



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 : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Selatna riane
Zoubiri maroua

Le : Septembre 2020

Thème

Détermination du profil protéique par SDS page des bactéries ondulant une légumineuse

Jury :

Titre	Prénom puis NOM	Grade	Université de Biskra	
				Président
Dr.Mme		MC	Université de Biskra	Rapporteur
MokraDj		B		
amila				
Titre	Prénom puis NOM	Grade	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019-2020

Remerciement

Tout d'abord je remercie « **Dieu** » le tout puissant qui m'a donné la volonté et la patience d'accomplir ce travail.

Merci à tous ceux qui partagent ma vie et qui m'accompagnent avec tant d'amour et de tendresse, Merci à **mon père**, à **ma mère** et à toute la famille. A mon fiancé , **Belgacem**, pour son aide et son encouragement

Je suis très reconnaissante à mon enseignante et promotrice **Mme MOKRANI DJAMILA** pour m'avoir accepté de m'encadrer. Je le remercie pour son soutien et son dévouement pendant tout le long de ce travail.

Je tiens à remercier infiniment **Mr Djabellah Said** enseignant de l'Université de Chlef pour son aide et ses conseils

Merci à mes amis pour tous les moments passés.

Selatna Riane

Dédicace

Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail
A ma très chère mère khadidja et ma père Abdenour
,ma raison de vivre et raison de tout succès dans ma vie.
A mes chères sœurs ,Qui m'a toujours aidé moralement.
leur soutien m'a beaucoup aidé.
Avec mes sentiments d'amour, a mon fiancé,
Symbole du courage et son aide qui m'ont toujours
encouragée.et à tous les membres des familles

Selatna Riane

Sommaire

Remerciement	2
Dédicace	3
Table des matières	Error! Bookmark not defined.
Liste des tableaux	8
Liste des figures	7
Liste des abréviation	9
Introduction générale	11
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	3
1-La fixation biologique d'azote:	4
1-1-L'enzyme impliqué dans la fixation d'azote	5
2-Généralité sur les rhizobia	5
2-1- Les bactéries fixatrices d'azote	6
3-Généralité sur les légumineuses:	6
4- Symbiose légumine-rhizobia	7
5- Mécanisme de la nodulation:	9
5-1 Echange de signal d'infection:	9
5-2- L'infection	9
5-3- Développement du nodule et maturation des bactéroïdes	10
6- La taxonomie bactérienne	10
7- Le gere <i>Astragalus</i>	12
7-1-Description botanique	12
7-2-Répartition géographique	13
7-3-Classification d'<i>Astragalus armatus</i>	14

sommaire

7-4-Intéret médicinal de la plante	14
Chapitre 2 : Parties expérimentale	15
1- Purification des isolats:	14
2-Test de coloration de Gram	14
3- Conservation des souches	14
4- Détermination du profil protéique par SDS-PAGE	15
4-1- Principe	15
4-2- Protocole	16
Chapitre 3 : Résultat et Discussion	20
1-Caractères macroscopiques: (Aspect des colonies)	20
2-Caractères microscopiques : Coloration de Gram	20
3-Analyse des profils protéiques par SDS page de différents articles	21
3-1-Analyse des profils protéiques par SDS page: (Dekak et al.,2018)	21
3-2-Analyse des profils protéiques par SDS page: (Salif et al.,2002)	22
3-3-Détermination protéique (SDS-PAGE): (Saoudi ,2008)	25
3-4-Détermination du profil protéique par SDS page: (Benahmed ,2010)	26
Conclusion	30
Bibliographie	<u>Error! Bookmark not defined.</u>
has it led to an increase in nitrogen fixation?. <i>Field Crops Researchm.</i> Pages 165-181	36
12. Dekak, A.,& Benhizia, Y.(2018) . Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotyques et électrophorétiques isolés à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des <i>Ginesteae</i> (Fabaceae).	34
13. Tak A., Gehlot P., Pathak R., Singh S.K. (2017) . Species Diversity of Rhizobia. <i>Rhizobium Biology and Biotechnology</i>, pp 215-245	37

sommaire

<u>14. Benselama,A.(2015). Réhabilitation du la culture du <i>Lablab purpureus</i> L.ex SWEet et études de Son partenaire Symbiotique .Thèse de Doctorat ,Université Ahmed Ben Bella,Oran.</u>	<u>Error! Bookmark not defined.</u>
<u>18. Mania, D.,Woliy, K.,Degefu, T.,& Ftostegard, A.(2019). A common mechanism for efficient N₂O reduction in diverse isolates of nodule-forming <i>Bradyrhizobium</i>. <i>Environmental microbiology</i>.Volume 22,pages 17-31</u>	<u>Error! Bookmark not defined.</u>
<u>19. Nowakowski ,A. B, Wobig , W. J., &Petering , D.H. (2014). Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions.<i>Metallomics</i> , 2014,6, 1068-1078</u>	35
<u>20. Rybicki , Ed.C .,& Purves , M.(1996). Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. <i>Molecular Biology Techniques</i></u>	35
<u>24. Bouchiba, Z.(2018). Diversité des rhizobia associés à <i>Scorpiurus muricatus ssp.sulcatus</i> et leur utilisation pour la réhabilitation des zones dégradées. Thèse de Doctorat, Université Ahmed Ben Bella,Oran.</u>	34
<u>2- http://www.planetefleurs.fr/Systematique/Fabaceae/Astragalus_armatus.html</u>	
<u>Consulter le 25/09/2020</u>	37
<u>Annexes</u>	39
<u>Résumés</u>	<u>Error! Bookmark not defined.</u>

Liste des figures

Figure 1: <i>Astragalus armatus</i> (Site web 2)	13
Figure 2 : La répartition géographique de la plante <i>Astragalus armatus</i> (Labeled,2016)	13
Figure 3 :Concervation des isolats dans milieu YMA incliné	15
Figure 4: Aspect des colonies sur milieu YMA+RC	20
Figure 5 : Coloration de Gram (grossissement x 100)	21
Figure 6 : Dendrogramme montrant les relatinsmontrant les relatins 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>Argyrobolium uniflorum</i> (B) (Dekak et al.,2018)	22
Figure 7 : Dendrogramme montrant les relation entre les profils protéiques électrophorétiques des isolats de nodules d'<i>Acaciatortilis</i> subps. raddiana (*) et les souches de référence de <i>Rhizobium</i>, <i>Sinorhizobium</i>, <i>Mesorhizobium</i>, <i>Azorhizobium</i>, <i>Bradyrhizobium</i> et <i>Agrobacterium</i>. La ligne verticale en pointillés indique le niveau de similitude à quels groupes ont été délimités. L'échelle représente la valeur r convertie en pourcentages. (Salif et al.,2002)	24
Figure 8 : Profils SDS-PAGE des proteines totales 1 : <i>R.l.bv.t</i> ; 2 : Ast 1 ; 3:Ast 3; 4:Ast 4; 5:<i>R.l.bv.v</i> ; 6:Ast 5 ; 7:Ast 6 ; 8:Ast 7; 9:Ast 8; 10:<i>M. ciceri</i> ;11:Ast 9 ;12:Ast 10 ; 13:Ast 11 ;14:Ast 12;15:<i>R.sullae</i>. (Saoudi ,2008)	25

Liste des tableaux

[Tableau 1 : diagramme type des bandes polypeptidiques.....](#)26

[Tableau 2 : Coefficient de similitude entre les différentes souches testées.....](#)28

Liste des abréviations

A : Astragalus

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BNL : Bactéries Nodulantes Légumineuses

CaCl₂ : Chlorure de Calcium

CaCO₃ : Carbonate de Calcium

C : Carbone

CO₂ : dioxyde de carbone

Fe : Fer

HCl : chlorure d'hydrogène

MCE : mercaptoéthanol

Mg ATP : Adenosine Triphosphate Magnésium

N : azote

N₂ : diazote

NH₃ : L'ammoniac

NaCl : Chlorure de Sodium

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

pH : potentiel hydrogène

QSP : Quantité suffisante pour

RC : Rouge Congo

REP : Réseau d'éducation prioritaire

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SDS : Réaction en chaîne par polymérase

pH : potentiel hydrogène

Tris : 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol

Liste des abréviation

Temed : Tetramethylethylenediamine

TCA : l'acide tricholacétique

YMA :Yeast Mannitol Agar

YMB : Yeast Mannitol Agar

Introduction générale

Introduction générale

Les rhizobia sont des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote pour former des nodules sur les racines, ou occasionnellement sur les tiges de nombreuses plantes légumineuses. Environ 50 espèces bactériennes formant nodules ont été documentées dans les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia* et *Blastobacter* dans les alphaprotéobactéries; *Burkholderia* et *Ralstonia* dans les bêtaprotéobactéries; et certaines espèces chez les gamaproteobacteria. Compte tenu du grand nombre et de la vaste distribution des légumineuses, plus de nouvelles bactéries nodulaires racinaires (wang et al.,2006)

Les légumineuses fixatrices d'azote (NFTL) sont plantés à grande échelle dans le monde comme ils le peuvent fournir du bois de feu, du fourrage et des produits riches en azote améliorer la fertilité des sols (Milnitsky et al.,1997)Les légumineuses constituent une très grande famille de plantes et moins de 20% des espèces de légumineuses ont été examinées pour nodulation. Ces dernières années, l'exploration d'un certain nombre d'espèces de légumineuses sauvages tropicales, d'arbres, d'arbustes et d'herbes a mis en évidence une diversité inattendue. (Zakhia et al.,2004)

Le genre *Astragalus* L. présenté par des plantes fleurissantes, contient plus de 2500 espèces, la plupart du temps perennes. Ce genre est réparti dans des régions climatiques méditerranéennes, le long des côtes Pacifiques de l'Amérique du Sud du nord et, en Europe méridionale et l'Afrique du nord.(saoudi,2008)

