

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement et de la Recherche Scientifique
Université 08 mai 1945 de Guelma
Faculté des sciences et de l'ingénierie
Département de Biologie



Mémoire de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire
Option : Biologie Moléculaire des Procaryotes

THEME

Détermination des profils protéiques d'une bactérie isolée à partir des nodules d'une plante légumineuse du genre Hedysarum.

Présenté par : ABDA KAMILA.

GHADDAB SABRINA.

ROUACHDIA WASSILA.

Membres de jury :

Président : Mr Ben ouareth Djamel Eddine, professeur Université de Guelma.

Examinatrice : Melle Beddioui Soraya, maître assistant A Université de Guelma.

Promoteur : Mme Torch Asma, maître assistant A Université de Guelma.

Juin 2010

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire fut une occasion merveilleuse de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes.

Avant tous nous remercions dieu, le clément, le miséricordieux qui nous a donné la patience et l'énergie pour la réalisation de cet humble travail.

Nous tenons remercier par le biais de ce mémoire les membres de jury :

Le président Mr Benouareth Djamel Eddine, professeur Université de Guelma, qui nous aide à réaliser une grande partie de ce travail et a sacrifié son temps pour évaluer ce travail, et l'examinatrice : Melle Beddioui Soraya, maître assistant A Université de Guelma, qui nous a fait l'honneur de sa présence pour juger ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre encadreur ; Mme Torche Asma, maître assistant A Université de Guelma, qui nous aide à planifier le mémoire et nous pourvoit de conseils et de matériels.

Nous tenons également à remercier Mr Kachi, le chef de département de Biologie, ainsi qu'à tous nos enseignants de la promotion de Biologie moléculaire des procaryotes qui ont allumé notre chemin de savoir.

A toute personne qui a contribué à réaliser ce modeste travail surtout Samiha et Hanène.

Produced with Scantopdf

Dédicace

Je dédis ce modeste travail, les acquis de 5 ans de formation à toute ma petite famille.

A mes chers parents, ils sont mon point de départ dans toutes les occasions, ils m'ont poursuivi pendant toute ma vie avec beaucoup de patience et courage, ils allument mon chemin avec leurs conseils et consignes sans jamais chichi ou ronchonnement.

A mes sœurs Lilia et son mari Mohamed et le petit Rayane, Meryem et Chahra Zed, malgré la distance qui nous séparent, et malgré que nous ne rencontrerons que rarement, nous sommes comme des jumelles, nous sommes soudées quelques soit les circonstances la joie comme la tristesse.

A mon seul cher frère Moncef, notre choucou, malgré son sérieux, et qu'il tait ses sentiments vers nous, il est très gentille, et nous aide sereinement.

A tous ceux et celle qui me sont chers, qui m'ont entouré d'amour et d'affection.

Kenneth

Dédicace

Je dédis ce modeste travail à toute ma famille, tout d'abord et bien sûr à mes très chers parents, mon soutient moral et matériel ; ils m'ont inculqué les valeurs de vie, le respect de soi et d'autrui, ils m'ont élevé avec amour et discipline.

À mes sœurs Karima, Naima et Moryem, nous avons des caractères différents mais nous avons su les mélanger ce qui fait que nous sommes unis comme les doigts de la main, les trois sont ma comble de joie et de patience.

À mes deux chers frères Malek et Rafik, comme tous les hommes ils ne montrent pas leurs sentiments, mais par des gestes de gentillesse ou regard de tendresse, ils se jetteraient au feu pour nous.

Chaleureusement et spécialement, je dédis mes acquis de 5 années de formation à mon mari, mon pôle d'attraction, mon commanditaire et ma source d'effort et de volonté, j'ai lui trouvé toujours plus proche de moi avec sa longue patience et son courage, il n'a jamais ronchonné, vraiment il me pourvoit de force et plus de capacité, j'espère que le dieu me permet de lui rendre un peu de ses plaisirs.

À tous ceux et celle qui me sont chers, qui m'ont entouré d'amour et d'affection.

Scantopdf

Dédicace

Je dédis ce modeste travail à mes chers parents qui m'ont offert la vie, m'ont poussé avec courage, patience, discipline et tendresse : mon soutien moral et matériel tout au long de ma carrière.

A mes sœurs Nadia et Soussen, soit dans la joie ou dans la tristesse nous sommes unis en une seule personne.

A mes frères A. Elkarim et Ramzi, nos chouchous, qui m'aident avec plaisir et sans compter.

Je tiens à remercier mon époux, mon pôle de volonté et de patience, il me pousse avec tout efforts, me donne le courage et la force pour poursuivre mes études à proximité de mon travail.

A toute ma grande famille, surtout ma tante Messaouda ses filles Fatma, Faddu, Liji et Zouzou, et son garçon Nabif, ma tante Rahima, Mabreka et ses enfants

A mes amies collègues Kamila et Sabrina qui me complètent, m'aident et me remplacent pendant mon absence

A tous ceux et celles qui me sont chers, qui m'ont entouré

M. A. S.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

Chapitre I : Etude bibliographique

Partie I : La fixation symbiotique de l'azote : légumineuses- bactéries

I - L'azote.....	3
I - 1 - Généralités.....	3
I - 2 - Le cycle d'azote.....	5
I - 3 - Fixation biologique de l'azote.....	9
I - 3 - 1 - Les fixateurs libres.....	10
I - 3 - 2 - Les fixateurs symbiotiques.....	10
II - La symbiose légumineuses- bactéries.....	11
II - 1 - Les légumineuses.....	11
II - 1 - 1 - Caractères généraux.....	12
II - 1 - 2 - Classification.....	13
II - 1 - 2 - 1 - Tribu des <i>Hedysarées</i>	14
II - 1 - 2 - 2 - Les principaux attributs de <i>Sulla</i>	17
II - 2 - Les rhizobia.....	20
II - 2 - 1 - Généralités.....	20
II - 2 - 2 - les caractères morphologiques.....	21
II - 2 - 3 - Les caractères culturaux et biochimiques.....	22

II - 2 - 4 - Les caractères symbiotiques.....	23
II - 2 - 5 - Taxonomie.....	25
II - 3 - Relation symbiotique.....	28
II - 3 - 1 - Les nodules.....	28
II - 3 - 1 - 1 - Les étapes du développement.....	31
II - 3 - 2 - Fonctionnement des nodules.....	34
II - 3 - 3 - Les conséquences de l'infection.....	35
II - 3 - 4 - Les gènes nod.....	36
II - 3 - 5 - Inoculation.....	38
Partie II : L'électrophorèse	
I - L'électrophorèse.....	39
Chapitre II : Partie pratique	
I - Isolement des <i>Rhizobia</i> à partir des nodules.....	45
I - 1 - Collecte des nodules.....	45
I - 2 - Conservation des nodules.....	46
I - 3 - Isolement des bactéries.....	47
I - 3 - 1 - Stérilisation des nodules.....	47
I - 3 - 2 - Isolement selon la méthode des nodules écrasés.....	47
I - 3 - 3 - Culture : milieu solide \longleftrightarrow liquide.....	48
II - La coloration de Gram.....	49

III - L'électrophorèse SDS - PAGE.....	49
III - 1 - Préparation des extraits protéiques.....	50
III - 2 - Préparation des solutions stocks (solution mères).....	50
III - 3 - Préparation des gels.....	51
III - 4 - Préparation du tampon de migration pH 8,3.....	52
III - 5 - Préparation des plaques de gel.....	52
III - 6 - Dépôts des échantillons et migration électrophorétique.....	52
III - 7 - Révélation des bandes protéiques.....	53
Résultats et discussion.....	54
I - Les caractères cultureux.....	54
II - Les caractères microscopiques et morphologiques.....	55
III - La révélation électrophorétique.....	56
Conclusion.....	60
Les annexes	
Références bibliographiques	
Les sites Web	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1 : caractère des trois groupes de <i>Rhizobia</i> éssymbiotiques.....	24
Tableau 2 : classification de trois principaux genres des bactéries de la famille <i>Rhizobiaceae</i>	25
Tableau 3 : différences principales entres les nodules de type déterminée et indéterminée	30

Liste des figures

Figure 1: le cycle d'azote.....	6
Figure 2: <i>Hedysarum coronarium</i>	17
Figure 3: cellule bactérienne du genre <i>Rhizobium</i>	20
Figure 4: les nodules isolés partir de <i>Hedysarum Coronarium</i>	28
Figure 5: structure des nodules de légumineuses.....	29
Figure 6: attachement et infection.....	32
Figure 7: la formation du cordon d'infection.....	33
Figure 8: la ramification du cordon d'infection.....	33
Figure 9: la formation du nodule.....	34
Figure 10: la leghémoglobine nodulaire.....	36
Figure 11: les facteurs NOD.....	37
Figure 12: traitement des protéines par le SDS.....	43
Figure 13: électrophorèse SDS - PAGE.....	43
Figure 14: collecte des nodules.....	46

Figure 15: conservation des nodules.....	47
Figure 16: l'écrasement des nodules.....	48
Figure 17: culture des bactéries sur milieu solide.....	54
Figure 18: croissances bactérienne sur YMA et dans YMB.....	55
Figure 19: bactérie Gram négatif isolée à partir de la boîte N3 vues au microscope optique (x 100).....	56
Figure 20: la migration électrophorétique.....	57
Figure 21: gel coloré.....	58
Figure 22: révélation des bandes électrophorétique.....	59

Produced with ScanTopDF

Introduction

A l'échelle de la biosphère, la quantité d'azote disponible est l'un des facteurs limitant majeurs de la croissance des plantes. Néanmoins la plus part des êtres vivants n'assimilent le diazote que sous forme combinée.

L'utilisation de cette source d'azote est limitée à certains procaryotes (cyanobactéries, actinomycètes, bactéries) appelés diazotrophes. Ces procaryotes arrivent à fixer l'azote directement de l'atmosphère grâce à leur capacité de synthétiser un complexe enzymatique dénommé nitrogénase, en conditions de carence azotée.

Cependant, la fixation symbiotique de l'azote représente la plus grande part des apports d'azote au sol. Une association symbiotique entre une bactérie fixatrice d'azote et une plante est en principe bénéfique pour les deux partenaires. Ainsi si le microorganisme apporte sa capacité de réduire l'azote gazeux pour le transformer en ammonium, essentiel pour le développement de la plante, celle-ci à son tour, fournit à la bactérie un apport carboné indispensable pour sa croissance et assure sa reproduction dans un milieu clos, le nodule. La bactérie utilise une partie de l'apport d'énergie de la plante pour la réduction de l'azote gazeux.

Les anciennes civilisations avaient déjà découvert que le rendement des cultures peut être exploité par une utilisation judicieuse des rotations avec les légumineuses pour améliorer la productivité des systèmes traditionnels. Les résultats agronomiques au champ, la fixation symbiotique de l'azote et sa disponibilité et par conséquent la nutrition azotée des céréales succédant aux légumineuses sont généralement améliorées.

Dans cette étude, nous sommes entraînés de confirmer ou infirmer si les bactéries nodulant la légumineuse *Hédysarum coronarium* de la région de Guelma sont des *Rhizobia*.

Une série d'études est effectuée afin de caractériser et identifier des bactéries isolées à partir des nodules de la plante étudiée, suivie par une technique d'électrophorèse SDS- PAGE pour déterminer le profil protéique des souches isolées et le comparer avec celui de la souche de référence A6 (*Rhizobium sulae*).

Le mémoire est réalisé selon le plan suivant :

Introduction

Chapitre I: Etude bibliographique.

Partie I : L'azote et la fixation symbiotique.

Partie II : L'électrophorèse.

Chapitre II : partie pratique.

Conclusion.

Produced with ScanTOPDF

Chapitre I

Etude bibliographique

Produced with Scantopdf

Partie I

L'azote et la fixation symbiotique

Chapitre I :

Partie I : L'azote et la fixation symbiotique

I - L'azote

I - 1- Généralités

On a vu que la vie sur terre influence profondément la composition de l'atmosphère en produisant du dioxyde de carbone CO_2 et du méthane CH_4 à travers les processus de la respiration et la fermentation reliés au recyclage du carbone. La vie a aussi influencé la composition de l'atmosphère à travers le recyclage d'un autre élément, l'azote (N). [1]. Ce gaz est le premier en importance dans l'atmosphère terrestre (78% en volume et de 75,5% en masse) (Ramade, 2003). Par rapport à leur masse de la matière sèche, l'azote est le 4^{ème} élément nutritif important des plantes. C'est un constituant essentiel des protéines, des acides nucléiques, des hormones, de la chlorophylle et d'une foule de composés primaires ou secondaires des plantes.

La plupart des plantes sont incapables de convertir le diazote en une forme biologiquement utilisable, car les deux atomes du diazote sont reliés par une liaison exceptionnellement stable $\text{N}\equiv\text{N}$ les plantes ne possèdent pas l'enzyme capable de rompre cette liaison (seules certaines espèces procaryotiques sont capables d'effectuer cette réaction importante). Cette situation pose aux plantes un problème particulier concernant l'absorption et l'assimilation de l'azote ; alors les plantes dépendent d'organismes procaryotes pour convertir le diazote atmosphérique à une forme instable qu'elles puissent utiliser tel que nitrate NO_3^- ou ammonium NH_4^+ , mais l'approvisionnement en azote du sol est limité si bien que vis-vis de l'azote disponible, les plantes entrent en compétition avec toute une série de microorganismes. Il en résulte que l'azote est souvent un facteur limitant dans les écosystèmes naturels ou cultivés (Hopkins, 2003).

L'azote est un élément chimique de la famille de pictogènes, de symbole N et de nombre atomique 7. dans le langage courant l'azote désigne le gaz diatomique N_2 , c'est le 34^{ème} constituant de la croute terrestre par ordre d'importance [2], c'est un gaz incolore, inodore, sans saveur et relativement inerte (peu réactif). [3].

Dans la nature, il y a deux formes d'azote : azote inorganique et azote organique.

- **Azote inorganique** : sous forme gazeux (N_2 , NH_3), soluté (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) ou minéral (KNO_3 , $NaNO_3$)
- **Azote organique** : acides aminés, protéines, nucléotides et acides nucléiques. [4]

L'azote a en particulier les rôles suivants :

- azote liquide : agent réfrigérant.
- agent de lutte contre les incendies.
- métallurgie : l'azote est régulièrement injecté dans des fours de production de métaux hautement oxydables (exemple : l'aluminium et ses alliages) pour en empêcher la réaction avec l'oxygène de l'air.
- construction mécanique.
- gaz utile pour gonfler les accumulateurs hydrauliques en raison de sa passivité vis-à-vis des huiles et de pneumatiques.
- Emballage de denrées alimentaires et produits pharmaceutiques.
- gaz propulseurs pour bombes aérosols (N_2O) ou aérographes. [2]
- la nutrition des plantes :
 - joue un rôle important dans le développement de la tige et la feuille.
 - contribue au développement de la chlorophylle nécessaire à la photosynthèse.
 - favorise la multiplication cellulaire et la multiplication des chloroplastes.

- évite le jaunissement de feuilles et l'attaque par les organismes nuisibles.
- facteur limitant de la croissance de la plante.

Les sources d'azote

- **Sources naturels** : l'atmosphère, l'océan, les débris organiques.
- **Sources artificiels** : les engrais organiques, les engrais minéraux. [5]

I – 2 - Le cycle d'azote

L'azote totale est généralement réparti dans trois ensembles principaux : l'ensemble constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenue dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme «le cycle d'azote » (Hopkins, 2003). Ce dernier est un cycle biogéochimique. [6]

Il est plus complexe en raison du grand nombre de formes minérales sous lesquelles cet élément est présent dans l'environnement et de la grande difficulté qu'éprouve la biomasse à incorporer l'azote. (Frontier et al., 1999) (Figures 1).

