



Université Mohamed Khider de Biskra

Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Ghada ALMI

Saida ACHI

Le: lundi 5 octobre 2020

Thème :

**Détermination du profil protéique par SDS-
PAGE des bactéries nodulant une légumineuse
Saharienne**

Jury

Mme. Amel MEGDOUD	MAA Université de Biskra	Président
Mme. Djamila MOKRANI	MAA Université de Biskra	Rapporteur
Mr. Fateh GUEMMAZ	MAA Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019–2020

Remerciement

Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience, la volonté pour mener à terme ce travail.

On remercie sincèrement Mme. Djamila MOKRANI enseignante à Université Mohamed Khider de Biskra d'avoir dirigé ce travail et accepté de l'encadrer.

Nous exprimons tous nos remerciements à l'ensemble des membres de notre jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce mémoire.

Merci infiniment aux ingénieurs de laboratoire du département pour tout l'aide qu'ils ont nous adonnez pour mettre fin à ce travail.

Que toutes les personnes ayant contribué à la réalisation et l'aboutissement de ce modeste travail trouve ici l'expression de notre profonde et sincère gratitude.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

A la lumière de mes jours, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman
AMEL que j'adore.

A mon cher père *ABDELOUAHED* pour lequel je souhaite une longue et heureuse vie
pleine de bonheur, pour leurs sacrifices sans limites, leur amour et leur encouragement.

A mes chères sœurs *Chorouk, Ryheb* et *Wissal*.

A mes frères *Ahmed Raed* et *Mohamed Iyed*.

Je ne pourrais jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à mes chères tantes.

Pour ma très chère binôme: *Saida*

Ghada

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A celle qui ma mise en monde, à la lumière de mes yeux, le bonheur de ma vie,
Ma mère *MESSAOUDA* pour son soutien et ses conseils durant toutes mes années d'étude.

A mon cher père *KHELIFA* qui m'a toujours encouragé et soutenu sans cesse, pour ses
sacrifices.

A mes chères sœurs *Hakima* et *Sara*.

A mes frères *Hassan*, *Djallel*, *Ahmed* et *Mohammed Anis*.

A toute ma grande famille *ACHI* et *KIHEL*.

Pour ma très chère binôme: *Ghada*.

A tous mes amis et les personnes qui me cannaient.

Saida

Sommaire

Liste des Tableaux	I
Liste des Figures	II
Liste des abreviations	III
Introduction	1

Premiere partie: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

1.1. Fixation biologique de l'azote	3
1.1.1. Fixateurs libres	3
1.1.2. Fixateurs symbiotiques	3
1.2. Importance de la fixation biologique de l'azote	3

Chapitre 2 :PARTENAIRES SYMBIOTIQUES

2.1. légumineuses	5
2.1.1. Classification des légumineuses	5
2.1.2. Importance des légumineuses	5
2.2. Macrosymbionte : <i>Astragalus gombo</i> Bunge	6
2.2.1. Position systématique	6
2.2.2. Importance de l' <i>Astragalus gombo</i>	7
2.3. Microsymbionte : Rhizobia	7

2.3.1. Classification	7
2.4. Formation des nodules.....	9
2.5. Méthodes appliquées à l'études de la diversité des rhizobia	11
2.5.1. Méthodes phénotypiques	11
2.5.2 Méthodes génotypiques	12

Deuxieme partie: PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3 : MATERIEL ET METHODES

3.1. Isolement des bactéries à partir des nodules	17
3.1.1. Echantillonnage.....	13
3.1.2. Conservation des nodules	13
3.1.3. Milieux utilisés.....	13
3.1.4. Stérilisation des nodules	14
3.1.5. Isolement des bactéries à partir des nodules	15
3.2. Caractères cultureux	17
3.2.1. Absorption du rouge Congo.....	17
3.2.2. Examen microscopique par coloration de Gram.....	18
3.3. Conservation des souches	18
3.4. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE	19
3.4.1. Principe.....	19
3.4.2. Protocole	20

Chapitre 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Caractères cultureux	24
4.1.1. Absorption du rouge Congo.....	26
4.1.2. Examen microscopique par coloration de Gram.....	26
4.2. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE	28
Conclusion	35
Références.....	36
Annexes	

Liste des Tableaux

Tableau 1. Classification actuelle des rhizobiacées.	8
Tableau 2. Vitesse de croissance et absorption du rouge Congo	24
Tableau 3. Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram	27

Liste des Figures

Figure 1. <i>Astragalus gombo</i> Bunge	6
Figure 2. Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-léguimineuse	10
Figure 3. Conservation des nodules.....	13
Figure 4. Echantillons des nodules d' <i>A. gombo</i> réhydratés	14
Figure 5. Stérilisation des nodules	15
Figure 6. Ecrasement des nodules	16
Figure 7. Techniques d'ensemencement sur les boites Pétri.....	17
Figure 8. Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle verticale sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	21
Figure 9. Appareillage d'électrophorèse	23
Figure 10. Aspect de colonies sur les milieux de cultures. A: YMA ; B: YMA+RC	26
Figure 11. Résultat de la coloration de Gram de l'isolat GS10.	27
Figure 12. Profil SDS-PAGE des protéines totales	29
Figure 13. Modèles des bandes de protéines totales SDS-PAGE sur un gel coloré au bleu de Coomassie pour les souches représentatives de <i>Rhizobium</i>	32
Figure 14. Dendrogramme montrant les relations phénotypiques (A) et les schémas d'électrophorèse normalisés sur gel de dodécyl sulfate de sodium et de polyacrylamide des souches de rhizobia nodulant <i>Genista microcephala</i> et <i>Argyrolobium uniflorum</i> (B).....	33
Figure 15. Séparation électrophorétique des protéines totales sur gel polyacrylamide	34

Liste des abréviations

A: *Astragalus* ;

ADN: Acide désoxyribonucléique ;

ARN: Acide ribonucléique ;

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique;

DTT: Dithiolthréiol ;

M: *Mesorhizobium* ;

Mr: masse moléculaire relative ;

Mt: marqueurs de taille ;

Nod: Gène de nodulation ;

PBPM: Peptide à bas poids moléculaire ;

PCR: Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de polymérisation) ;

R: *Rhizobium* ;

RC: Rouge Congo;

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction) ;

SDS: Sodium dodécyl sulfate;

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis ;

YMA: Yeast Mannitol Agar;

YMB: Yeast Mannitol Broth.

Introduction

Introduction

L'azote est un élément majeur qui joue un rôle fondamental dans la constitution de la matière vivante. L'atmosphère est la principale réserve naturelle d'azote. Malheureusement l'azote moléculaire, en abondance considérable, n'est pas accessible à la plupart des êtres vivants. L'azote combiné est la seule forme d'azote biologiquement assimilable par les plantes et les animaux.

La fixation symbiotique joue donc un rôle important dans le cycle de l'azote et dans l'écosystème tout entier, puisqu'elle constitue la plus grande source d'azote combiné produite dans la nature (Jeder *et al.*, 1996).

Plusieurs associations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent les associations connues entre différentes espèces bactériennes et les légumineuses (Hopkins, 2003). L'association symbiotique la plus importante et la mieux connue est celle des bactéries du genre *Rhizobium* avec les légumineuses (Danso et Eskew, 1984).

Les légumineuses, constituent une famille très importante de plantes à fleurs, herbacées ou arborées (Vertes *et al.*, 2010). Elles présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol communément appelées rhizobia (Giraud, 2007).

L'association rhizobia-légumineuses aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable (Vertes *et al.*, 2010). En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie. C'est donc une véritable symbiose avec un échange bénéfique pour les deux partenaires.(Giraud, 2007)

Plusieurs méthodes sont utilisées pour étudier et caractériser les rhizobia parmi ces derniers l'électrophorèse des protéines, qui est une méthode de dépistage fiable pour l'examen d'un grand nombre de souches bactériennes, qui par conséquent, elle a été utilisée pour l'identification et la classification des bactéries. L'électrophorèse sur gel des protéines des cellules entières et de membranes externe a été avérée utile pour la caractérisation rhizobienne (Zahran, 1997).

L'objectif de notre travail est l'isolement et la caractérisation des souches bactériennes, symbiotiques et fixatrices d'azote, nodulant la légumineuse *Astragalus gombo* Bunge, récolté de la région Echoucha, wilaya de Biskra. Ainsi la réalisation de profil des protéines totales par SDS-PAGE en conditions dénaturantes en présence de souches témoins, afin de situer la position taxonomique des isolats.

Notre travail est constitué de 4 chapitres :

Le premier chapitre comporte la fixation biologique de l'azote et son importance

Le deuxième chapitre comporte les deux partenaires de la symbiose fixatrice de l'azote, la formation des nodules et la technique d'électrophorèse SDS-PAGE.

Le troisième chapitre : matériel et méthodes, comprenant les étapes d'isolement et de purification des bactéries, les caractères cultureux, ainsi que la détermination du profil protéique par SDS-PAGE.

Le quatrième chapitre comprenant les résultats et discussion, conclusion et perspectives.

Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1
Fixation biologique
de l'azote

1.1. Fixation biologique de l'azote

Pour bien se développer, les plantes ont besoin, entre autres éléments minéraux, d'azote. Cependant les plantes supérieures n'utilisent pas l'azote atmosphérique; l'azote dont elles ont besoin est assimilé sous une forme combinée (Ammoniac, nitrate etc ...) grâce à certains microorganismes capables de fixer l'azote de l'air, c'est à dire de le convertir en ammoniac (NH₃) (Dianda, 1987).

Il existe plusieurs micro-organismes fixant l'azote :

1.1.1. Fixateurs libres

Comprennent les bactéries aérobies (*Azobacter sp.*, *Beijrinkingia sp.*) ou anaérobies (*Clostridium sp.*), des algues bleues (*cyanophycées*) (Schvartz *et al.*, 2005).

1.1.2. Fixateurs symbiotiques

D'autres bactéries vivent en symbiose avec des plantes. Certaines bactéries fixant l'azote vivent en liberté, mais la plupart des espèces économiquement importantes, telles que les bactéries du rhizobia, vivent au sein de nodosités sur les racines de légumineuses. La formation de ces nodosités exige une relation génétique intime entre les bactéries et la plante puisqu'on connaît de nombreuses mutations dans leurs génomes respectifs qui peuvent bloquer le développement d'une nodosité fonctionnelle (Saoudi, 2008).

1.2. Importance de la fixation biologique de l'azote

la fixation biologique de l'azote, dont la symbiose rhizobia- légumineuses est l'exemple type, est donc d'importance majeure pour la productivité agricole et pour le cycle biogéochimique de l'azote, nécessaire au maintien de la vie sur la terre (Perry *et al.*, 2004).

Ce phénomène est très important pour la production végétale car il permet de minimiser les dépenses, de réduire les apports d'engrais azotés et donc éviter les problèmes écologiques liés à l'usage de ces engrais (Jeder *et al.*, 1996).

Le système agronomique qui tend vers un système à faible utilisation d'intrants doit se baser impérativement sur le fonctionnement des symbioses qui apportent les éléments fertilisants indispensables. Il s'agit en particulier de la symbiose rhizobia-légumineuses qui assure une des fixations les plus efficaces de l'azote atmosphérique (jusqu'à 200-300 kg d'azote par hectare pour des légumineuses fourragères ou des plantes à graines comme le soja) (Adolphe *et al.*, 2017).

Grâce à cette association symbiotique, les légumineuses participent à la revégétalisation des écosystèmes pauvres en azote, en s'établissant comme flore pionnière, initiatrice d'une succession écologique (Giraud, 2007).

Chapitre 2

Partenaires symbiotiques

2.1. Légumineuses

Les légumineuses sont des végétaux regroupés dans la famille des Fabacées (*Fabaceae*). Les légumineuses sont, après les orchidées et les astéracées, la troisième plus grande famille d'angiospermes en terme de richesse spécifique. D'un point de vue biogéographique, les légumineuses ont une distribution cosmopolite et jouent des rôles écologiques importants dans quasiment tous les biomes terrestres, même les plus extrêmes (Vincent, 2019).

2.1.1. Classification des légumineuses

Bentham et Hooker ont publié la première classification relativement complète des légumineuses. Ces auteurs ont divisé les légumineuses en trois sous-familles.