La relation Rhizobia-légumineuse est plus importante avec les autres organismes fixateurs d'azote en raison de son potentiel élevé. La fixation de l'azote est obtenue par des bactéries à l'intérieur des cellules, les nodules, qui se développent généralement sur les racines et sur les tiges. Cette association mutualiste est bénéfique pour les deux partenaires, la plante fournissant des acides dicarboxyliques comme source de carbone aux bactéries et obtenant en retour, de l'ammonium. Cette interaction commence par un échange de signaux moléculaires précis entre la légumineuse et le rhizobia vivant en liberté. (Nirmalakumari et al,2017)

Introduction générale

Dans l'objectif d'étudier les bactéries associées aux nodules des racines de légumineuses du genre *Astragalus* (particulièrement *Astragalus armatus*), les isolats sont caractérisés par une étude phénotypique

Elle comprend généralement trois chapitres représentatifs :

- ❖ Le premier chapitre sous forme d'une synthèse bibliographique, comporte un rappel de quelques connaissances sur le thème étudié.
- ❖ Le deuxième chapitre, matériel et méthode englobe les différents techniques utilisés pour caractériser les différents isolats.
- ❖ Le troisième chapitre est une discussion des différents résultats obtenus.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1-La fixation biologique d'azote:

L'azote est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone .Il est essentiel à la croissance et au développement de tous les organismes. La plupart de l'azote se trouve dans l'atmosphère et l'utilisation de cette source est importante pour éviter la privation d'azote.(**Kneip et al.,2007**) Il est très fréquemment le facteur clé de la production agricole car la concentration des formes d'azote assimilables dans le sol(ammonium, nitrate, composés organiques simples) est souvent limitante pour la croissance des plantes. (**Roger et al,1996**)

L'azote moléculaire (N₂), constituant majeur de l'atmosphère mais chimiquement inerte, ne peut être utilisé que par certains micro-organismes procaryotes appelés fixateurs de N₂, qui sont soit libres, soit symbiotiques, c'est à dire associés à d'autres organismes.(**Roger et al,1996**) Par conséquent, la plupart des organismes doivent obtenir leur azote sous des formes fixes, l'ammoniac ou le nitrate (**Seefeldt et al.,2009**).Cependant, la capacité de fixer l'azote atmosphérique via le complexe enzymatique nitrogénase est limitée à certaines bactéries.(**Kneip et al,2007**)

La fixation biologique de l'azote (N₂) est un aspect important de la production alimentaire durable et respectueuse de l'environnement et de la productivité des cultures à long terme. (**Kessel et Hartley ,2000**)

La fixation biologique du N₂ représente la principale source d'apport de N dans les sols agricoles. Les principaux systèmes de fixation du N₂ sont les systèmes symbiotiques .(**Zahran,1999**)

La fixation biologique de N₂ est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an. (**Roger et al,1996**)

En absence de fertilisation, la fixation de N₂ est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol. (Roger et al,1996)

Une grande partie de l'azote fixé par les légumineuses à grains est éliminée à la récolte, le reste devient disponible pour les cultures ultérieures après la minéralisation. (Kessel et Hartley ,2000)

Au cours de la fixation biologique de l'azote (BNF), l'azote moléculaire est réduit dans de multiples réactions de transfert d'électrons, ce qui entraîne la synthèse d'ammoniac et la libération d'hydrogène. L'ammonium est ensuite utilisé pour la synthèse ultérieure de biomolécules. Cette réduction de l'azote moléculaire en ammonium est catalysée dans tous les organismes fixateurs d'azote (Sugiyama et al.,2015) appelés diazotrophes (Seefeldt et al.2009). via le complexe enzymatique de la nitrogénase dans une réaction dépendante de l'ATP et très consommatrice d'énergie. (Sugiyama et al.,2015)

1-1-L'enzyme impliqué dans la fixation d'azote

La réduction de N₂ par la nitrogénase implique une interaction complexe entre ces deux composants protéiques, les électrons, le MgATP et les protons (Seefeldt et al,2009).La forme prédominante de l'enzyme nitrogénase, qui catalyse cette réaction, comprend une protéine Fe de délivrance d'électrons et une protéine catalytique MoFe. (Hoffman et al.,2014)

Une caractéristique importante du complexe enzymatique nitrogénase est son extrême sensibilité à des concentrations même mineures d'oxygène. (Sugiyama et al.,2015)

Il est nécessaire de faire la distinction entre les deux classes de voies de réaction potentielles: (Hoffman et al.,2009)

de la protéine molybdène-fer (MoFe) (dinitrogénase ou composant I)

protéine fer (Fe) (dinitrogénase réductase ou composant II)

2-Généralité sur les rhizobia

Du grec rhiza (qui signifie racine) et bio (vie), rhizobia signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des Rhizobiaceae. Ces bactéries présentent la capacité de

former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. (**Benahmed, 2010**).

Les rhizobia sont appelées diazotrophes, car elles obtiennent tout leur azote en fixant l'azote moléculaire. (**Sugiyama et al.,2015**) Ces bactéries sont un assemblage hétérogène de bactéries Gram-négatives, aérobies, non sporulantes, de symbiotes de légumineuses et de bactéries du sol. (**Tak et al.,2017**) en forme de bâtonnet et présentant un flagelle polaire ou sub-polaire ou des flagelles péritriches qui lui confèrent sa mobilité. (**Benselama,2015**) peuvent se développer à un pH [4–10], une concentration en sel [NaCl = 0–5%] et une température jusqu'à 45 ° C. (**Dekak et Benhizia ,2018**) Ils appartiennent à la sous classe alpha des protéobactéries de la grande classe des eubactéries. (**Benselama ,2015**)

2-1- Les bactéries fixatrices d'azote

a) Les fixateurs libres :

Il existe des bactéries libres qui vivent dans le sol et assurent la fixation de l'azote, soit seules, soit en symbiose avec d'autres bactéries. Ce sont principalement:

- des bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas* ;
- des bactéries anaérobies : *Clostridium*... (**Saoudi ,2008**)

b) Les 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 *Rhizobium*, vivent au sein de nodosités spécialisées 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**)

3-Généralité sur les légumineuses:

Les légumineuses (Fabaceae) constituent la troisième plus grande famille de plantes au monde, avec environ 700 genres et 20 000 espèces. (**Roger et al,1996**)

Elles présentes sous forme d'herbes, d'arbustes, de vignes ou d'arbres dans des habitats principalement terrestres ,et qui font partie de la plupart des types de végétation du monde. Actuellement, la famille des légumineuses est divisée en trois sous-familles, les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Papilionoideae. Les membres des Caesalpinioideae sont regroupés en quatre tribus, les Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae et Detarieae comprenant 170 genres et 2250 espèces. Les Mimosoideae sont regroupés en deux tribus, les Ingeae et Mimoseae avec environ 80 genres et 3270 espèces, tandis que les Papilionoideae se compose de 28 tribus avec environ 480 genres et 13 800 espèces. (**Andrews et Andrews,2017**)

Cependant, une nouvelle classification des légumineuses a été proposée avec six sous-familles basées sur les séquences du gène matK plastid de 20% de toutes les espèces de légumineuses à travers environ 90% de tous les genres actuellement reconnus. Les six sous-familles proposées sont un Caesalpinioideae recirculé, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae et Papilionoideae. Dans ce système, les Mimosoideae actuellement reconnus sont un clade distinct niché dans les Caesalpinioideae recirculés. Les espèces des Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae et Duparquetioideae ne nodulent pas. (**Andrews et Andrews,2017**)

La plupart des légumineuses acquièrent des nutriments azotés par symbiose avec des microbes du sol appelés rhizobies. (**Roger et al,1996**)

La plupart des espèces de la famille des légumineuses peuvent fixer l'azote atmosphérique (N₂) via des bactéries symbiotiques (rhizobie) dans les nodules racinaires, ce qui peut leur donner un avantage dans des conditions de faible teneur en azote (N) du sol si d'autres facteurs sont favorables à la croissance. De plus, la fixation de N₂ par les légumineuses peut être un apport majeur de N dans les écosystèmes naturels et agricoles. (**Andrews et Andrews,2017**)

4- Symbiose légumine-rhizobia

La remise en état et l'amélioration de la fertilité des terres par l'application d'engrais organiques (fumier et boues d'épuration) et inorganiques (synthétiques) coûtent cher et peuvent être une source de pollution. (**Zahran,1999**)

La symbiose Rhizobia-légumineuse (herbe ou arbre) est suggérée comme la solution idéale pour l'amélioration de la fertilité des sols et la réhabilitation des terres arides et constitue une direction importante pour les recherches futures.(**Zahran,1999**)

Une meilleure compréhension de la façon dont les bactéries résistent aux stress rencontrés lors de la progression des symbioses plante-microbe améliorera notre capacité à stimuler la croissance des plantes.(**Kulkarni et al.,2015**)

Ces symbioses nécessitent l'invasion bactérienne des tissus végétaux et l'adaptation du symbiote bactérien à l'environnement hôte de la plante, processus dans lesquels plusieurs lipides membranaires microbiens jouent un rôle clé. Par exemple, la phosphatidylcholine est essentielle pour une fixation efficace de l'azote dans plusieurs partenariats légumineuses-rhizobiens tels que soja-Bradyrhizobium diazoefficiens. (**Kulkarni et al.,2015**)

