

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université Constantine 1
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie**



Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie

Spécialité : Ecologie Microbienne

Intitulé :

**Caractérisation phénotypique des bactéries hôtes de la légumineuse
médicinale *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugrec).**

Présentée et soutenu par:

le : 22 juin 2014

- ❖ Boudjenana Amina
- ❖ Mansour Meryem

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. Y. BENHIZIA

Professeur. Université Constantine 1

Rapporteur : Mr. R. CHABBI

M.A.A Université Constantine 1

Examinatrice : Mme. N. RIAH

M.C. Université Constantine 1

***Année universitaire
2013/2014***

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre plus profonde gratitude notre plus grand respect à Mr. Chabbi Rabeh qui nous assistées et guidées, nous vous remercions d'avoir été toujours présent et nous avoir suivies régulièrement pour la réalisation de ce travail, pour sa gentillesse, ces conseils précieux et ces encouragement.

Nous présentons notre plus grand respect au professeur Mr.

Benguedouar Ammar responsable de laboratoire de recherche de biotechnologie pour l'occasion qu'il nous a donnée afin de réaliser ce travail dans votre laboratoire.

Un grand merci aux membres du jury:

Mr. Benhizia. Y professeur a l'université constantine 1 et M^{eme} Riah.

N d'avoir accepté d'examiner, de juger notre travail.

Nous remercions toute l'équipe du laboratoire sans exception surtout M^{eme} Guargouri. J, Radja et Leila pour leurs aides et leur gentillesse.

Table de matières

Introduction.....	1
Chapitre 1: Revue bibliographique	
I- L'azote	3
I-1-cycle d'azote.....	3
I-1-1- Ammonification.....	3
I-1-2- Nitrification.....	3
I-1-3- Dénitrification.....	4
II- Symbiose <i>Rhizobium</i>-légumineuse.....	5
II-1- les légumineuses.....	5
II-1-1-La légumineuse <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	6
II-1-1-1-Historique.....	7
II-1-1-2-Origine et distribution	7
II-1-1-3-Classification de la plante.....	7
-Taxonomie de la plante	8
II-1-1-4-Morphologie de la plante.....	8
II-1-1-5-Propriété symbiotique de la plante.....	9
II-1-1-6-Principaux constituants de la plante.....	9
II-2-<i>Rhizobium</i>.....	11
II-2-1-Taxonomie des rhizobiums.....	11

III-Nodulation.....	16
III-1-Morphologie et structure des nodules.....	18
III-2-Génétiq ue de nodulation.....	18
III-2-1-Les gènes <i>nod</i>	19
III-2-2-Les gènes <i>nif</i>.....	19
III-2-3-Les gènes <i>fix</i>.....	19
III-2-4-Les gènes de la plante.....	19

Chapitre2: Matériel et méthodes

I-Isolement des bacteries nodulant le fenugrec (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.)	20
I-1- Collecte des nodules.....	20
I-2- Conservation des nodules.....	21
I-3- Isolement des souches à partir des nodules	22
I-3-1-Stérilisation de nodules	22
I-3-2- Isolement des souches.....	22
II-Caractères culturaux.....	23
II-1- Principaux milieux de culture utilisés.....	23
II- 2- Purification des isolats.....	24
II-3- Examen microscopique et macroscopique.....	24
II-3-1- Coloration de Gram.....	24
II-3-2- Examen de la mobilité.....	24
II-4- Conservation des isolats	24
III-caractères phénotypiques des isolats	25

III-1-Testes nutritionnels	25
III-1-1-Utilisation des sucres comme seul source de carbone	25
III-1-2-Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote	26
III-1-3-Besoin en vitamines	26
III-2- Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)	26
III-2-1- Réduction des nitrates	26
III-2-2 Hydrolyse de l'urée	27
III-2-3 Activité cellulosique	27
III-3- Tests physiologiques : (facteur intrinsèques)	27
III-3-1- Tolérance au NaCl	27
III-3-2- Effet de la température	28
III-3-3- Effet du pH.....	28
III-4- Résistance au Métaux lourds et Antibiotiques	28
III-5-1- Métaux lourds	28
III-5-2- Antibiotiques	28
III-6- Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE	29

Chpitre3: Résultat et discussion

I- Caractères cultureux	31
I-1-Examen microscopique	32
I-2-Mobilité des souches	32
III-Caractérisation phénotypique des bactéries	34
II-1-Testes nutritionnels	34

