Quanto C.** 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*. *J. Bacteriol.* 173, 1250-1258.
- Viands., D. R., Vance C.P., Heichel G.H et Barnes D.K.** 1979. An ineffective nitrogen fixation trait in Alfalfa. *Crop Sci.* 19, 905-908.

- Viands., D. R., Vance C.P., Heichel G.H et Barnes D.K.** 1979. An ineffective nitrogen fixation trait in Alfalfa. *Crop Sci.* 19, 905-908.
- Vincent J. M., et Humphey B.A.** 1970. Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 63, 379-382.
- Voirin B et Lebreton P** 1972. Influence de la température sur le métabolisme de flavonoïdes chez *Asplenium trichomanes*. *Phytochemistry.* 11, 3435-3439.
- Willems A., et Collins M.D.** 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 305-313.
- Williams et Lynch D.L.** 1954. Inheritance of a non nodulating character in soybean. *Agro. J.* 46, 28-29.
- Wolffender J.L., Maillard M and Hostettmann** 1994. Thermospray liquid chromatography-Mass spectrometry in phytochemical analysis. 5, 153-182.
- Wolff A.B, Streit W, Kipe-Nolt J.A, Vargas H, Werner D.** 1991. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. *Biol. Fertil. Soils.* 12, 170-176.
- Wolff A B., Singleton P.W., Sidereli M and Boohlool B B.** 1993 Influence of acid soil on nodulation and interstrain competitiveness in relation to tannin concentrations in seeds and roots of *Phaseolus vulgaris*. *Soil. Biol. Biochem.* 25 (6), 715-721.
- Xian-guo He., Long-Ze. Lin., Li-Zhi LIAN** 1996. Analysis flavonoids from red clover by liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. *Journal of chromatography A.* 755, 127-132.
- Yistra B., Touraev A., Benito-Moreno RM, Stöger E., van Tunnen Aj., Vicento O., Mol J. N. M., Herbele-Borse E.** 1992. Flavonols stimulate development, germination and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol.* 100, 902-907.
- Young J.P.W., Downer H.L., et Eardly B.D.** 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173, 2271-2277.
- Zaat S.A.J., Wijffelman C.A., Spaik H.P., Van Brussel A.A.N., Okker R.J.H et Lugtenberg B.J.J.** 1987. Induction of the nod A promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRLJI by plant flavanones and flavones. *J. Bacteriol.* 169, 198-204.
- Zaat S.A.J., Wijffelman C.A., Mulders I. H. M., VAN Brussel A.A.N et Lugtenberg B. J. J.** 1988. Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes. *Plant Physiol.*, 86-1298-1303.

Zaat S.A. J., Schripsema J., Wijffelman C.A., Van Brussel A.A.N. et Lugtenberg B.J.J 1989. Analysis of the major inducers of the *Rhizobium* nod A promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different nod D genes. *Plant Mol. Biol.*, 13, 175-188.

Zevenhuizen L.P.T.M., et Bertochi C. 1989. Polysaccharide production by *Rhizobium phaseoli* and the typing of their excreted anionic polysaccharides. *FEMS Microbiol. Lett.* 65, 211-218.

PUBLICATIONS

Article 1. (accepté)

Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations.

**Fewzia Bekkara^(1,2), Maurice Jay⁽¹⁾, Marie Rose Viricel⁽¹⁾
and Sophie Rome⁽³⁾**

Article 2. (en cours d'impression)

Flavones and flavanones exuded from exudate roots induce nod genes in *Rhizobium leguminosarum*.