La symbiose rhizobienne, exclusive aux légumineuses, s'établit avec des bactéries diazotrophes du sol qui induisent la formation de nodules dans les racines des plantes hôtes. Les rhizobias fixent le diazote atmosphérique (N₂) et le fournissent aux plantes sous forme d'ammonium qui peut facilement être assimilée par la plante. La fixation biologique de l'azote (BNF) contribue ainsi de manière significative au bilan azote (N) des légumineuses. On estime que sa part dans l'absorption totale de N par les plantes peut atteindre 65–95%. (**Püschel et al.,2017**)

Cette symbiose légumineuse-rhizobium a lieu dans des organes spécialisés, appelés nodules, dans lesquels les rhizobiums transforment efficacement l'azote atmosphérique en ammonium. En retour, les plantes fournissent aux rhizobies les produits de la photosynthèse.(**Roger et al,1996**)

Ces relations complexes compliquent notre compréhension de l'acquisition de nutriments par les légumineuses et de la façon dont elles récompensent leurs partenaires symbiotiques avec du carbone le long de gradients de conditions environnementales. Chaque symbiose peut consommer environ 3 à 20% de C récemment fixé pour maintenir la croissance et l'activité et pour accumuler les réserves d'énergie des microbes participants. Les plantes peuvent en partie compenser les besoins en C de leurs symbiotes par une assimilation accrue du CO₂, soit en raison

de la stimulation des puits de carbone, soit indirectement grâce aux bénéfices nutritionnels des symbioses. (Püschel et al.,2017)

Certaines souches de rhizobia forment des symbioses efficaces (fixant le N₂) avec leurs légumineuses hôtes sous des stress salins, thermiques et acides, et peuvent parfois le faire sous l'effet des métaux lourds. La remise en état et l'amélioration de la fertilité des terres arides par l'application d'engrais organiques (fumier et boues d'épuration) et inorganiques (synthétiques) coûtent cher et peuvent être une source de pollution. La symbiose Rhizobia-légumineuse (herbe ou arbre) est suggérée comme la solution idéale pour l'amélioration de la fertilité des sols et la réhabilitation des terres arides et constitue une direction importante pour les recherches futures. (Zahran,1999)

5- Mécanisme de la nodulation:

5-1 Echange de signal d'infection:

Le processus de nodulation pour presque toutes les légumineuses étudiées est initié par la production de légumineuses d'un mélange de composés, principalement des flavonoïdes, qui induisent la synthèse de la protéine NodD chez les rhizobia. La protéine NodD active la transcription d'autres gènes impliqués dans le processus de nodulation, y compris ceux nécessaires à la production de facteurs Nod, les molécules signal produites par le rhizobium et détectées par la plante, qui induisent l'organogenèse des nodules. La perception du signal du facteur Nod dans les légumineuses est médiée par les récepteurs du facteur Nod (Andrews et Andrews,2017) et va déclencher un enchaînement d'événements aboutissant à la formation du nodule. (Giraud, 2007)

Le facteur Nod agit ainsi comme un véritable sésame. Sans celui-ci, la plante maintient un système de défense lui permettant de se protéger de l'intrusion des mille et une bactéries pathogènes qui rôdent autour de ses racines. (Giraud, 2007)

5-2- L'infection

les rhizobia pénètrent dans les poils de la racine et le matériau de la paroi cellulaire hôte se développe autour de l'infection en développement, formant un fil

d'infection se ramifiant à plusieurs reprises(Andrews et Andrews,2017) , qui conduisant la bactérie jusqu'à un primordium nodulaire .(Giraud, 2007)

5-3- Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

libération des bactéries par endocytose dans les cellules du primordium nodulaire. Au sein de ce primordium nodulaire, les bactéries se différencient en bactéroïdes, alors capables de convertir le N₂ en NH₃.(Giraud, 2007)

Les nodules de légumineuses peuvent être classés comme indéterminés ou déterminés en croissance. Les nodules indéterminés maintiennent le tissu méristématique, tandis que les nodules déterminés ont un méristème transitoire. Le type de nodule dépend de la plante hôte, et les espèces de légumineuses qui peuvent produire des nodules à la fois déterminés et indéterminés sont rares. (Andrews et Andrews,2017)

6- La taxonomie bactérienne:

La taxonomie est la science qui étudie les relations entre les organismes. Il comprend la classification, la nomenclature et l'identification. La taxonomie bactérienne moderne est polyphasique. Cela signifie qu'il repose sur plusieurs techniques moléculaires, chacune récupérant les informations à différents niveaux cellulaires (protéines, acides gras, ADN ...). Un petit nombre de techniques de classification étaient disponibles pour les microbiologistes (principalement une caractérisation phénotypique était réalisée: une capacité de nodulation d'espèces de légumineuses pour un Rhizobia, par exemple). Avec le développement de techniques basées sur la réaction en chaîne par polymérase pour la caractérisation, la taxonomie bactérienne a subi de grands changements. En particulier, la classification des bactéries nodulantes des légumineuses a été modifiée à plusieurs reprises au cours des 20 dernières années. (Zakhia et de Lajudie ,2006)

En dehors des préoccupations bien spécifiques liées à la systématique bactérienne, il est souvent nécessaire de pouvoir identifier et différencier une souche bactérienne d'une autre, soit afin d'explorer la richesse d'un site en bactéries, par

exemple autour d'une fonction donnée (bactéries détoxifiantes, bactéries nitrifiantes, bactéries productrices d'un métabolite intéressant...), soit pour suivre le devenir d'une souche bactérienne d'intérêt particulier après sa réintroduction en milieu non contrôlé. (Prin et al.,1993)

Le choix de la ou des méthodes utilisées pour l'identification microbienne dépend du type et de la nature du micro-organisme. La ou les méthodes choisies doivent être bien décrites dans la littérature scientifique et conformes à celles qui sont actuellement utilisées dans le domaine de l'identification et de la classification taxonomique microbienne. Ces méthodes doivent aussi permettre l'identification des organismes aux niveaux du genre, des espèces et, si possible, de la souche(Site web 1)

polymorphisme de longueur des fragments amplifiés, ou AFLP.

électrophorèse sur gel en champ pulsé.

amplification aléatoire de l'ADN polymorphe.

réaction en chaîne de la polymérase (PCR) multiplex.

l'analyse séquentielle du gène d'ARNr 16s.

le typage génomique multi-locus ou MLST.

l'analyse génomique multi-locus ou MLSA.

désorption-ionisation par impact laser assistée par matrice spectrométrie à temps de vol (technologie MALDI-TOF-MS).

spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation (technologie ESI-MS).

désorption-ionisation laser assistée par surface (technologie SELDI).

spectrométrie de masse.

Pour cette étude ,on choisi SDS-Page (électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide)

Une cellule bactérienne contient une plus de 2000 protéines différentes. Cela constitue une source d'information importante. La méthode SDS-PAGE consiste en l'extraction des protéines cellulaires totales que l'ont fait ensuite migrer sur gel de

polyacrylamide en présence de SDS. on obtient ainsi des profils caractéristiques de chaque souche bactérienne.

Deux microorganismes très proches doivent avoir des profils électrophorétiques similaires ou identiques. Le profil électrophorétique d'une souche donnée est le reflet du bagage génétique du microorganisme, et sa comparaison avec les profils d'autres bactéries permet de mesurer le degré de parenté avec ces microorganismes. **(Robert et Col,1980)** ont étudié la diversité de BNL en utilisant cette technique et depuis, son application a été très importante dans la taxonomie des BNL. Cette technique produit une discrimination variable selon les groupes bactériens étudiés.

Aujourd'hui cette technique trouve sa limitation dans le fait qu'elle nécessite un degré de standardisation très poussé (méthodologie précise, qualité des produits constante) qui rend les bases de données peu exportables d'un laboratoire à l'autre, et pose parfois des problèmes de reproductibilité dans le temps. **(Saoudi,2008)**

7- Le genre *Astragalus*:

Parmi les 730 genres de la famille des Fabacées, on trouve en Algérie environ 53 genres et 337 espèces. De notre part, nous nous sommes intéressés dans ce travail au genre *Astragalus L.* qui est le plus grand genre à fleurs avec environ 3000 espèces dont 10 espèces sont endémiques au Maroc, Tunisie et 'Algérie. D'après la bibliographie, ce genre montre une richesse en saponines notamment de squelettes cycloartane et olénane, il est mentionné aussi les composés phénoliques et les polysaccharides **(Labad,2016)**

7-1-Description botanique:

Astragalus armatus est un petit buisson épineux. Les feuilles sont paripennées, terminées par un épine; le rachis persiste en devenant une longue épine. Les fleurs sont blanches et violettes, le calice devient renflé après la floraison. Cet Astragale se rencontre dans les régions prédésertiques du Sahara septentrional. *A. spinosus* est voisin, parfois considéré comme une sous espèce, et se rencontre de la Lybie au Moyen Orient. **(Site web 2)**



Figure 1: *Astragalus armatus*(Site web 2)

7-2-Répartition géographique

L'espèce *Astragalus armatus* grandissant en Afrique du Nord. C'est une espèce endémique, elle se trouve en Algérie, en Maroc et en Tunisie.