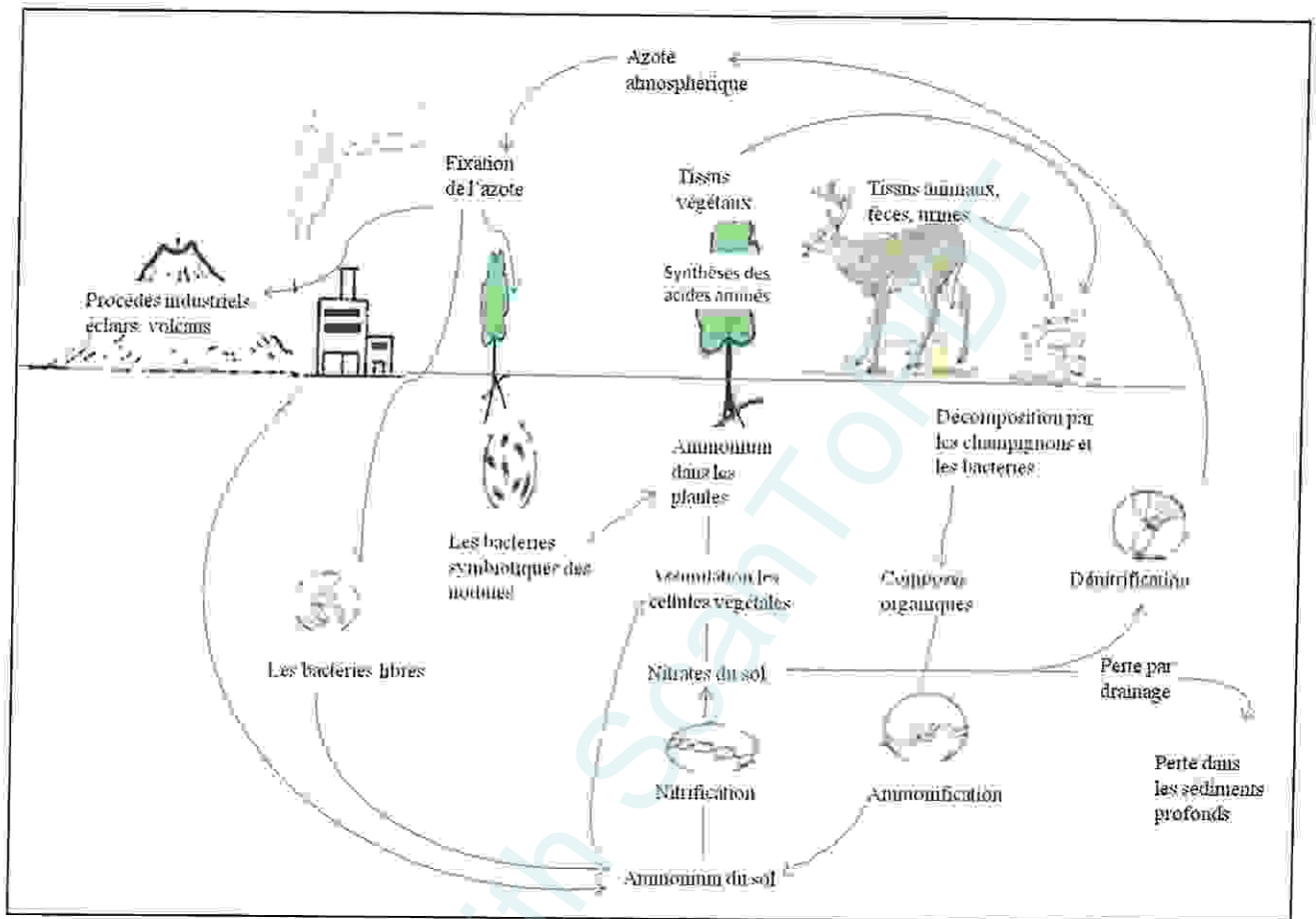
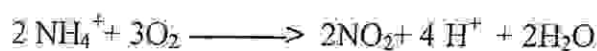


Fig 1: le cycle d'azote dans un écosystème terrestre.

Plusieurs étapes importantes du cycle de l'azote doivent être mises en évidence : nitrification, dénitrification, ammonification et fixation de l'azote.

La nitrification : est le processus aérobie d'oxydation biologique de l'ammoniac ou des ions ammonium (NH_4) en nitrite (NO_2) (Prescott et al., 1995). Elle s'effectue sous l'action des bactéries qui sont très répandues dans le sol, ces microorganismes sont désignés comme des autotrophes chimiosynthétiques spécifiques qui récupèrent l'énergie dégagée au cours de la réaction, les conditions optimales d'activité de ces populations sont assez strictes : aérobieuse, PH compris entre 6et9, températures comprise entre 28et 36C° (Schvartz et al., 2005). La bactérie nitrificative, *Nitrosomonas* et le principal responsable de l'oxydation de l'ammonium en nitrite.

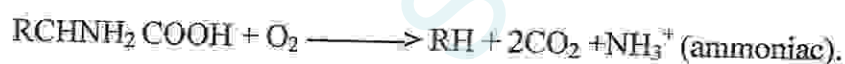


Les nitrites sont toxiques pour les plantes, mais ils s'accumulent rarement dans le sol. *Nitrobacter*, autre genre de bactéries, oxyde les nitrites pour produire des ions nitrate, avec une nouvelle libération d'énergie:



En raison de la nitrification, c'est sous forme de nitrate que la plus de l'azote est absorbée par la plupart des plantes (Raven et al., 2003).

L'ammonification : les substances azotées telle que les protéines, les acides aminés, les acides nucléiques sont en général rapidement décomposées en molécules plus simples par les bactéries saprophytes et divers champignons du sol, ces organismes incorporent l'azote dans leurs acides aminés et leurs protéines, et libèrent l'azote en excès sous forme d'ions ammonium (NH_4^+) par le processus d'ammonification, ou minéralisation de l'azote (Raven et al., 2007).



La dénitrification : la principale perte d'azote par le système sol-plante provient de la dénitrification, processus anaérobie au cours duquel le nitrite est réduit en molécules plus simples volatile de l'azote, comme l'azote gazeux et l'oxyde d'azote (NO_2)_x, qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven et al., 2003), avec une quantité de 93 à 190 millions de tonnes (Hopkins, 2003), cette transformation s'effectue selon les étapes suivantes :



La réduction de nitrate en nitrite ne nécessite pas une microflore spécifique, par contre la réduction du nitrite en azote gazeux se fait sous l'action d'un nombre restreint de microorganisme (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*...) très répandus dans les sols, ces bactéries sont des organismes aérobies facultatives et, en conditions d'anaérobiose partielle. Elles peuvent utiliser NO_3^- comme source d'oxygène pour dégrader le glucose et former de l'ATP (Ramade, 2003).

Pour que les réactions de dénitrification produisent il faut que le nitrate et le carbone soient présents (Schvartz et al., 2005). On a longtemps considéré que les faibles teneurs en oxygène nécessaires à la dénitrification (Davet, 1996), était propres aux sols gorgés d'eau et des habitats tels que les marais et tourbières. Les chercheurs admettent actuellement que ces conditions se rencontrent fréquemment dans les agrégats du sol, même sans excès d'eau ; la dénitrification et par conséquent un processus pratiquement universel dans les sols (Raven et al., 2000). La dénitrification est responsable de l'accumulation actuelle de nitrites dans certaines nappes pyrétiqes, suit un apport excessif de nitrates par l'agriculture industrielle (Frontier, 1999).

La fixation de l'azote : si l'azote éliminé du sol n'était pas régulièrement remplacé, toute vie disparaîtrait lentement de la terre. Le sol récupère principalement la perte d'azote par dénitrification grâce sa fixation. La fixation de l'azote est le processus qui aboutit à la réduction du N_2 atmosphérique en ammonium NH_4^+ (Raven et al., 2007) on avec précision la transformation d'azote non assimilable en azote assimilable par la plante.

[5]

La fixation de l'azote se fait par les voies suivantes :

- a- **la fixation chimique :** une très faible fraction d'azote atmosphérique (10%) peut être rendue assimilable par voie purement chimique, les décharges électriques (l'éclair et la lumière ultraviolette) ou les orages provoquent en présence d' O_2 la formation d'oxygène d'azote (NO , N_2O) [3] ; les autres sources d'oxyde d'azote atmosphérique proviennent de combustions industrielles, des feux de forêt, des gaz d'échappement et des centrales électriques (Hopkin, 2003).
- b- **la fixation industrielle :** l'air contient 78% d'azote, cette énorme source d'azote est utilisée pour la fabrication industrielle d'engrais azotés selon le procédé de Haber-Bosch, dans des conditions de pression et de température élevées et en présence d'hydrogène (Luttge et al, 1997).

e- la fixation biologique : à l'échelle mondiale, la fixation biologique de l'azote représente environ 150 à 190 millions de tonnes par an (Hopkins, 2003). c'est le processus biochimique le plus important après l'assimilation de CO₂. Elle assure la transformation de l'azote gazeux atmosphérique en ammoniac. [7]

I – 3 - Fixation biologique de l'azote

Seules certaines bactéries et cyanobactéries ont évolué avec la capacité de fixation du N₂, cette capacité est visiblement limitée au monde procaryote, et ces réactions fournissent en fin de compte une source de composés azotés pour la nutrition des eucaryotes (Perry et al., 2004).

La fixation biologique de l'azote se déroule à 25°C, et est catalysée par un complexe enzymatique : la nitrogénase/ hydrogénase. La réaction, réalisée par les fixateurs biologiques, exige :

- 8 électrons et 8 protons pour la réduction.
- 16 ATP pour la fourniture de l'énergie d'activation.

La réaction globale devient :



La formation de l'ammoniac s'accompagne toujours de celle d'hydrogène.

La nitrogénase est un complexe enzymatique, présent uniquement chez les procaryotes, est responsable de la fixation de l'azote moléculaire, formé de deux métalloprotéines : la protéine à fer, appelée dinitrogénase réductase, et la protéine molybdène-fer, appelée dinitrogénase. Cette enzyme est inactive en présence d'oxygène (Meyer et al., 2008).

Les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à des groupes taxonomiques très divers regroupant une cinquantaine d'espèces bactériennes et de nombreuses cyanobactéries et actinomycète. [8]

Classiquement on groupe les bactéries fixatrices d'azote en deux grandes catégories en fonction de leur relation avec les plantes.

I - 3 - 1 - Les fixateurs libres

Le groupe des bactéries fixatrices libres non associées avec une plante spécifique fixent leur azote à l'état libre ou dans la rhizosphère de certaines plantes (François et al., 1997), elles sont très répandues, habitent les sédiments marins ainsi que ceux d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de divers animaux (Hopkins, 2003). Bien que les bactéries impliquées sont surtout des bactéries du sol, aérobies (*Azotobacter*, *Beijerinckia*...) ou anaérobies (*Clostridium*, *Citrobacter*...), toutes hétérotrophes et de nombreuses cyanobactéries (Frontier, 1999). Les quantités de l'azote incorporées annuellement par la fixation libre dans les sols cultivés sont estimées entre 10 et 30 kg par hectare. Dans les sols inondés ou submergés, rizières en particulier, ces quantités peuvent être beaucoup plus importantes (Schvartz et al., 2005).

I - 3 - 2 - Les fixateurs symbiotiques

Le groupe des bactéries symbiotiques qui fixent l'azote en association avec la plante, c'est le cas de *Rhizobium* avec les légumineuses, de certains actinomycètes comme *Frankia* avec *Casuarina* et d'*Anabaena Azollae* qui fixe l'azote à l'intérieure de la fougère *Azolla*. [8]

La fixation d'azote par des bactéries symbiotiques induit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes d'azote, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres.

La symbiose fixatrice de l'azote est le résultat d'un équilibre délicat entre certains procaryotes et végétaux. (Davet, 1996) Cette relation induise la formation d'organes spécifiques qui sont les nodosités, à l'intérieur desquelles l'azote moléculaire atmosphérique est réduit en ammoniac, en retour les bactéries utilisent les assimilats de la plante hôte comme source d'énergie (François et al., 1997).

La fixation symbiotique nécessite la présence de la légghémoglobine dont la synthèse dépend de la coopération des deux partenaires. La réaction de réduction de l'azote atmosphérique se fait grâce à la nitrogénase. [3]

Dans la nature, les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont les systèmes symbiotiques en raison de leur intérêt pour le maintien de la fertilité des sols. [8]

Il existe quelques symbioses fixatrices d'azote dont interviennent de multiples plantes. Les aulnes (*Alnus*) ; par exemple, produisent des nodules qui sont induits et abritent ce sont les *Actinomyces* fixateurs d'azote. Une autre association symbiotique est économiquement très importante dans certaines parties du monde. *Azolla* est une petite fougère flottante, et *Anabaena* est une cyanobactérie fixatrice d'azote dans les cavités des frondes d'*Azolla*. Cette association peut apporter jusqu'à 50 kg d'azote/ hectare (Raven et al., 2007).

II - La symbiose légumineuses- bactéries

II - 1 - Les légumineuses

Leur terme est dérivé du Latin mot *legumen* (avec la même signification que la limite anglaise), qui alternativement est censé pour venir du verbe *legere* « pour recueillir. » L'anglais a emprunté la limite au Français « légume, dont », cependant, a une signification plus large dans la langue moderne et fait référence à toute sorte de légume; la légumineuse anglaise de mot étant traduite en français par le légumineuse de mot. [9]

Les légumineuses (*leguminosae*) ou Papilionacées sont des Angiospermes, dicotylédones, appartenant à la famille des fabacées, qui représentent la troisième grande famille des plantes à fleurs, elles sont très nombreuses (entre 1600 et 1900 espèces), constituent de loin le groupe le plus important des plantes participant à la fixation de l'azote avec les *Rhizobiums* symbiotiques (Raven et al., 2007) ; il s'agit de légumineuse à graines telles que : le fève, pois, haricot, soja, lupin, ou de légumineuses fourragères telles que : les luzernes, trèfle, sainfoin (Neyra, 1992). Au sens large, les légumineuses sont des

plantes vivaces herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. C'est une famille cosmopolite des zones froides à tropicales. [10]

II - 1 - 1 - Caractères généraux

La famille des légumineuses se caractérise par les traits suivants :

- feuilles en général pennées, alternes et stipulées.
- fleurs (le plus souvent hermaphrodites) en grappes ou isolées. Calice et corolle à 5 pièces.
- gynécée composé d'un seul carpelle, ovules à placentation structurale. Style terminal.
- les fruits sont des gousses (ou légumes), les graines n'ont pas d'albumen.
- présence de nodosités sur les racines pour 90% des Papilionacées et Mimosacées et 30% des Césalpiniacées (Neyra, 1992).

L'histoire des légumineuses est attachée étroitement avec cela de la civilisation humaine, apparaissant tôt dedans L'Asie, les Amériques (haricot commun, plusieurs variétés), et l'Europe (fèves) par 6.000 avant JÉSUS CHRIST, où ils sont devenus une agrafe, essentielle pour compléter la protéine où il n'y avait pas assez de viande. [11]

Cette famille à une grande importance économique, c'est une source de matières grasses, de bois et des produits divers comme : gomme, tanins, matières colorantes (Indigo). On y rencontre aussi des espèces qui présentent un intérêt comme plantes ornementales.

Réduire les coûts d'engrais pour les agriculteurs et les jardiniers. [10]

Les légumineuses sont une vraie mine d'or au point de vue nutritionnel grâce à leur haute teneur en protéines et en acides aminés, la plupart desquelles sont d'excellentes sources d'acide folique et de potassium, de bonnes sources de fer et de magnésium en plus

de contenir des vitamines du complexe B, du zinc et du cuivre ! D'origine végétale, les légumineuses sont dépourvues de cholestérol et constituent habituellement une source très élevée de fibres. [12]

Comme beaucoup de Fabacées, leur culture tient une place particulière dans la rotation culturale du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. [13]

II - 1 - 2 - Classification

La famille des légumineuses appartient selon la classification classique au règne *Plantæ*, sous règne *Tracheobionta*, division *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, sous classe *Rosidæ*, ordre *Fabales*, famille *Fabaceæ* qui est divisée en trois sous familles avec la distribution représentant:

Mimosoïdeae (Mimosoïcées): 80 genres et 3200 espèces. Essentiellement tropicales et tempérées chaudes d'Asie et d'Amérique. *Mimosa*, *Acacia*.

Caesalpinioideae (caesalpioidées): 170 genres et 2000 espèces, cosmopolite. *Caesalpinia*, *Senna*, *Bauhinia*, *Amherstia*. [14]

Papilionadeae (Papilionacées): les **Faboïdées** sont une sous-famille de plantes dicotylédones, dialypétales périgynes, de la famille des Légumineuses, et tirant son nom de la forme des fleurs. Elle comprend plus de 14000 espèces et 500 genres répartis sur tout le globe.

Les nombreux végétaux qui composent cette sous-famille sont des herbes à feuilles alternes composées et accompagnées de stipules ou plus rarement des arbres ou arbustes. [15]

Les caractères généraux de ce groupe qui renferme des espèces différant souvent les unes des autres par des particularités un peu secondaires :

- feuilles stipulées, de type imparipenné pouvant se réduire au type trifolié. La fiolle terminale peut être remplacée par une vrille ou disparaître donnant un type bi folié.