**Fewzia Bekkara^(1,2), Maurice Jay⁽¹⁾, Ahmed Taleb Bendiab,
Marie Rose Viricel⁽¹⁾ and Sophie Rome⁽³⁾**

A N N E X E S

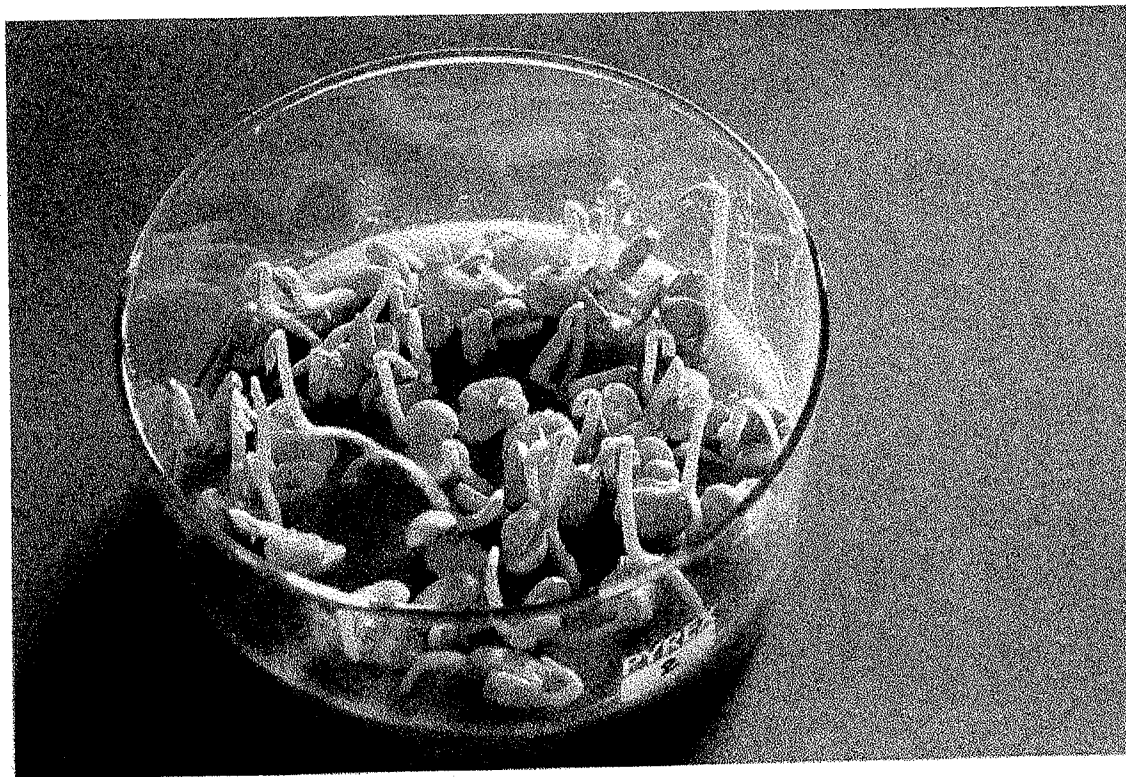
Annexe 1. Fleurs blanches avec ailes noires de *Vicia faba*