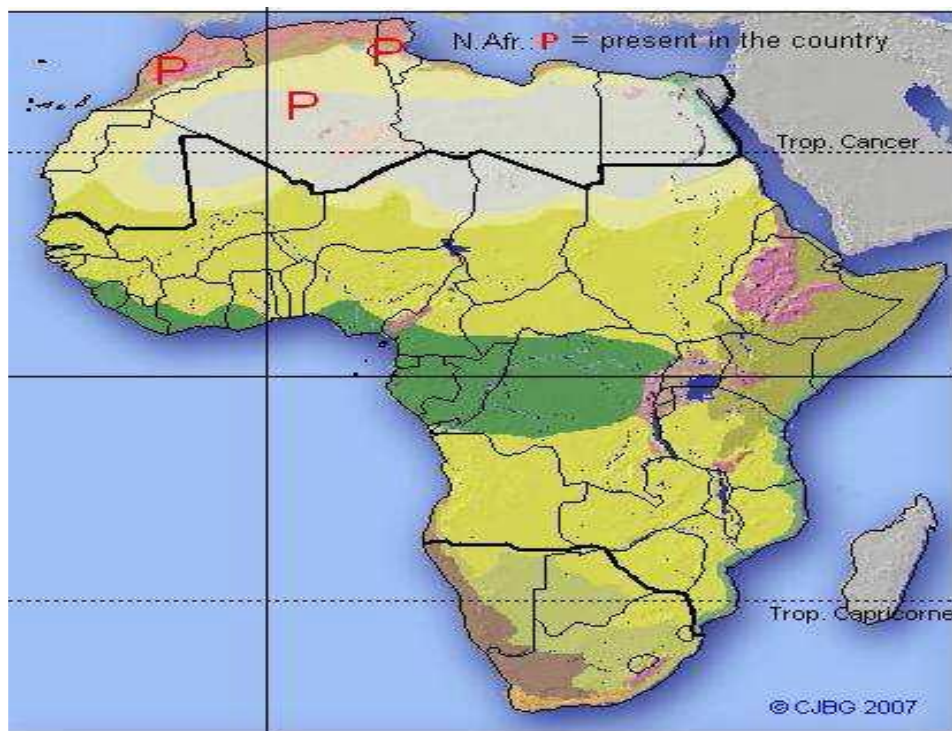


Figure2 : La répartition géographique de la plante *Astragalus armatus*(Labeled,2016)

7-3-Classification d'*Astragalus armatus*:

Règne :	Plante (plantae)
Classe :	Dicotylédones
Sous classe :	Dialypétales
Ordre :	Fabales
Famille :	Fabacées
Sous famille :	Papilionacées
Tribu :	Galegée
Genre :	<i>Astragalus</i>
Espèce :	<i>Armatus</i>
Sous espèce :	<i>Astragalus armatus ssp.numidicus</i> (Labeled ,2016)

7-4-Intéret médicinaal de la plante:

Les espèces du genre *Astragalus* sont appréciées dans la médecine populaire à travers le monde et utilisées comme herbes médicinales contre l'ulcère d'estomac, la toux, la bronchite chronique, l'hypertension, gynécologique troubles, diabète. Certaines plantes du même genre ont été rapportés comme ayant des activités immunostimulantes, cardiovasculaires et antivirales.(**Benchadi et al.,2013**)

A Ghardaïa, l'écorce et les graines d'*Astragalus armatus* sont fréquemment utilisés pour le traitement de différents types de blessures , la douleur la fièvre et la constipation. (**Labeled ,2016**)

Les parties aériennes fraîches broyées d'*Astragalusarmatus* sont utilisées pour traiter les morsures de serpents et de scorpions dans le sud du Maroc (application locale).(Labeled,2016)

Chapitre 2 :

Parties expérimentale

Chapitre 2 : Parties expérimentale

On a travaillé la partie pratique à partir d'une collection des isolats fait par les étudiants l'année passée.

1- Purification des isolats:

Les colonies bien isolées sont repiquées sur milieu YMA +RC et incubées à 28 ° C pendant 4 à 7 jours. cette opération renouvelées 2 fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure (**Bouchiba ,2018**)(**Nirmalakumari et al.,2017**)

Dans des conditions aseptiques les colonies à purifier sontensemencées dans 9ml du milieu YMB puis placée dans un bain-marie agitateur (Haier-water Bath Shaker-) à28 ° C pendant 24h (**Benhamed, 2010**)

2-Test de coloration de Gram

A partir des cultures sur YMB, des lames sont préparée pour la coloration de Gram. Sous la hotte à flux laminaire, la préparation est étalée en couche mince, séchée et fixée. Les lames sont déposées sur un support. Les étapes de la coloration :

- Recouvrir le violet de gentiane, laisser agir 1 minute.
- Verser sur la lame la solution iode et laisser agir 30 secondes
- Incliner la lame et laisser tomber goutte à goutte 'alcool-acétone.
- Rincer avec de l'eau distillée.
- Recolorer avec de la Fuschine, laisser agir 1 minute.
- Rincer avec de l'eau distillée et ensuite mises à sécher (**Ifriqya , 2010**)
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur la frottis et observer au microscope à un fort . (**Bouchiba ,2018**)

3- Conservation des souches

Deux méthodes sont utilisées pour la conservation des souches bactériennes :

La première méthode est la conservation sur YMA additionné de 1 à 3 g/l de CaCo₃ comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés (figure 3). Après des stries régulières sont effectuées sur la surface de la gélose (ensemencement) avec des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle (dans le milieu YMB), les souches sont incubées à 28°C pendant 7 jours puis transférer au réfrigérateur à 4°C. (VINCENT,1970).

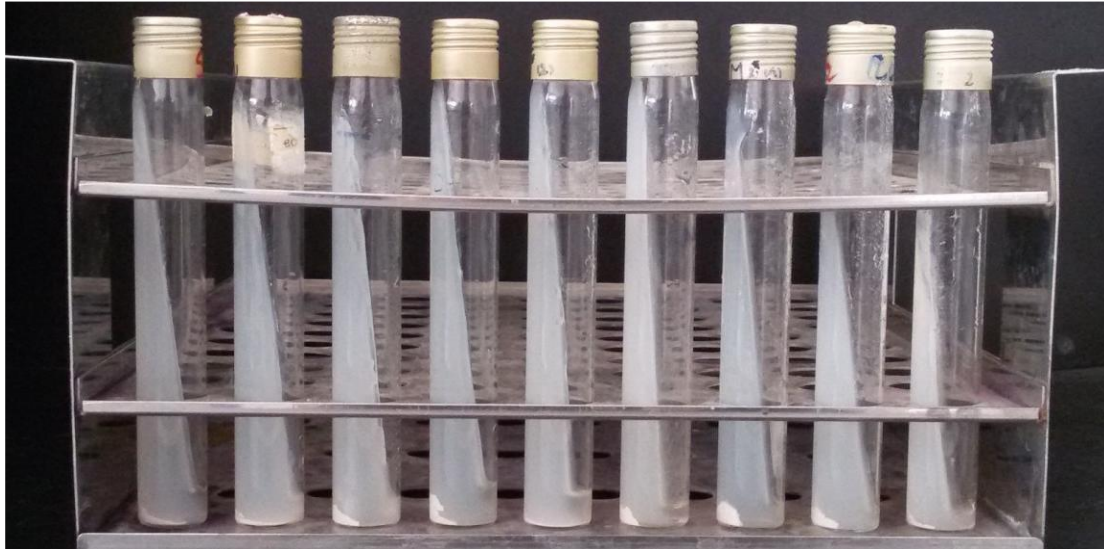


Figure 3:Conservation des isolats dans milieu YMA incliné

La deuxième méthode est la conservation de 1 ml des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle (dans le milieu YMB) dans des eppendorf contenant 1 ml de glycérol

4- Détermination du profil protéique par SDS-PAGE

4-1- Principe

L'électrophorèse est la migration de molécules chargées en solution en réponse à un champ électrique. Leur taux de migration dépend de la force du champ; sur la charge nette, la taille et la forme des molécules ainsi que sur la force ionique, la viscosité et la température du milieu dans lequel les molécules se déplacent. (Rybicki et purvus, 1996)

La méthode dénature dans un premier temps les protéines qui vont subir une électrophorèse.(Nowakowski et al.,2014) Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) est un détergent anionique qui dénature les protéines en enveloppant le squelette

polypeptidique .Le SDS se lie aux protéines et confère au polypeptide une charge négative proportionnelle à sa longueur .Lors de la dénaturation des séparations SDS-PAGE, la migration n'est pas déterminée par la charge électrique intrinsèque du polypeptide, mais par le poids moléculaire. **(Rybicki et purvus, 1996)**

Bien que les caractéristiques structurales covalentes des protéines résolues puissent être déterminées avec SDS-PAGE, les propriétés fonctionnelles sont détruites, y compris la présence d'ions métalliques liés de manière non covalente.**(Nowakowski et al.,2014)**

4-2- Protocole: par (Laemli,1970)

-Une aliquote de 200 µl de chaque culture bactérienne, en phase exponentielle de croissance, est centrifugée à 7000 tours/min pendant 15 min.

-La lyse des cellules s'effectue après traitement du culot bactérien obtenu par l'addition de 100 µl de tampon de lyse et agitation pendant 20mn, ensuite mis dans l'étuve à 60°C pendant 20 mn pour interrompre les ponts di-sulfures.

-Un dépôt de 35 µl de chaque échantillon est mis dans un puit.

-L'électrophorèse est réalisée sur un gel de polyacrylamide de 12 % .

-Après migration et démoulage, le gel est mis dans une solution de coloration contenant le bleu de Coomassie et l'acide trichloracétique (60%) pendant une nuit sous une faible agitation.

-Enfin le gel est décoloré dans l'eau distillée sous faible agitation jusqu'à l'apparition des bandes polypeptidiques. Le gel est photographié à l'aide d'un appareil photo numérique.