- du point de vue morphologie florale, cette sous famille est beaucoup plus homogène que les deux autres,
- les fleurs des papilionacées présentent une zygomorphe très accusée : un étendard, deux ailes, une carène.
- androcée à 10 étamines.
- graine sans albumen, à gros cotylédons.
- présence de tanins, de nombreux alcaloïdes et d'hétérosides à acide cyanhydrique (Neyra, 1992).

Cette sous-famille se divise ordinairement en 31 tribus, les quatre principales sont les *Hedysarées*, les *Viciées*, les *Phaséolées* et les *Trifoliées* :

II – 1 – 2 – 1 - Tribu des *Hedysarées*

Les *Hedysarées* contiennent plusieurs caractères, elles renferment le Sainfoin oscillant (*Hedysarum gyrans*), dont les folioles sont animées de mouvements spontanés réguliers et le Sainfoin ordinaire (*Onobrychis sativa*). Le fruit provient, bien encore d'un carpelle, mais au lieu d'être une gousse, il a l'aspect de celui de l'Acacia et prend la forme d'un chapelet dont chaque renflement ou article renferme une graine; à maturité, les articles se séparent les uns des autres en entraînant chacun sa graine. [15]

Nous rappelons celui du genre *Hedysarum*, qui, tel que nous l'avoir jadis vaguement défini, aurait compris dans son extension tous les genres de cette tribu (De Candolle, 1825).

Hedysarum vient du grec latinisé *hedy* signifiant «doux» en référence au parfum des fleurs (Burnié et al., 2006), appartient à la famille des légumineuses, comprend 100 espèces communes dans les montagnes et les prairies de tout l'hémisphère boréal (nord), composé de plantes vivaces, herbacées ou sous- frutescente, à feuilles imparipennées, vert moyen, à fleurs grandes, ordinairement violettes, pourpres, rouge ou roses, parfois

blanches ou jaunes, disposées en grappe sur des pédoncules axillaires (Bonduel et al., 2004), et des épis floraux étroits et chargés, elles ressemblent aux vesces (*vicia*) malgré le manque de vrille, calice divisé jusqu' au milieu en cinq segments linéaires-subulés, presque égaux ; corolle papilionacée, dont l'étendard est grand ; la carène tronquée obliquement ; les ailes beaucoup plus courtes que celle-ci ; dix étamines didelphes, dont le faisceau de neuf étamines offre une courbure abrupte qui résulte de la forme tronquée de la carène ; gousse composée de plusieurs articles comprimés, monospermes, orbiculés ou leuciculaires, régulières, attachés l'un à suite de l'autre par le milieu seulement (Audouin et al., 1829).

Toutes les espèces sont :

- rustiques et demandent une exposition ensoleillée (Burnie, 2006), ainsi qu'un sol bien drainé de préférence sableux ou rocailleux et calcaire, peu fertile, alcalin (Bonduel et al., 2004), arrosés régulièrement au printemps et en été.
- multipliés, par semis ou division minutieuse, au printemps (Burnie, 2006).

Les espèces *Hedysarum* sont utilisés comme plantes alimentaires par les larves de certains lépidoptères (pyrale et le papillon), y compris les espèces *Accordella coleophora*. Certaines espèces, telles que *Hedysarum alpinum* également connu sous le nom Alpine Sweetvetch, ont été mangés par les enuits pour aider à contrer les effets du scorbut parce qu'elle est riche en vitamine C , contenant environ 21 mg/100g.[16]

Grâce au parfum des fleurs, quelques espèces seulement sont cultivées dans les jardins .outre leur valeur ornementale, certaines espèces sont cultivées comme fourrage.les racines pivotantes épaisses de certaines espèces nord-américaines étaient autrefois consommées (Burnie, 2006).

Le genre *Hedysarum* ne présente pas de grandes difficultés dans la classification des unités taxonomique, selon la classification scientifique, les *Hedysarum* appartiennent au :

Règne : *Eukaryota*

Embranchement : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous famille : *Faboideae*

Tribus : *Hedysarées*

Genre : *Hedysarum* [17]

Espèce : ce genre est restreint à environ trente espèces pour la plupart est européennes, parmi lesquelles nous citerons comme les plus remarquables les *Hedysarum coronarium*. (Audouin et al., 1829).

Son nom générique paraît venir des mots grecs *Hedys* et *aroma* qui signifient doux et parfum, il est aussi appelé sainfoin rouge, sainfoin, sainfoin à bouquets, sainfoin d'Espagne, sainfoin Italienne, *Sulla*, *astorki*, chèvrefeuille français, tête de coq. [18]

Hedysarum coronarium est une plante diploïde ($2n=16$), vivace bisannuelle dressée, ou par fois bisannuelle (Bonduel et al., 2004), à vie courte, semi-érigé à érigé en croissance, de 0,3 à 1,5 m, avec succulentes tiges qui deviennent légèrement boisé après la floraison [19], ses tiges sont droites, cannelées, hautes d'un pied et demi à deux pieds, épaisses et rameuses à ses sommet, munies des feuilles 3 à 4 cm de long, sont pennés, composées de sept à quinze foliole, entières, opposées, elliptiques, ovales ou orbiculaires, très légèrement velues : au printemps apparaissent des grappes de 10 à 35 fleurs de 1 à 2 cm de long (Bonduel et al., 2004), ces dernières sont d'un beau rouge, rarement blanches, assez grandes, droites ou étalées, jamais pendantes et de pollinisation croisée principalement par les abeilles, elles sont disposées en un épi court, sur des pédoncules axillaires plus longs que les feuilles (François, 1827).

Les fruits sont des gousses formées de trois à huit segments ovoïdes par gousse qui s'est scindée en graines non décortiquées avec une surface rugueuse, épineux, les graines décortiquées sont blanches, crèmes à brunes, claires et aplaties avec un circulaire profil presque.

Profonde, ramification racinaire pivotante (jusqu'à 2 m), avec de nombreuses racines secondaires. [20] (Figure 2).



Fig 2 : *Hedysarum coronarium*.

II – 1 – 2 – 2 - Les principaux attributs de Sulla

- tannins condensés contient.
- antihelminthique (c'est-à-dire réduit les charges internes parasite).
- non-ballonnements.
- teneur élevée en protéines - bon foin / ensilage (séjours de feuilles sur la tige).
- très agréable au goût.
- de productions élevées en matière sèche.

- établit facilement des semences et régénère à partir de semences.
- dormants d'été et ne répond pas à la pluie ou d'irrigation jusqu'à l'automne.
- légumineuse fixe l'azote.
- besoin de *Rhizobia* spécifiques propres à former des nodules fixateurs d'azote des racines.
- n'aime pas l'eau d'enregistrement.
- répond bien au phosphate et potassium. [21]

Originaires d'Afrique du Nord (Algérie , Maroc , Tunisie) et de la Méditerranée occidentale. Comme la culture s'est étendue à des pays comme l'Australie, l'Inde, le Brésil et l'Espagne, où il est cultivé dans certaines régions du sud (Cádiz, Málaga, Huelva) et les îles Baléares. A également été développé dans certaines régions de la côte de la Catalogne. A l'état spontané, elle présente une large aire de répartition géographique (Algérie , Maroc , Tunisie...etc.).[22]

Pour une production optimale, *Sulla* semble avoir des exigences spécifiques en termes de texture du sol, drainage, la fertilité des sols, température et le pH...etc. [20]

Il se développe naturellement aux :

Sols plus profonds et argileux eutrophiés et calcaires, mais peut se développer aussi sur une large gamme de sols pourvu qu'ils soient basiques, il tolère les sols acides ou salins. [23]

Sol bien drainé, fertile, à moyen et à texture fine. En règle générale ne pousse pas bien sur les sols à texture grossière, avec incompatibilité nodulation signalée.

Il se développe sur des sols à pH de > 6 . [20]

Il est adapté aux climats doux et à proximité de la mer, il ne peut supporter le froid et tolère des gelées très légères, mais sont habituellement tués au dos par congélation lourde. [24]

Il est résistant à la sécheresse et peut se développer avec des précipitations inférieures à 500 mm/an. [23]

Le *Sulla* se développe lentement en hiver mais pousse très rapidement au printemps, avec un maximum de production à partir de fin de Mars jusqu'à Mai. Il est généralement dormant pendant la chaleur d'été. Plusieurs coupes peuvent être prélevées la seconde année. Il peut être pâturé en hiver et au début du printemps lorsque le fourrage vert est rare, puis laissé à part pour le foin. Martinello et Ciola (1996) rapportent qu'en Italie le *Sulla* et le sainfoin sont généralement pâturés d'octobre à avril, et récoltés en foin en Mai-Juin. [23]

Sa culture est de l'importance agricole en Afrique du Nord (Algérie, Maroc et Tunisie) et est largement semée dans le sud de la Sicile, principalement pour :

- la production de foin et d'ensilage.
- il a également été utilisé pour lutte contre l'érosion et l'embellissement routier en Nouvelle-Zélande.
- *Sulla* produit une qualité du fourrage qui est bien accueillie par le bétail. [25]
- les fleurs sont attractives pour les abeilles et elles sont une source majeure de nectar dans le sud et le centre de l'Italie pour la production du miel. Elles produisent un très bon effet dans les jardins, répandent en même temps une odeur douce et agréable (Henri et al., 1809).
- meilleure performance des agneaux de pâturage, *Sulla* comparé à Luzerne due aux effets de protection des tannins condensés sur l'infection par les nématodes. [19]

II - 2 - Les Rhizobia

II - 2 - 1 - Généralités

Les microsymbiontes sont des bactéries qui répartissent actuellement en plusieurs genres, que nous désignerons collectivement sous le nom de *Rhizobium* (Duhoux et al., 2004) (du grec "*rhiz*" racine = "*bios*" = vie), est un type de bactéries responsables de la fixation biologique de l'azote moléculaire, ils sont subdivisés en espèce et en sous-espèce nommées biovars (une variété biologique) d'après l'espèce hôte. Leur nombre y est très variable, il s'étend de 0 ou 10 jusqu'à atteindre 10^7 g^{-1} de sol; il dépend de la structure du sol, de son contenu en eau et de nombreux autres facteurs. En présence des racines de l'hôte, la multiplication et la colonisation de rhizosphère sont accrues (Hopkins, 2003).

Les *Rhizobia* sont des bactéries saprophytes qui vivent à l'état libre dans le sol et dans la rhizosphère. Avec quelques exceptions (dont *Azorhizobium*), dans ce cas fixent très peu ou pas d'azote, et à l'état symbiotique ont l'aptitude à infecter la racine ou parfois la tige des légumineuses pour y former des nodules (Duhoux et al., 2004) (Figure 3).

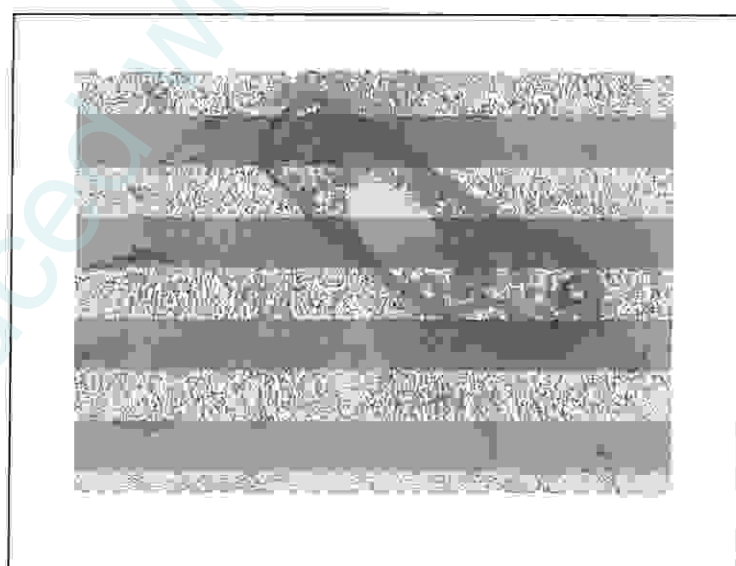


Fig 3 : cellule bactérienne du genre Rhizobium. (Meyer et al, 2008)

Beijerinck en Hollande a réussi à isoler l'intrus dans les radicelles des papilionacées, à le cultiver, puis à infecter de nouveau avec ses cultures les racines de vicia faba et obtenir ainsi la formation de nodosités en 1888. Beijerinck a nommé cette bactérie *Bacterium radicumicola*, un nom que Frank (1839-1900), professeur à l'école supérieure d'agriculture de Berlin, a changé en *Rhizobium « leguminosarum »* dans son étude monographique sur la fixation de l'azote. Il fut démontré expérimentalement, à la fin du siècle, par toute une série de chercheurs, que les *Rhizobia* fixent l'azote atmosphérique sous forme de combinaisons absorbables par les plantes (Hendriket al., 1994).

Toutes les autres espèces ont été initialement mis dans le *Rhizobium* genre . Toutefois, des méthodes avancées de plus d'analyse ont révisé cette classification , et maintenant il y a de nombreux autres genres. La plupart des recherches ont été effectuées sur les cultures et les fourrages de légumineuses comme le trèfle, la luzerne, les haricots et le soja ; récemment, plus de travail est en cours sur les légumineuses en Amérique du Nord. [26]

II - 2 - 2 - Les caractères morphologiques

Les *Rhizobia* isolés et purifiés des nodules racinaires présentent plusieurs caractères associés à leur forme, taille, couleur...sont généralement des caractères stables utilisés pour la différenciation des souches et qui sont cités ci-dessous :

Ce sont des bactéries de forme bâtonnet de 0,5 à 0,9 μm x 1,2 à 3 μm de taille, Gram négatif, aérobies strict, non sporulée, généralement mobiles par un seul flagelle polaire ou subpolaire quand elles sont jeunes ou bien par deux à six flagelles péritriches quand elles sont âgées. Elles possèdent des granules réfringents de poly-b-hydroxyburate (PHB) et des enzymes nitrogénase (Duhouset al., 2004).

Les *Rhizobia* sont entourés par une capsule en exo-polysaccharide visqueuse qui les protège du dessèchement, et permet aussi à la bactérie de s'en tenir à la racine des poils au cours de différentes étapes de son cycle de vie. [27]

Certaines souches sont dénitrifiantes, d'autres réduisent le nitrate en nitrite. Parfois microaérophiles, chimio-organotrophes utilisant un large spectre de sucres et d'acides organiques.

Les colonies sont incolores, blanches ou de couleur crème et de forme circulaires, convexes, semi-translucides, agrandies et mucilagineuses. [28]

Formulaires nodules racinaires de légumineuses.

Le pourcentage de C / C est évalué à 59 - 64 %. [27]

Les bactéries sont présentes dans les nodules sous forme de bactéroïdes polymorphes, responsables de la fixation de N_2 . Ces bactéroïdes ont des formes caractéristiques enflées, ellipsoïdes, en forme de crosse ou branchées.

Prototrophes sauf quelques exceptions. [28]

II - 2 - 3 - Les caractères culturels et biochimiques

Les *Rhizobia* ne poussent pas bien sur les médias peptone utilisés couramment pour de nombreuses bactéries, mais le faire sur divers extraits complexes d'origine végétale. Mannitol levures (YM) est le plus généralement adapté à leur croissance.

La vitesse de croissance est variée généralement d'une souche à l'autre, certaines se développent plus rapidement, avec un temps de génération de 2 à 4h et l'autre se croît lentement, avec un temps de génération de 6 à 8h (Perry et al., 2004).

La croissance optimale de la plupart des souches se produit à une température de 25 à 30 °C et à un pH de 6 à 7.

En dépit de leur métabolisme aérobie d'habitude, de nombreuses souches sont capables de bien pousser dans des conditions microaérophilliques à des tensions d'oxygène de moins de 0,1 atm.

Les *Rhizobia* à croissance rapide produisent une réaction acide dans un milieu (YM standard + bleu actes bromothymol) tout à croissance lente des réactions alcalines. [27]

La plupart des espèces n'absorbent pas le rouge Congo sur milieu gélosé au mannitol et n'hydrolysent pas la cellulose et l'amidon.