Sous-famille Mimoseae avec fleurs régulières et petites, et pétales valvés.

Sous-famille Caesalpinieae avec feuilles pennées ou rarement pennées.

Sous-famille Papilionaceae à radicule courbée très rarement courte et droite (Kopooshian, 1963).

2.1.2. Importance des légumineuses

Les légumineuses sont importantes à la fois sur le plan écologique et agricole car elles sont responsables d'une partie du flux global d'azote provenant de l'azote atmosphérique N_2 vers des formes telles que l'ammoniac, le nitrate et azote organique (Sobti *et al.*, 2015).

Les légumineuses alimentaires occupent une partie très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que la phytotechnie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie, la physiologie, la nutrition et la sélection variétale. Elles constituent un apport important et peu coûteux en protéines (18 à 30 % de la graine sèche) (Baudoin, 2001). Elles constituent par ailleurs une source d'alimentation extrêmement importante aussi bien pour l'homme (soja, pois, haricot...) que pour l'animal (trèfle, luzerne...) (Giraud, 2007). Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec des souches bactériennes du genre *Rhizobium*, elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la rotation des cultures (Baudoin, 2001).

Ces espèces sont notamment utilisées dans les secteurs de l'agronomie car elles sont riches en protéines (haricot, pois, lentille, soja, trèfle, luzerne...), en agroforesterie (production de

bois, huiles, résines...) et également dans la restauration des sols dégradés (concept de « plante hôte ») (Vincent, 2019).

2.2. Macrosymbionte : *Astragalus gombo* Bunge

Description botanique: Plante vigoureuse au port dressé de 10 à 50 cm de haut. Tiges bien développées. Feuilles de grandes tailles de couleur vert clair, avec de très nombreuses petites folioles. Les pétioles robustes perdant leurs folioles deviennent coriaces et piquant à l'extrémité. Fleurs jaunes, en grappe axillaires denses. Gousse couverte d'un duvet soyeux. Elle est très résistante à la sécheresse (figure1).

Habitat: En pieds isolés ou en petites colonies, dans les terrains sablonneux.

Répartition: Assez commun dans tout le Sahara.

Période de végétation: Floraison en mars- avril (Chehema, 2006).



Figure 1. *Astragalus gombo* Bunge (Photo originale).

2.2.1. Position systématique

La classification phylogénétique, établi par l'Angiosperm Phylogeny Group (APG) définit la position systématique d'*Astragalus gombo*: (Chouana, 2017)

Règne : Plantae

Sous-règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Rosidae
Ordre :	Fabales
Famille :	Fabaceae
Genre :	<i>Astragalus</i>
Espèce :	<i>Astragalus gombo</i>

2.2.2. Importance de l'*Astragalus gombo*

Les huiles essentielles d'*Astragalus gombo* renferment quelques composés actifs comme le γ -terpinène possédant une activité antioxydante et l' α -pinène, le camphène et le terpinène-4-ol possédant des activités antibactérienne et anti-inflammatoire (Teyeb *et al.*, 2012).

Plusieurs espèces d'*Astragalus* trouvent des applications en médecine traditionnelle et moderne. Plusieurs constituants des Astragales pharmacologiquement actifs, telles que les saponines et les polysaccharides, ont des effets hépatoprotecteurs, immunostimulants et antiviraux (Teyeb *et al.*, 2012).

Intérêt pastoral : C'est un excellent pâturage pour les dromadaires (Chehema, 2006).

2.3. Microsymbionte : Rhizobia

Les Rhizobia sont des bactéries capables de transformer l'azote gazeux de l'air en azote combiné, lorsqu'ils vivent en symbiose avec une légumineuse (Dianda, 1987). Gram négatives, aérobies, non sporulées. Phylogénétiquement, elles appartiennent à la subdivision alpha protéobactéries (Zakhia et de Lajudie, 2001).

2.3.1. Classification

Sur la base de la séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) ribosomique 16S, les symbiontes des légumineuses décrites actuellement appartiennent à trois principales sous-classes phylogénétiques distinctes : α , β et γ - protéobactéries.

Plus de 98 espèces regroupées en 11 genres appartenant à la sous classe α -Proteobactéria et 2 genres appartenant à l'ordre des Burkholdriales dans la sous classe β - Proteobacteria, et enfin,

un genre appartenant à l'ordre Pseudomonales dans la sous-classe γ - Protéobactéries (Berrada et Fikri- Ben Brahim, 2014). On a indiqué seulement la partie englobant les Astragales (tab.1).

Tableau 1. Classification actuelle des rhizobiacées (Berrada et Fikri- Ben Brahim, 2014).

Espèces de genre	Source d'isolement
Classe: Alphaproteobacteria	
Ordre: Rhizobiales	
Famille: Phyllobacteriaceae	
Genre: Mesorhizobium	
<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis,</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. thioganicum</i>	*
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>
<i>M. gobiense</i>	<i>Wild legumes</i>
<i>M. tarimense</i>	<i>Wild legumes</i>
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>

<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>
<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia.</i>
<i>M. abyssinicae</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>
<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. hawassense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>
<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
<i>M. shonense</i>	<i>Different agroforestry legume trees</i>
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana species</i>
<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus species</i>
<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia, Lotus berthelotii</i>

2.4. Formation des nodules

Les rhizobia vivent sous une forme libre dans le sol mais ne peuvent fixer l'azote que lors d'associations symbiotiques avec une plante hôte compatible en formant des organes spécifiques à la fixation biologique de l'azote : les nodules (Vincent, 2019).

L'établissement de l'association symbiotique entre le rhizobia et la plante légumineuse passe par une série d'étapes complexes (figure 2). La bactérie et la plante mettent en place un système de dialogue basé sur un échange de molécules chimiques. Dans un premier temps, les racines excrètent des flavonoïdes qui attirent le rhizobia dans le voisinage de la racine et activent les gènes bactériens Nod, qui codent pour les facteurs de nodulation Nod (Perry *et al.*, 2004), qui active les processus symbiotiques de l'hôte, nécessaire à l'infection des poils radiculaires et au développement du nodule. Après la fixation de la bactérie, le poil s'incurve et la bactérie induit chez la plante la formation d'un filament infectieux qui grandit dans le poil radiculaire (Prescott *et al.*, 2003).

L'infection s'entend progressivement aux cellules situées à proximité du site d'infection. La division bactérienne rapide entraîne la formation d'un nodule. La majorité de la population bactérienne se transforme en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue. Une membrane pér bactéroidienne enveloppe les bactéroides (Perry *et al.*, 2004). La croissance ultérieure et la différenciation conduisent au développement d'une forme fixatrice d'azote, le symbiosome. Dans les nodules, les bactéroides différenciés réduisent l' N_2 atmosphérique et forment de l'ammoniac (le produit primaire) et l'alanine, libérés dans la cellule de la plante hôte, et distribués dans toute la plante (Prescott *et al.*, 2003).

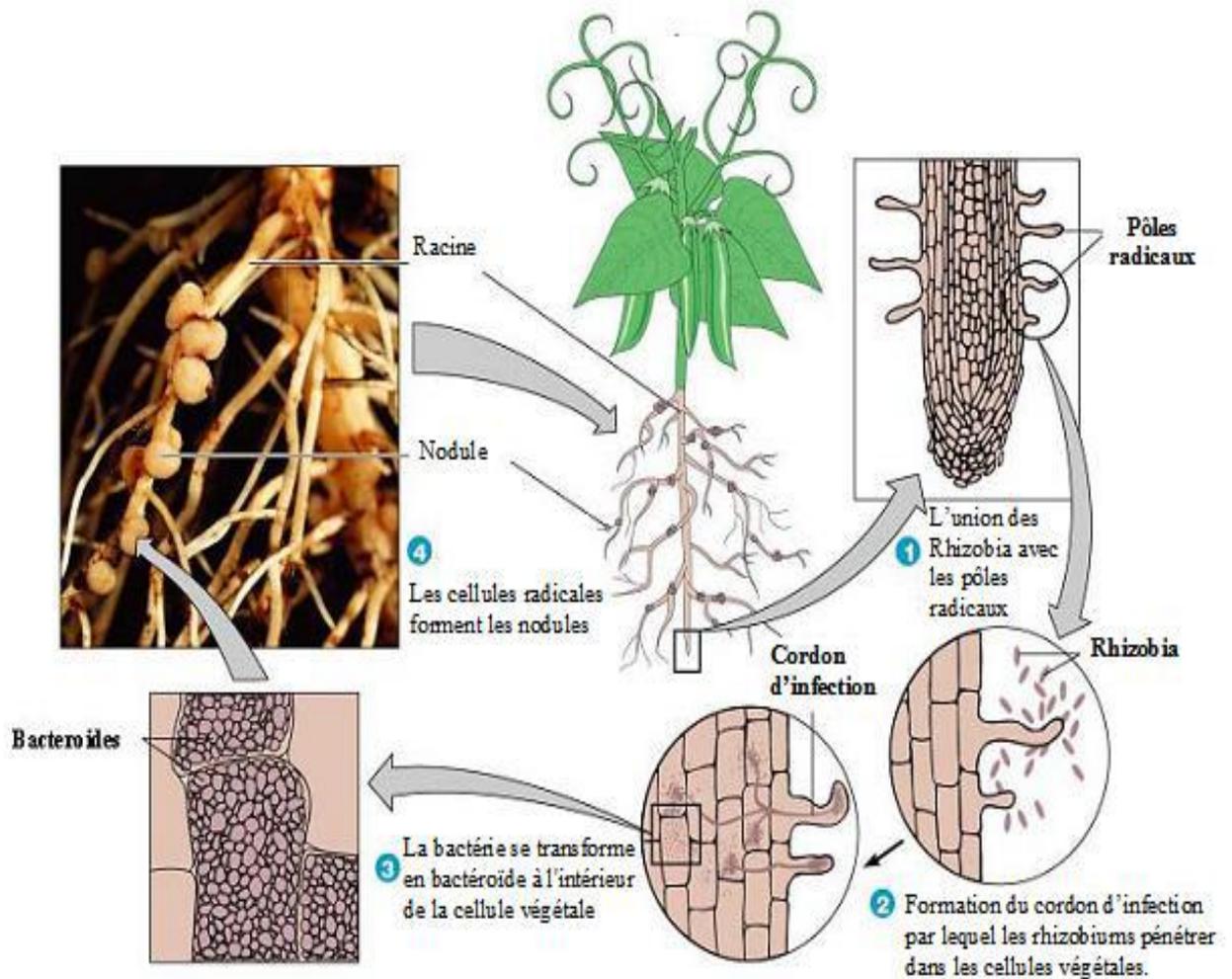


Figure 2. Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse.

(Faghir, 2012)

2.5. Méthodes appliquées à l'études de la diversité des rhizobia

La diversité des rhizobiums peut être évaluée par un ensemble de méthodes basées sur des caractéristiques phénotypiques et génotypiques. (Riah, 2015).

2.5.1. Méthodes phénotypiques

Selon les méthodes décrites par vandemme et al. (1996), il y'a :

➤ Analyse phénotypique classique

Comprenant les caractéristiques morphologiques (forme, présence de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores), physiologiques (vitesse de croissance, la capacité d'utiliser différentes sources de carbone, la croissance à différentes variations de température, du pH, de sels, d'antibiotiques et de métaux lourds) et biochimiques (détermination de l'activité de différentes enzymes caractéristiques de certains groupes de bactéries).

➤ Analyse numérique

Les données montrant le degré de similitude, entre chaque paire de souches et l'analyse de grappes aboutissant à des dendrogrammes, ont révélé une image générale de la cohérence d'un groupe particulier de souches.

➤ Système automatisé

Sont des systèmes d'empreinte phénotypique.

➤ Méthode de frappe (typage)

C'est l'utilisation des composés cellulaires pour caractériser des souches au niveau infraspécifique.

➤ Acides gras cellulaires

Se base sur l'étude des lipides polaires des membranes bactériennes.

➤ Analyse des protéines de cellule entière

La comparaison des modèles de protéines de la cellule entière obtenue par électrophorèse sur gel polyacrylamide dodécyl sulfate de sodium hautement standardisé (SDS-PAGE).

C'est une technique de criblage, connue pour son important pouvoir de discrimination. Permet de distinguer les espèces bactériennes et même des souches au sein d'une même espèce.