II-1-1- Source de carbone	34
II-1-2- Source de d'azote	36
II-1-3- Besoin en vitamines	37
II-2- Testes biochimique (recherche de certains enzymes)	38
II-2-1-Réduction de nitrate	38
II-2-2 Hydrolyse de l'urée	38
II-2-3 Activité cellulolytique.....	39
II-3-Tests physiologiques	42
II-3-1-Tolerance au NaCl	42
II-3-2- Effet du pH	44
II-3-3- Effet du température	46
II-4- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques	47
II-4-1- Métaux lourds	47
II-4-2- Antibiotiques	48
II-5-Etablissement un dendrogramme à partir des testes phénotypiques	51
III- Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE	52
III-1-Coefficient de similitude	52
III-2-Etablissement du dendrogramme	54
 Conclusion	 55
 Référence bibliographique	 57
 Annexes	

Résumé

Cette étude consiste à mettre en évidence les bactéries qui ont été isolées à partir des nodules de la plante médicinale et légumineuse *Trigonella foenum-graecum* L. cultivée dans deux régions de l'Est algérien Mila et Guelma et analyser leur diversité phénotypique.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique suivie d'une caractérisation phénotypique qui regroupe les tests biochimiques, physiologiques, nutritionnels aussi que la détermination des résistances aux métaux lourds et aux antibiotiques.

Un profil des protéines totales a été déterminé selon la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE en présence d'une souche de référence fait apparaître un polymorphisme entre les isolats.

Sur la base des caractères étudiés, les souches ont été apparentées au rhizobia.

Mots clés: *Trigonella foenum-graecum* L., diversité phénotypique, caractérisation, SDS-PAGE, rhizobia.

Abstract

This study consist in highlighting the bacteria wich isolated from the nodules of the medicinal plant the genus *Trigonella foenum-graecum* L. cultivated in East Algerian area Mila and Guelma and to analyze thier phenotypical diversity.

The characterization of the strains consist of a morphological study followed by a phenotypical characterization which includes the biochemical, physiological and nutritional tests as well as the measurement of the resistances of the strains to heavy metals and antibiotics.

The technique of electrophoresis on polyacrylamide gel in denaturing conditions (SDS-PAGE) is carried out to determine the profile of total proteins of the isolates in presence of reference strain reveal a polymorphisme between isolates.

On the basis of studied characters, strains were related to the Rhizobia.

Key words: *Trigonella foenum-graecum* L., phenotypical diversity, characterization, SDS-PAGE, Rhizobia.

الملخص

هذه الدراسة تقوم على الوضع بالحسبان البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للنبات الطبي و البقولي من جنس المزرورع في منطقتين من الشرق الجزائري -ميلة و قالمة- و تحليل *Trigonella foenum-graecum* L. تنوعها المظهري.

تجمع بدراسة وصفية مظهرية متبوعة مرفولوجية دراسة مجموعة الدراسة الوصفية للسلاطات تعتمد على الحيوية. المضادات الثقيلة و مقاومة المعادن إلى تحديد إضافة فيسيولوجية و غذائية ، بيو كيميائية اختبارات مشوهة ظروف تحت الاكريلاميد عديد هلام على الكهربائية الهجرة بتقنية تحديده تم البروتيني الكلي المحتوى في وجود سلاله مرجعية أظهر وجود تنوع مظهري بين العزلات. (SDS-PAGE) الخصائص المدروسة اضافة الى مخطط مقارنة تشابه المرسوم سمح باستنتاج أن أغلبية عزلتنا كانت جد قريبة . Rhizobia الى السلاطات المرجعية التي هي عبارة عن

SDS-PAGE ، تنوع المظهري، تعريف *Trigonella foenum-graecum* L. :المفتاحية الكلمات
.Rhizobia



INTRODUCTION

L'azote est un nutriment essentiel et limitant pour le développement des plantes et, bien que majoritaire dans l'atmosphère, le diazote (N₂) n'est pas directement assimilable par les végétaux. En revanche, certaines plantes peuvent s'associer en symbiose avec des microorganismes diazotrophes qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Ces bactéries induisent sur la racine de la plante hôte la formation d'un organe spécialisé appelé nodule. À l'intérieur des nodules, la bactérie subit des transformations et fixe l'azote moléculaire de l'atmosphère en le convertissant en ammonium, (NH₄⁺) assimilables par la plante. En retour la plante fournit aux bactéries des composés carbonés issus de la photosynthèse.

C'est la fixation biologique de l'azote, opérée par le système Légumineuse - BNL. Cette symbiose permet aux légumineuses de coloniser des milieux dégradés ou pauvres et d'enrichir le sol en matière organique, facilitant ainsi l'implantation d'autres espèces végétales et la réhabilitation de l'écosystème dégradé. D'autre part, cette fixation d'azote est importante sur le plan agroéconomique, car elle conduit à un enrichissement du sol en azote, jouant ainsi le rôle d'engrais naturel.