La croissance sur sucres s'accompagne d'une production abondante de polysaccharide exocellulaire. [28]

II – 2 – 4 - Les caractères symbiotiques

Les caractères symbiotiques se diffèrent d'un genre à l'autre, et lorsque les *Rhizobia* montrent une grande diversité, une révision systématique de leur famille a dû être effectuée récemment pour en tenir compte. Ici pour simplifier, nous regrouperons les différents genres en trois ensembles *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* dont les caractères sont résumés dans le tableau ci -dessous : (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractère des trois groupes de rhizobiacées symbiotiques (Robert et al., 2000) :

espèce caractères	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
Croissance en culture	rapide	lente	rapide
Fixation de N ₂ en dehors de l'hôte	non	non	oui
Localisation des gènes nod et nif	plasmide en générale	chromosome	chromosome
Substances induisant les gènes nod	flavonoïdes	iso Flavonoïdes	flavonoïdes
Croissance du nodule	indéterminée	déterminée	déterminée
Spécificité vis - à - vis de l'hôte	étroite	assez large	un seul hôte connu Sesbania rostrata

II – 2 – 5 - Taxonomie

Les *Rhizobia* sont classés scientifiquement en :

Règne : *Procaryote*

Uni : *Les bactéries*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Alphaproteobacteria*

Famille : *Rhizobiaceae* [29]

Genre : dans un récent classement basé sur l'analyse des séquences des gènes identifiés la famille des *rhizobia*, qui se compose actuellement de 76 espèces dans 13 genres. (Tableau 2).

Tableau 2 : classification des bactéries de la famille *Rhizobiaceae* : [30]

Genre	Espèce
<i>Rhizobium</i>	<i>R. cellulosilyticum</i>
	<i>R. daejeonense</i>
	<i>R. etli</i>
	<i>R. galegae</i>
	<i>R. gallicum</i>
	<i>R. gardnu</i>
	<i>R. hamanense</i>
	<i>R. huautlense</i>
	<i>R. indigoferae</i>
	<i>R. leguminosarum</i>
	<i>R. loessense</i>
	<i>R. lusitanum</i>
	<i>R. miluonense</i>
	<i>R. mongolense</i>
	<i>R. multihospitum</i>
	<i>R. oryzae</i>
	<i>R. phaseoli</i>
	<i>R. pisi</i>
	<i>R. sultae</i>
	<i>R. tropici</i>
<i>R. undicola</i>	
<i>R. yanglingense</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. canariense</i>
	<i>B. elkanii</i>
	<i>B. iriamotense</i>
	<i>B. japonicum</i>
	<i>B. jicamae</i>
<i>B. liaoningense</i>	

	<i>B. pachyrhizi</i>
	<i>B. yuanmingense</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>
	<i>A. doebereineriae</i>
	<i>M. albiziae</i>
	<i>M. alhagi</i>
	<i>M. amorphae</i>
	<i>M. australicum</i>
	<i>M. caraganae</i>
	<i>M. chacoense</i>
	<i>M. ciceri</i>
	<i>M. gobiense</i>
	<i>M. humulii</i>
	<i>M. loti</i>
	<i>M. mediterraneum</i>
	<i>M. metallidurans</i>
	<i>M. opportunistum</i>
	<i>M. plurifarum</i>
	<i>M. shangrilense</i>
	<i>M. septentrionale</i>
	<i>M. tarimense</i>
	<i>M. temperatum</i>
	<i>M. tianshanense</i>
	<i>E. abri</i>
	<i>E. americanum</i>
	<i>E. arboris</i>
	<i>E. fredii</i>
	<i>E. indicaense</i>
	<i>E. kostiense</i>
	<i>E. kummerowiae</i>
	<i>E. medicae</i>
	<i>E. meliloti</i>
	<i>E. mexicanus</i>
	<i>S. morslense</i>
	<i>E. adhaerens</i>
	<i>E. saheli</i>
	<i>E. terangaie</i>
	<i>E. xinjiangense</i>
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>
	<i>B. caribensis</i>
	<i>B. cepacia</i>
	<i>B. mimosarum</i>
	<i>B. nodosa</i>
	<i>B. phymatum</i>
	<i>B. sabiae</i>
	<i>B. tuberum</i>
<i>Capriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>
<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i>
<i>Herbaspirillum</i>	<i>H. lusitanum</i>
<i>Ochrobactrum</i>	<i>O. cyathii</i>
	<i>O. lupini</i>
<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>
	<i>P. ifriqiense</i>
	<i>P. leguminum</i>
<i>Shinella</i>	<i>S. kummerowiae</i>

Rhizobium fournit la principale source biologique d'azote fixé dans les sols agricoles. Il est responsable d'une quantité importante de fixation de l'azote; cette espèce peut fixer jusqu'à 220 UI de N₂ par acres agricoles par an. La majorité de la recherche et le travail effectué sur la fixation de l'azote se fait à l'aide de cet organisme. C'est en raison de son importance agricole des légumineuses qui il a été aussi étudié. [27]

Environnemental

Améliorer et valoriser le bilan favorable des légumineuses.

Évaluer l'impact favorable dans les rotations.

Réduire les rejets par les animaux en améliorant la digestibilité.

Géopolitique

Augmenter la surface cultivée.

Augmenter la teneur en protéines.

Développer les circuits courts.

Sur l'utilisation

Réduire le coût.

Augmenter la teneur en protéines et leur digestibilité.

Améliorer la quantité pour l'alimentation humaine.

Développer l'utilisation non alimentaire.

Sur la production

Augmenter et stabiliser les rendements.

Réduire les charges de culture.

Optimiser la rentabilité à l'échelle de la rotation.

Concevoir une offre pour les marchés à forte valeur ajoutée.

Pour le consommateur

Adapter les formes de consommation.

Répondre à des exigences alimentaires. [31]

II – 3 - Relation symbiotique**II – 3 – 1 - Les nodules**

Les nodules sont des organes spécifiques formés par la prolifération simultanée des cellules de la racine et très rarement de la tige d'une légumineuse et de bactéries du genre *Rhizobium* (Bruhier et al., 2003). (Figure 4).

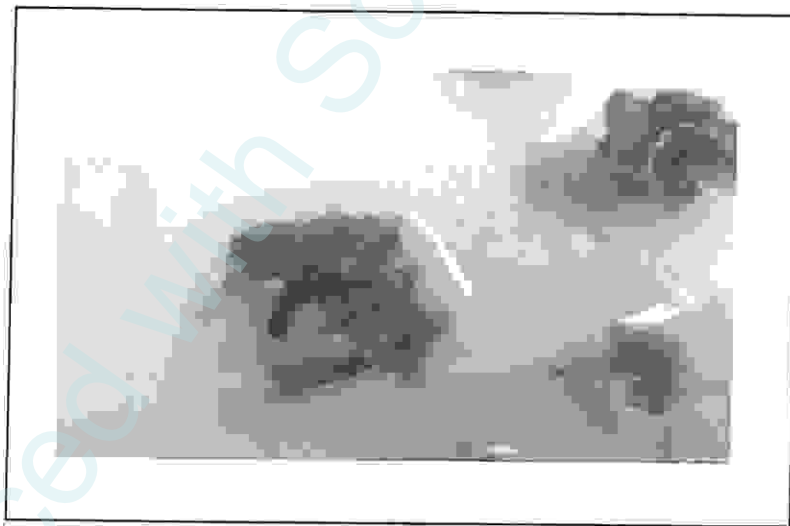


Fig 4 : Les nodules isolés partir de *Hedysarum Coronarium*.

Les nodules des fabacées présentent une structure similaire à celle d'une tige avec des tissus vasculaires périphériques qui se raccordent à ceux de la racine et une zone centrale infectée par les *rhizobia*.

De la périphérie vers l'intérieur du nodule, on trouve :

- le cortex externe constitué en majorité par des cellules parenchymateuses.
- le cortex moyen
- les tissus vasculaires constitués surtout de phloème et entourés par un endoderme et un péricycle.

- le cortex interne formé de une à trois couches de cellules.
- le parenchyme central qui contient les cellules infectées par les *rhizobia* et des cellules non infectées plus petites.

Les nodules sont positionnés sur la racine face aux pôles de xylème. Selon le modèle proposé par Vijn et coll. (1993), les pôles du xylème stimulent les divisions cellulaires par le biais de l'uridine alors que les pôles du phloème les inhibent en synthétisant de l'éthylène. Ceci donne lieu à l'apparition des primordia nodulaires face aux pôles de xylème.

Le nombre et la masse des nodules sont contrôlés par la plante. Deux types de nodule peuvent être distingués : indéterminée et déterminée. (Figure 5).

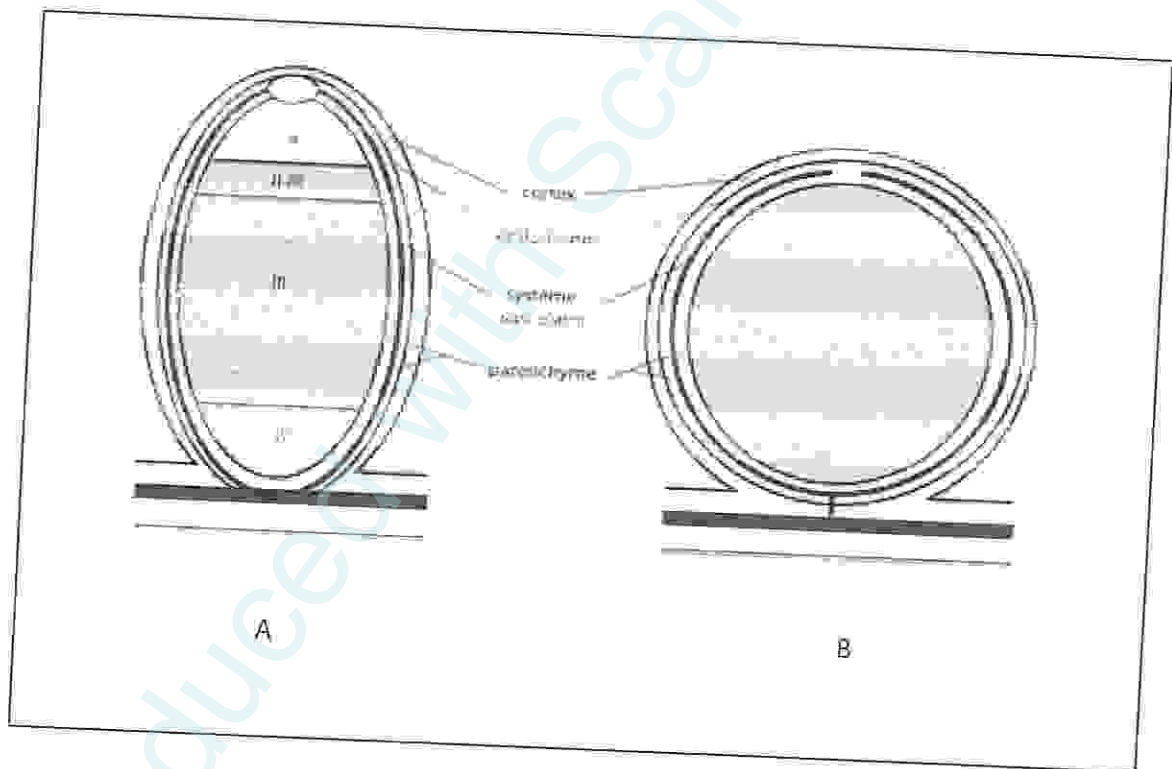


Fig 5 : Structure des nodules de légumineuses A : nodule de type indéterminé.

B : nodule de type déterminé (Svistoonoff, 2003).

Ces deux types de nodule peuvent être différents l'un de l'autre par des principaux caractères. (Tableau 3).

Tableau 3 : Différences principales entre les nodules de type déterminée et indéterminée (Diaw, 2002) :

Type de nodule	Déterminée	Indéterminée
Cordon d'infection	Étroit	large
Site d'initiation du primordium nodulaire	cortex externe	cortex interne
Méristème nodulaire	activité limitée	apical et persistant
Croissance nodulaire	division cellulaire	expansion cellulaire
Morphologie	Circulaire	allongée, ramifiée petites vacuoles
Cellules infectées matures	non vacuolisées	Acides aminés
Forme d'exportation de l'azote	Uréides (allantoïne)	Asparagine, glutamine

Les nodules se caractérisent par :

- ✓ la forme de boules ou boursouffures.
- ✓ relativement petites et très rares grosses.
- ✓ la structure multicellulaire hypertrophiée (Hopkins, 2003).
- ✓ nombreuses surtout lorsque la plante est en pleine végétation.
- ✓ ne présentent pas tous la même couleur, certaines sont blancs, d'autres plus ou moins rosés (Pousset, 2008).
- ✓ une vie relativement courte mais est constamment remplacé en cours de saison.

- ✓ le maximum de nodules a été rencontré entre 2 et 3 mètres du tronc, et à une profondeur comprise entre 25 et 75 cm.
- ✓ une biomasse importante de nodules apparemment très fixateurs d'azote a été produite pendant la saison pluvieuse.
- ✓ la densité des nodules apparaît contrôlée à la biomasse racinaire, mais également à l'humidité du sol de la rhizosphère (Grouzis et al., 2003).

Les nodules ont les rôles suivants :

- permet un environnement réducteur (anaérobie) pour la nitrogénase.
- permet aussi une activité respiratoire aérobie pour générer l'énergie requise par la fixation de l'azote par les bactéries.
- rend disponible le carbone organique de la plante vers le *Rhizobium*.
- fixe l'azote atmosphérique et régule le transport de l'ammonium (NH_4^+) vers la plante par la racine grâce à une protéine spécifique, la leghémoglobine. [32]

II - 3 - 1 - 1 - Les étapes du développement

La séquence des événements qui débutent par l'infection bactérienne et qui se terminent par la formation d'un nodule différencié fixant l'azote, a été très étudiée chez les légumineuses, d'abord sous l'angle morphologique, puis plus récemment sous un angle biochimique et de génétique moléculaire. Globalement, le processus mis en jeu des interactions multiples entre la bactérie et la racine hôte. En effet, les *Rhizobia* et les racines du futur hôte nouent un dialogue sous la forme de messages chimiques entre les deux partenaires.

A partir d'études effectuées initialement sur le soja, le trèfle et le pois, différentes étapes de développement ont été identifiées et aujourd'hui parfaitement bien connues (Hopkins, 2003) :

- **reconnaissance, attachement et excrétion de facteurs nod** : les *Rhizobia* sont attirées chimiquement par les composés phénoliques (flavonoïdes) libérés par les racines des légumineuses. Grâce à ce chimiotactisme positif, ces bactéries colonisent la rhizosphère et s'accrochent à la racine au niveau des poils absorbants. Les signaux chimiques de la racine activent le produit d'un gène de nodulation des *Rhizobia*, le gène constitutif *nodD*, qui induit l'expression des autres gènes *nod* bactériens. Les produits de l'expression de ces gènes sont des polymères de type chitine, appelés facteurs de nodulation ou facteurs NOD libérés dans la solution du sol (Meyer et al., 2008). (Figure 6).

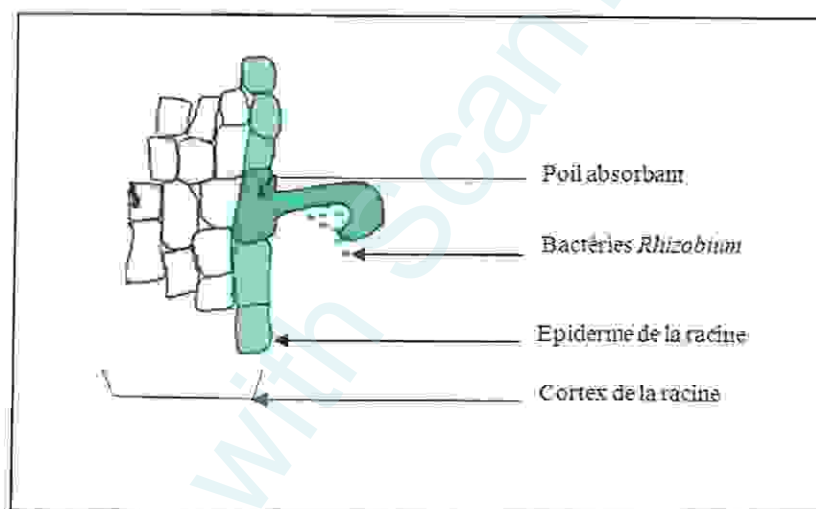


Fig 6 : attachement et infection (Hopkins, 2003).

- **invasion du poil absorbant et la formation du cordon d'infection** : les facteurs NOD induisent la courbure des poils absorbants en croissance, ils activent aussi l'expression des gènes *nod* du végétal, qui conduisent à la formation des nodulines nécessaires à la construction et fonctionnement de la nodosité. Des nodulines précoces induisent la différenciation de cellule de l'écorce et du péricycle à l'origine du méristème de la nodosité. Au fur et à mesure que le poil absorbant se courbe, il englobe des bactéries en sécrétant des enzymes hydrolysant la paroi du poil absorbant, les bactéries pénètrent dans celui-ci, toujours sous l'effet du facteur NOD, ce dernier

s'invagine en une sorte de tube où les bactéries se disposent. C'est le cordon d'infection (Meyer et al., 2008). (Figure 7).