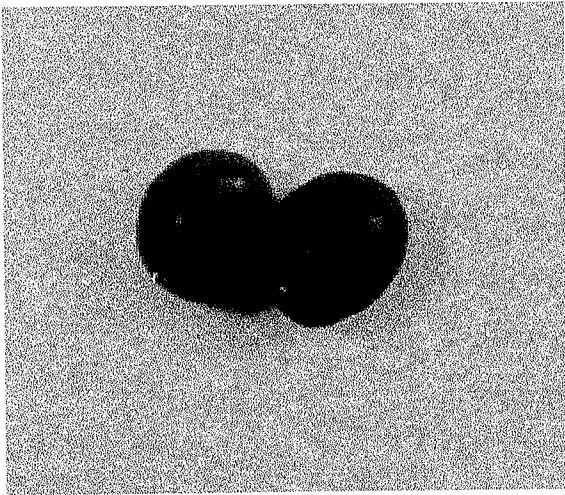


Annexe 2. Gousses de 8 à 20 cm de longueur de *Vicia faba*

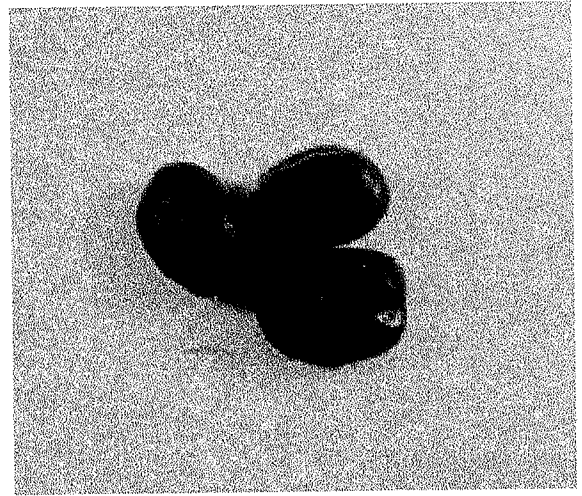


Annexe 3. Graines de *vicia faba* cv Alfred au 3^{ème} jour de germination

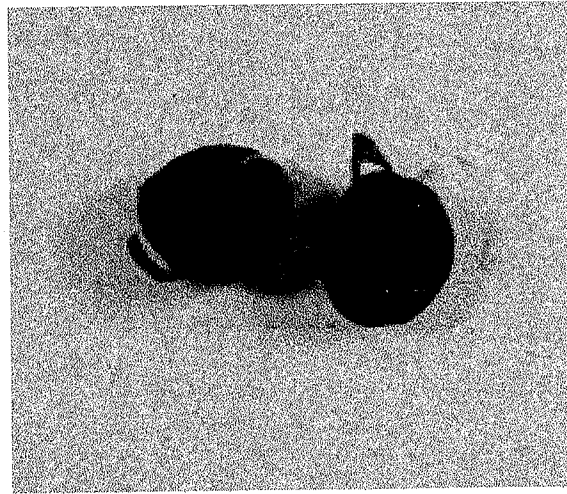




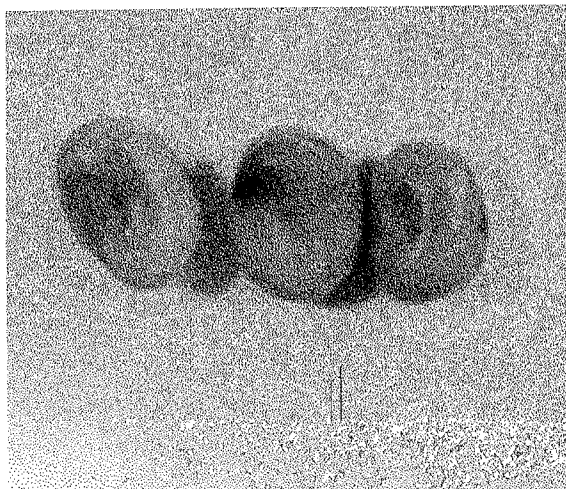
F123⁺⁺⁺ (nodulant précoce)



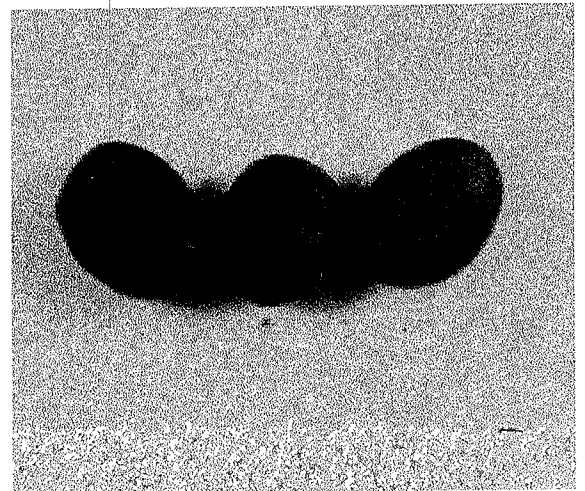
F48⁻ (non nodulant)



F32⁺⁺ (hypernodulant)