Du point de vue fondamental, il est important d'explorer et de caractériser taxonomiquement les symbiotes de nouvelles légumineuses non étudiées encore. Cette nouvelle exploration peut conduire à l'identification de nouvelles associations BNL - Légumineuses, plus performantes que d'autres en termes que fixation d'azote ou d'enrichissement de sols en matières organiques. Ces symbiotes non caractérisés jusqu'à ce jour peuvent comporter de nouvelles espèces ou genres de BNL, comportant peut-être des fonctions nouvelles.

De nombreuses espèces de légumineuses telles que la plante médicinale *Trigonella* L.

La plante du genre *Trigonella* L. Et en particulier l'espèce cultivé *Trigonella foenum-graecum* L. (fenugrec) est une plante herbacée annuelle ont été connus et employés pour différents buts dans des périodes antiques, particulièrement en Grèce et en Egypte. Actuellement, le fenugrec est largement cultivé en Asie, en Europe, l'Amérique et le Nord d'Afrique. En Algérie elle est particulièrement cultivée dans les régions du nord.

Au cours de cette étude, nous avons caractérisé des BNL associée à la légumineuse cultivée *Trigonella foenum-graecum* L. dans deux différentes régions de l'Est algérien.

Dans ce modeste travail nous avons fixé l'objectif suivant: Caractérisation phénotypique des bactéries hôtes de la légumineuse médicinale *Trigonella foenum graecum* L. (Fenugrec).

Ce travail est réalisé selon le plan suivant:

- Isolement des bactéries à partir des nodules.
- Étude morphologique et microscopique des isolats.
- Une étude comparative entre les isolats des espèces cultivées selon leur écosystème par une caractérisation phénotypique qui comporte une série de tests:
 - nutritionnels (source de carbone, source d'azote, besoin en vitamine),
 - Recherche des enzymes spécifique (nitrate réductase, uréase, cellulase),
 - Effet des facteurs abiotiques (pH, T°, NaCl),
 - Recherches des concentrations inhibitrices par les métaux lourds et les antibiotiques.
- Analyse des profils protéiques par SDS-PAGE.
- Etablissement d'un dendrogramme qui réunie tous les testes phénotypiques réalisés.



CHAPITRE 01
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- L'azote

L'azote joue un rôle essentiel dans la synthèse de la matière vivante à partir de la matière minérale. Contrairement aux animaux (organismes hétérotrophes), les végétaux ou certains microorganismes (organismes autotrophes) sont capables d'utiliser l'azote minéral du sol pour former des substances organiques azotées qui seront, à leur tour, utilisés par les animaux.

I-1- Cycle de l'azote

L'azote total 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 contenu dans la biomasse. Les échanges complexes entre ces trois ensembles sont connus sous le terme de cycle de l'azote (Hopkins, 2003).

les principales étapes de ce cycle sont: l'ammonification, la nitrification et l'assimilation (Raven *et al.*, 2007) (**Figure1**).

I-1-1 Ammonification

Les décomposeurs, certaines bactéries du sol et les champignons transforment les composés azotés d'origine animale ou végétale en ammoniac NH₃.

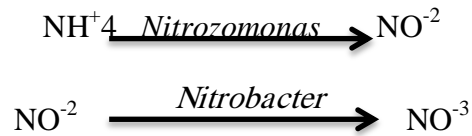
La réaction chimique est:



I-1-2- Nitrification

C'est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite (NO⁻²) puis en nitrate (NO⁻³) qui est la forme la plus utilisable par les plantes.

La première étape de la formation du nitrate, est l'oxydation d'ammoniac en nitrite par des bactéries du genre *Nitrosomonas*, le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter* (Hopkins, 2003). Selon les réactions suivantes:



I-1-3- Dénitrification

Un processus anaérobie au cours duquel le nitrate est réduit en formes volatiles de l'azote, comme l'azote gazeux N_2 et l'oxyde d'azote N_2O , qui retournent ensuite à l'atmosphère (Raven *et al.*, 2007).