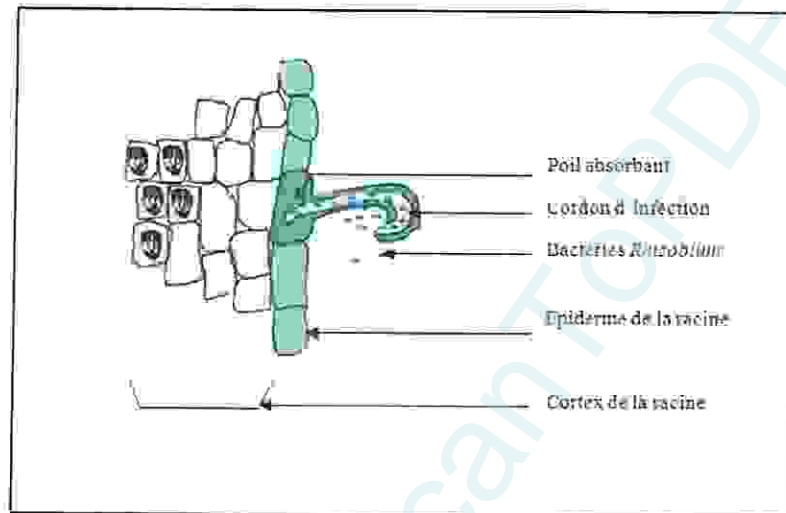


Fig 7: la formation du cordon d'infection (Hopkins, 2003).

- **la ramification du cordon d'infection** : le cordon s'étend jusqu'à la base du poil absorbant, puis progresse dans l'écorce de la racine, les bactéries migrent ainsi jusqu'au niveau de la nodosité en formation où le cordon d'infection se ramifie (Meyer et al., 2008). (Figure 8).

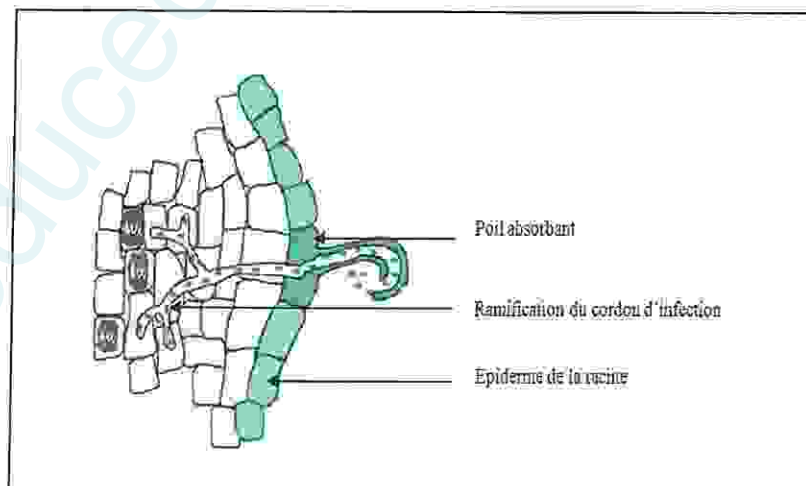


Fig 8: la ramification du cordon d'infection (Hopkins, 2003).

- la formation du nodule et la transformation des cellules bactériennes en bactéroïdes : le cordon infectieux bourgeonne et des bactéries sont ainsi régulièrement enfermées dans les cellules hôtes au sein de vésicules limitées par une membrane. Elles grossissent et se différencient alors : fin des divisions cellulaires et acquisition de la capacité à fixer le diazote, on parle de formes bactéroïdes (Madigan et al., 2007). Le processus infectieux se poursuit durant toute la vie du nodule.

Le nodule établit des relations vasculaires avec le système vasculaire racinaire ce qui permet l'apport en carbone et l'exportation de l'azote organique fixé vers les autres parties de la légumineuse infectée. (Figure 9)

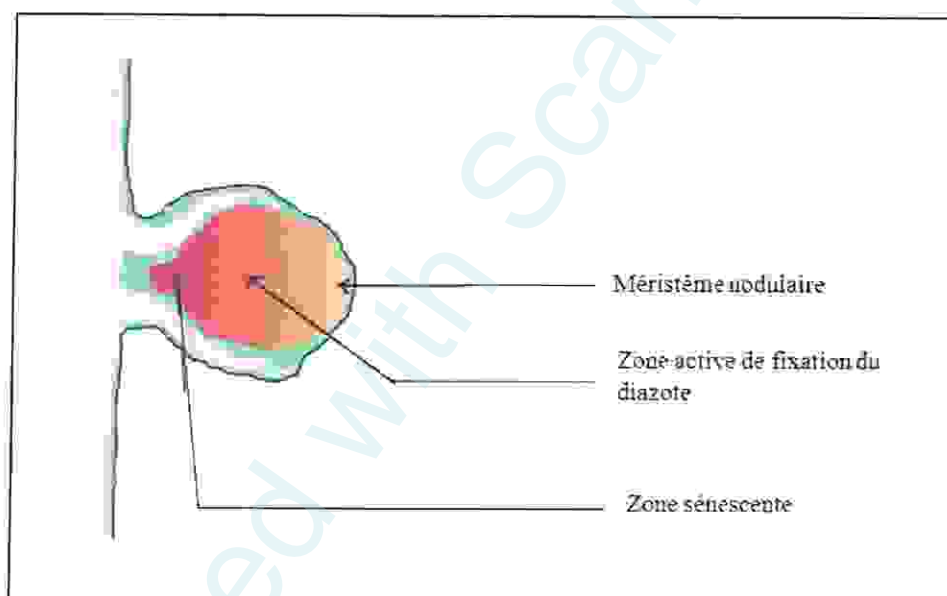


Fig 9 : la formation du nodule. [33]

II - 3 - 2 - Fonctionnement des nodules

L'azote est fixé grâce à la nitrogénase contenue dans les bactéroïdes et serait exporté vers le cytosol végétal sous forme d'ammonium. Une activité glutamine synthétase cytoplasmique et un glutamate synthase plastidique très importantes dans les nodules pourraient incorporer rapidement l'ammonium dans des acides aminés (glutamine et glutamate respectivement). Chez certaines espèces, la glutamine est exportée directement vers le reste de la plante. Des études récentes ont cependant montré que c'est plutôt un

échange d'acides aminés entre le bactéroïde et le cytoplasme (Glu/Gln ; Asp/Asn) qui permet d'exporter l'azote vers la cellule végétale et le xylème.

L'exportation de l'azote se fait surtout sous forme d'amides (asparagine surtout, accessoirement glutamine) pour les nodules de légumineuses tempérées. Chez les légumineuses tropicales, les formes prépondérantes de transport de l'azote sont les uréides (allantoïne et acide allantoïque).

L'énergie nécessaire à la fixation de l'azote par les bactéroïdes est fournie par la plante sous forme de carbone réduit. La plante fournit du saccharose à travers le phloème. Des fortes activités sucrose synthase et invertase sont présentes dans le cytosol des cellules infectées, permettant l'hydrolyse du saccharose en glucose. Le glucose est ensuite métabolisé en phosphoénol pyruvate, en oxaloacétate, en malate et en succinate. Ces deux derniers composants sont la principale source carbonée des bactéroïdes (Svistoonoff, 2003).

II – 3 – 3 - Les conséquences de l'infection

La cellule végétale "infectée" fabrique diverses protéines particulières aux nodules qui sont appelées nodulines, on distingue des nodulines précoces, précédant et accompagnant l'infection, et des nodulines tardives apparaissant au début de la fixation de l'azote. Ce sont les produits de gènes impliqués dans :

- la déformation des poils absorbants.
- la formation du cordon d'infection.
- la morphogénèse de la nodosité.
- la formation de la membrane enveloppante.
- l'alimentation énergétique des bactéroïdes.
- l'assimilation de l'azote fixé et le transport dans les organes de la plante (Davel, 1996).

Parmi ces protéines le plus notamment :

La leghémoglobine : la leghémoglobine est une hémoprotéine constituée d'un groupement prothétique associé à une globine, de couleur rose ou rouge, produite en réponse à l'interaction des deux partenaires, la globine étant codée par le génome de la plante, l'hème étant au contraire sous le contrôle du génome de la bactérie symbiotique. Cette protéine a pour rôle de réguler précisément la teneur en oxygène à l'intérieur de la nodosité et la synthèse d'ATP mais à un niveau suffisamment faible pour ne pas inactiver le système de la nitrogénase sensible à l'oxygène (Madigan et al., 2007). (Figure 10).

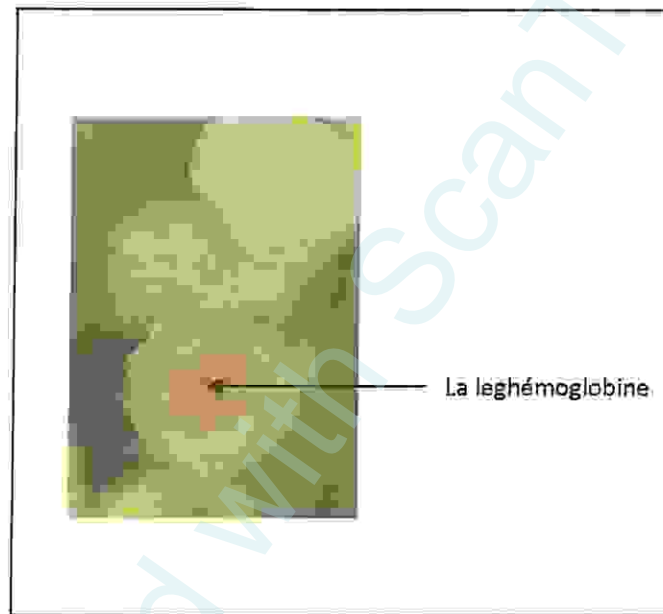


Fig 10 : la leghémoglobine nodulaire.

II – 3 – 4 - Les gènes nod

Les gènes *nod* qui, chez une souche définie de *Rhizobium*, contrôlent les étapes de la nodulation chez les légumineuses. La plupart de ces gènes sont généralement localisés sur des plasmides de grande taille appelés plasmides *Sym* (pour symbiose), sont hautement conservés dans les espèces de *rhizobia*, ces plasmides *Sym* portent d'autres gènes de spécificité définissant le spectre d'hôtes restreints d'une souche *Rhizobium*. Cette spécificité peut être transmise d'une souche d'un groupe d'infection croisée à une autre par le plasmide *Sym* (Perry et al., 2004).

Les gènes *nod* sont organisés en opérons, localisés entre deux groupes de gènes impliqués dans la fixation de l'azote, les gènes *nif*. Ils contiennent dix gènes parmi ceux-ci les gènes *nodA*, *nodB*, *nodC* qui sont interchangeable entre toutes les espèces de *Rhizobium*, impliqués dans la production d'oligosaccharides, appelés les facteurs *nod* qui sont notamment responsables de la déformation en crosse des poils absorbants et de la division des cellules du cortex de la racine aboutissant finalement à la formation des nodules; leur structure est constituée par un oligomère d'N-acétyl-glucosamine présent divers constituants (Madigan et al., 2007).

L'expression des gènes *nod* est régulée par un même mécanisme, qui fait intervenir les gènes *NodD*, les produits de ces gènes sont des protéines régulatrices, qui se fixent sur une séquence d'ADN, appelée *nod box*, présent en amont des opérons *nod*.

En présence de certains composés de plante présents dans les exsudats racinaires (flavonoïdes), les protéines *NodD* activent la transcription des différents opérons *nod* (gènes de structure), ces protéines sont capables de reconnaître les différents flavonoïdes (François et al., 1997). (Figure 11).

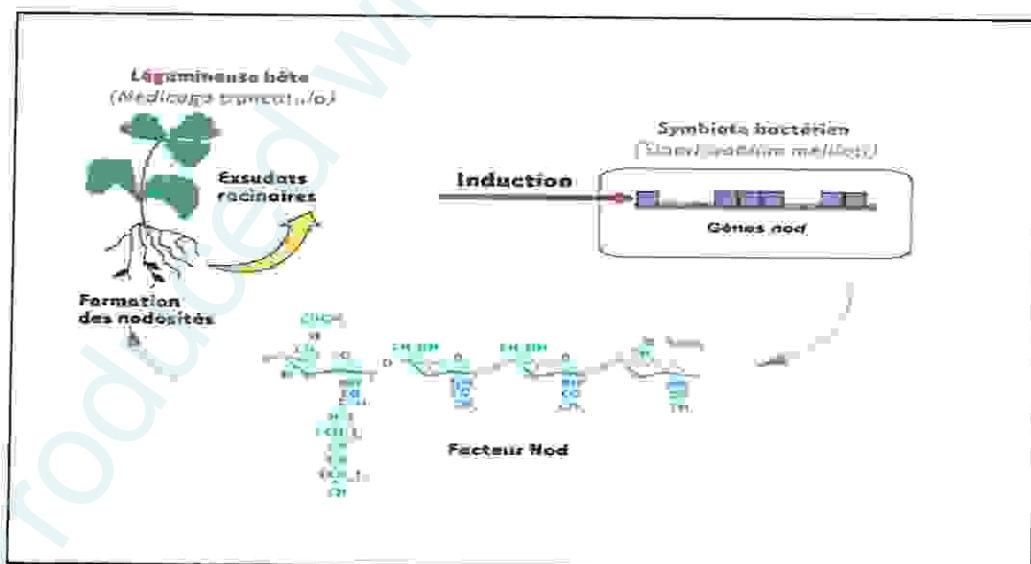


Fig 11 : Les facteurs NOD (François et al., 1997).

II – 3 – 5 - Inoculation

Opération qui met en contact par l'intermédiaire d'un substrat de culture l'extrémité des racines et un organisme symbiotique (bactérie, champignon). L'inoculation est efficace s'il y a constitution d'un organe mixte racine/organisme symbiotique (nodosité) efficace (Bruhier et al., 2003).

Inoculation des graines de légumineuse a pour but de revêtir chaque graine d'un nombre suffisamment élevé de *rhizobia* viables de la souche appropriée pour assurer une nodulation rapide et efficace au champ.

Vincent (1970) estime que le chiffre de 300 organismes par graine est un minimum pour assurer une nodulation efficace, mais en pratique on en utilise beaucoup plus (Skerman, 1982).

L'infestation du terrain peut être réalisée par épandage de quelques kg d'un sol de la même zone où l'association légumineuse - *Rhizobium* est efficiente. Mais cette technique doit être réalisée avec précaution car elle risque aussi de conduire à l'infestation du sol par des maladies, le rendant ainsi impropre à certaines cultures (bactéries telles que le *Pseudomonas solanacearum*, mais aussi champignons, nématodes, ...). [34]

Partie II

L'électrophorèse

Produced with Scantopdf

Partie II : L'électrophorèse

I - L'électrophorèse

Comme leur nom l'indique, le groupe des méthodes connus sous le nom d'électrophorèse est une technique de séparation basée sur les différences de vitesse de migration dans une solution tampon, des molécules chargées (protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques et nucléotides), soumise à l'action d'un champ électrique continu (Skoog et al., 2003).

L'origine de cette technique a été imaginée par **S.E. Linder** et **H. Picton** en 1892 qui se sont inspirés des études d'Hermann Von Helmholtz menées sur l'électro-osmose. Celui-ci constate qu'il est possible, sous un champ électrique, de déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge.

En 1937, **Arne Wilhelm Kaurin Tiselius**, posait au point la première électrophorèse: l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer les protéines du sérum sanguin en appliquant un champ électrique. Cette technique ne permet toutefois pas de séparer totalement les protéines. Il est néanmoins possible de mettre en évidence les frontières formées par des méthodes optiques comme la fluorescence, l'absorption des UV ou l'indice de réfraction.

En 1939, **P. König** et **D Von Klobusitzky** ont séparé avec succès les composants du venin de serpent en élaborant la technique d'électrophorèse sur papier.

En 1952, **Pierre Grabar** élaborait, en collaboration avec **C.A. Williams**, une méthode connue sous le nom d'analyse immuno-électrophorétique, qui permet d'analyser de manière précise des mélanges très complexes d'antigènes.

En 1955, **O. Smithies** mit au point la technique d'électrophorèse en gel d'amidon.