Elle peut être utilisée à des fins analytiques ou préparatifs, et est relativement rapide, peu coûteuse et reproductible. (Benselama, 2015).

2.5.2. Méthodes génotypiques

Ces méthodes sont basées sur l'analyse des molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau de l'ensemble du génome, soit en ciblant certains fragments du chromosome ou de plasmides bactériens. (vandemme *et al.*, 1996).

➤ Détermination du rapport de bases d'ADN

La détermination du pourcentage en moles, de guanosine + cytosine est considérée comme faisant partie de la description standard des taxons bactériens.

➤ Etude d'homologie d'ARNr

Basé sur le séquençage de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16s avec des amorces conservées et la transcriptase inverse.

➤ Méthodes de typage basées sur l'ADN

Basées sur l'ADN de première génération comprenant l'analyse des fragments de restriction du génome entier et l'analyse de l'ADN plasmidique.

➤ Etude d'hybridation ADN-ADN

La précision de l'hybridation ADN-ADN est considéré équivalente à la comparaison de séquences génomiques entières (Christensen *et al.*, 2007).

Partie

Expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1. Isolement des bactéries à partir des nodules

3.1.1. Echantillonnage

Les nodules ont été obtenus à partir d'une collection faite l'année passée dans la wilaya de Biskra, région Echoucha suivant la méthode décrite par Somasegaran et Hoben (1994).

Lavez soigneusement les racines pour enlever la saleté. Séparez le nodule de la racine en coupant la racine d'environ 0,5 cm de chaque côté du nodule. Lors du déplacement du nodule, utilisez une pince sur les appendices radiculaires pour réduire le risque d'endommager le nodule.

3.1.2. Conservation des nodules

Les nodules séchés au papier filtre sont stockés dans le réfrigérateur à 4° C dans des flacons en verre (figure 3), avec un dessiccateur spécial : le chlorure de Calcium (CaCl_2) (Somasegaran et Hoben, 1994).

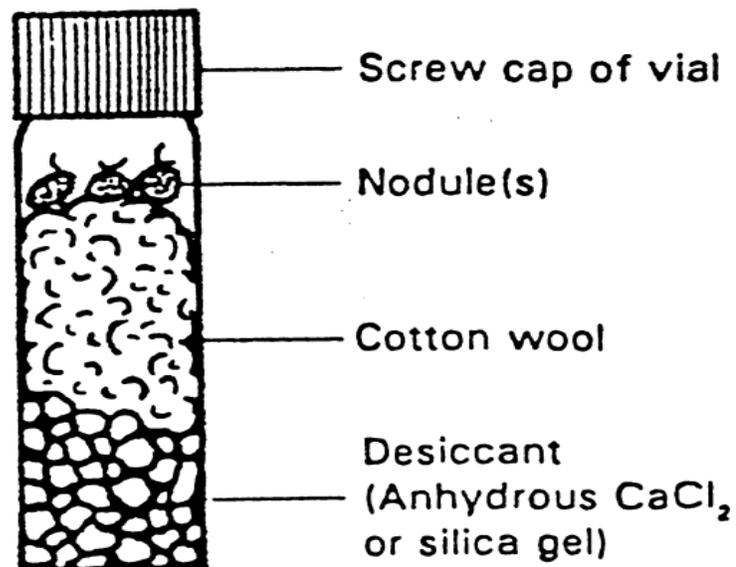


Figure 3. Conservation des nodules (Somasegaran et Hoben, 1994)

3.1.3. Milieux utilisés

Les milieux de culture utilisés pour l'isolement des rhizobia sont répartis dans des Erlen-Meyer, à raison d'une demi-mesure par volume utile. Le matériel est ensuite autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Les milieux sont finalement coulés dans des boîtes de Pétri.

Les milieux utilisés (Martinez *et al.*, 1985 ; Dianda, 1987) sont: (voir l'annexe 1)

YMB (YeastManitolBroth)

YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMA+RC (Yeast Mannitol Agar + Rouge Congo)

3.1.4. Stérilisation des nodules

Selon la méthode de Somasegaran et Hoben (1994), Avant la stérilisation, les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés dans un petit béccher contenant l'eau distillé stérile, et laisser au réfrigérateur pour les imbiber toute la nuit, puis une heure à température ambiante (figure 4).



Figure 4. Echantillons des nodules d'*A. gombo* réhydratés (photo originale)

Ils sont ensuite désinfectés superficiellement sous hotte, en les immergeant pendant 5 à 10 secondes dans l'éthanol à 95% ou l'isopropanol. Puis les transférer à 2,5 - 3% de solution d'hypochlorite de sodium et laisser tremper pendant 2 à 4 min, une solution de chlorure de mercure acidifié (0,1%) ou une solution de peroxyde d'hydrogène (3% v/v) peut être utilisée pour la stérilisation des nodules. Cependant, le chlorure mercurique est fortement toxique et le peroxyde d'hydrogène est cher, ce qui rend l'hypochlorite de sodium le choix préféré (figure 5).

A l'aide d'une paire de pinces préalablement flambées à l'alcool, les nodosités sont transférées dans un récipient contenant de l'eau distillée stérile pour un premier rinçage. Nous

avons effectué plusieurs autres rinçages par immersions successives dans l'eau distillée stérile (Dianda, 1987).



Figure 5. Stérilisation des nodules (photo originale)

3.1.5. Isolement des bactéries à partir des nodules

Ecraser les nodules stérilisés superficiellement avec une paire de pinces à pointe émoussée dans une grosse goutte d'eau stérile dans une boîte de Pétri, les nodules peuvent être écrasés dans des tubes à essai stériles avec une tige en verre stérile (figure 6).



Figure 6. Ecrasement des nodules (photo originale)

Une suspension de chaque nodule écrasé est étalée sur un milieu YMA et sur YMA+ RC (Drevon et Sifi, 2003; Woomer *et al.*, 2011) de manière à isoler des simples colonies (figure 7), et donc faciles à caractériser. Incuber ces derniers à 28°C (Wallington et Lund, 1994; El Hilali *et al.*, 2016) dans l'obscurité. (Quelques rhizobia tropicaux à croissance lente absorbent le rouge Congo lorsqu'ils sont incubés à la lumière) (Somasegaran et Hoben, 1994).

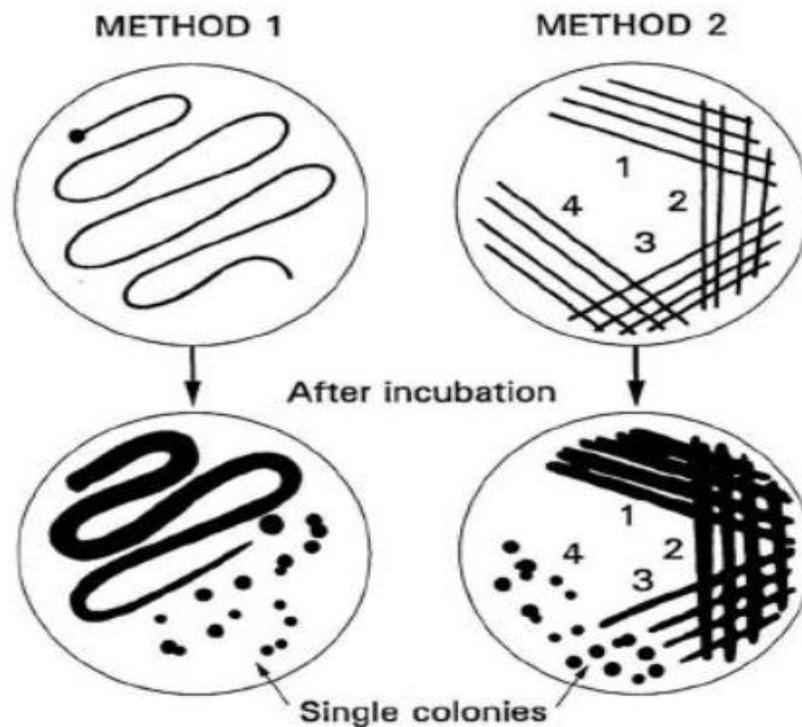


Figure 7. Techniques d'ensemencement sur les boîtes Pétri

(Somasegaran et Hoben, 1994).

Dès l'apparition d'une colonie bactérienne, elle est repiquée sur une nouvelle boîte de Pétri (Dianda, 1987). Des colonies uniques ont été striées deux ou trois fois (De Lajudie *et al.*, 1994).

Plusieurs repiquages successifs sont nécessaires pour s'assurer de la pureté des différents isolats (Sy *et al.*, 2001).

3.2. Caractères cultureux

3.2.1. Absorption du rouge Congo

Les bactéries nodulant les légumineuses, en particulier les rhizobia, présente deux types de croissance : les bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) et les bactéries à croissance rapide (genre *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,...).

Le test du rouge Congo permet de différencier les rhizobia des contaminants, les colonies typiques aux rhizobia absorbent faiblement le rouge Congo par rapport aux contaminants où les souches occupant le nodule sans fixation de l'azote.

Le teste consiste à cultiver les isolats sur le milieu YMA contenant 0,0025% rouge Congo (annexe1) et incubé à l'obscurité à 28°C (Somasgaran et Hoben, 1994).

3.2.2. Examen microscopique par coloration de Gram

La coloration de Gram permet effectivement de diviser le monde des bactéries en deux groupes distinctes (Gram + et Gram -) est principalement liée à une différence de structure chimique des parois cellulaires des bactéries. Elle permet en générale d'apprécier la pureté des souches avant tout identification (Ritsema *et al.*, 1996; Delarras, 2014).

Après être cultivées à 28°C sur du milieu YMB, dans un bain-Marie agité, l'identification des isolats en tant que rhizobia a été établie par des testes de caractérisation comprenant la coloration de Gram (Drevon et Sifi, 2003 ; Kumari *et al.*, 2010). Le protocole est le suivant :

- Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure ;
- Recouvrir le frottis de violet cristal oxalaté ; laisser agir 1 minute ; rincer à l'eau distillée.
- Verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 minute puis rincer à l'eau distillée.
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes puis rincer à l'eau distillée.
- Recolorer avec la safranine pendant 10 à 30 secondes puis rincer à l'eau distillé.
- Sécher au dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

La safranine peut être remplacée la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10

- Observer au microscope à l'objectif $\times 100$ à immersion.

Avec cette coloration double, les bactéries «Gram +» apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries «Gram -» sont colorées en rose ou rouge (Delarras, 2014).

3.3. Conservation des souches

La conservation se fait sur le milieu YMA additionné de 3 g/l de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est répartie dans des tubes à essai formant des géloses inclinées. Après être cultivées à 28°C sur du milieu YMB (Ritsema *et al.*, 1996) et à partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose, et après incubation à 30°C pendant trois jours les tubes sont conservés à 4°C au réfrigérateur. Cette méthode permet une conservation de 06 à 12 mois (Dekak, 2010) ou à 80% de glycérol à -20°C ou -80°C (Rosenberg *et al.*, 2014; El Hilali *et al.*, 2016).

3.4. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE

Une cellule bactérienne renferme plus de 2000 protéines différentes, ce qui constitue une source d'information très riche pour la caractérisation d'un organisme bactérien (Drevon et Sifi, 2003).

3.4.1. Principe

Le profil des protéines totales est déterminé par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE (Torche *et al.*, 2010). Le principe de l'électrophorèse consiste à la séparation des protéines, suivant leur mobilité sur un support en gel de polyacrylamide, PAGE, et en présence d'un agent dénaturant, le sodium dodécyl sulfate, SDS (Drevon et Sifi, 2003). La caractérisation des souches par cette technique repose sur le degré de similitude entre les bandes polypeptidiques des isolats et des souches de référence (Torche *et al.*, 2010).

Le SDS charge négativement les protéines et les dénature, aidée par le chauffage, en entourant le squelette polypeptidique. L'agent réducteur des thiols (dithiothréitol DTT ou le β -mercaptoéthanol) réduit les ponts disulfures des protéines, ce qui a pour conséquence de les dissocier en sous-unités polypeptidiques individuelles. Les protéines ainsi solubilisées migrent dans un système d'électrophorèse discontinu constitué de deux gels de polyacrylamide de porosité différente et tamponnés à des pH différents.