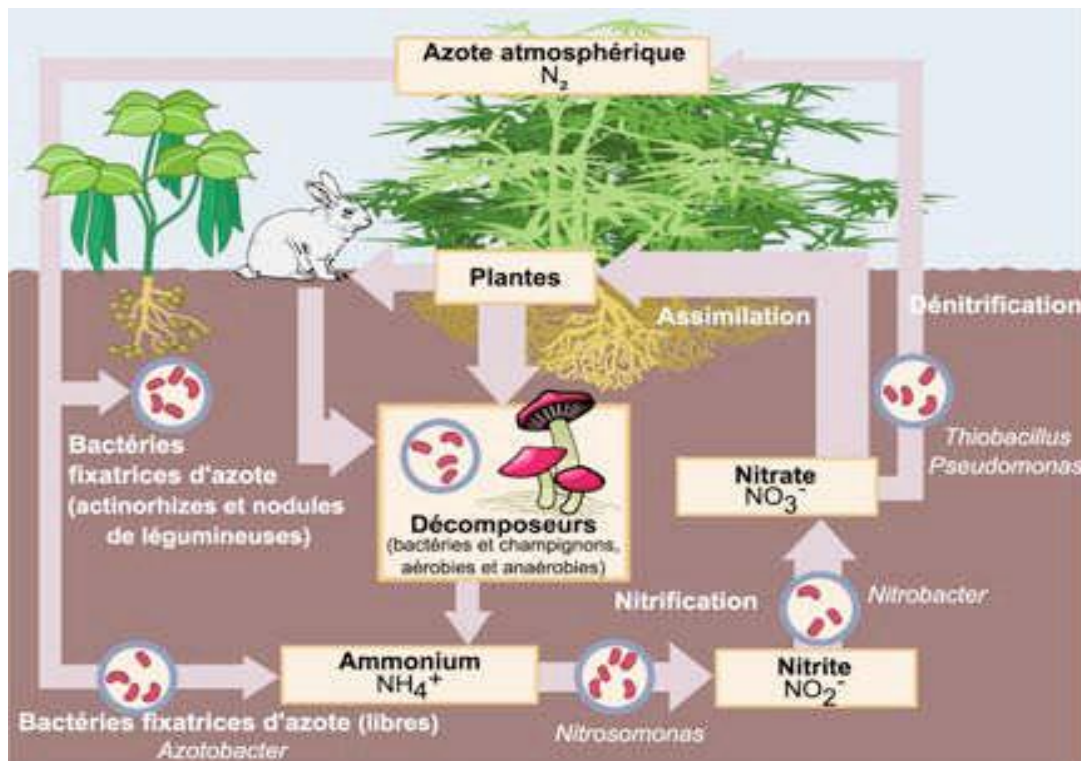


Figure1: Cycle de l'azote simplifié pour les écosystèmes terrestres (Pujic., 2009).

II- Symbiose *Rhizobium*-légumineuse

II-1- Les légumineuses

Les légumineuses ou *Fabaceae* sont classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones. Elles sont les sœurs des *Polygalaceae*, composant avec les familles des *Quillajaceae* et *Surianaceae*, les Fabales (Campbell *et al.*, 2001).

Les légumineuses occupent la deuxième place, après les céréales, pour les terres cultivées et la production. En 2004, plus de 300 millions de tonnes de légumineuses à graines ont été produites sur une superficie de 190 millions d'hectares, soit 13% des terres cultivées (FAO., 2004).

Les légumineuses constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun est de produire des fleurs ayant un ovaire libre, constitué par seul carpelle qui donne un fruit appelé gousse ou légume. On compte 475 genres et environ 16400 espèces se répartissant en trois famille: *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* (Paraphylétique) et *Papilionoideae* (ou Fabacées) (Come *et al.*, 2006). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2007). Cependant il y a encore 40% des légumineuses qui ont des graines riches en amidon (Fève, Haricot, Lentille, Pois, Pois chiche), en huile (Arachide, Soja) ou en protéines (Fenugrec, Lupin, Soja) les trèfles, les luzernes, le sainfoin et le lotie servent à l'alimentation du bétail (Come *et al.*, 2006).

Les légumineuses alimentaires tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que jamais été examinées pour la nodulation (Sprent., 1999).

Beaucoup d'espèces sont cultivées pour l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin *et al.*, 2001).

Les principales études de recherche, sur les légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur

coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Chabbi., 2010).

L'intérêt agronomique des légumineuses provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée, d'où leur intérêt également dans le cadre d'une agriculture "durable" (réduction des intrants, préservation et enrichissement des sols en azote) (Chabbi., 2010).

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la Légumineuses. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale (Chabbi., 2010). Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18% à 30% de la graine sèche) (Baudoin *et al.*, 2001).

II-1-1- La légumineuse *Trigonella foenum- graecum* L.

Le genre *Trigonella* L. est un membre de la famille *Fabaceae* qui à été la deuxième grande famille des plantes fleurissantes avec 650 genres et 18000 espèces (Singh *et al.*, 2008).

Trigonella foenum- graecum L. du nom arabe de l'helba est un herbe annuelle connue sous le nom de fenugrec (Talip *et al.*, 2011), il vient de foenum-graecum signifiant le foin grec qui est un herbe séché pour être utiliser comme un fourrage dans le passé (Ionescu et Roman., 2013).

Le fenugrec est distribué dans la plus part des régions du monde Europe, Afrique du nord, Asie, Argentine, Canada, Amérique, Australie, (Ionescu et Roman., 2013) il a une activité anti-oxydante et antibactérienne et connue par les affects hypoglycémiques, hypocholestérolémie et anti inflammatoire (Moradi Kor *et al.*, 2013) son usage est très recommandé, généralement en cas de manque d'appétit (Harchane *et al.*, 2012) et dans la préparation des aliments (avec riz en Iran, arôme de fromage en Suisse).