Colony 12



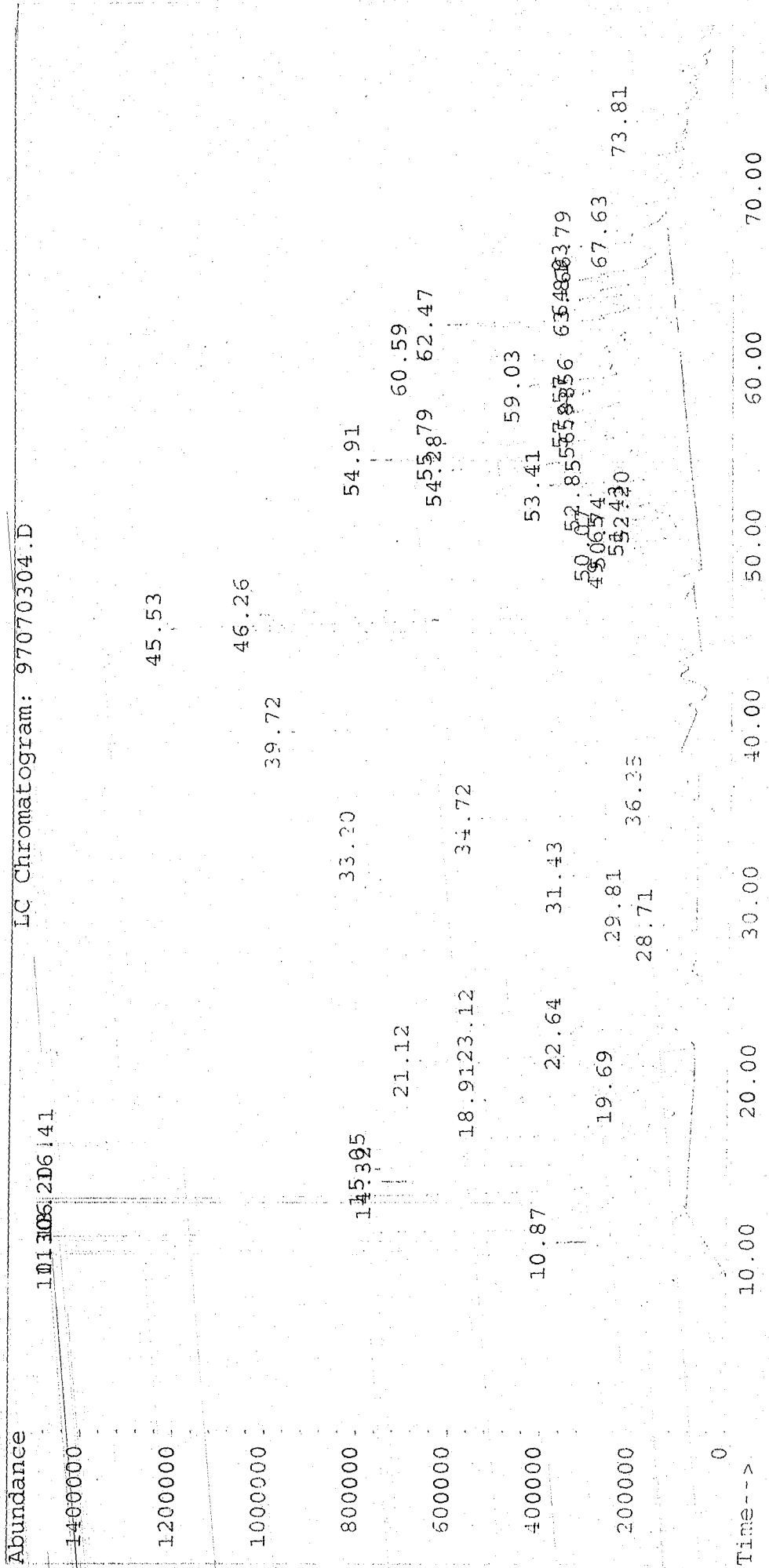
Colony 13

Annexe 4.

Chromatogrammes LC/SM et LC/UV
des exudats racinaires et hydrolysats de racines
de *Vicia faba* cv Alfred

File : C:\HPCHEM\2\DATA\BSB\97070304.D
 Operator : [BSB2]MMF
 Acquired : 3 Jul 97 11:22 am using AcqMethod PALMFOUZ G0.5
 Instrument : 5989x - I
 Sample Name: ER
 Misc Info : CE 104V ET EL VAR
 Vial Number: 1