Les gels sont coulés et polymérisés dans un système vertical « en sandwich » entre 2 plaques de verre. L'échantillon est déposé au-dessus d'un premier gel appelé gel de concentration (stacking gel) tamponné au pH 6,8 par du Tris-HCl, et de réticulation très lâche. Dans ces conditions, la présence de glycine dans la solution de la cuve d'électrophorèse va permettre de concentrer les protéines dans le gel au cours de la migration. Au pH 6,8 du gel, la glycine est faiblement chargée et présente une faible mobilité contrairement au Cl^- complètement ionisé avec une forte mobilité.

Lorsqu'une tension est appliquée au système, les ions Cl^- migrent plus vite dans le gel laissant derrière eux une zone de faible conductivité, un gradient de tension important et un pH plus élevé qui accélère la migration de la glycine de façon à ce qu'elle suive les ions Cl^- . Ce front constitué par les ions Cl^- et les ions glycine migrent à travers de l'échantillon puis à travers du gel. Les protéines chargées négativement par le SDS possèdent une vitesse de migration

intermédiaire, et vont de ce fait se trouver emprisonnées, donc concentrées dans la fine zone délimitée par les ions Cl^- et les ions glycine.

Les protéines ainsi concentrées sont ensuite séparées suivant leur taille dans le gel de séparation (running gel) tamponné à PH 8,8 avec des pores plus petits. La migration des protéines dans ces pores va être ralentie jusqu'à devenir plus faible que celle des ions glycine. Le PH 8,8 a pour effet d'augmenter la vitesse de migration des ions glycine qui vont alors dépasser les protéines et se trouver juste derrière les ions Cl^- . Les protéines ne sont plus emprisonnées dans la fine zone et sont alors séparées suivant leur taille par migration vers l'électrode positive.

La comparaison du profil de migration des protéines à celles de marqueurs de taille (Mt) connus et traités de la même façon permet de donner la masse moléculaire relative (Mr) des protéines séparées (Ballihaut, 2007).

3.4.2. Protocole

Les rhizobia ont été cultivés dans un milieu mannitol-extrait de levure (YMB). Les cellules ont été récoltées à partir d'une culture jeune (12-18 h).

Environ 50 μL de suspension cellulaire ont été granulés dans une microcentrifugeuse Eppendorf à 12000 xg pendant 3 minutes à 4°C (Tan *et al.*, 1997; Zahran, 1997; Pereira *et al.*, 2006). Les culots ont été dilués 3 fois et lysés dans un tampon d'échantillon (SDS à 2%, 5% de 2-mercaptoéthanol, 10% de glycérol, 0,5 mol / L de Tris-HCl à PH 6,8 et 0,05% de bleu de bromophénol), puis chauffé à 95°C pour 5 minutes. Les débris solides dans le mélange ont été éliminés par centrifugation. Et le surnageant a été recueilli et les extraits de protéines de cellules entières ont été préparés (De Lajudie *et al.*, 1994; Zahran, 1997).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium de Laemmli 1970 a été suivie par les chercheurs mais avec légères modifications (Cloutier *et al.*, 1992; De Lajudie *et al.*, 1994).

Des volumes égaux d'échantillons équivalents en teneur en protéines ont été chargés dans chaque puits. La migration électrophorétique a été réalisée pendant 16 h à 85volt (tension constante) (Cloutier *et al.*, 1992) jusqu'à ce que le colorant de suivi migre vers le bas du gel (Mateos *et al.*, 1992).

Les séparations ont été effectuées sur un 12 cm de gel de séparation en gradient (12 à 18%), 0,8 mm d'épaisseur, avec un gel de concentration de 2 cm de haut avec 4,5%. (figure 8) (Cloutier *et al.*, 1992).

Le tampon migration contenait 0,3% de Tris-base, glycine 1,5% et SDS 0,1%. Après électrophorèse (Zahran, 1997). Les bandes ont été visualisées par coloration de bleu de Coomassie brillant (Struffi *et al.*, 1998) : (0,7% de bleu de Coomassie, 9,2% d'acide acétique, 4,5% de 2-propanol) pendant une nuit et blanchi pendant 3 à 5 h avec solution de blanchiment (75% d'acide acétique et 5,5% de 2-propanol). La masse molaire des protéines a été comparée avec des marqueurs de masse molaire LKB 1860-102 (gamme 12-78 kDa) (Zahran, 1997).

Des gels humides ont ensuite été photographiés ou séchés à l'aide d'un séchoir sous vide Bio-Rad. Les photographies et les gels séchés des profils protéiques ont été visuellement comparés et analysés en fonction du profil protéique général et du nombre et position des principales bandes peptidiques dans chaque profil. Les rhizobia qui présentaient des protéines identiques ou similaires dans les profils ont été classés dans un cluster

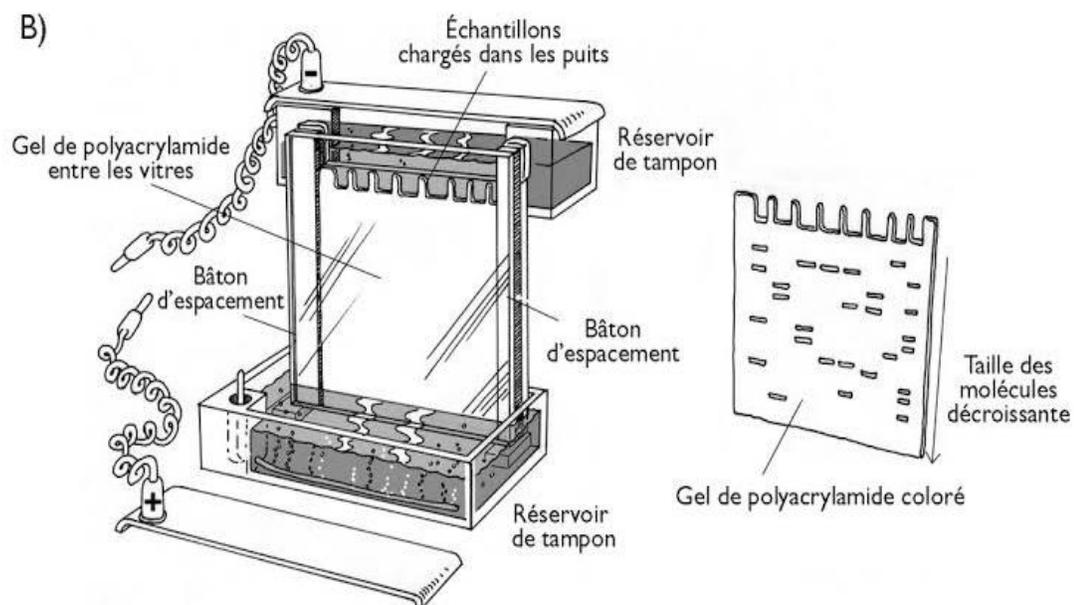


Figure 8. Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle verticale sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (site web1).

Préparation du gel de Séparation

Les quantités des solutions du gel de séparation sont préparées pour une concentration de 12% d'Acrylamide et de dimensions 160x120x1.5 mm (Saoudi, 2008):

Tampon Tris-Hcl PH 8.8 16.5 ml

Acryl.Bis Acryl. T 30% 26.4 ml (Annexe 2)

Eau distillée 22.8 ml

TEMED 15 μ l

Persulfate d'ammonium 0.3 ml

Préparation du gel de concentration

Tampon Tris-HCl PH 6.8 5 ml

Acryl/bis Acryl. 2.5 ml (Annexe 2)

Eau distillée 12.5 ml

TEMED 10 μ l

Persulfate d'ammonium 75 μ l

Préparation des plaques de gel

La solution du gel de séparation est coulée entre les plaques de verre en laissant une hauteur de 3-4 cm pour le second gel, éviter l'incursion de bulles d'air. Avec une pipette Pasteur niveler le gel avec une solution d'alcool iso butylique saturé d'eau pour obtenir, après polymérisation, une surface de gel lisse et droite.

Après polymérisation du gel de séparation (20-30 mn) jeter l'iso butanol, rincer abondamment avec de l'eau distillée, sécher avec du papier filtre sans toucher la surface du gel, verser ensuite le gel de concentration (laissant une hauteur de 3-4 mm environ du bord supérieur). Insérer le peigne de manière inclinée ce qui évitera les bulles d'air. Après 20 mn de polymérisation retirer le peigne très lentement vers le haut et sécher les puits d'échantillons avec du papier filtre (figure 9).

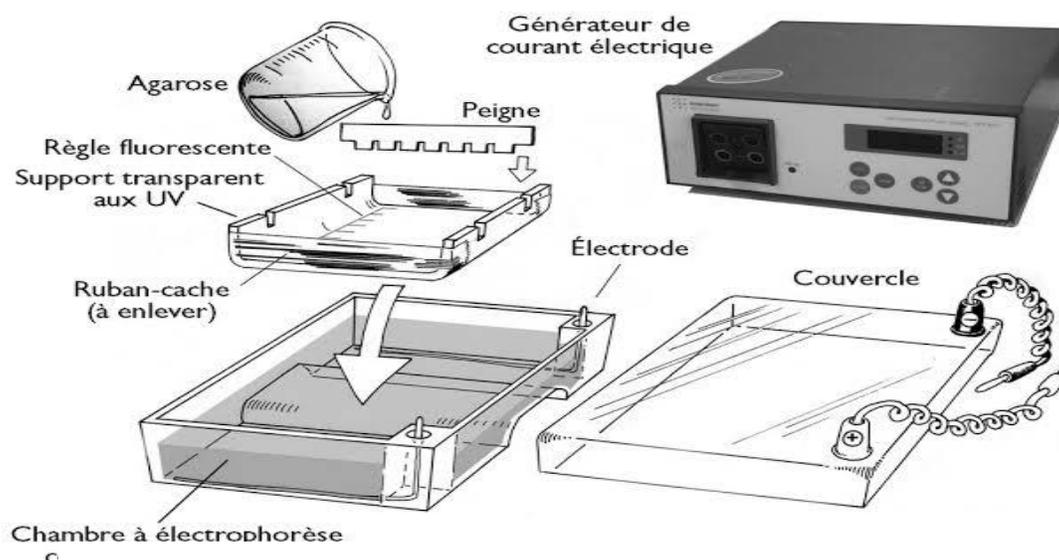


Figure 9. Appareillage d'électrophorèse (site web2).

Chapitre 4

Résultats et discussion

Après l'isolement et la purification, on a pu isoler 10 souches : GS1; GS2; GS3; GS4; GS5; GS6; GS7; GS8; GS9; GS10 (tab. 2).

Toutes les souches rhizobiales ont été identifiées sur la base de caractéristiques morphologiques (Hameed *et al.*, 2004).

4.1. Caractères cultureux

Premièrement, la caractérisation a été réalisée en déterminant la morphologie des colonies, la morphologie cellulaire (au microscope optique), le taux de croissance dans les milieux de croissance, et la réaction de coloration de Gram. Les isolats avaient des caractéristiques morphologiques et culturelles typiques du genre *Rhizobium* à croissance rapide. (Arredondo-Peter et Escamilla, 1993; El Hilali *et al.*, 2016).

En prenant pour critère leur vitesse de croissance sur le milieu de culture YMA, les rhizobia sont classés en deux groupes distincts. Un premier groupe de souches à croissance rapide, dont les colonies apparaissent après 48 -72 h de culture, et un second groupe de souches à croissance lente pour lesquelles les colonies n'apparaissent qu'au bout de 7 jours de culture (Sy *et al.*, 2001). Nos souches présentaient en général une croissance rapide (El Hilali *et al.*, 2016). Ainsi, une croissance pour nos souches est obtenue au bout de 24 - 72h (tab. 2).

Ces résultats sont en accord avec ceux d' Arredondo et Escamilla (1993), en travaillant sur le *Rrhizobium leguminosarum biovar phaseoli* nodulant l'haricot *Phaeolus coccineus*.