II-1-1-1-Historique

Le fenugrec est la plante le plus utilisé dans la thérapeutique depuis les anciens temps. En Egypte antique, il a été employé pour soulager l'accouchement et pour augmenter l'écoulement de lait (Fedelic *et al.*, 2009), et pour embaumer les morts et purifier l'air des habitations et des lieux de culte (Journal canadien de microbiologie 2011).

Dans le présent, il est utilisé par les femmes Egyptiennes pour la douleur menstruelle et comme thé de helba pour soulager des problèmes de l'estomac des touristes (Fedelic *et al.*, 2009), et aussi dans la fabrication du pain (Journal canadien de microbiologie 2011).

Depuis l'ancienne temps les Grec et les romaines sont utilisés le fenugrec dans la médecine et comme fourrage pour les animaux (Singh *et al.*, 2008).

II-1-1-2- Origine et distribution

Trigonella foenum-graecum L. est une plante légumineuse annuelle, de nombreux auteurs suggèrent que l'ancêtre direct de l'espèce cultivée est le fenugrec sauvage *T. gladiata* qui diffère de *T. foenum-graecum* par l'ensemble de l'agrégat de caractères les plus marquants: dont la tuberculination des graines et la petite taille des gousses. Il est possible que l'espèce *T. foenum-graecum* évoluée de *T. gladiata* (Sinskaya., 1961).

La région méditerranéenne est connue pour être l'habitat naturel de genre *Trigonella*, il a été trouvé à l'Asie, Afrique et beaucoup cultivé en Inde (Kanak *et al.*, 2012), fréquemment cultivées et souvent sub-spontanée en Algérie (Quezel et Santa., 1962).

II-1-1-3- Classification de la plante

Le nombre des espèces de *Trigonella* qui sont actuellement identifiés est seulement 18 espèces mais le genre *Trigonella foenum-graecum* L. est la seule espèce cultivée (Helambe et Dande., 2012).

-Taxonomie de la plante

Super-Règne: Chlorobiontes.

Règne: Plantae.

Sous-Règne: Tracheobionta.

Division: Magnoliophyta.

Class: Magnolipsida.

Cladus: Fabidees.

Order: Fabales.

Famille: Fabaceae.

Genre: *Trigonilla*.

Espèce: *Trigonella foenum graecum* L. (Mehani et Segni., 2012).

II-1-1-4- Morphologie de la plante

Le fenugrec est une plante annuelle de 30-60 cm de hauteur, les feuilles sont composés par trois folioles, dentées, gris-vertes de 20-25 mm de longueur. (Moradi Kor *et al.*, 2013).

Les fleurs de *Trigonella foenum-graecum* L. sont blanchâtres ou jaune pale, les variétés sauvages et cultivés existant avec 1 à 2 fleurs axillaires, sessiles, blanchâtres ou jaune citron (Moradi Kor *et al.*, 2013).

La gousse de 5-7cm de long avec un bec persistant, chaque une portante 10-20 graines qui sont petites de 5 mm de long, dur et jaune brunâtre (Moradi Kor *et al.*, 2013) (**Figure2**).

II-1-1-5-Propriétés symbiotique de la plante

Trigonella foenum-graecum L. (fenugrec) est connue par leurs propriétés médicales et la fixation symbiotique de l'azote par les rhizobia présentés dans leurs nodules racinaires. Il était reporté que la fixation de 48% de l' N_2 totale pendant la saison de développement (Singh *et al.*, 2008)

II-1-1-6- Principaux constituants de la plante

Les actions biologiques et pharmacologiques de fenugrec sont attribuées dans la variété de leur constituant nommé: stéroïdes, substances polyphénoliques, acides aminés (Mehrafarin *et al.*, 2010).

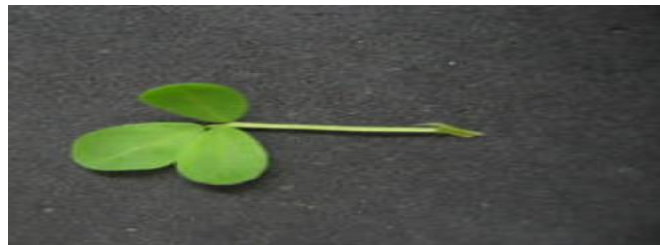
Les graines de fenugrec contiennent de 45- 60% de carbohydrate, 20 -30% des protéines de lysine et tryptophane, 5-10% d'huile (lipide), les fibres muqueuses, trigonelline (0.20- 0.38%), choline (0.5%), les acides aminés libres comme 4-hydroxyisoleucine (0.09%), arginine, histidine et lysine, calcium et fer, vitamines A1, B1, C et 0.015% des huiles volatiles (Moradi Kor *et al.*, 2013).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Figure 2 : (a): *Trigonella* fleurissante, (b): pied de *Trigonella*, (c): feuilles, (d) gousses, (e):graines

II-2- Rhizobium

Rhizobiums sont des bactéries capables de former des nodules et établir une symbiose avec les racines ou les tiges des plantes légumineuses. Pendant le processus symbiotique, les rhizobiums réduire l'azote atmosphérique à une forme assimilable (ammonium) directement par les plantes (Barrada et Fikri-Benbrahim., 2014).