En 1957, **Joachim Kohn** séparait les différents phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose.

En 1969, Beber et Osborn introduisaient l'agent dénaturant SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous-unités protéiques. [35]

La technique électrophorétique possède de nombreux avantages :

- le traitement simultanément de plusieurs échantillons en même temps.
- la séparation est fine.
- la quantité de produit nécessaire est très petite.
- des protéines ne différant que par un seul acide aminé peuvent être séparées.
- des méthodes enzymatiques et immunologiques permettent la révélation des substances.
- il est possible de quantifier les différentes fractions séparées.
- cette méthode est extrêmement simple à mettre en œuvre aujourd'hui notamment grâce à l'utilisation de nouveau support plus performant comme le gel d'agarose, d'amidon, ou de polyacrylamide. La simplicité et les performances de cette méthode lui valent d'être utilisée quotidiennement. [36]

L'électrophorèse est devenue de plus en plus importante pour:

- la recherche fondamentale, la recherche biomédicale dans le laboratoire.
- le diagnostic de la maladie en milieu clinique .
- la détection et la quantification d'infimes traces de biomolécules nombreuses dans un mélange.
- la détermination de certaines propriétés physiques telles que le poids moléculaire , point isoélectrique, et l'activité biologique. [37]

Les séparations par électrophorèse sont en général effectuées de deux manières tout à fait différentes, la première est appelée l'électrophorèse en veine liquide "libre" dans laquelle les molécules à séparer étaient directement dissoutes dans le tampon, sauf en cas d'électrophorèse capillaire, l'autre, électrophorèse de zone est la méthode classique, utilisée

depuis de nombreuses années pour séparer les espèces biologiques et biochimiques de masse moléculaire élevée, les séparations de zone sont menées sur un support homogène, poreux et inerte convenable est imprégné de tampon (Borel et al., 1997).

Différents types de support peuvent être utilisés:

Support en papier ou acétate (la migration des mélanges s'effectue à la surface de celui-ci).

Support en polyacrylamide ou agarose (la migration des mélanges s'effectue à l'intérieur même du support).

Les montages peuvent être mis en place:

Montage horizontal : utilisé pour les supports en acétate de cellulose ou en papier. Le support se présente sous forme de longue et étroite bande.

Les extrémités du support plongent dans un tampon d'électrode, créant une mince couche d'eau à sa surface.

Montage vertical : utilisé pour les supports en gel polyacrylamide ou, plus rarement d'agarose. Le gel est souvent préparé peu avant usage en le coulant entre 2 plaques de verre. Durant la gélification on aura pris soin de faire des puits où on déposera les échantillons. Chaque extrémité du gel est mise en contact avec un tampon contenant des électrolytes qui permettra la propagation d'un courant dans le gel. [35]

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Un grand nombre de protéines ou d'acides nucléiques de taille et de forme différentes ont presque le même rapport de charge : masse, par conséquent, l'électrophorèse de ces macromolécules en solution conduit à une séparation faible ou nulle des molécules de longueurs différentes. Toutefois, une séparation efficace des protéines et des acides nucléiques peut être obtenue grâce à l'électrophorèse dans différents gels plutôt qu'en solution liquide.

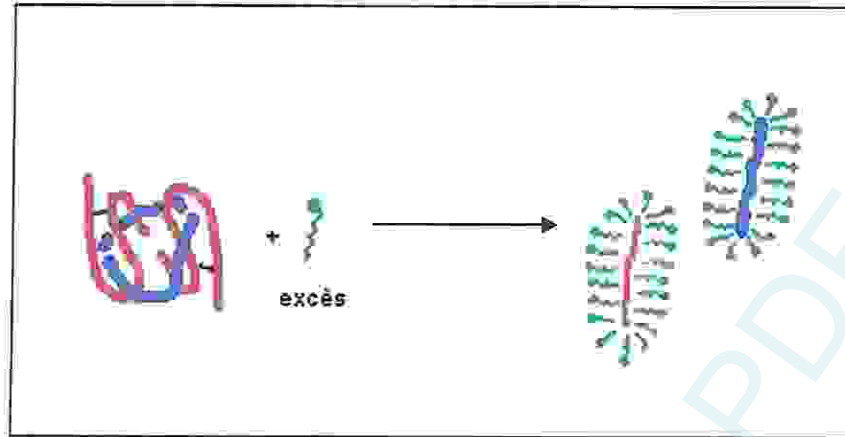


Fig 12 : traitement des protéines par le SDS [35]

SDS - PAGE est une méthode très fine qui sert à déterminer les faibles différences caractérisant les souches bactériennes au sein de la même espèce, cette technique de criblage, connu par son important pouvoir de discrimination, permet de distinguer les espèces bactériennes de la même souche. Sa bonne reproductibilité a déjà été déterminé par Morena et al (1993); de Lajudie et al et Dupuy et al (1994) par l'utilisation de plusieurs subcultures et des extraits différents de la même souche [38] (Figure 13).

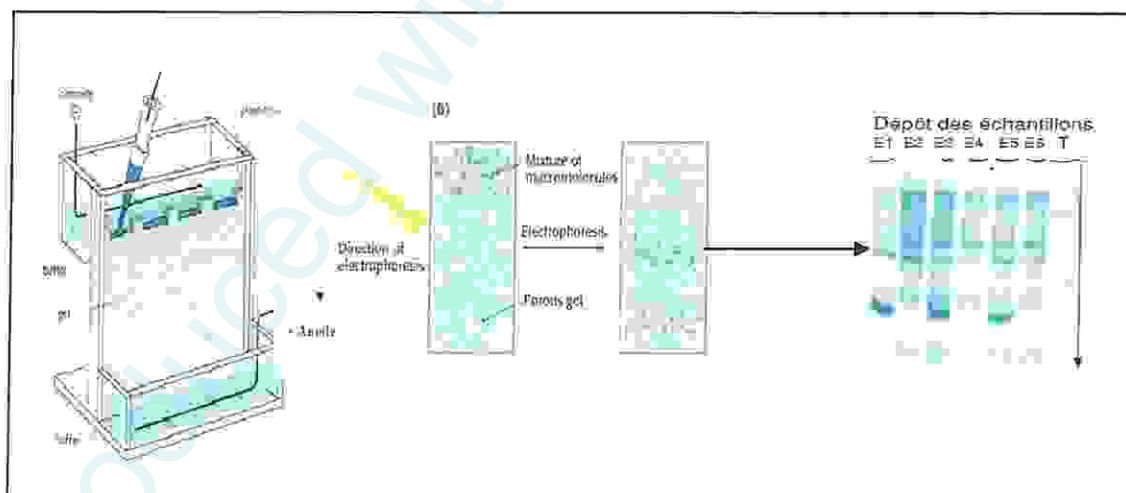


Fig 13 : électrophorèse SDS - PAGE, [38]

Cette technique est mieux adaptée à l'exécution des molécules les plus petits, comme les protéines, a un certain nombre d'utilisations, notamment :

- établir la taille des protéines.
- identification des protéines.
- détermination de pureté de l'échantillon.
- identification des ponts disulfure.
- la quantification des protéines.
- éprouver les applications. [39]
- mettre en évidence la diversité des *Rhizobium* associés aux légumineuses à partir d'une comparaison des profils électrophorétiques de protéines totales de la collection des souches à ceux des souches de référence (Drevon et al., 2003).

Matériel et méthodes

I - Isolation des Rhizobiums à partir des nodules

I - 1- Collecte des nodules.

La collecte des nodules est faite à partir d'une plante légumineuse du genre *Hedysarum coronarium*, située dans la région de l'université 08 Mai 45 de Guelma (derrière le département de biologie).

La collecte est réalisée selon la méthode de Vincent (1970) et Beck et al (1993) :

- Creuser environ 15 cm autour de la plante et à 20cm de profondeur.
- Soulever lentement le bloc de sol et des racines.
- Enlever soigneusement le sol pour ne pas endommager les racines secondaires où il y a beaucoup de nodules.
- Placer toute la plante dans un sachet en plastique.
- Au laboratoire, enlever la partie aérienne de la plante et laver délicatement les racines sous l'eau de robinet.
- Pour des raisons de stockage et d'isolement, on coupe les racines de 1 à 2 mm de site d'attachement de nodules ce qui permet d'obtenir des nodules intacts et d'améliorer les chances d'avoir des cultures variables et propres de bactéries.
- Après lavage, sécher les nodules avec du papier absorbant avant les stocker. (Figure 14).

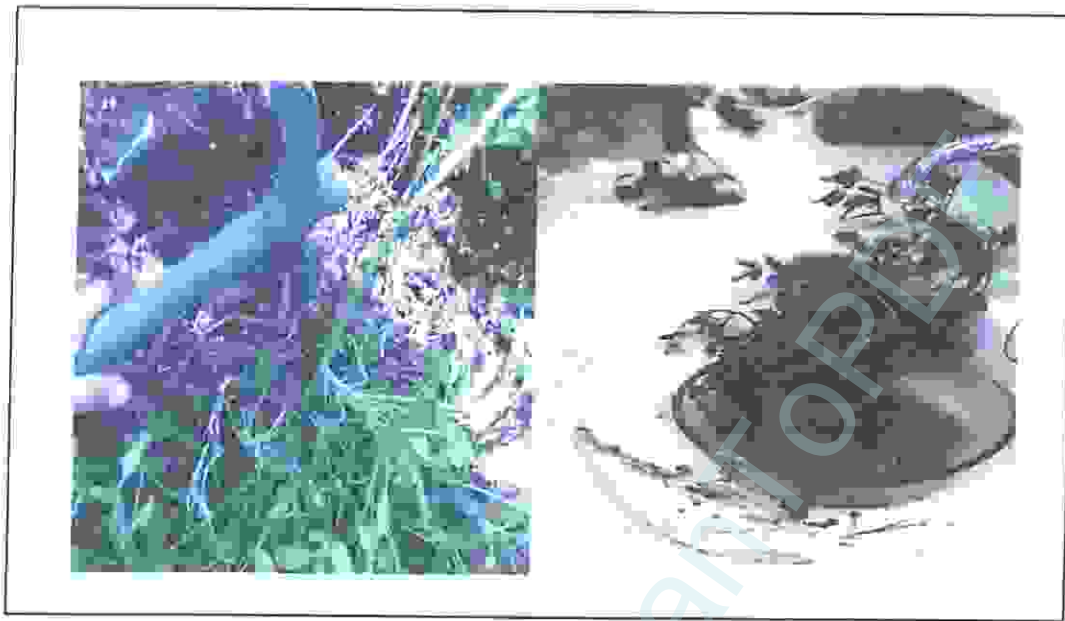


Fig 14 : collecte des nodules

I - 2- Conservation des nodules

Afin d'un usage immédiat, on a stocké les nodules frais dans le réfrigérateur à 4°C pendant 48h.

Pour permettre une longue conservation, la dessiccation des nodules est recommandée. Cette dessiccation est réalisée dans des flacons en verre contenant un élément déshydratant tel que le CaCl_2 (au fond des flacons) et une couche épaisse de coton sur laquelle reposent les nodules. (Figure 15).

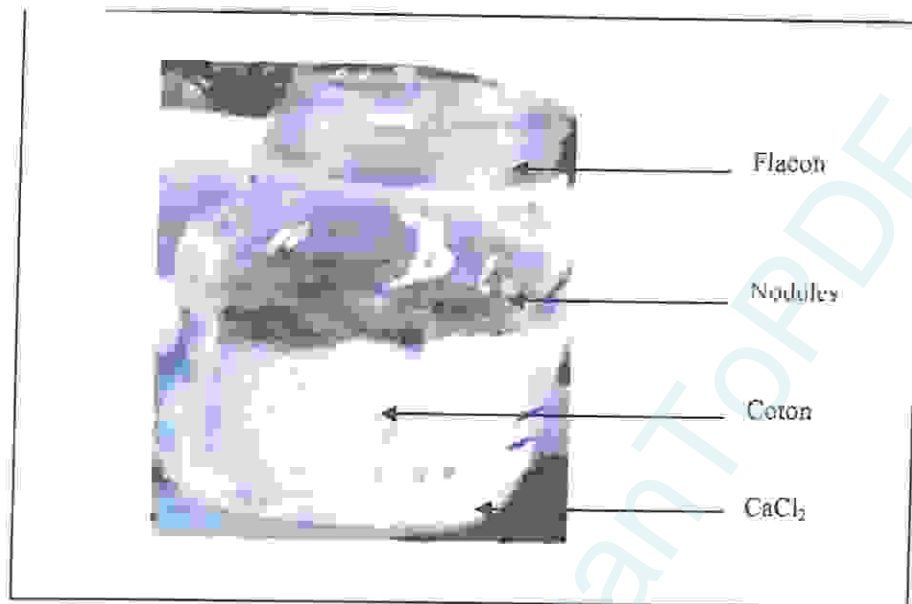


Fig 15: conservation des nodules.

1 – 3 - Isolement des bactéries

1 – 3 – 1 - Stérilisation des nodules

Les nodosités conservées sont réhydratées en les plaçant dans l'eau distillée stérile pendant 24h à 4°C, puis une heure à la température ambiante.

Devant le bec Bensen et dans des conditions microbiologiques, les nodules sont immergés dans l'éthanol 90° pendant 10 secondes, puis transférés rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0,1% pendant 3 minutes, et enfin on rince avec l'eau distillée stérile 10 fois.

1 – 3 – 2 - Isolement selon la méthode des nodules écrasés

Dans une boîte de Pétri stérile, on dépose un nodule stérile avec 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile et l'écrase avec une pince stérile. (Figure 16).



Fig 16 : l'écrasement des nodules

Après couler les géloses (YMA - Rouge Congo, GPA - BCP) dans 06 boîtes de Pétri stériles, et à l'aide d'une anse de platine on étale la suspension de nodules (le jus de nodules) selon la technique des stries sur les milieux YMA - Rouge Congo, GPA - BCP dans le but à isoler des simples colonies de bactéries.

Les boîtes préparées sont bien fermées et incubées à 30°C pendant 48h.

I-3-3 - Culture : milieu solide ↔ liquide

A partir des colonies développées sur le milieu YMA - Rouge Congo, des cultures dans un milieu YMB sont réalisées (dans 06 tubes à vice) et incubées à 30°C pendant 48h.

Dans 06 boîtes de Pétri contenant du YMA, des prélèvements à partir du milieu liquide YMB (après incubation) sontensemencés selon la méthode des stries, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48h.

Nous avons utilisé une souche de référence A6 (*Rhizobium sllae*) isolées et identifiées par le professeur Benguedouar Ammar, UMC (université Mantouri, Constantine).

Les colonies développées sur le milieu solide YMA (les souches N1, N2,...N6 et la souche de référence A6) sont transférées sur un milieu liquide YMB dans des tubes à vis et incubées à 30°C pendant 18h.

II - Coloration de Gram

Devant le bec benzène et dans des conditions microbiologiques, nous avons essayé de réaliser une coloration de Gram sur des frottis à partir des souches bactériennes cultivées antérieurement.

- recouvrir de violet de gentiane en versant le colorant en bout de lame et en le faisant glisser le long de la lame. Laisser agir 1 minute.
- pencher la lame et éliminer le violet de gentiane en faisant couler sur la lame la solution de lugol. Laisser agir 30 secondes, puis rincer à l'eau distillée pour éliminer l'excédent de lugol.
- verser quelques gouttes d'alcool sur le frottis tenu verticalement jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté (5 secondes environ), rincer avec un jet de pissette d'eau distillée.
- recolorer par de la fuschine en versant le colorant en bout de lame et en le faisant glisser le long de la lame. Ne pas verser la fuschine sur le frottis pour éviter une coloration trop intense. Laisser agir 1 minute, rincer avec un jet de pissette d'eau distillée. Laisser sécher, puis ajouter une goutte d'huile de cèdre et voir sous le microscope optique (grossissement x100).

III - L'électrophorèse SDS – PAGE

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

III -1 - Préparation des extraits protéiques

Une aliquote de 100 μ l de chaque culture bactérienne, en phase de croissance exponentielle en milieu YMB, est centrifugée à une vitesse de 6000 tours/min pendant 15 min à 4°C et le culot mis en suspension dans 50 μ l de tampon de lyse et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (p/v) en conditions dénaturantes.

Tampon d'échantillons

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

Dans la préparation des échantillons après addition du SDS et β -mécaptoéthanol, la solution est portée au bain-marie bouillant 3 min pour une dénaturation complète des protéines. Ce traitement est nécessaire pour la rupture des ponts disulfure.