Préparation du tampon d'échantillon (tampon de lyse)

Tris	25mM
Glycérol	192 mM
SDS 2.5%	

_ -mercaptoéthanol 2.5% (v/v)

Bleu de Bromophénol 5mg

Eau distillée 200ml

Préparation des solutions stock

• **Solution d'acrylamide**

_ Acrylamide 30% 60g

_ Bis acrylamide 0.8% 1.6g

_ Eau distillée QSP 200ml

• **Tampon du gel de séparation (resolving gel buffer) : Tris-HCL 3M pH 8.8**

_ Tris 3M 72.7g

_ SDS 0.8% 1.6g

_ Mercaptoéthanol(MCE) 0.8ml

_ Eau distillée QSP 200ml

Ajuster à pH 8.8 avec HCL

• **Tampon du gel de concentration (stacking gel buffer) : Tris-HCL 0.5M
pH 6.8**

_ Tris 0.5M 12.1g

_ SDS 0.4% 0.8G

_ MCE 0.2% 300µl

_ Eau distillée QSP 200ml

Ajuster à pH 6.8 avec HCL

Préparation des gels

• **Préparation du gel de séparation à 12 %**

Solution d'acrylamide 10.4ml

Tampon de séparation 3.14ml

Temed 12.5 µl

Eau distillée QSP 25ml

• Préparation du gel de concentration à 7.5%

Solution d'acrylamide 5ml

Tampon de concentration 5ml

Temed 20µl

Eau distillée QSP 20ml

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

Préparer 0.15 g de persulfate dans 1 ml d'eau distillée et ajouter au

Gel de séparation 140 µl

Gel de concentration 200 µl

• Préparation du tampon de migration (running buffer)

_ Tris 0.025M 1.06g

_ Glycine 0.192 M 5.04g

_ SDS 0.1% 0.35g

_ MCE 0.05% 175µl

_ Eau distillée QSP 350ml

• Préparation des plaques de gel

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

• Migration électrophorétique

Remplir les puits par la solution du tampon de migration. Un volume de 35 μ l de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque puit. Après le dépôt, la migration des polypeptides a été assurée par une différence de potentiel de départ de 127V (80mA), jusqu'à ce que le voltage arrive à 287V. L'électrophorèse est conduite jusqu'à ce que le bleu de bromophenol arrive à 3-4 mm de l'extrémité anodique du gel

• Révélation des bandes protéiques

_ La solution de la coloration :

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

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

QSP 400ml

Agiter la solution.

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

Chapitre 3 :

Resultant et Discussion

Chapitre 3 : Résultat et Discussion

1- Caractères macroscopiques: (Aspect des colonies)

Les souches isolées à partir des nodules d'*Astragalus armatus* ont une croissance rapide, avec premières colonies apparaissant après 24 h – 48 h sur levure-mannitol gélose. (Salif et al., 2002) (Vincent ,1970) Les colonies ont une forme circulaires légèrement élevées lisses, opaques, avec une texture translucide blanchâtres mais les isolats apparaissent avec une couleur rosâtre, et généralement absorbent très peu le rouge Congo sur milieu YMA (figure 4)(Vincent ,1970)



Figure 4: Aspect des colonies sur milieu YMA+RC

2- Caractères microscopiques : Coloration de Gram

L'examen microscopique des cellules bactériennes révèle des bâtonnets courts à Gram négative.(figure 5)

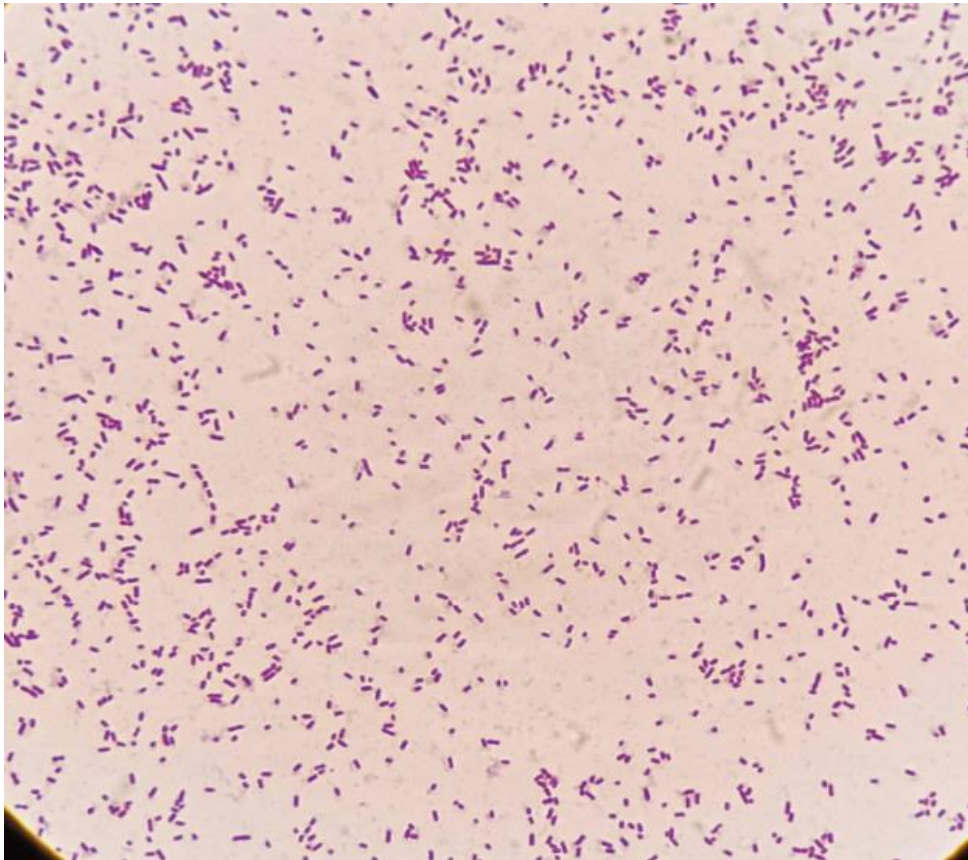


Figure 5 : Coloration de Gram (grossissement x 100)

3-Analyse des profils protéiques par SDS page de différents articles

3-1-Analyse des profils protéiques par SDS page:

Comme le montre la figure6, l'analyse des protéines a montré qu'à 45,61% de similitude, les isolats formés trois classes distinctes avec des souches de référence. Le groupe I a regroupé un isolat (B3) d' *A. uniflorum* (Bir El-Ater) et deux souches de référence (*Pseudomonas sp. KD* et *Pantoea agglomérants*). Les deux isolats (K et AN11 ») de *G. microcephala* et *A. uniflorum* étaient groupé avec *Pseudomonas sp. NZ096* et *Rhizobiumsullae* à 62,61% et 64,35% similitude, respectivement (Groupe II). Le groupe III a classé l'isolat (AB2 ') d'*A. Uniflorum*(Bir El-Ater) et *Enterobacter kobei* à 62,61%. La comparaison des profils protéiques totaux obtenu par électrophorèse en présence de SDS peut être hautement standardisé pour regrouper un nombre de souches et les souches avec des électrophérogrammes sur gel

de protéines identiques peuvent constituer un cluster très homogène avec des homologies moléculaires internes très probablement élevées. De plus, plusieurs études ont révélé une grande similitude entre la teneur en protéines et Hybridation ADN / ADN . Cependant, l'utilisation limitée de SDS-PAGE pour l'identification des rhizobies au niveau de l'espèce. (Dekak et al.,2018)

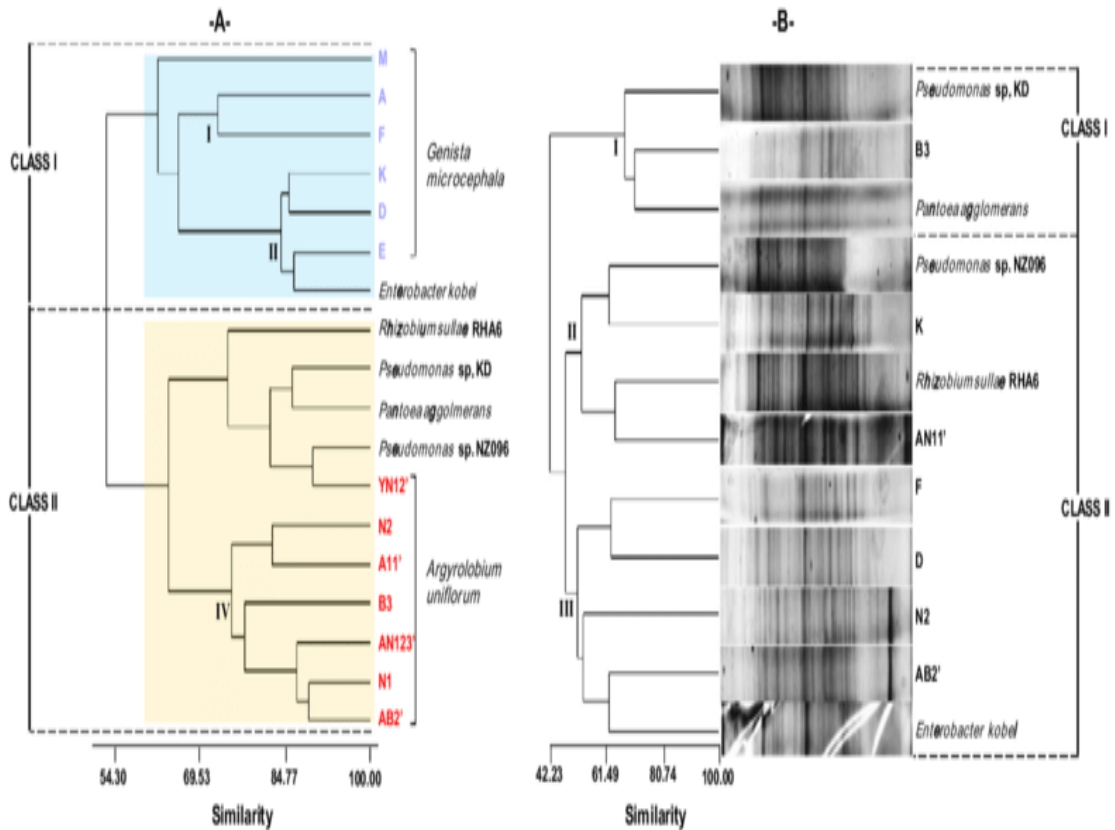


Figure 6 : Dendrogramme montrant les relations montrant les relations phénotypiques (A) et les schémas d'électrophorèse normalisés sur gel de dodécyl sulfate de sodium et de polyacrylamide des souches de rhizobia nodulant *Genista microcephala* et *Argyrolobium uniflorum* (B) (Dekak et al.,2018)

3-2-Analyse des profils protéiques par SDS page: (Salif et al.,2002)

Les isolats d'*Acacia tortilis* sont taxonomiquement diversifiés tel qu'évalué par SDS-PAGE, Les schémas de protéines de cellules entières SDS-PAGE du 59 des isolats rhizobiens d'*A. tortilis* ont été scannés et analysés numériquement avec celles de 54 souches de référence disponibles dans notre base de données, qui représentaient le différents *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Groupes Allorhizobium*, *Azorhizobium* et *Agrobacterium*. Les résultats sont présentés sous forme de dendrogramme de similitude dans Figure 7.