La plupart d'entre eux ne forment de nodules qu'avec un petit nombre de plantes hôtes, alors que d'autres sont très spécifiques et n'infectent qu'une seule espèce hôtes (Hopkins, 2003).

II-2-1-Taxonomie des rhizobiums

La taxonomie qui se définit comme l'étude des relations qui existent entre les organismes, englobe la classification, la nomenclature et l'identification. Ces trois parties consistent respectivement à classer et à arranger les organismes dans des groupes sur la base de similarités (classification), à donner des noms aux groupes trouvés (nomenclature) et enfin à identifier des organismes inconnus pour déterminer s'ils appartiennent aux groupes déjà définis (Vandamme *et al.*, 1996).

Rappelons que « rhizobia » est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les légumineuses, et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Nous préférons substituer au terme de « rhizobia », qui est un terme dérivé du nom du genre *Rhizobium*, le terme de BNL (Zakhia *et al.*, 2004).

Wornin (1866) fut le premier à signaler l'observation de micro-organismes ressemblant à des bactéries dans les nodosités de *luinus mutabilis*. Par la suite, les bactéries vont être classées sur la base de leur temps de génération et leur vitesse de croissance sur milieu de culture, tels que définis par Lönhis et Hansen en 1921. Ainsi, utilisant ce concept, Jordan (1982) classa pour la première fois, les bactéries symbiotiques en deux genres: le genre *Rhizobium* correspondant aux souches à croissance rapide et le nouveau genre *Bradyrhizobium* pour les souches à croissance lente.

Plusieurs méthodes comparatives comme la sérologie, SDS-PAGE des isoenzyme ou des protéines totales, FAME, le coefficient de Chargaff, l'hybridation ARN / ADN ou ADN /ADN, et l'analyse des plasmides ont été adoptées pour la classification des rhizobiums (N'zoué *et al.*, 2006)..

Les BNL ont été également découvertes dans la classe β -*Proteobacteria*, à savoir dans *Burkholderia et Ralstonia* (Moulin *et al.*, 2001). En outre, Benhizia *et al.* , (2004) a signalé l'association entre les légumineuses du genre Hédysarum et les souches appartenant à la classe γ -*Proteobacteria*, à savoir *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter Kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *vulneris coli* et *Pseudomonas sp* bien que leur capacité de nodulation n'est pas encore clairement démontrée (**Tableau1**).

Tableau1: classification des rhizobiums (Berrada et Fikri-Benbrahim., 2014).

Genres et espèces	Plantes hôtes
Class: Alphaproteobacteria	
Order: Rhizobiales	
Family: Rhizobiaceae	
Genus: Rhizobium	
<i>R. leguminosarum</i>	
<i>symbiovar viciae</i>	<i>Pisum, Viciae, Lens, Lathyrus</i>
<i>symbiovar trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>
<i>symbiovar officinalis</i>	<i>Galega orientalis</i>
<i>symbiovar orientalis</i>	<i>Galega officinalis</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>
<i>R. leucaenae</i>	
<i>R. tropici</i>	
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>
<i>symbiovar mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>symbiovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>symbiovar giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum, Centrosema, etc.</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>
<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>Populus alba</i>
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>R. multihospitium</i>	<i>Multiple legume species</i>
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia Dalbergia</i>
<i>R. alamii</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>
<i>R. halophytocola</i>	<i>Coastal dune plant</i>
<i>R. radiobacter</i>	*

<i>R. rhizogenes</i>	*
<i>R. rubi</i>	*
<i>R. vitis</i>	*
<i>R. nepotum</i>	*
Genus: Ensifer	
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>E. fredii</i>	
<i>symbiovar fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
<i>symbiovar siensis</i>	<i>Glycine</i>
<i>E. sahelense</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>
<i>E. terangae</i>	Different host plants
<i>symbiovar acaciae</i>	<i>Acacia</i>
<i>symbiovar sesbania</i>	<i>Sesbania</i>
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>
<i>E. xingianense</i> (Formerly: <i>Sinorhizobium xingianense</i>)	<i>Glycine max</i>
<i>E. adhaerens</i>	*
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulaceae</i>
<i>E. americanum</i>	<i>Acacia</i>
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>
<i>E. numidicus</i>	<i>Medicago sativa</i>
Genus: Shinella	
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>
Family: Phyllobacteriaceae	
Genus: Mesorhizobium	
<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena,</i> <i>Prosopis,</i>
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>
<i>M. thiogangeticum</i>	*
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>
<i>M. gobiense</i>	Wild legumes
<i>M. tarimense</i>	Wild legumes
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi</i>
<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia.</i>
<i>M. abyssinicae</i>	Different agroforestry legume trees