III -2 - préparation des solutions stocks (solutions mères)

Solution d'acrylamide :

Acrylamide	60 g
Bis acrylamide	1.6 g
H ₂ O	QSP 200 ml

Tampon de séparation : Tris-HCl 3 M pH 8,8

Tris	72,7 g
SDS	1,6 g

Mecaptoéthanol (MCE) 0,8 ml

H₂O QSP 200 ml

Ajuster à pH 8,8 avec HCL

Tampon de concentration : Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

Tris 12,1 g

SDS 0,8 g

Mecaptoéthanol (MCE) 400 µl

H₂O QSP 200 ml

Ajuster à pH 6,8 avec HCL.

III – 3 - Préparation des gels

Gel de séparation à 12%

Solution d'acrylamide 10,4 ml

Tampon de séparation 3,14 ml

TEMED 12,5 µl

H₂O QSP 25 ml

Gel de concentration à 7,5%

Solution d'acrylamide 5 ml

Tampon de concentration 5 ml

TEMED 20 µl

H₂O QSP 20 ml

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

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

Gel de séparation	140 μ l
Gel de concentration	200 μ l

III - 4 - Préparation du tampon de migration pH 8,3

Tris	1,06 g
Glycine	5,04 g
SDS	0,35 g
Mecaptoéthanol (MCE)	175 μ l
H ₂ O	QSP 350 ml

III - 5 - Préparation des plaques de gel

Monter les plaques dans le couleur (1 plaque blanche + 1 espacer de chaque côté + 1 plaque en verre + 1 intercalaire en plastique etc.).

- couler le gel de séparation et recouvrir d'eau + isopropanol.
- retirer l'eau + l'alcool et couler le gel de concentration.
- placer rapidement le peigne.
- laisser polymériser, démonter et retirer le peigne.
- placer les plaques dans l'appareil à électrophorèse et remplir avec le tampon de migration.

III - 6 - Dépôts des échantillons et migration électrophorétique

Avant de déposer les échantillons, remplir les puits avec le tampon de migration.

A l'aide d'une seringue Hamilton, un volume de 20 μ l de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque puits.

La migration électrophorétique est réalisée en appliquant un ampérage constant de 80 mA et un voltage de départ 127 V qui atteint à la fin de migration la valeur 287 V.

La migration dure jusqu'à 5 heures, et elle est arrêtée lorsque le fond formé par l'indicateur bleu de bromophénol arrive de 3 à 4 mm de l'extrémité inférieure du gel.

III – 7 - Révélation des bandes protéiques

Solution de coloration

Méthanol	40%
Acide acétique	10%
Bleu de Comassie	0,1%
Eau distillée	QSP 200 ml

Après migration, le gel est démoulé. Le gel de concentration est écarté, et donc le gel de séparation est mis dans un récipient contenant la solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation.

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

Résultats et discussions

I - Les caractères culturaux

Les coloniesensemencées sur les milieux solides (YMA-Rouge Congo, GPA - BCP) apparaissent au bout de 24h, elles présentent une couleur blanche à crème, forme homogène et un aspect lisse brillant avec une texture translucide, quelques colonies sont séparées:

Les souches bactériennes dans les 06 boites présentent quelques modifications :

- sur le milieu YMA - Rouge Congo absorbent le Rouge Congo.
- sur le milieu (GPA - BCP) les boites : N2, N3, N4, N6 ne modifient pas le pH et le milieu reste de couleur mauve, la boite N5 subit un virage partiel de couleur mauve vers le jaune et la boite N1 présente un changement ou un virage total de couleur mauve et devient jaune. (Figure 17).

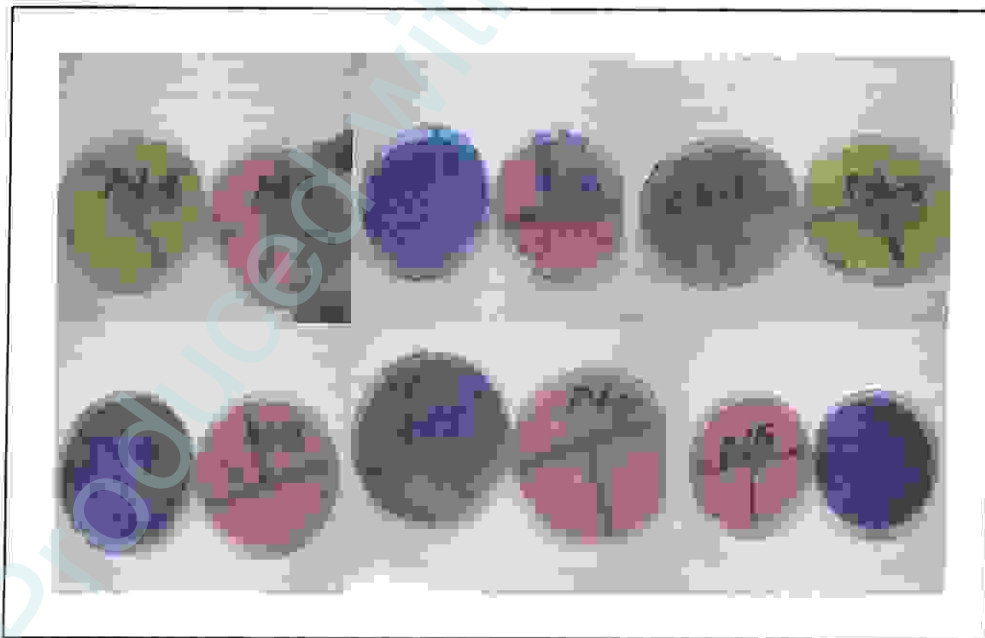


Fig 17 ; culture des bactéries sur milieu YMA - RC et GPA - BCP.

- le milieu YMB devient trouble grâce à la poussé des bactéries.
- apparition des colonies crémeuses sur le milieu YMA. (Figure 18).

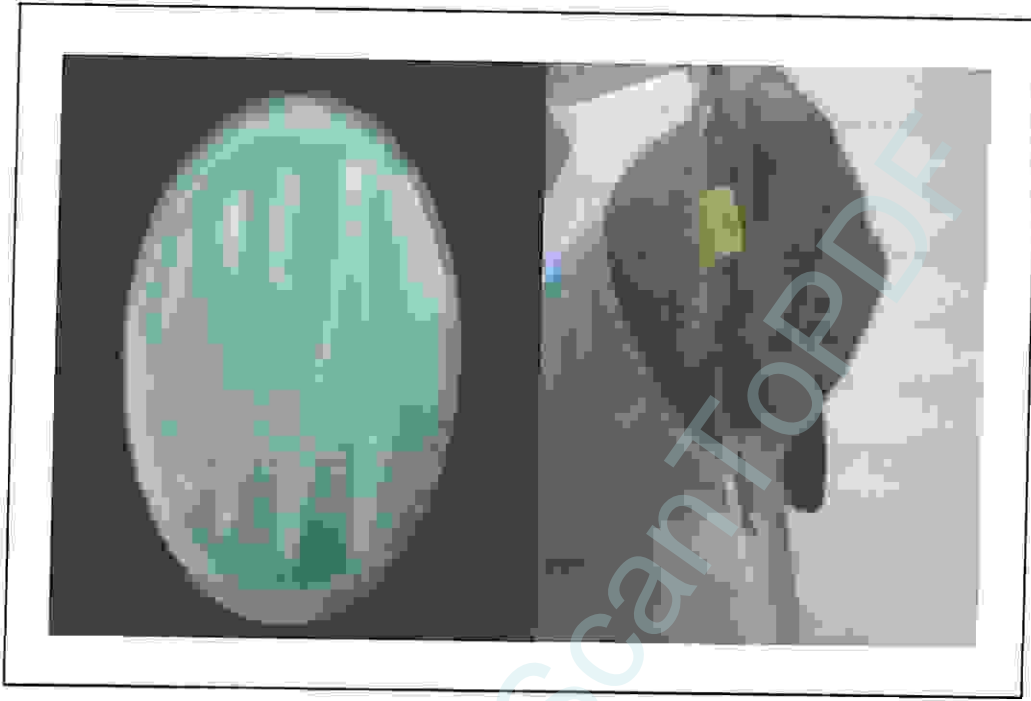


Fig 18 : croissances bactérienne sur YMA et dans YMB.

II - Les caractères microscopiques et morphologiques

II- 1 - Coloration de Gram

Après réalisation de la coloration différentielle de Gram, les bactéries apparaissent sous forme bâtonnet à extrémités arrondies et de différentes tailles, de couleur rose, Gram négatif.

- le violet de gentiane colore en violet le contenu de la bactérie et se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries.
- le lugol permet de fixer cette coloration interne.
- l'alcool sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « gram négative ».
- en effet, celles ci ont une paroi pauvre en peptidoglycane, donc plus fine qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile) ou le mélange alcool- acétone, et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane.
- une contre coloration ayant pour but de donner aux bactéries précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. (Figure 19).

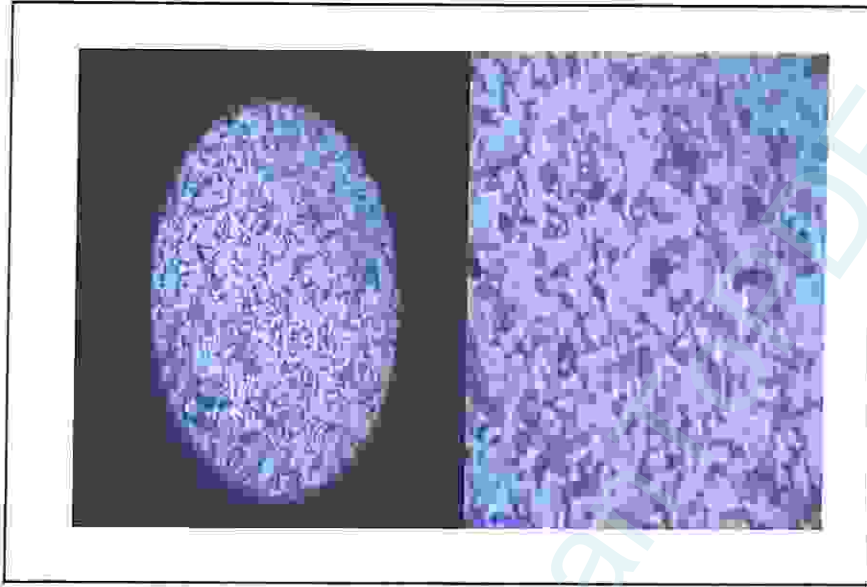


Fig 19 : Bactéries Gram négatif isolées à partir de la boîte N5 vues au microscope optique (x 100).

III - Révélation électrophorétique

L'utilisation de l'électrophorèse SDS PAGE a pour but de séparer le profil protéique des souches bactériennes étudiées selon leurs poids moléculaire et le comparer avec celui d'une souche de référence A6 du genre *Rhizobium*.

Après 6 heures de migration, les échantillons déplacent vers le pôle positif avec une distance de 1,5 cm, et après 16 heures ils ont migré avec une distance de 4,5 cm. (Figure 20).

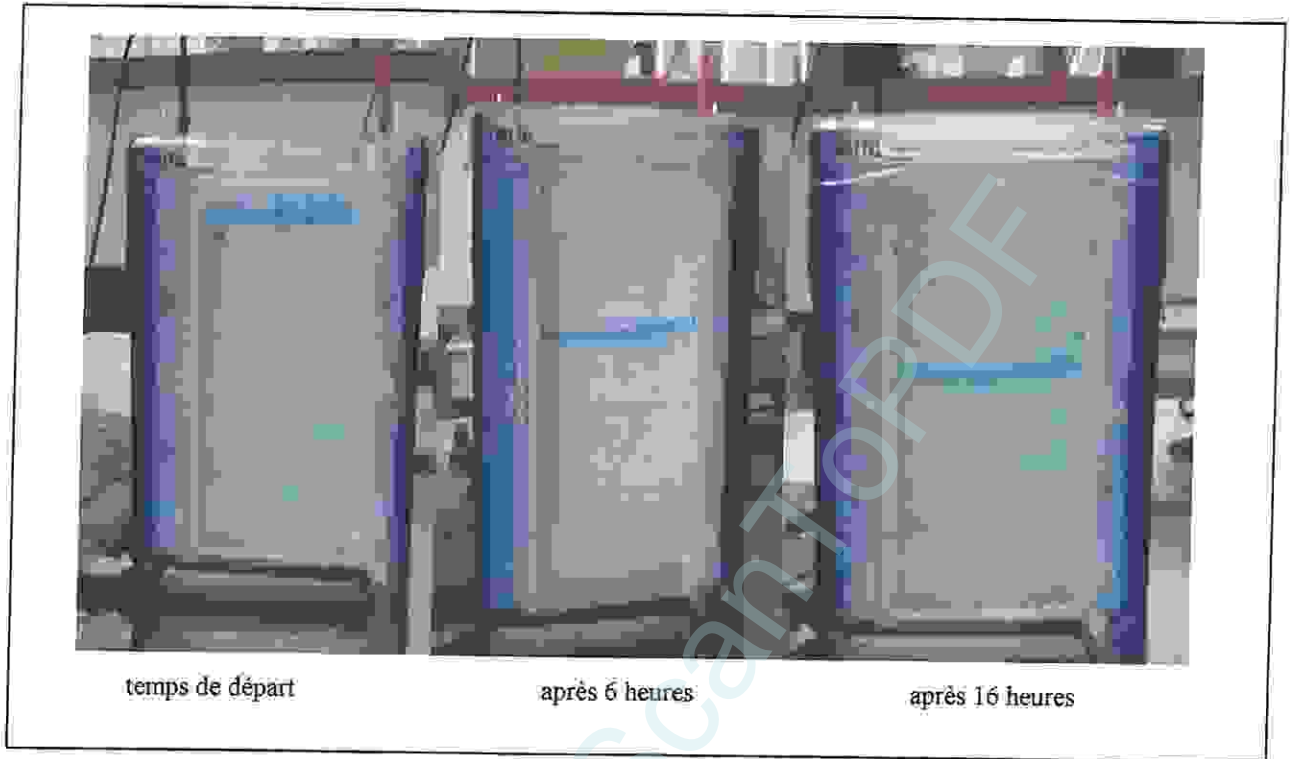


Fig.20 : la migration électrophorétique.

La migration des bandes protéiques était très lente.

Comme la technique est réalisée pour la première fois au niveau de notre département, en plus de manque de produits et la difficulté trouvée avec les plaques, il était difficile de voir un bon résultat pour l'interpréter.

Nous avons essayé de réaliser la coloration puis la décoloration de gel, mais les résultats restent illisibles. Donc on ne peut pas dire que les bactéries que nous l'étudions sont *Rhizobium Sullae*. (Figure 21).

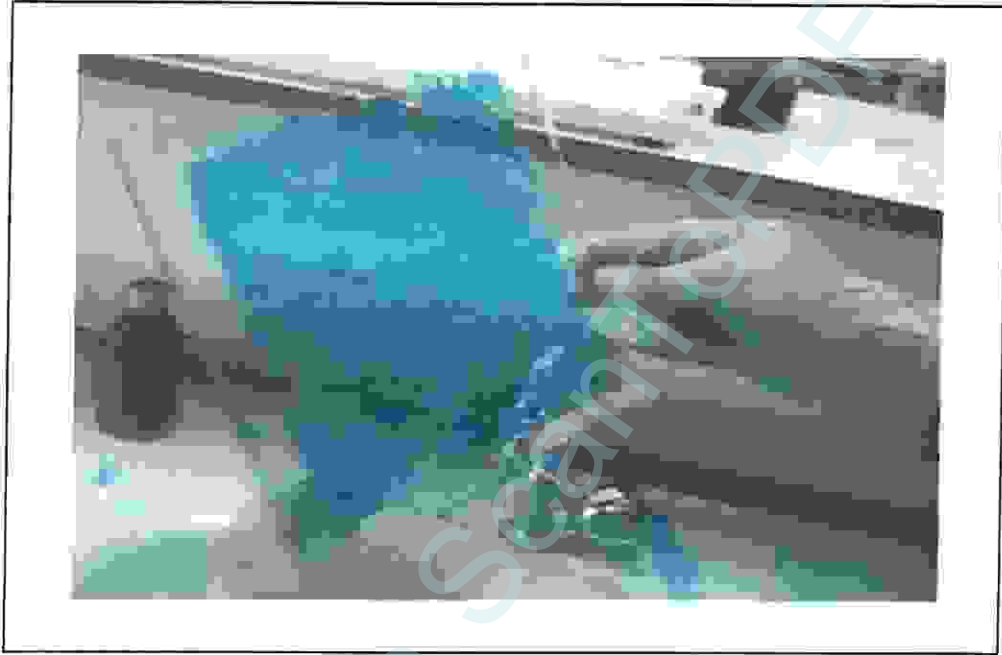


Fig 21 : gel coloré.