À un coefficient de corrélation moyen (valeur r) de 87,5% valeur à laquelle les différentes espèces de *rhizobium* constituent des grappes séparées

les isolats d'*A. tortilis* étaient trouvés se diviser en 8 groupes. Douze souches avaient des postes, à savoir ORS40, ORS49, ORS1042, ORS1085, ORS1086, ORS1087, ORS1233, ORS1243, ORS1263, ORS1267, ORS1310, ORS1316.

Les groupes 4 et 5, contenaient souches de référence appartenant à *M. plurifarium* et *S. terangae*, respectivement. Il est à noter que la souche de type *M. huakuii* regroupée ici avec *M. plurifarium*.

Aucune corrélation n'a pu être observée entre l'origine, les conditions édaphiques ou la profondeur d'isolement.

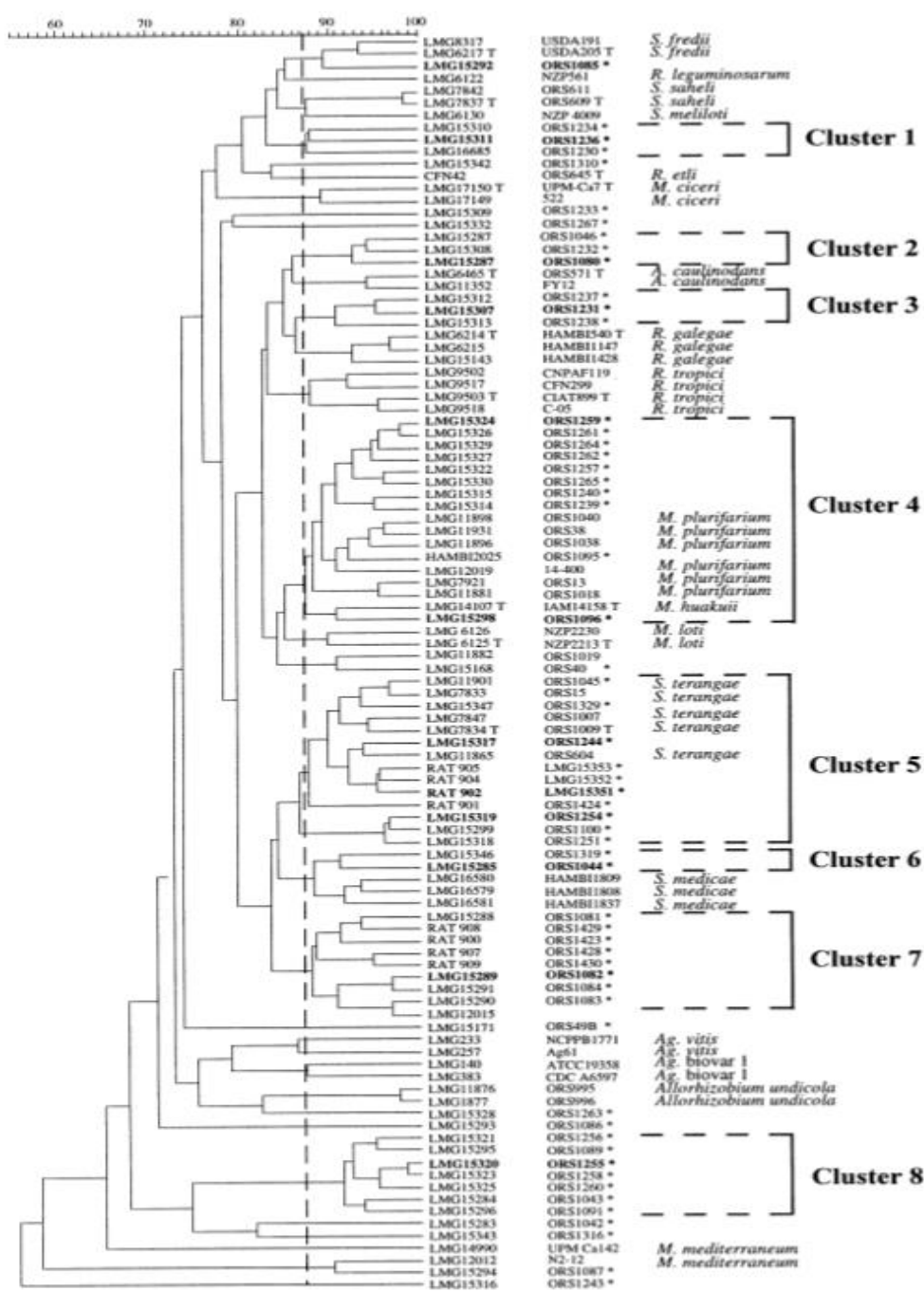


Figure 7 : Dendrogramme montrant les relation entre les profils protéiques électrophorétiques des isolats de nodules d'*Acaciatortilis* subsp. *raddiana* (*) et les souches de référence de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Agrobacterium*. La ligne verticale en pointillés indique le niveau de similitude à quels groupes ont été délimités. L'échelle représente la valeur r convertie en pourcentages. (Salif et al.,2002)

3-3-Détermination protéique (SDS-PAGE): (Saoudi ,2008)

Le profil obtenu (figure 8) montre un polymorphisme entre les isolats (Ast.). Ce gel montre trois clusters (groupe des souches Ast.1,2,3; Ast.4,5,6 et 7; et le groupe Ast.8,9,10,11). On note, en outre, que les profils des isolats Ast7, 8, 9 et Ast 12, 13 sont pratiquement identiques avec celui de *R. ciceri*.

Enfin les bactéries isolées à partir des nodules de *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 *Mezorhizobium huakuii*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
13 14 15

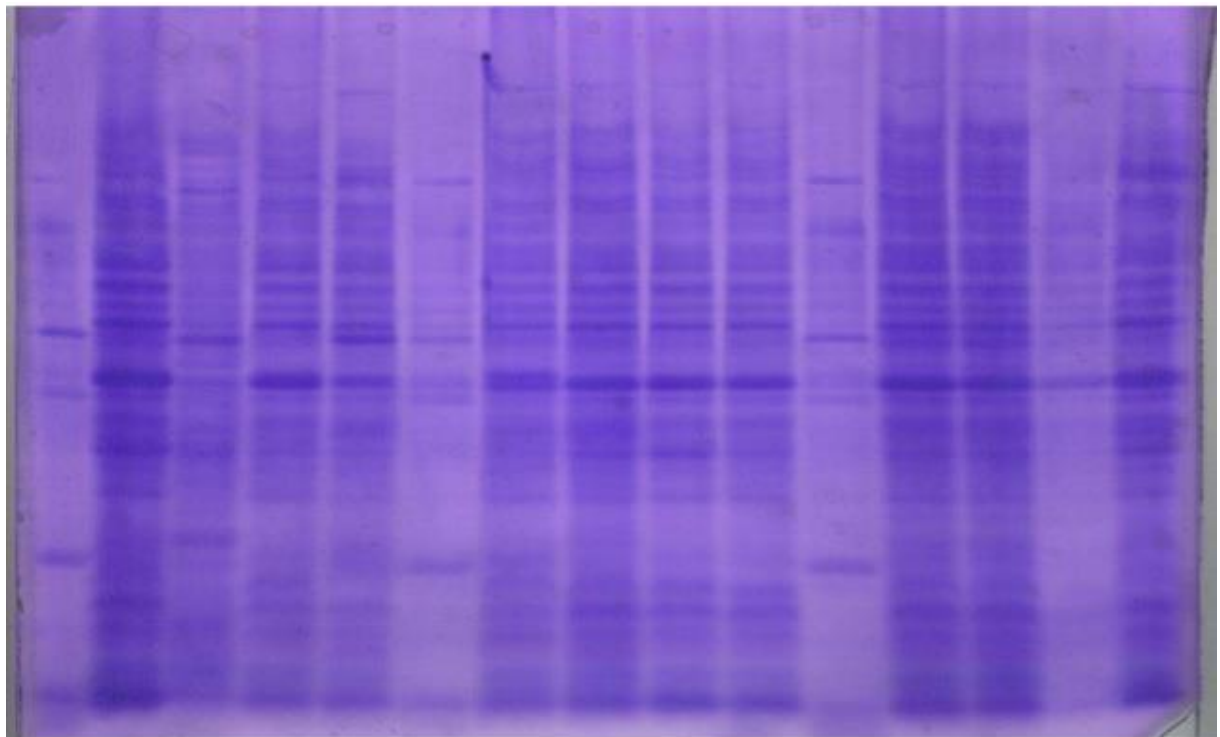


Figure 8 : Profils SDS-PAGE des protéines totales 1 : *R.l.bv.t* ; 2 : Ast 1 ; 3:Ast 3; 4:Ast 4; 5:*R.l.bv.v* ; 6:Ast 5 ; 7:Ast 6 ; 8:Ast 7; 9:Ast 8; 10:*M. ciceri* ;11:Ast 9 ;12:Ast 10 ; 13:Ast 11 ;14:Ast 12;15:*R.sullae*. (Saoudi ,2008)