Tableau 2. Vitesse de croissance et absorption du rouge Congo

Souches	24 heures		48 heures		72 heures	
	Absorption	Croissance	Absorption	Croissance	Absorption	croissance
M44	±	+	±	++	±	+++
MB5	±	±	±	+	±	++
M17	±	+	±	++	±	+++
M61	±	±	±	+	±	++
MB19	±	±	±	+	±	++
M14	±	+	±	++	±	+++

R20	±	±	±	+	±	++
CB16	±	±	±	+	±	++
C1	±	+	±	++	±	+++
GR6	±	±	±	+	±	++
MB2	±	+	±	++	±	+++
GB6	±	±	±	+	±	++
C21	±	+	±	++	±	+++
MB11	±	+	±	++	±	+++
M3	±	±	±	+	±	++
K5	±	±	±	+	±	++
GS1	-	-	±	±	±	+
GS2	-	-	-	+	±	++
GS3	-	-	-	±	-	+
GS4	-	-	±	±	+	+
GS5	-	-	-	±	±	+
GS6	-	-	±	±	+	+
GS7	-	-	±	±	+	+
GS8	-	-	-	±	±	+
GS9	-	-	-	±	-	+
GS10	-	-	±	±	±	++

+ : Une croissance/ Une absorption du RC

± : Peu de croissance/ Peu d'absorption du RC

- : Pas de croissance/ Pas d'absorption du RC

4.1.1. Absorption du rouge Congo

Sur le milieu YMA, les colonies étaient blanc laiteux, translucides, brillantes et de forme circulaire, surélevées et de 2 à 5 mm de diamètre (figure 10). Même constatations ont été trouvées par Sobti *et al.* (2015), dans leurs études sur le rhizobia nodulant la légumineuse *Medicago sativa*.

La croissance sur YMA+RC montre que les souches présentent une différence dans leur absorption du rouge Congo. Certaines souches absorbent peu le rouge Congo, mais la plupart des souches de rhizobia n'ont pas la capacité d'absorber le colorant. Cependant, il existe des exceptions à ce comportement généralisé.

La croissance des isolats sur le milieu YMA+RC est considéré parmi les principaux critères phénotypiques dans la caractérisation des rhizobia (Ausmees *et al.*, 1999 ; Torche *et al.*, 2010).

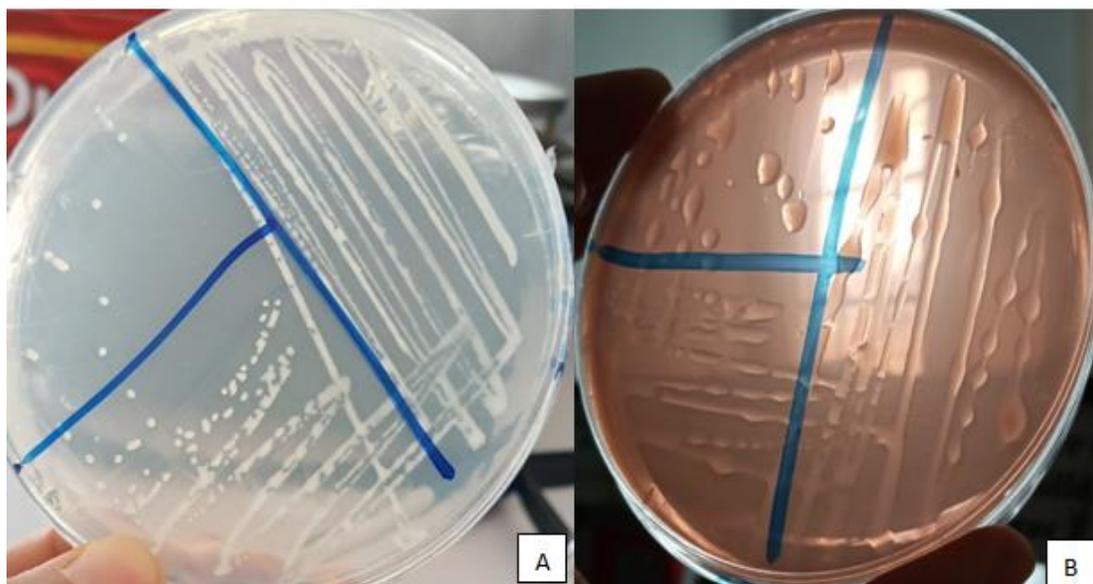


Figure 10. Aspect de colonies sur les milieux de cultures. A: YMA ; B: YMA+RC

(Photos originales)

4.1.2. Examen microscopique par coloration de Gram

Pour vérifier que nos cultures bactériennes sont pures, la coloration de Gram est utilisée par visualisation des bactéries au microscope optique

La technique de coloration de Gram révèle des coccobacilles Gram négatif (figure 11) et (tab. 3), ces résultats correspondent avec les travaux de Hameed *et al.* (2004).

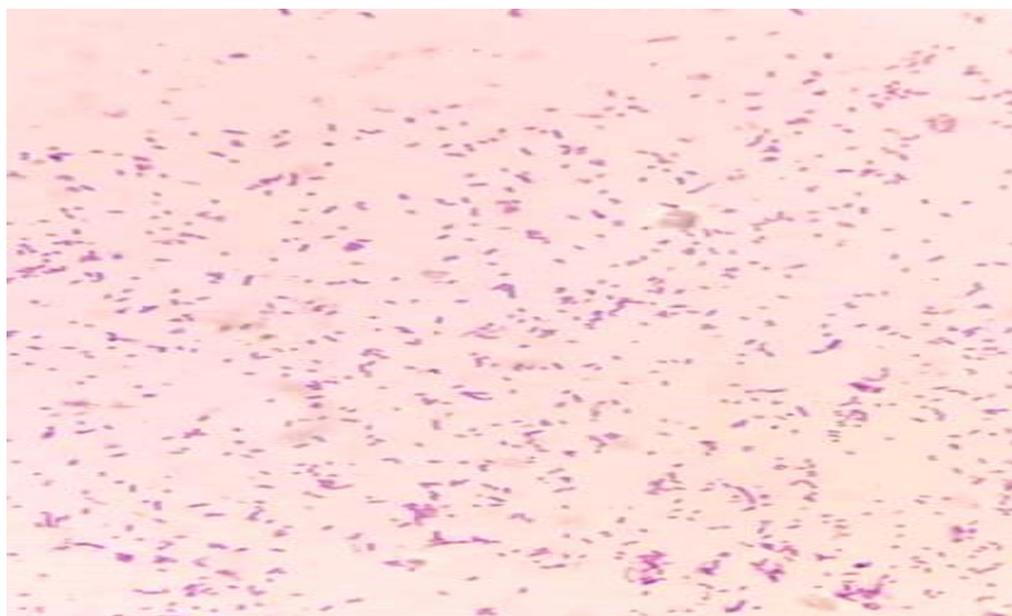


Figure 11. Résultat de la coloration de Gram de l'isolat GS10.

(Photo originale)

Tableau 3. Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram

La souche	Le Gram	La forme
M44	Négatif	Bâtonnet
MB5	Négatif	Bâtonnet
M17	Négatif	Bâtonnet
M61	Négatif	Bâtonnet
MB19	Négatif	Bâtonnet
M14	Négatif	Bâtonnet
R20	Négatif	Bâtonnet
CB16	Négatif	Bâtonnet
C1	Négatif	Bâtonnet
GR6	Négatif	Bâtonnet

MB2	Négatif	Bâtonnet
GB6	Négatif	Bâtonnet
C21	Négatif	Bâtonnet
MB11	Négatif	Bâtonnet
M3	Négatif	Bâtonnet
K5	Négatif	Bâtonnet
GS1	Négatif	Bâtonnet
GS2	Négatif	Bâtonnet
GS3	Négatif	Bâtonnet
GS4	Négatif	Bâtonnet
GS5	Négatif	Bâtonnet
GS6	Négatif	Bâtonnet
GS7	Négatif	Bâtonnet
GS8	Négatif	Bâtonnet
GS9	Négatif	Bâtonnet
GS10	Négatif	Bâtonnet

4.2. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE

Notre travail pratique a pris une direction totalement différente par rapport au calendrier programmé basant sur le suivi, et la détermination du profil protéique par SDS-PAGE pour les souches isolées.

La caractérisation des souches par SDS-PAGE repose sur le degré de similitude entre les bandes polypeptidiques des isolats et des souches de référence (Torche *et al.*, 2010).

D'après les résultats obtenus par Saoudi (2008), suivant le protocole de Lammeli (1970). Le profil des bactéries nodulant la légumineuse *Astragalus armatus* montre un polymorphisme entre les isolats Ast. (Annexe 3).

Trois clusters ont montrées dans le gel (groupe des souches Ast.1, 2,3 ; Ast.4, 5, 6 et 7; et le groupe Ast.8, 9, 10, 11).

Les profils des isolats Ast.7, 8, 9 et Ast. 12, 13 sont pratiquement identiques avec celui de *R. ciceri*. (Figure 12)

Les bactéries isolées à partir des nodules d'*Astragalus armatus* montrent des profils assez loin de ceux des espèces *R.l. bv trifolii*, *R. l. bv viceae*, et *R. sullae*.

Toute la bibliographie récente faisant apparaître le genre *Astragalus armatus* fait ressortir l'espèce bactérienne, *Mézorhizobium huakuii*.

Dans l'aspect taxonomique, notamment l'analyse en conditions dénaturantes des protéines totales sur SDS-PAGE, les profils montrent un polymorphisme entre les souches de référence et les isolats, toutefois certains profils des isolats (Ast. 7, 8, 9 et 12) rejoignent celui de *Mesorhizobium ciceri*.

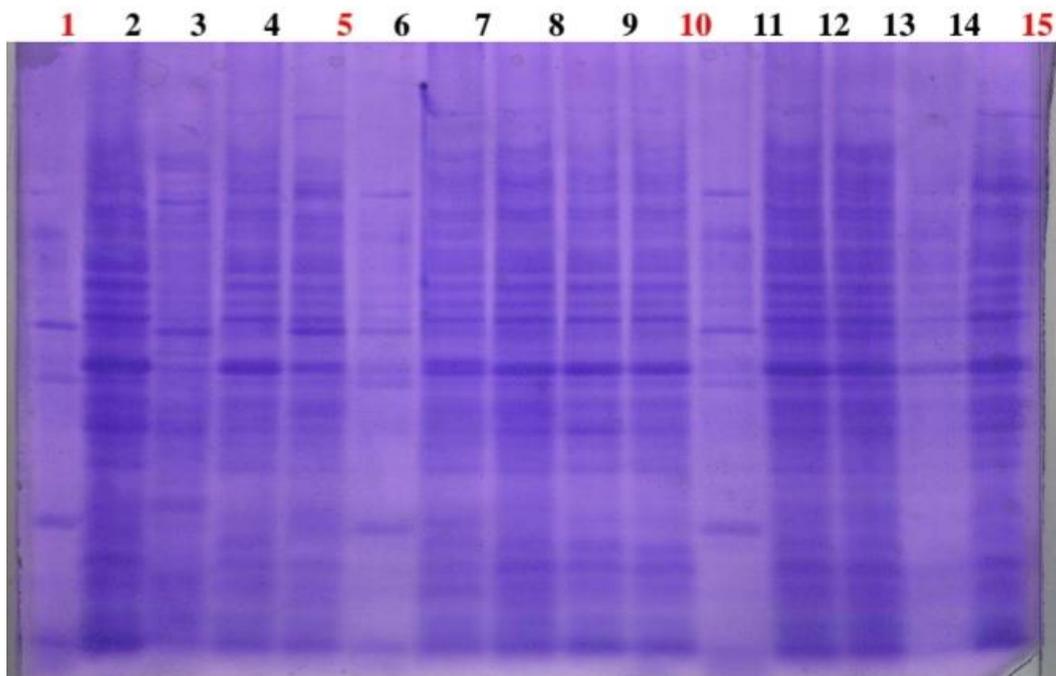


Figure 12. Profil SDS-PAGE des protéines totales (Saoudi, 2008).

1 : R.l.bv.t ; 2 : Ast. 1 ; 3:Ast. 3; 4:Ast. 4; 5:R.l.bv.v ; 6:Ast. 5 ; 7:Ast. 6 ; 8:Ast. 7; 9:Ast. 8 ; 10:*M. ciceri* ;11:Ast. 9 ;12:Ast. 10 ; 13:Ast. 11 ;14:Ast. 12 ;15:*R.sullae*.

Selon les résultats obtenus par Arredondo et Escamilla (1993) en travaillant sur les souches de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* isolées du haricot mexicain *Phaseolus coccineus* (figure 13).