Dans notre étude, le rôle d'électrophorèse c'est de contribuer à l'identification des souches isolées en comparant les profils protéiques des isolats avec celui de la souche de référence et de déterminer le coefficient de similitude.

La comparaison protéine- protéine est en relation étroite avec l'ADN - ADN ce qui donne une idée préalable sur l'information de l'identification génotypique des isolats, et la détermination du statut taxonomique des souches

Exemple :

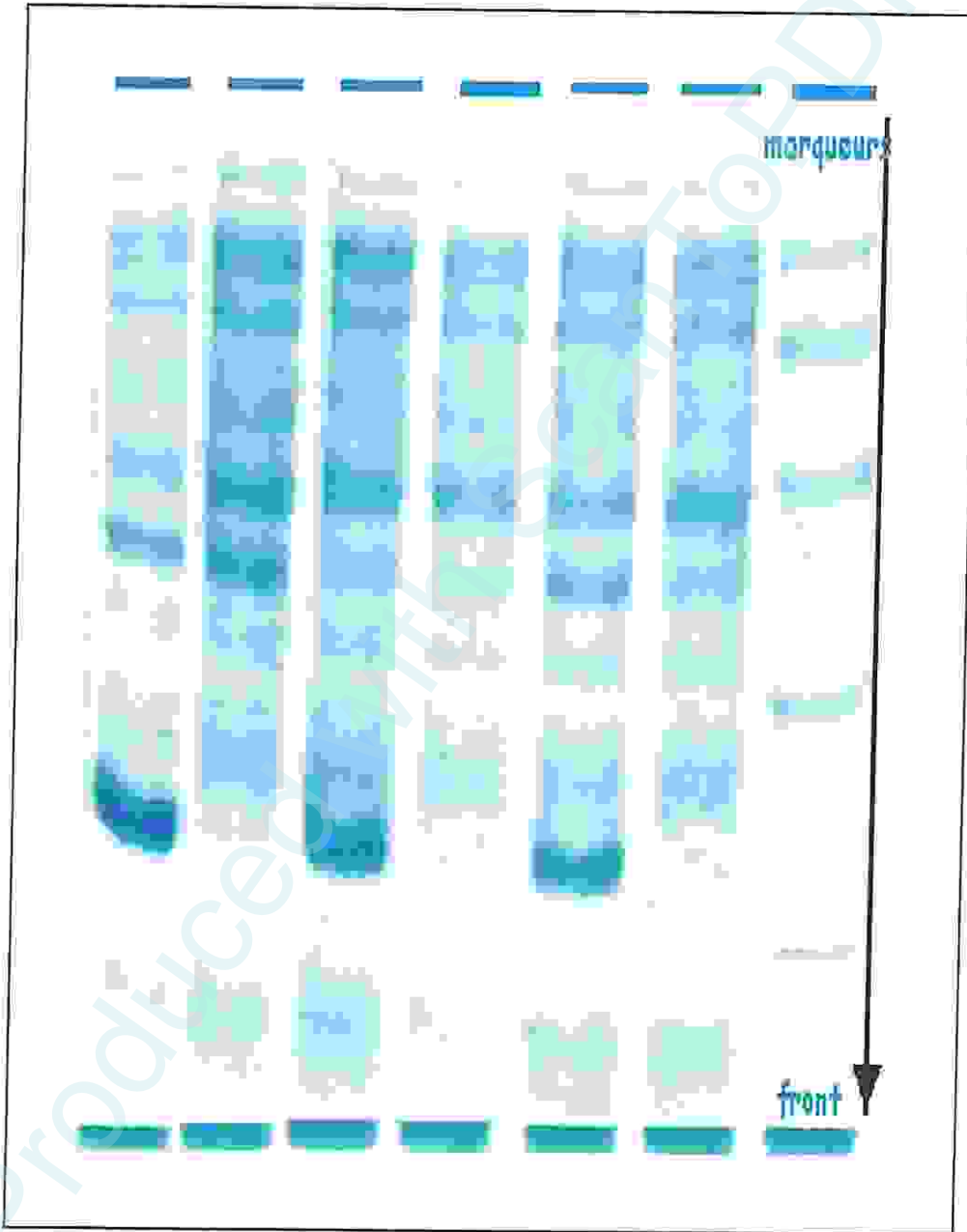


Fig 22 : révélation des bandes électrophorétique. [39]

Conclusion

Il existe des plantes – notamment les légumineuses – qui ne sont pas capables de fixer l'azote atmosphérique que par l'intermédiaire de partenaires symbiotiques : les *Rhizobiums*, et cela dans un contexte de microaérobie.

Dans notre étude, nous avons essayé d'isoler et de caractériser des souches bactériennes à partir des nodules d'une légumineuse du genre *Hedysarum coronarium*. Cette caractérisation est faite en présence d'une souche de référence A6 isolées à partir de la même plante, en comparant le profil protéique des isolats avec celui de la souche A6.

La coloration de Gram résulte des courts bâtonnets à extrémités arrondies et de différentes tailles, de couleur rose, Gram négatif.

- sur le milieu YMA - Rouge Congo les bactéries poussent rapidement et absorbent le Rouge Congo.

- sur le milieu (GPA - BCP) les boîtes : N2, N3, N4, N6 ne modifient pas le pH et le milieu reste de couleur mauve, la boîte N5 subit un virage partiel de couleur mauve vers le jaune et la boîte N1 présente un changement ou un virage total de couleur mauve et devient jaunie.

- sur le milieu YMB les bactéries poussent par des troubles.

- sur le milieu YMA, développement des bactéries avec apparition des colonies crémeuses.

Après la migration des échantillons sur gel, on n'a pas pu faire la révélation des bandes protéiques, il était très difficile à séparer les plaques de verre et démouler le gel, alors l'interprétation des résultats qui n'étaient pas visibles est impossible. Donc on ne peut pas dire que les bactéries que nous l'étudions sont *Rhizobium sulae*.

Le nombre croissant des espèces de *Rhizobium* et l'évolution continue de la recherche taxonomique posent un problème pour mettre en évidence une classification taxonomique courante et appropriée. Pour confirmer la position taxonomique des isolats, le travail doit être justifié par une étude génotypique.

Les annexes**Milieu YMB (yeast mannitol broth).**

Mannitol	10 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	0,1 g
Extrait de levure	0,5 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu YMA (yeast mannitol agar)

Mannitol	10 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	0,1 g
Extrait de levure	0,5 g
Eau distillée	1000 ml
L'agar	15 g

Milieu YMA Rouge Congo

YMA	1000 ml
Solution stock de Rouge Congo	10 ml
Agar	15 g

Solution stock de Rouge Congo

Rouge Congo	1 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu GPA - BCP : (glucose peptone agar)

Glucose	10 g
Peptone	5 g
Solution stock de BCP	10 ml
Eau distillée	1000 ml
Agar	15 g

Solution stock de pourpre de bromocrésol

BCP	10 g
Ethanol 90°	1000 ml

Chlorure de mercure acidifié 0,1%

HgCl ₂	1 g
HCL	5 ml
Eau distillée	1000 ml

Références bibliographiques

- 1 - Andouin., Bourdon I., Brongniart., Cambessde., De Candolle., Delafosse G., Deslonchamps E., Drapiez., Dumas., Edwards., Edwards H. M., Fée A., Hilairs G. S., Guérin., Guillemin., De Jussieu A., Kunth., Latreille., Lesson., Pevost C., Richard A., De Saint-Vincent B., 1829. – Dictionnaire classique d'histoire naturelle, volume 15. Tome Quinzième. Edition RUA-S, PARIS. 764 p.
- 2 - Bonduel P., Delavie A., Valerie., Dersu G., Goutier J., Koenig O., Loaec M. H., Wengrow R., Willery D., 2004. - Encyclopédie universelle des 15000 plantes et fleurs de jardin. Edition La rousse. 1080 p.
- 3 - Borel J.P., Randoux A., 1997. - Biochimie dynamique. Edition département De Boeck Université Paris, Bruxelles. 942 p.
- 4 - Bruhier S. V., Piedallu C., Delory I., 2003. - Réaménagement forestier des carrières de granulats. Editions Quae. 319 p.
- 5 - Burnie G., Forrester S., Greig D., Guest S., Harmony M., Hobley S., Jackson G., Lavaraack P., Ledgett M., Medonald R., Macoboy S., Molyneux B., Moodie D., Moore J., Newman D., North T., Pienaar K., Purdy G., Ryan S., Schien G., Silk J., 2006. - Encyclopédie de botanique et d'horticulture plus de 10000 plantes du monde entier. Edition PAO, Paris. 1020 p.
- 6 - Davet P., 1996. - Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris. 383 p.
- 7 - De Candolle A. P., 1825. - Mémoires sur la famille des légumineuses - Nature. Edition Université d'Oxford. 525 p.
- 8 - De Wit H. C. D., Baudière A., 1994. - Histoire du développement de la biologie, Volume 3. Edition Pudoec. 635 p.

- 9 - **Diaw F. N., 2002.** – Utilisation des inoculums de *Rhizobium* pour la culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*) au Sénégal. Thèse de Doctorat. Université Cheika Anta Diop Dakar. 96 p.
- 10 - **Drevon J. J., B. Sifi., 2003.** - Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris. 418 p.
- 11 - **Duhoux E., Nicole M., 2004.** -Biologie végétale : association et interactions chez les plantes. Edition Dunod. 166 P.
- 12 - **François A. J., Brochant de Villers M., 1827.** - Dictionnaire des sciences naturelles; dans lequel on traite Science. 562 p.
- 13 - **François J., Gaudry M., 1997.** -Assimilation de l'azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique. Edition INRA, Paris. 422 p.
- 14 - **Frontier S., Pichod -Viale D., 1999.** -écosystème : Structure. Fonctionnement. Evolution. 2^e édition révisée et augmentée. Edition DUNOD. 447 p.
- 15 - **Grouzis M., Le Floc'h É., 2003.** -Un arbre au désert: *Acacia raddiana*. Editions IRD. 313 p.
- 16 - **Henri J., Saint-Hilaire J., 1809.** -Plantes de la France: décrites et peintes d'après nature. Edition Harvard university.
- 17 - **Hopkins W.G., 2003.** -Physiologie végétale. Edition De Boeck. 532 p.
- 18 - **Karp G., 2004.** - Biologie cellulaire et moléculaire. Edition De Boeck, Bruxelles. 850 p.
- 19 - **Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Darnell J., Kaiser C. A., Krieger., Scott., Zipursky., Darnell., 2005.** -Biologie moléculaire de la cellule. Edition De Boeck, Bruxelles. 1096 p.
- 20 - **Luttge U., Klge M., Bauer G., 1997.** -Botanique. Edition TEC et DOC, Paris. 604 p.
- 21 - **Madigan M. T., Martinko J. M., Brock T. D 2007.** -Biologie des microorganismes. Edition PEARSON.1088 p.
- 22 - **Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R., 2008.** -Botanique : Biologie et Physiologie Végétales. Edition MOLOINE, Paris. 490 p.

- 23 - Neyra M., 1992. -Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote: légumineuse/rhizobium. Edition FAO.
- 24 - Perry J. J., Staley J. T., Lory S., 2004. -Microbiologie. Edition Dunod 891 p
- 25 - Pousset J., 2008. -Agriculture naturelle : répondre aux nouveaux défis. Edition Agridécisions. 444 p.
- 26 - Prescott., Harley., Klein., 1995. -Microbiologie. Edition De Boeck.1014 p.
- 27 - Ramade F., 2003. -Eléments d'écologie. Edition Dunod, Paris.690 p.
- 28 - Raven., Evert., Eichhonn., 2000. – Biologie végétale. Edition De Boeck, Paris.738 p.
- 29 - Raven P. H., Evert, R. F., Eichhorn S.E., Bouharmont J., 2003. -Biologie végétale. Edition De Boeck. 968 p.
- 30 - Raven., Evert., Eichhonn., 2007. – Biologie végétale. Edition De Boeck, Paris. 733 p.
- 31 - Robert D., Catesson A.M., 2000. -Organisation végétative. Nouvelle édition DOIN. 356 p.
- 32 - Schvartz C., Decroux J., Muller J.C., Comité français d'étude et de développement de la fertilisation raisonnée., 2005. -Guide de la fertilisation raisonnée: grandes cultures et prairies. Editions France Agricole, Paris. 414 p.
- 33 - Skerman P. J., 1982. - Les Légumineuses fourragères tropicales. Edition FAO,666 p.
- 34 - Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 2003. -Principes d'analyse instrumentale. Edition De Boeck, Paris. 968 p.
- 35 - Svistoonoff S., 2003. - Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse de Doctorat. Université. Montpellier II – Sciences et Techniques du Languedoc UFR Des Sciences.67 p.

المخلص :

السلة نبات بقولي بإمكانه إقامة علاقة تعايش مع بكتيريا التربة (*Rhizobium*) لتثبيت الأزوت هذه العلاقة تؤدي إلى تشكيل عقد بكتيرية على مستوى جذور هذا النبات.

أجريت سلسلة دراسات ظاهرية التي استلزمت سلسلة تجارب تنموية على السلالات البكتيرية المعزولة من العقد الجذرية للنبات البقولي (السلة) المقطوف من جامعة قلمة 08 ماي 45 (خلف قسم البيولوجيا) هذه الدراسات بينت أن هذه البكتيريا لها مميزات شبيهة ب (*Rhizobium*).

إجراء صبغة (Gram) على السلالات المعزولة أعطت عصيات سالبة (Gram) بعد تطبيق جهاز الجرة الكهربائية على هلام متعدد (acrylamide) لم يتمكن من الحصول على الأشرطة البروتينية التي كان من الصعب الحصول على نتائج يمكن تفسيرها و بالتالي لا يمكننا القول بأن البكتيريا التي تمت دراستها من نوع (*Rhizobium*). توجد تقنيات أخرى من أجل التعرف ب (*Rhizobium*) ولتأكيد الوضع التصنيفي لهذه البكتيريا هذه الدراسة يجب أن تكمل بدراسة وراثية.

الكلمات المفتاحية: دورة الأزوت ، السلة، ريزوبيوم، التعايش، نموذج البروتين

Summary

Hedysarum coronarium is a legume which can establish symbiosis with nitrogen-fixing soil bacterium *Rhizobium*. This interaction leads to the formation of nodules on the root system of the plant.

The strains of bacteria isolated from nodules of *Hedysarum coronarium* collected from the region of Guelma University (Biology Department) have undergone a series of studies that included a phenotypic series of cultural tests: show that these bacteria phenotypic traits similar to *Rhizobia*. Gram staining performed on these strains of Gram negative rods gives.

After completion of electrophoresis on polyacrylamide gel, we could not make the protein banding it was very difficult to obtain interpretable results; therefore we can not say that the bacteria studied are *Rhizobia*.

There are other techniques for the identification of rhizobia, and to confirm the taxonomic position of these bacteria, the study must be supplemented by a genotypic study.

Keywords

Nitrogen cycle, *Hedysarum coronarium*, *Rhizobium*, symbiosis, protein profile.

Produced with Scantopdf

Résumé

Hedysarum coronarium est une légumineuse qui peut établir une symbiose fixatrice d'azote avec une bactérie du sol *Rhizobium*. Cette interaction aboutit à la formation de nodules au niveau du système racinaire de la plante.

Les souches des bactéries isolées à partir des nodules du *Hedysarum coronarium* collectée à partir de la région de l'université de Guelma (département de Biologie) ont subi une série d'études phénotypiques qui inclue une série de tests culturels, montrent que ces bactéries présentent des caractères phénotypiques comparables aux *Rhizobia*. La coloration de Gram effectuée sur ces souches donne des bâtonnets Gram négatif.

Après la réalisation d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, on n'a pas pu faire la révélation des bandes protéiques; il était très difficile à obtenir des résultats interprétables, donc nous ne pouvons dire que les bactéries étudiées sont des *Rhizobia*.

Il reste d'autres techniques pour l'identification des *Rhizobiums*, et pour confirmer la position taxonomique de ces bactéries, l'étude doit être complétée par une étude génotypique.

Les mots clés

Cycle d'azote, *Hedysarum coronarium*, *Rhizobium*, symbiose, profil protéique.