3-4-Détermination du profil protéique par SDS page: (Benahmed ,2010)

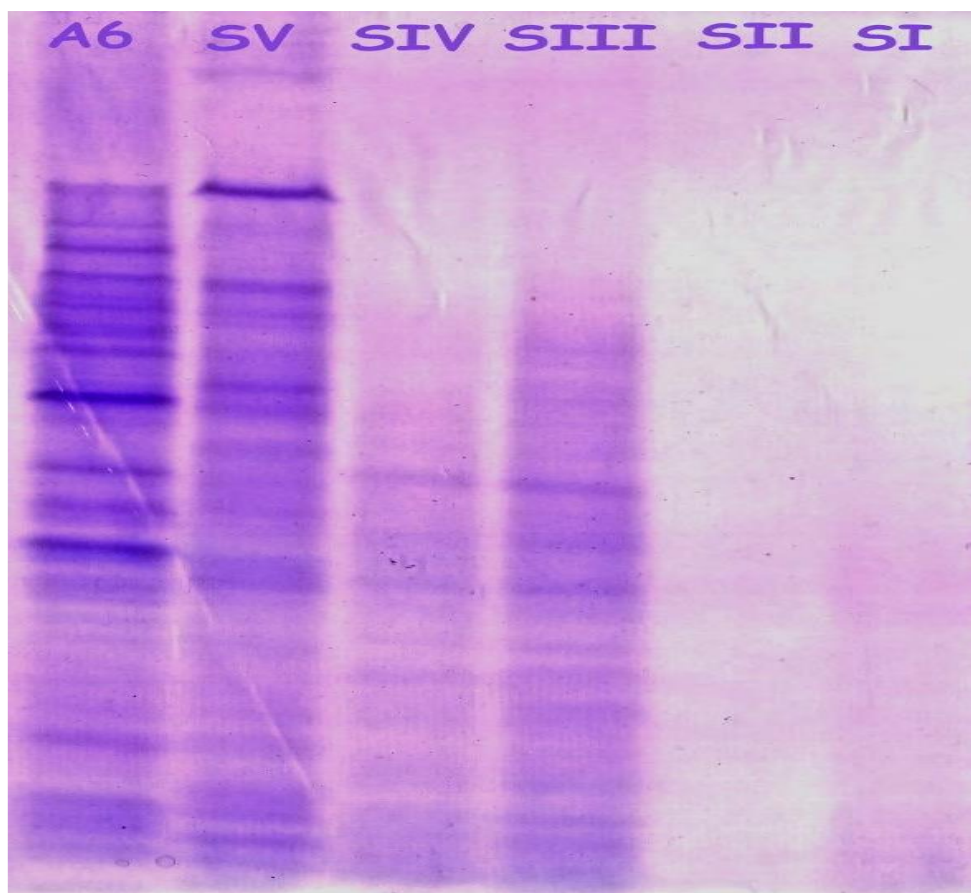


Figure 9 : Profils protéique des différentes souches SI, SII, SIII, SIV, SV Souches de references: A6. (Benahmed ,2010)

L'analyse numérique des profils électrophorétiques obtenus pour chaque souche, consiste à calculer le rapport frontal Rf de chaque bande polypeptidique selon la formule suivante :

$Rf = \text{distance parcourue par la bande polypeptidique} / \text{la distance parcourue par le marqueur.}$

Après avoir dénombré les différentes bandes de chaque profil et calculé les rapports frontaux correspondants, on a pu établir le diagramme type suivant :

Tableau 1 :diagramme type des bandes polypeptidiques

Bande	Rf	S1	S2	S3	S4	S5	A6
-------	----	----	----	----	----	----	----

Résultat et Discussion

1	0,045	0	0	0	0	1	0
2	0,08	0	0	1	0	1	0
3	0,12	0	0	0	0	1	0
4	0,2114	0	0	1	0	1	1
5	0,2171	0	0	0	0	0	1
6	0,2571	0	0	0	0	1	1
7	0,2685	0	0	0	0	0	1
8	0,28	0	0	0	0	1	1
9	0,3142	0	0	1	0	1	1
10	0,3257	0	0	0	0	0	1
11	0,3485	0	0	0	0	1	1
12	0,3657	0	0	0	0	1	1
13	0,3771	0	0	1	0	0	1
14	0,3942	0	0	1	0	1	1
15	0,4171	0	0	1	0	0	0
16	0,4342	0	0	1	1	1	1
17	0,4457	0	0	0	0	0	1
18	0,4687	0	0	1	1	1	0
19	0,4742	0	0	0	0	0	1
20	0,5085	0	0	1	1	1	0
21	0,5371	0	0	1	1	1	1
22	0,5714	0	0	0	0	1	1
23	0,5828	0	0	0	0	0	1
24	0,6000	0	0	1	1	1	0
25	0,6171	0	0	1	1	0	1
26	0,6285	0	0	0	0	1	1
27	0,6628	0	0	1	1	1	1
28	0,6800	0	0	0	0	0	1
29	0,7028	0	0	1	1	0	1
30	0,7200	0	0	0	0	1	1
31	0,7371	0	0	1	1	0	0
32	0,7485	0	0	0	0	0	1

33	0.7657	0	0	1	1	0	1
34	0.7771	0	0	0	0	1	0
35	0.7942	1	0	1	1	0	0
36	0.8000	0	0	0	0	1	1
37	0.8228	0	0	1	1	0	0
38	0.8342	1	0	0	0	1	1
39	0.8742	0	0	0	0	0	1
40	0.8857	0	0	1	1	1	0
41	0.9028	0	0	0	0	1	1
42	0.9257	0	0	1	1	1	1
43	0.9428	0	0	1	1	1	1
44	0.9714	0	0	0	0	1	1

0 : absence de bande ; **1** : présence de bande

Afin de déterminer le degré de ressemblance entre les différentes souches testées, on a calculé le coefficient de similitude selon la méthode de Jana et coll., (1992). Formule du coefficient de similitude :

Coefficient de similitude = (nombre de bandes communes entre les 2 souches /nombre total de bande) ×100

Tableau 2 : Coefficient de similitude entre les différentes souches testées

Souches Testées	S1	S2	S3	S4	S5	A6
S1	 					
S2	95.45%	 				
S3	47.72%	52.27%	 			
S4	61.36%	65.90%	86.38%	 		
S5	40.90%	38.63%	50%	45.45%	 	
A6	31.81%	27.27%	34.09%	27.27%	52.27%	

Les résultats obtenus montrent que les isolats présentent un degré de similitude faible avec la souche de référence A6.

Les profils protéiques révèlent une différence importante entre la majorité des isolats sauf entre la souche S1 et S2 où le coefficient de similitude atteint les **95.45%**.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluants et qui permettent de réduire l'usage d'engrais notamment riches en azote a permis de concentrer l'attention sur le rôle potentiel de la fixation biologique de l'azote. En effet, la reconnaissance de l'importance de la symbiose *Rhizobia* – légumineuse a joué un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris.

Dans cette étude nous avons essayé de caractériser et d'identifier des souches bactériennes isolées à partir des nodules conservés présents au niveau des racines de la plante légumineuse d'une espèce de genre *Astragalus L.*

L'étude du partenaire bactérien est commencée par une morphologique en utilisant des milieux de culture spécifique et un examen microscopique par coloration de Gram. Ainsi qu'une caractérisation phénotypique par l'utilisation de la technique d'électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE)

L'aspect morphologique des isolats sur milieu YMA- rouge Congo est des colonies circulaires de 1 à 3 mm de diamètre d'un aspect gommeux translucide ou crémeux, avec une croissance rapide, cette rapidité en croissance a des bénéfices via le domaine pratique surtout dans la production d'inoculum. La croissance sur le milieu YMA-RC montre que les souches absorbent peu ou pas du rouge Congo.

L'examen microscopique par la coloration de Gram révèle des bactéries Gram négatif de forme bâtonnet courts .

La SDS-PAGE est une méthode utilisée depuis plusieurs années dans la taxonomie des rhizobiums, est très sensible et donne surtout des informations sur l'analogie des

Conclusion générale

souches qui se trouvent dans les mêmes genres, espèces ou sous espèces. L'utilisation de la technique d'électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence d'un détergent (SDS-PAGE) a permis de déterminer les profils des protéines totales des souches. Les coefficients de similitude des bandes polypeptidiques obtenus et le dendrogramme montrent d'une part une grande similitude entre un isolat et la souche de référence et donnent une idée sur la position taxonomique des isolats.

Il est préférable d'améliorer ce travail par : es tests nutritionnels des tests biochimiques , effets des facteurs abiotique , la détermination de la résistance et la sensibilité aux antibiotiques, l'étude de la résistance des isolats aux métaux lourds ainsi leur sensibilité aux phages et l'étude génétique par l'utilisation des techniques moléculaires tels que REP / PCR-RFLP, séquençage des gènes ARNr 16S et hybridation ADN / ADN.

Bibliographies

Bibliographies

Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 705.

Benselama,A.(2015). Réhabilitation du la culture du *Lablab purpureus* L.ex Sweet et études de Son partenaire Symbiotique .Thèse de Doctorat ,Université Ahmed Ben Bella,Oran.

Benahmed ,A., (2010). Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la Nodulation de la légumineuse *Hedysarumcoronarium*. Mémoire de Magister.Université Mentouri. Constantine.Algérie. 128p.