Comme approche initiale pour comparer les profils de bandes SDS-PAGE, les protéines totales de certaines des souches CIES isolées de *Phaseolus coccineus*, CFN7, CFN42, CFN229 isolées de *Phaseoli vulgaris* et CFN226 isolée de *Phaseolus acutifolius*, (Annexe 3) ont été soumises à une électrophorèse dans des gels sur plaque à 10% et colorées au bleu de Coomassie.

Plusieurs protéines ayant des masses moléculaires dans la gamme de 30 à 60 KDa été hautement conservées parmi les souches CIES, peu de différences, voire aucune, ont été observées entre ces souches.

En revanche, quelques différences mineures ont été détectées lorsque les souches CIES et les souches CFN7, CFN42, CFN226, CFN229 ont été comparées, en particulier dans la protéine sur-synthétisée de 40KDa présente dans la souche CFN7.

Dans ce gel, un grand frottis apparaissant après la bande de 13à 14 KDa était présent dans toutes les souches étudiées, cela suggère qu'une dégradation des protéines s'est produite.

Cependant, le frottis a été déterminé comme étant des peptides de bas poids moléculaire (PBPM) bien définis lorsque les gels étaient pré-traités pendant une nuit.

Un degré élevé de similitude dans les profils de bandes de protéines a été observé lorsque les souches CIES de différentes localités ont été comparées, des variations mineures ont été observées pour certaines bandes de protéine.

Les PBPM qui ont été détectés lorsque les échantillons de protéines ont été chargés après le pré-rinçage du gel ont été hautement conservés dans les souches CIES collectées à Yalbante, Elamb6, Jocosic et localité de Jardin botanique.

En revanche, les souches CIES110 et CIES113 qui ont été collectées dans la localité de Bautista Chico, contenaient un PBPM majeur, qui n'a été détecté dans aucune autre souche rhizobia utilisée dans cette étude.

Dans ce travail, nous avons étudié les rhizobia appartenant à deux catégories de variabilité *R. leguminosarum biovar phaseoli*, CFN7, CFN42, CFN226, CFN229 ont été à l'origine isolés de diverses zones géographiques (5) et ont présenté un certain degré de variabilité lorsque les profils de bandes de protéines totales SDS-PAGE ont été comparés.

Ce résultat était attendu de Arredondo et Escamilla car Martinez *et al.* (1985) ont montré que les rhizobia isolées de plantes mexicaines de *P. vulgaris* constituent un groupe diversifié.

En revanche, les souches CIES ont produit des modèles de bandes de protéines SDS-PAGE similaires, ce qui suggère que ces rhizobia appartiennent à une population isolée qui peut avoir un faible niveau d'échange génétique ou aucun échange génétique avec d'autres populations bactérienne du sol.

De plus, les souches CIES ont été collectées dans une zone géographique étroite, comme ce fut le cas pour les rhizobia étudié par Young (1985).

Cependant, dans ce cas la topographie des localités est telle qu'elles sont isolées, ce qui peut favoriser la diversification des populations et la spéciation.

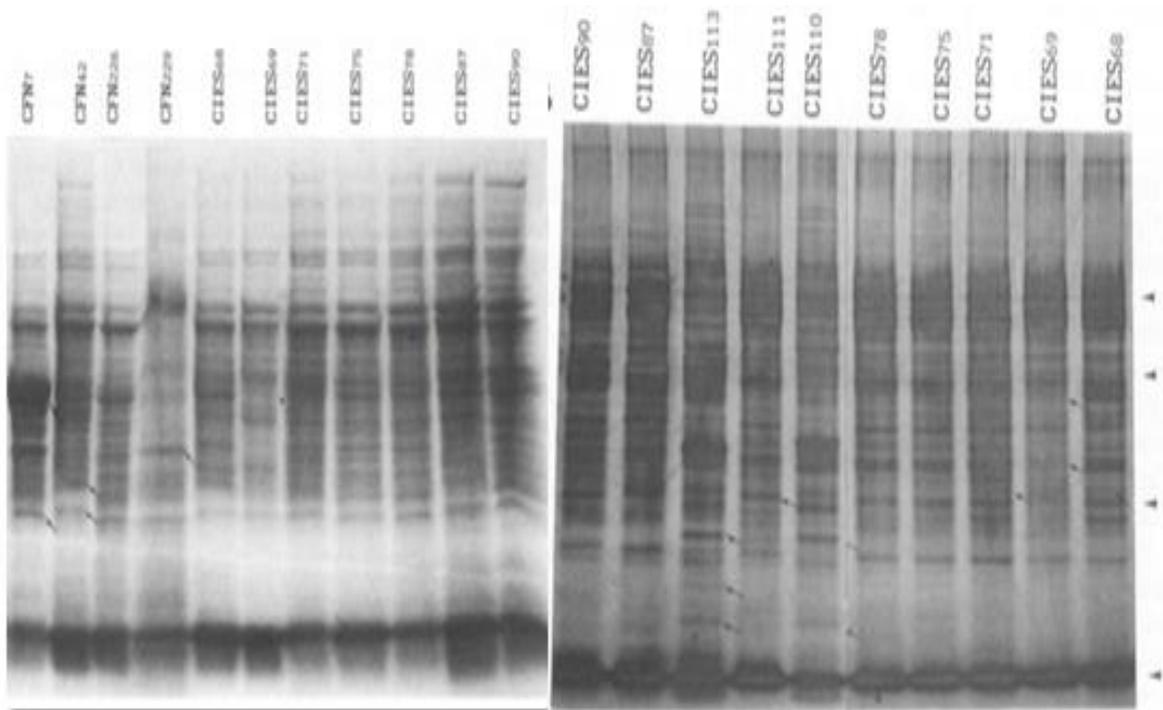


Figure 13. Modèles des bandes de protéines totales SDS-PAGE sur un gel coloré au bleu de Coomassie pour les souches représentatives de Rhizobia (Arredondo et Escamilla 1993).

Les résultats de Dekak (2019) et Dekak *et al.* (2018) sur les rhizobia nodulant les légumineuses *Genista microcephala* et *Argyrolobium uniflorum* montrent que l'analyse des protéines a montré qu'à 45,61% de similitude. Les isolats forment trois classes distinctes des souches de référence (figure 14).

Le premier groupe regroupe un isolat (B3) de *A. uniflorum* (Bir El Ater) et deux souches de référence (*Pseudomonas sp. KD* et *Pantoea agglomerata*).

Les deux isolats (K et AN11) de *G. microcephala* et *A. uniflorum* étaient groupés avec *Pseudomonas sp. NZ096* et *Rhizobium sultae* à 62,61% et 64,35% de similitude respectivement (groupe 2).

Le troisième groupe a classé l'isolat (AB2) de *A. uniflorum* (Bir El Ater) et *Enterobacter kobei* à 62,61%.

La comparaison des profils protéiques totaux obtenus par électrophorèse en présence de SDS peut être hautement standardisée pour regrouper un nombre de souches, et les souches avec électrophérogrammes sur gel de protéine identique peuvent constituer un cluster très homogène avec des homologues moléculaires internes très probablement élevés.

Les résultats sont exprimés dans le dendrogramme (figure 14)

Les isolats sont représentés dans l'annexe 3.

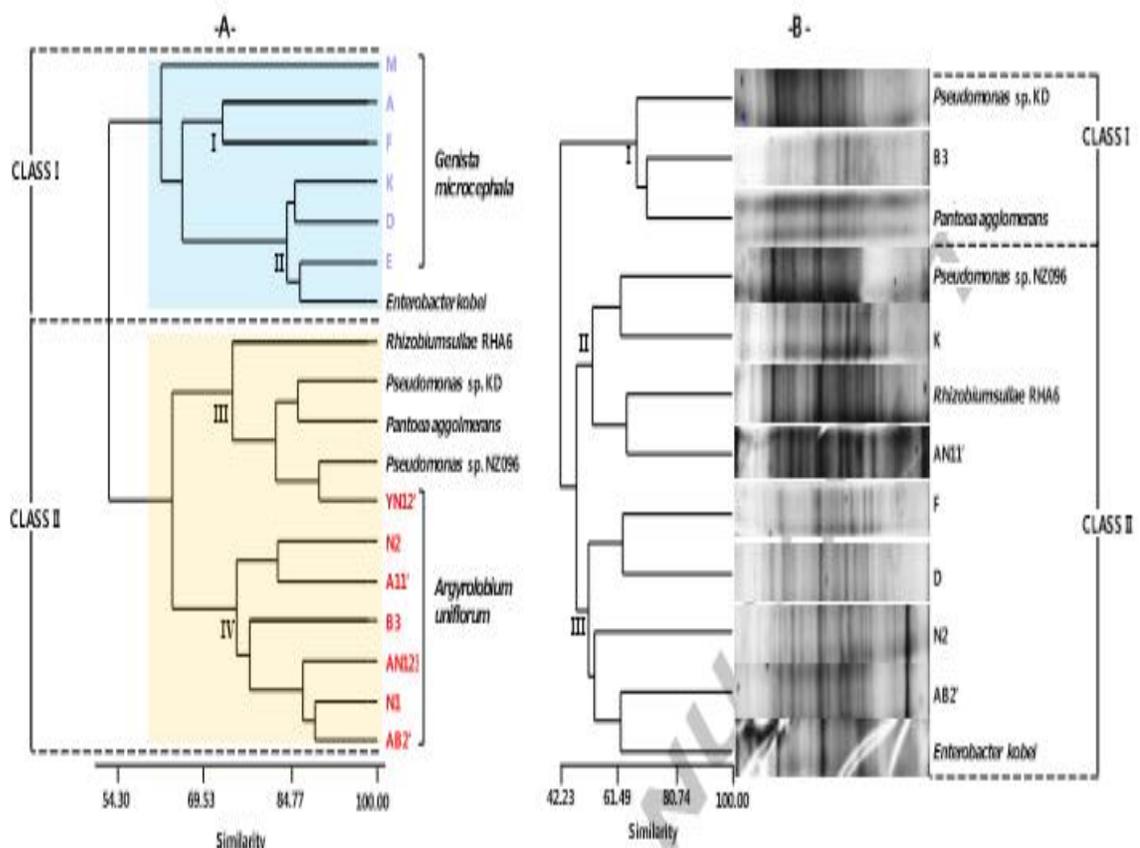


Figure 14. Dendrogramme montrant les relations phénotypiques (A) et les schémas d'électrophorèse normalisés sur gel de dodécyl sulfate de sodium et de polyacrylamide des souches de rhizobia nodulant *Genista microcephala* et *Argyrolobium uniflorum* (B) (Dekak, 2019 ; Dekak *et al.*,2018).

Les travaux de Struffi *et al.* (1997) sur le rhizobia nodulant *Hedysarum coronarium* (Annexe 3) montrent que les profils protéiques de différentes souches de Rhizobia partagent une grande similarité (figure 15).

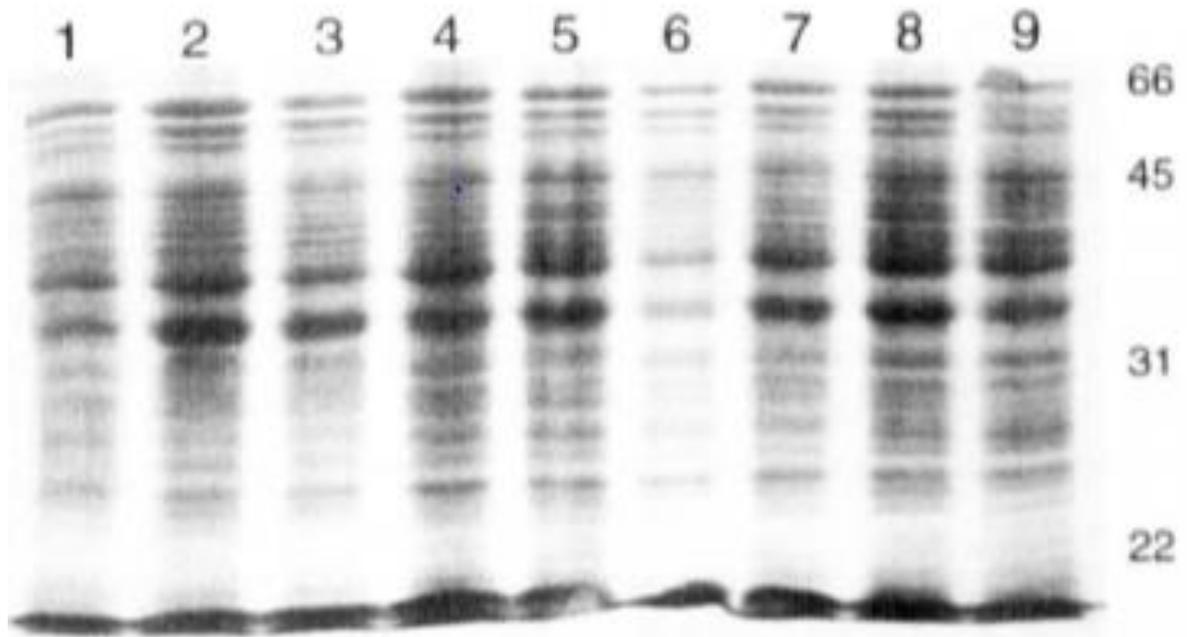


Figure 15. Séparation électrophorétique des protéines totales sur gel polyacrylamide
(Struffi *et al.*, 1997)

1:CC1335; 2:A10; 3: A6; 4: RH44; 5: RH100; 6: RH19; 7: RHf; 8: HCNT-1; 9:IS 123.