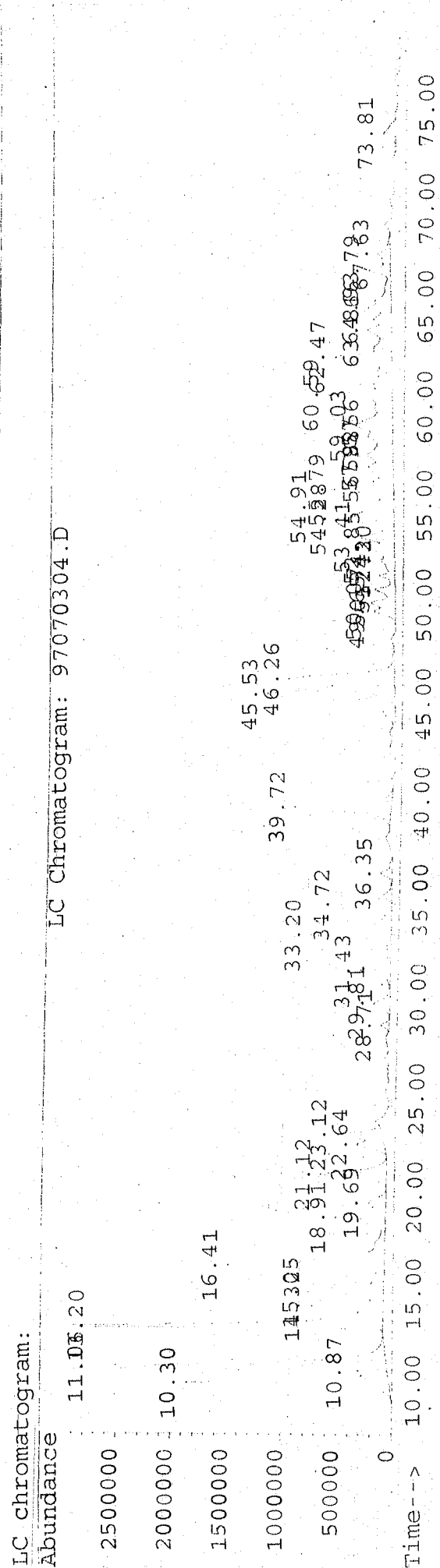
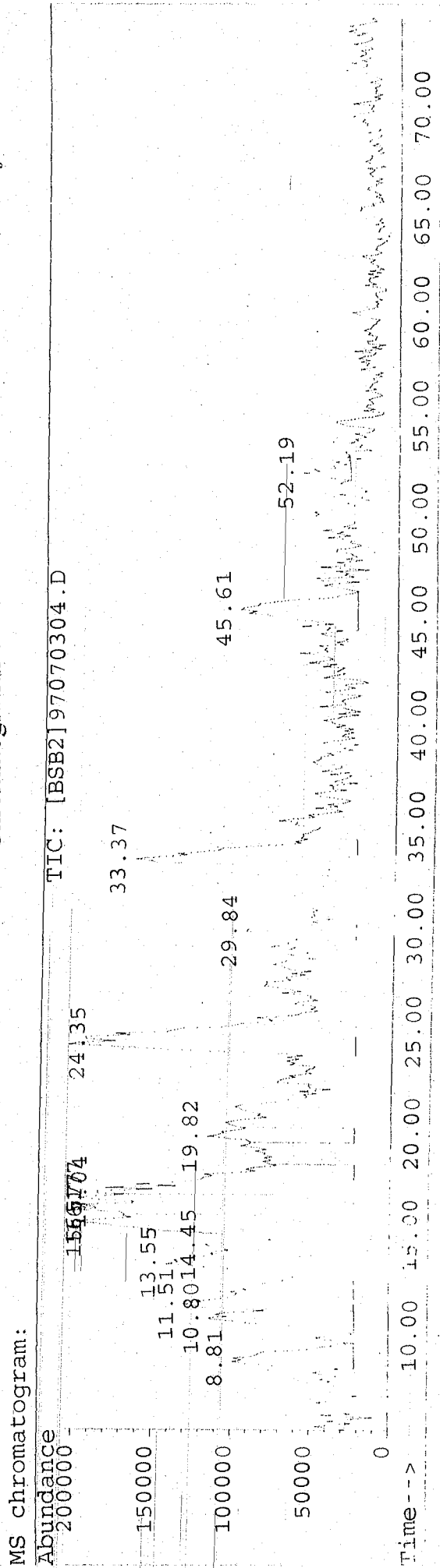
Chromatogramme LC/UV des exsudats racinaires de *Vicia faba* cv Alfred



Time-->

Operator : [BSB2]MMF
 Acquired : 3 Jul 97 11:22 am using AcqMethod PALMFOUZ G0.5
 Instrument : 5989x - I
 Sample Name: ER
 Misc Info : CE 104V ET EL VAR
 Vial Number: 1

Chromatogramme LC/SM des exsudats racinaires de *Vicia faba* cv Alfred



File : C:\HPCHEM\2\DATA\BSB\97070204.D

Operator : [BSB2]MMF

Acquired : 2 Jul 97 2:06 pm using AcqMethod PALMFOUZ G0.5

Instrument : 5989x - I

Sample Name: R

Misc Info : CE 110 V ET EL VAR

Vial Number: 1

Chromatogramme LC/UV des hydrolysats de racines de *Vicia faba* cv Alfred