Bouchiba, Z.(2018). Diversité des rhizobia associés à *Scorpiurus muricatus ssp.sulcatus* et leur utilisation pour la réhabilitation des zones dégradées.Thèse de Doctorat, Université Ahmed Ben Bella,Oran.

Benchadi ,W., Haba, H., Lavaud ,C., Harakat ,D.,& Benkhaled ,M.(2013). Secondary Metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. and Their Chemotaxonomic Significance.*Rec. Nat. Prod.* 7:2 (2013) 105-113.

Dekak, A.,& Benhizia, Y.(2018) .Caractérisation des isolats bactériens par des techniques phénotyques et électrophorétiques isolés à partir des nodules de quelques espèces de légumineuses spontanées de la tribu des *Ginesteae* (Fabaceae).

Giraud, E.(2007). Symbiose *Rhizobium/* légumineuse : un nouveau sesame. *MEDECINE/SCIENCES* 23 : 663-4,p 663

Hoffman, B. M., Dean, D. R.,& Seefeldt, L. C. (2009).Climbing Nitrogenase: Toward a Mechanism of Enzymatic Nitrogen Fixation.

Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Dean, D. R.,& Seefeldt, L. C. (2014).Nitrogenase: A Draft Mechanism.*Acc. Chem. Res*, 46, 2, 587–595

Kulkarni, G., Buset, N., Molinaro, A., Gargani, D., Chaintreuil, C., Silipo, A.,

Kessel Ch. V. & Hartley Ch.(2000).Agriculturalmanagement of grain legumes:

Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C., & Maier, U. G. (2007). Nitrogen fixation in

Giraud, E., & Newman, D. K. (2015). Specific hopanoid classes differentially affect free-living and symbiotic states of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *mBio*, 6(5), e01251-15.

Labeled, A.(2016). Investigation phytochimique et biologique de l'espèce *Astragalus armatus* ssp. *Numidicus* (Coss. et Dur.) Maire. et Synthèse catalytique de nouveaux dérivés julolidines Thèse de doctorat.Université Mentouri de Constantine .

Bibliographies

Ifriqya ,M.(2010). Contribution à la caractérisation des souches bactériennes isolées à partir des nodules de la plante légumineuse du genre *Lupinus*. Mémoire de Magistère, Université de Tebessa.

Mania, D.,Woliy, K.,Degefu, T.,& Ftostegard, A.(2019). A common mechanism for efficient N₂O reduction in diverse isolates of nodule-forming *Bradyrhizobium*. *Environmental microbiology*.Volume 22,pages 17-31

Nowakowski ,A. B, Wobig , W. J., &Petering , D.H. (2014).Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions.*Metalomics* , 2014,**6**, 1068-1078

Nirmalakumari ,N.B., Nagaraju ,B. &Mallikarjuna ,K.(2017).Biochemical characterization and protein profile by SDS-PAGE of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) associated rhizobia.*InnovatInternational Journal Of Medical & Pharmaceutical Sciences*, 2(2)

Prin ,Y.,Galiana ,A., Ducouso ,M., Dupuy ,B., dr Lajudie ,P.& Neyra,M. (1993). Les rhizobiums d'acaia biodiversité et taxonomie. *Bois et Forêts des Tropiques*, 1' 238, 4^e trimestre

Püschel, D., Janoušková, M., Voříšková, A., Gryndlerová, H., Vosátka, M., & Jansa, J. (2017).Arbuscular Mycorrhiza Stimulates Biological Nitrogen Fixation in Two *Medicago* spp. through Improved Phosphorus Acquisition. *Frontiers in plant science*, 8, 390.

Rybicki , Ed.C .,& Purves , M.(1996).Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.*Molecular Biology Techniques*

Roger, P. , Dommergues,Y., Balandreau,J., Dreyfus ,B.&Sougoufara,B.(1996). Lafixation biologique de l'azote : quelles potentialites pour le devel oppement ?. *Conference–debat de l'orstom*, 209-213

Sugiyama, A., Ueda, Y., Takase, H., & Yazaki, K. (2015). Do soybeans select

Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M., & Dean, D. R. (2009). Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual review of biochemistry*, 78, 701–722.

eukaryotes--new models for symbiosis. *BMC evolutionary biology*, 7, 55.

Bibliographies

- has it led to an increase in nitrogen fixation?. *Field Crops Research*. Pages 165-181
- Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology* 63 (4) : 968-989
- specific species of *Bradyrhizobium* during growth?. *Communicative & integrative biology*, 8(1), e992734.
- Saoudi, M.(2008)**.Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.LP) :caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalus armatus*. Mémoire de Magister. Université Mentouri de Constantine .
- Somasegaran , P. , & Hoben , H. J. (1994)**. Handbook for Rhizobia: Methods in legume-rhizobia technology. In Springer-Verlag. New York.
- 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*. *Microbiol* 84 : 81-89.
- Salif ,B., Willems ,A., de Lajudie ,P., Roche ,P., Jeder ,H., Quatrini ,P., Neyra,M., Ferro ,M., Promé ,J.C., Gillis ,M., Boibin-Masson ,C.& Lorquin ,J.(2002)**. Symbiotic and Taxonomic Diversity of Rhizobia Isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa . *System. Appl. Microbiol.* 25, 130–145
- Torche ,A., Benhizia ,Y., Benguedouari , 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. *Technologie C* (32) : 43-50.
- légumineuses (BNL). *Canadian Journal of Microbiology*, 52 (3), 169-181. ISSN 0008-4166 .
- Vincent , J. M. (1970)**.A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford, United Kingdom.
- Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., & de Lajudie, P. (2004)**-Characterisation of wild legume nodulating bacteria (BNL) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(3) :380-395.
- Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., et de Lajudie, P. (2004)**-Characterisation of wild legume nodulating bacteria (BNL) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(3) :380-395.

Bibliographies

Zakhia , F.& De Lajudie, P.(2006). La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques - application à la caractérisation des bactéries nodulant les

ZAHRAN H. H. 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under
Tak A., Gehlot P., Pathak R., Singh S.K. (2017) . Species Diversity of Rhizobia.
Rhizobium Biology and Biotechnology, pp 215-245

Les sites web:

1-<https://www.inspection.gc.ca/protection-des-vegetaux/engrais/circulaires-a-la-profession/t-4-126/fra/1346524491267/1346527009874>. Consulter le. 15/09/2020

2-

http://www.planetefleurs.fr/Systematique/Fabaceae/Astragalus_armatus.html Consulter le 25/09/2020

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture

Composition de milieu YMB (Yest Mannitol Broth) : Ph= 6.8

Mannitol	10.00 g
K ₂ HPO ₄	0.050 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20 g
NaCl	0.10 g
Extrait de levure	0.50g
Eau distillée	1000 ml

Composition de milieu YMA (Yest Mannitol Agar) : Ph= 6.8

YMB	1000 ml
Agar	15g

Composition de milieu RC (Solution stock de rouge Congo)

Rouge Congo	0.25 g
Eau distillée	100 ml

Préparation de milieu YMA-RC:

YMA	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10 ml (après ajustement de pH 6.8)

La stérilisation est réalisé à 120°C pendant 20 minutes.

ملخص

في النظم الزراعية. على الرغم من انخفاض N₂ يمثل تعايش البقوليات مع الجذور معظم التثبيت البيولوجي ل الحاجة إلى الأسمدة النيتروجينية الاصطناعية ، فإن حقول البقول مسؤولة عن انبعاثات كبيرة من أكسيد النيتروز. من خلال التعايش مع البكتيريا التي تنتمي إلى جنس N₂ تقوم العديد من البقوليات المهمة اقتصاديًا بإصلاح الريزوبيوم. درسنا في هذه الدراسة تم اختيار البقوليات العقدية للبكتيريا من العقيدات الجذرية لنبات *Astragalus armatus*. إن إنتاج SDS-PAGE تتميز السلالات ظاهريًا بتحليل ملف البروتين الكلي على *Astragalus armatus*. للسلالات يجعل من (SDS-PAGE) أشكال البروتين على هلام بولي أكريلاميد تحت ظروف تغيير طبيعة الممكن تحديد التشابه بين العزلات والسلالات المرجعية والحصول على فكرة عن موقعها التصنيفي.

Résumé

La symbiose légumineuse-rhizobium représente la majeure partie de la fixation biologique du N₂ dans les systèmes agricoles. Malgré leur besoin moindre d'engrais azotés synthétiques, les champs de légumineuses sont responsables d'émissions substantielles de N₂O. Plusieurs légumineuses économiquement importantes fixent le N₂ par symbiose avec des bactéries appartenant au genre rhizobium. Dans cette étude nous avons étudiée des bactéries nodulant les légumineuses ont été sélectionnés à partir des nodules racinaires d'*Astragalus armatus* . Les souches sont caractérisées phénotypiquement par un analyse d'un profil de protéines totales sur SDS-PAGE. La réalisation des profils protéiques sur gel polyacrilamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des souches permettent de déterminer la similitude entre les isolats et les souches de références et avoir une idée sur leur position taxonomique .

Abstract

The legume-rhizobium symbiosis accounts for most of the biological fixation of N₂ in agricultural systems. Despite their lower need for synthetic nitrogen fertilizers, legume fields are responsible for substantial N₂O emissions. Several economically important legumes fix N₂ by symbiosis with bacteria belonging to the genus rhizobium. In this study we studied bacteria nodulating legumes were selected from root nodules of *Astragalus armatus*. The strains are phenotypically characterized by analysis of a total protein profile on SDS-PAGE. The production of protein profiles on polyacrilamide gel under denaturing conditions (SDS-PAGE) of the strains makes it possible to determine the similarity between the isolates and the reference strains and to have an idea of their taxonomic position.