<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. hawassense</i>	Different agroforestry legume trees
<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>
<i>M. shonense</i>	Different agroforestry legume trees
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana</i> species
<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus</i> species
<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia</i> , <i>Lotus berthelotii</i>
Genus: Phyllobacterium	
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
Family: Methylobacteriaceae	
Genus: Methylobacterium	
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i> spp.
Genus: Microvirga	
<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus</i> sp.
<i>M. lotononidis</i>	Different legume host
<i>M. zambiensis</i>	Different legume host
Family: Brucellaceae	
Genus: Ochrobactrum	
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<i>Cytisus</i>
<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>
Family: Hyphomicrobiaceae	
Genus: Azorhizobium	
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>A. dobereinereae</i>	<i>Sesbania virgata</i>
<i>A. oxalatiphilum</i>	
Genus: Devosia	
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>
Family: Bradyrhizobiaceae	
Genus: Bradyrhizobium	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>B. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>
<i>B. canariense</i>	<i>Genistea et Loteae</i>
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entada koshunensis</i>
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>
<i>B. oligotrophicum</i>	
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
Class: Beta Proeobacteria	
Order: Burkholderiales	
Family: Burkholderiaceae	
Genus: Burkholderia	

<i>B. caribensis</i>	Vertisol microaggregates
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalatus carnosus</i>
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata, Mimosa scabrella</i>
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<i>B. rhizoxinica</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. diazotrophica</i>	<i>Mimosa</i> spp.
<i>B. endofungorum</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>B. heleia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>
<i>B. symbiotica</i>	<i>Mimosa</i> spp.
Genus: Cupriavidus	<i>Aspalatus carnosus</i>
<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i> sp.
Class: Gamma-Proteobacteria	
Order: Pseudomonadales	
Family: Pseudomonaceae	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Robinia pseudoacacia</i>

* la capacité de nodulation de ces genres n'est pas encore clairement démontrée ils sont considéré comme des *Rhizobium*.

III- Nodulation

L'établissement de l'association symbiotique, la formation des nodules et la fixation de l'azote sont la conséquence d'une série d'interactions contrôlées par signaux moléculaires entre la plante et son partenaire bactérien. Les plantes produisent des flavonoïdes (molécules signales) au niveau de leurs racines (Patriarca *et al.*, 2004). Ils sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses (Milane., 2004). Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit l'expression de gènes *nod* codant pour les enzymes de synthèse de facteurs Nod (lipochitinoooligosaccharides ou LCO) (Dénarié., 2000). Les facteurs Nod produits par le partenaire bactérien sont essentiels pour la capacité des rhizobia à induire les nodules racinaires (Spaink., 2000) (**Figure3**).

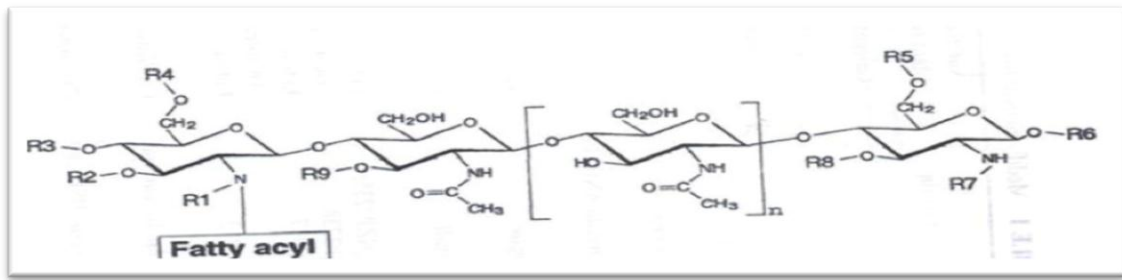


Figure 3: Structure générale d'un facteur Nod produit par les rhizobia (Spaink., 2000).

La reconnaissance spécifique entre les protéines NodD d'une espèce de rhizobium et leur flavonoïde activateur constitue donc le premier niveau de spécificité dans la symbiose rhizobium-légumineuse (Perry *et al.*, 2004). Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire d'une molécule d'adhésion spécifique localisée à la surface des cellules, la rhicadhésine (Perry *et al.*, 2004). Cette interaction induit une déformation du poil absorbant en réponse la bactérie secrète une enzyme, la polygalacturonase, qui fragilise la paroi et la pénétration des bactéries est ainsi facilitée (Dupuy et Nougier., 2005). La dernière étape de la formation du nodule consiste en un relâchement des rhizobiums à partir des cordons d'infection à l'intérieur des cellules corticales suivi de la division et la différenciation des rhizobiums en cellules fixatrices d'azote reconnues sous le nom de bactéroïdes (Machrafi., 2001). Une membrane pér bactéroidienne enveloppe ces bactéroïdes (Perry *et al.*, 2004). Elle protège la plante contre l'ammoniac produit et une pathogénicité potentielle de la bactérie, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation de l'azote (Bélanger., 1998).