Conclusion

Conclusion

Dans cette étude nous avons essayées d'identifier des bactéries isolées à partir des nodules de l'espèce *Astragalus gombo* Bunge et de les caractériser selon les critères morphologiques (aspect des colonies, absorption de rouge Congo, aspect des cellules bactériens sous le microscope...). Ainsi la réalisation d'une technique électrophorétique SDS- PAGE sur gel polyacrylamide comme une nouvelle approche moléculaire pour définir la position taxonomique des rhizobia et leurs relations phylogénétiques.

A la lumière des résultats obtenus, les souches isolées de la légumineuse *A. gombo* Bunge ont le même aspect morphologique que les souches appartenant au genre *Rhizobium*.

L'aspect morphologique des dix isolats sur le milieu de culture YMA montre qu'ils ont une croissance rapide avec un aspect visqueux, la croissance sur YMA+ rouge Congo montre que les isolats présentent une différence dans l'absorption du rouge Congo.

L'examen microscopique des cellules bactériennes des isolats donne des bactéries de forme cocobacille Gram négatif et de différentes tailles.

Les résultats de l'analyse numérique des protéines totales obtenus par SDS-PAGE ont permis de mettre en évidence la diversité des rhizobia associés aux légumineuses. Les souches se répartissent en plusieurs groupes. Certains sont phylogénétiquement très éloignés des autres, en effet les travaux antérieurs de taxonomie numérique ont toujours montré que le genre *rhizobium* est très hétérogène. Par contre d'autres souches présentent une homologie moléculaire.

Des techniques plus discriminatoires (PCR/RFLP, hybridations ADN/ADN, séquençage d'ARN 16S) sont nécessaires pour la caractérisation génomique de ces souches de rhizobia.

Références

Bibliographiques

Références

1. Adolphe A., Saïd B.-M. L., Gustave D., de Recherche M., Aliou S., & Fatiou T. 2017. Utilisation des microorganismes du sol pour accroître la productivité agricole. 1^{er} édition, Bénin, P.76.
2. Arredondo-Peter R., et Escamilla E. 1993. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Protein Banding Patterns among *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* Strains Isolated from the Mexican Bean *Phaseolus coccineus*. Applied and Environmental Microbiology, 59(11):3960-3962
<https://doi.org/10.1128/AEM.59.11.3960-3962.1993>
3. Ausmees N., Jonsson H., Höglund S., Ljunggren H., & Lindberg M. 1999. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii*. Microbiology, 145(5):1253-1262
<https://doi.org/10.1099/13500872-145-5-1253>
4. Ballihaut G. 2007. Détection et identification de sélénoprotéines par électrophorèse sur gel associée aux spectrométries de masse atomique et moléculaire. Thèse Doctorat en Chimie analytique et environnement, Université de Pau et des Pays de l'Adour. 210 p.
5. Baudoin J.P. 2001. Contribution des ressources phylogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. BASE. 5(4): 221-230
6. Benselama A. 2015. Réhabilitation de la culture du *Lablab purpureus L. ex sweet* et études de son partenaire symbiotique. Thèse de Doctorat en biotechnologie, Université d'Oran ES-Senia, Algérie.133 p.
7. Berrada H., Fikri-Benbrahim K. 2014. Taxonomy of the Rhizobia : Current Perspectives. British Microbiology Research Journal, 4(6):616-639
<https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5635>

8. Chehma A. 2006. Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Laboratoire de protections des écosystèmes en zones arides et semi arides, Université Kasdi Merbah-Ouargla, éd. Dar El Houda Algérie. 142p.
9. Chouana T. 2017. Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo* Bunge. Thèse de Doctorat en Nutrition et Sciences des Aliments, Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie. 203 p.
10. Christensen H., Kuhnert P., Busse H. J., Frederiksen W. C., & Bisgaard M. 2007. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the Pasteurellaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1):166-178
11. Cloutier J., Prevost D., Nadeau P., & Antoun' H. 1992. Heat and Cold Shock Protein Synthesis in Arctic and Temperate Strains of Rhizobia. *Applied and environmental microbiology*, 58(9):2846-2853
12. Danso S. K. A., & Eskew D. L. 1984. Comment renforcer la fixation biologique de l'azote. *Bulletin AIEA*, 26(2):29-33
13. 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* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4):715-733 <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-715>
14. Dekak A. 2010. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Mémoire de magistère en Biotechnologie végétale, Université de Tébessa, Algérie. 119 p.
15. Dekak A. 2019. Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotypiques et électrophorétiques isolés à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses

- spontanées de tribu des Ginesteae (Fabaceae). Thèse de Doctorat en Biotechnologies végétales, Université des frères Mentouri Constantine 1. 117p.
16. Dekak A., Chabi R., Menasria T., Benhizia Y. 2018. Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. *Journal of Advanced Research*, (14):34-42 doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.001>
 17. Delarras C. 2014. *Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Lavoisier, Paris. 772p.
 18. Dianda M. 1987. Isolement de souches de microorganismes symbiotiques (*Rhizobium* et champignons endomycorhiziens). Tests d'infectivité et d'affectivité sur *Acacia albida* Del. Université de Ougadogo. 101p.
 19. Drevon J. J., & Sifi B. 2003. Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen : Carthage (Tunisie), 13-16 octobre 1998 ; Montpellier (France), 9-13 juillet 2000. Editions Quae. 414p.
 20. El Hilali I., El Jamali J., Alami I. T., & Maltouf A. F. 2016. Characterisation and Biodiversity of a Fast-Growing Rhizobacterial Population Nodulating *Lupine* in Morocco. *International Journal of New Technology and Research*, 2(12):27-37
 21. Faghir M. 2012. Rôle des microorganismes symbiotiques (cas de rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin. Thèse de Doctorat en Agro-physiologie et Microbiologie des symbioses, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc, 111 p.
 22. Giraud E. 2007. Symbiose *rhizobium*/ légumineuse : Un nouveau sésame. *médecine/sciences*, 23(6-7):663-666 <https://doi.org/10.1051/medsci/20072367663>

23. Hameed S., Yasmin S., Malik K. A., Zafar Y., & Hafeez F. Y. 2004. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils*, 39(3):179-185 <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0697-z>
24. Hopkins W. G. 2003. *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur. Paris, 396p.
25. Jeder H., De Lajudie P., Dreyfus B., LE Floc'h E., & Behaeghe T., Zaafour M. S., et Akrimi N. 1996. Etude de la nodulation des légumineuses pastorales autochtones des régions arides de Tunisie. *Revue des régions arides (Tunis)*, (9):3-10
26. Kopooshian H. 1963. *Seed character relationships in the Leguminosae*. 166p.
27. Kumari B. S., Ram M. R., & Mallaiah K. V. 2010. Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profile of *Rhizobium* isolated from Indigofera species. *Malaysian Journal of Microbiology*. 6(2):133-139 <https://doi.org/10.21161/mjm.20109>
28. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 227(5259): 680-685.
29. Martinez E., Pardo M. A., Palacios R. and 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
30. Mateos P. F., Jimenez-Zurdo J. I., Chen J., Squartini A. S., Haack S. K., Martinez-Molina E., Hubbell D. H., & Dazzo F. B. 1992. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6):1816-1822 <https://doi.org/10.1128/AEM.58.6.1816-1822.1992>
31. Pereira S. I. A., Lima A. I. G., & Figueira E. M. de A. P. 2006. Screening Possible Mechanisms Mediating Cadmium Resistance in *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* Isolated from Contaminated Portuguese Soils. *Microbial Ecology*, 52(2):176-186 <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9057-5>

32. Perry J. J., Staley J.T., lory S. 2004. Microbiologie : cours et questions de révision. Edition Dunod ,France, P.891.
33. Prescott L. K., Harley J. P., & Klein D. A. 2003. Microbiologie. 2^{ème} édition. De boeck, Paris, 1131p.
34. Riah N. 2015. Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. Thèse de Doctorat en biochimie et microbiologie appliquée, Université Mentouri Constantine 1.149 p.
35. Ritsema T., Wijfjes A. H. M., Lugtenberg B. J. J., & Spaink H. P. 1996. *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. *Molecular and General Genetics MGG*, 251(1):44-51 <https://doi.org/10.1007/BF02174343>
36. Rosenberg E., DeLong E. F., Lory S., Stackebrandt, E, & Thompson F. 2014. The Prokaryotes : Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. Springer Berlin Heidelberg. 4^{ème} édition, p.1013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1>
37. Saoudi M. 2008. Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Thèse de Doctorat en Génomique et Techniques Avancées des Végétaux, Université Mentouri de Constantine, Algérie, 99 p.
38. Schwartz C., Decroux J., & Muller J.C. 2005. Guide de la fertilisation raisonnée : Grandes cultures et prairies. Edition France Agricole.298p.
39. Sobti S., Belhadj H. A., & Djaghoubi A. 2015. Isolation and Characterization of the Native Rhizobia Under Hyper-Salt Edaphic Conditions in Ouargla (southeast Algeria). *Energy Procedia*, 74(1):1434-1439 <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.07.790>

-
40. Somasegaran, P., & Hoben, H. J. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer New York. 511p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
41. Struffi P. Corich V. Giacomini A. Benguedouar A. Squartini A. Casella S. & Nuti M.P. 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. Journal of Applied Microbiology, 84(1):81-89 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00318.x>
42. Sy A., Giraud É., Samba R., De Lajudie P., Gillis M., & Dreyfus B. 2001. Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. Canadian Journal of Microbiology, 47(6):503-508 <https://doi.org/10.1139/cjm-47-6-503>
43. Tan Z.Y., Xu X.D., Wang, E.-T., Gao J.L., Martinez-Romero E., & Chen W.X. 1997. Phylogenetic and Genetic Relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and Related Rhizobia. International Journal of Systematic Bacteriology, 47(3):874-879 <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-874>
44. Teyeb H., Houta O., Douki W., & Neffati M. 2012. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Astragalus gombo* collectée à partir de deux sites de la Tunisie. Journal de société chimique de Tunisie. 14(1):63-67
45. Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli R., Benhizia H., Khelifi D., & Squartini A. 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. Sciences & Technologie. (32):43-50

-
46. Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., & Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2):407-438
47. Vertes F., Jeuffroy M.H., Justes E., Thiebeau P., & Corson M. 2010. Connaître et maximiser les bénéfices environnementaux liés à l'azote chez les légumineuses, à l'échelle de la culture, de la rotation et de l'exploitation. *Innovations agronomiques*. 11(1): 25-44
48. Vincent B. 2019. Contribution de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'une légumineuse à des sols contrastés: Le modèle *Acacia spirorbis* et les contraintes édaphiques extrêmes rencontrées en Nouvelle-Calédonie. Thèse de Doctorat en Biologie des interactions, Université de Montpellier, 87-88 p.
49. Wallington E. J., & Lund P. A. 1994. *Rhizobium leguminosarum* contains multiple chaperonin (cpn60) genes. *Microbiology*, 140(1):113-122.
50. Woomer P. L., Karanja N., Kisamuli S. M., Murwira M., & Bala A. 2011. A revised manual for *rhizobium* methods and standard protocols available on the project website.69p.
51. Young J. P. W. 1985. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphisms in isolates from peas, clovers, beans and lucerne grown at the same site. *J. Gen. Microbiol.* 131:2399-2408
52. Zahran H. H. 1997. Chemotaxonomic characterization of some fast-growing rhizobia nodulating leguminous trees. *Folia Microbiologica*, 42(4):367-380
<https://doi.org/10.1007/BF02816952>
53. Zakhia F., & de Lajudie P. 2001. Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*, 21(6-7):569-576
<https://doi.org/10.1051/agro:2001146>

54. site web1: <https://images.app.goo.gl/7isJE68DPRQ9> (consulté le 8/09/2020).
55. site web 2: <https://images.app.goo.gl/YioT6GtYApBGBSCs8> (consulté le 8/09/2020).

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture

Composition du milieu YMB (YeastManitolBroth) en g/l (Somasgaran et Hoben, 1994)

Mannitol..... 10.00

K₂HPO₄0.50

MgSO₄7H₂O0.20

NaCl.....0.10

Extrait de levure0.50

Eau distillée..... 1000 ml

pH.....6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Somasgaran et Hoben, 1994)

YMB 1000 ml

Agar 15

pH.....6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition du milieu YMA+ rouge Congo en g/l (Somasgaran et Hoben, 1994)

YMB 1000 ml

Solution stock de rouge Congo..10ml

Agar 15

pH.....6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100ml d'eau distillée), puis on ajoute l'agar.

Annexe 2 : Electrophorèse des protéines totales (SDS-PAGE) (Saoudi, 2008)

1- Préparation des solutions-stock

- Tampon du gel de séparation : 1.5M Tris HCl, pH 8.8 - SDS 0.4%

Tris	45.4 g
SDS	1.0 g
Eau distillée	100 ml

Porter à pH 8.8 avec HCl 6N puis compléter à 250ml eau distillée.

- Tampon du gel de concentration : 0.5M Tris-HCl pH 6.8- SDS 0.4%

Tris	15.1 g
SDS	1.0 g

Faire comme précédemment mais pH 6.8

- Solution d'Acrylamide/bis Acrylamide (30%T, 2.6%C)

Acrylamide	58.5 g
Bis Acrylamide	1.5 g
Eau distillée	200 ml

Filter sur papier Whatman N. 4

Conserver à 4°C. (Renouveler le stock tous les mois)

- TEMED (N, N, N1, N1 - tetramethylethylènediamine)

- Persulfate d'ammonium : 270 mg/ml d'eau distillée Peser 1.35 g de persulfate d'ammonium et dissoudre dans 5 ml d'eau distillée. La solution est préparée au moment de l'emploi.

Annexe 3 : Souches et isolats utilisés

	Souches	Source d'isolement	Origine	Références
Ast. 1	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 2	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast.3	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 4	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 5	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 6	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 7	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 8	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 9	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 10	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 11	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
Ast. 12	Isolat	<i>Astragalus armatus</i>	Biskra, Algérie	(Saoudi, 2008)
R.l.bv.t	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. Trifolli</i>			(Saoudi, 2008)
R.lbv.v	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. Viciae</i>			(Saoudi, 2008)
CFN 7	<i>P. vulgaris</i>		Guanajuato, Mexico	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CFN 42	<i>P. vulgaris</i>		Guanajuato, Mexico	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CFN 226	<i>Phaseolus</i>		Morelos, Mexico	(Arrendondo et

	<i>acutifolius</i>			Escamilla , 1993)
CFN 229	<i>P. vulgaris</i>		Brazil	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 136	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Yalbante	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 134	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Elamb6	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 106	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Experimental fieldb	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 98	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Jocosic	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 115	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Experimental fieldb	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 114	Isolat	<i>P. coccineus</i>		(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 112	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Experimental fieldb	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 96	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Experimental fieldb	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 90	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Las Ollas	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 87	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Las Ollas	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 113	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Bautista Chico	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 111	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Bautista Chico	(Arrendondo et Escamilla , 1993)

CIES 110	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Bautista Chico	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 78	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Bautista Chico	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 75	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Bautista Chico	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 71	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Bautista Chico	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 69	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Belizario Dominguez	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CIES 68	Isolat	<i>P. coccineus</i>	Belizario Dominguez	(Arrendondo et Escamilla , 1993)
CC1335	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Southern Spain	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)
A 10	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Eastern Algeria	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)
RH44	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Dalearic Islands	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)
A 6	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Eastern Algeria	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)
RH 100	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Dalearic Islands	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)
RH 19	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Sicily, Italy	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)
RHf	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Pisa, Italy	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)

HCNT-1	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Volterra, Italy	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)
IS 123	Isolat	<i>Hedysarum coronarium</i>	Cadiz, Southern Spain	(Struffi <i>et al.</i> ,1997)
GS1	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS2	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS3	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS4	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS5	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS6	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS7	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS8	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS9	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
GS10	Isolat	<i>Astragalus gombo</i> Bunge	Biskra. Algérie	Notre étude
B3	Isolat	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Bir el ater - Tebessa	(Dekak, 2019)

K	Isolat	<i>Genista microcephala</i>	Metlili -Batna	(Dekak, 2019)
AN11'	Isolat	<i>Argyrobium uniflorum</i>	Negrine - Tebessa-	(Dekak, 2019)
AB2'	Isolat	<i>Argyrobium uniflorum</i>	Bir el ater - Tebessa	(Dekak, 2019)

Annexe 4 : Liste des articles utilisés dans la partie pratique

1. Arredondo-Peter R., et Escamilla E. 1993. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Protein Banding Patterns among *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* Strains Isolated from the Mexican Bean *Phaseolus coccineus*. Applied and Environmental Microbiology, 59(11):3960-3966 <https://doi.org/10.1128/AEM.59.11.3960-3962.1993>
2. Ausmees N., Jonsson H., Höglund S., Ljunggren H., & Lindberg M. 1999. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii*. Microbiology, 145(5):1253-1262 <https://doi.org/10.1099/13500872-145-5-1253>
3. Cloutier J., Prevost D., Nadeau P., & Antoun' H. 1992. Heat and Cold Shock Protein Synthesis in Arctic and Temperate Strains of Rhizobia. Applied and environmental microbiology, 58(9):2846-2853
4. Danso S. K. A., & Eskew D. L. 1984. Comment renforcer la fixation biologique de l'azote. Bulletin AIEA, 26(2):29-33
5. 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 comb. nov.*, *Sinorhizobium saheli sp. nov.*, and *Sinorhizobium teranga sp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 44(4):715-733 <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-715>
6. Dekak A., Chabi R., Menasria T., Benhizia Y. 2018. Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. Journal of Advanced Research, (14):34-42 doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.001>

7. El Hilali I., El Jamali J., Alami I. T., & Maltouf A. F. 2016. Characterisation and Biodiversity of a Fast-Growing Rhizobacterial Population Nodulating *Lupine* in Morocco. *International Journal of New Technology and Research*, 2(12):27-37
8. Hameed S., Yasmin S., Malik K. A., Zafar Y., & Hafeez F. Y. 2004. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils*, 39(3):179-185 <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0697-z>
9. Kumari B. S., Ram M. R., & Mallaiah K. V. 2010. Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profile of *Rhizobium* isolated from Indigofera species. *Malaysian Journal of Microbiology*. 6(2):133-139 <https://doi.org/10.21161/mjm.20109>
10. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 227(5259): 680-685.
11. Martinez E., Pardo M. A., Palacios R. and 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
12. Mateos P. F., Jimenez-Zurdo J. I., Chen J., Squartini A. S., Haack S. K., Martinez-Molina E., Hubbell D. H., & Dazzo F. B. 1992. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6):1816-1822 <https://doi.org/10.1128/AEM.58.6.1816-1822.1992>
13. Pereira S. I. A., Lima A. I. G., & Figueira E. M. de A. P. 2006. Screening Possible Mechanisms Mediating Cadmium Resistance in *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* Isolated from Contaminated Portuguese Soils. *Microbial Ecology*, 52(2):176-186 <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9057-5>
14. Ritsema T., Wijfjes A. H. M., Lugtenberg B. J. J., & Spaik H. P. 1996. *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in

-
- Nod factor biosynthesis. *Molecular and General Genetics MGG*, 251(1):44-51
<https://doi.org/10.1007/BF02174343>
15. Sobti S., Belhadj H. A., & Djaghoubi A. 2015. Isolation and Characterization of the Native Rhizobia Under Hyper-Salt Edaphic Conditions in Ouargla (southeast Algeria). *Energy Procedia*, 74(1):1434-1439 <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.07.790>
16. Struffi P. Corich V. Giacomini A. Benguedouar A. Squartini A. Casella S. & Nuti M.P. 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1):81-89
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00318.x>
17. Sy A., Giraud É., Samba R., De Lajudie P., Gillis M., & Dreyfus B. 2001. Certaines légumineuses du genre *Crotalaria* sont spécifiquement nodulées par une nouvelle espèce de *Methylobacterium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(6):503-508
<https://doi.org/10.1139/cjm-47-6-503>
18. Tan Z.Y., Xu X.D., Wang, E.-T., Gao J.L., Martinez-Romero E., & Chen W.X. 1997. Phylogenetic and Genetic Relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and Related Rhizobia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3):874-879
<https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-874>
19. Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli R., Benhizia H., Khelifi D., & Squartini A. 2010. Caractérisation des bactéries isolées à partir des nodules des espèces de légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*,(32):43-50
20. Wallington E. J., & Lund P. A. 1994. *Rhizobium leguminosarum* contains multiple chaperonin (cpn60) genes. *Microbiology*, 140(1):113-122.

21. Young J. P. W. 1985. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphisms in isolates from peas, clovers, beans and lucerne grown at the same site. *J. Gen. Microbiol.* 131:2399-2408

22. Zahran H. H. 1997. Chemotaxonomic characterization of some fast-growing rhizobia nodulating leguminous trees. *Folia Microbiologica*, 42(4):367-380
<https://doi.org/10.1007/BF02816952>.

ملخص

يؤدي تعايش الريزوبيوم - البقوليات الى تكوين العقد الجذرية التي تثبت النيتروجين في الغلاف الجوي. هذه العملية الطبيعية ذات فائدة اقتصادية و زراعية كبيرة.

من أجل دراسة خصائص البكتيريا التي تغذي نوع *Astragalus gombo* المعزولة من منطقة الشوشة بولاية بسكرة، أجرينا اختبارات مورفولوجية و زراعية على العزلات.

ان انتاج ملف البروتين على هلام polyacrylamide تحت ظروف تغيير الطبيعة (SDS-PAGE) للسلاطات يجعل من الممكن تحديد التشابه بين العزلات و السلاطات المرجعية و الحصول على فكرة عن موقعها التصنيفي.

الكلمات المفتاحية: التعايش، ريزوبيوم، *Astragalus gombo*، الاختبارات المورفولوجية، SDS-PAGE.

Résumé

La symbiose Rhizobia-légumineuse conduit à la formation des nodules racinaires fixateurs d'azote atmosphérique. Ce processus naturel présente un intérêt économique et agronomique considérable.

Dans le but de caractériser les bactéries nodulant l'espèce *Astragalus gombo*, isolés de la région Echoucha, wilaya de Biskra, nous avons procédé à des tests morphologiques et culturels des isolats

La réalisation des profils protéiques , sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), des souches permettent de déterminer la similitude entre les isolats et les souches de référence, et avoir une idée sur leur position taxonomique.

Mots clés : symbiose ; Rhizobia ; *Astragalus gombo* ; tests morphologiques ; SDS-page

Abstract

Rhizobia-legume symbiosis leads to the formation of root nodules which fix atmospheric nitrogen. This natural process is of considerable economic and agronomic interest.

In order to characterize the bacteria nodulating the species *Astragalus gombo*, isolated from the Echoucha region, wilaya of Biskra, we carried out morphological and cultural tests of the isolates

The realization of protein profiles on polyacrylamide gel under denaturing conditions (SDS-PAGE) of strains makes it possible to determine the similarity between the isolates and reference strains we have helped to identify their taxonomic position

Key words :symbiosis ; Rhizobia ;*Astragalus gombo*; Morphologic tests, SDS-PAGE