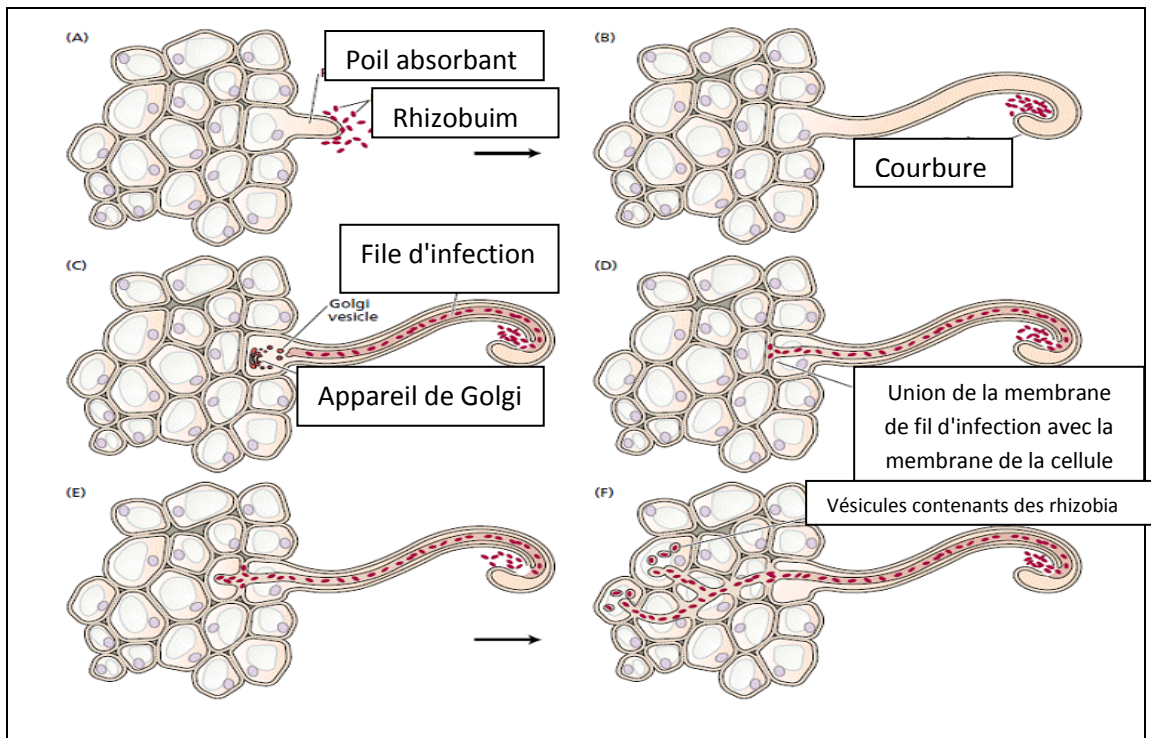


Figure 4: Processus de la nodulation (Taiz et Zeiger., 2006).

III-1- Morphologie et structure des nodules

Le nodule achevé peut prendre deux formes: soit cylindrique, avec un méristème apical, une croissance indéterminée et un système conducteur ramifié, soit sphérique, avec une croissance définie et des éléments conducteurs en forme d'arc, ayant un débouché commun dans le système conducteur de la racine (Richter., 1993)

III-2- Génétique de nodulation

Plusieurs groupes de gènes du microsymbionte et des racines de la plante hôte, contribuent à la fixation biologique de l'azote (Hopkins, 2003). Les différents *Rhizobium* utilisent des mécanismes génétiques et moléculaires similaires pour reconnaître et infecter les légumineuses- hôtes.

III-2-1-Les gènes *nod*

Gènes nécessaires à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités. Les gènes *nod* ou gènes de nodulation, au nombre de 20 à 30, sont localisés sur des plasmides bactériens géants. Certains sont responsables de la reconnaissance spécifique de l'infection racinaire et de la nodulation (Dupuy et Nougier, 2005).

Trois gènes *nod* (*nodA*, *nodB*, *nodC*) sont des gènes de nodulations communs à tous les rhizobiums ils codent pour le squelette chitinoooligosaccharidique des facteurs de nodulation (Hopkins, 2003).

Une autre série de gènes de spécificité d'hôte, *nod E*, *F*, *G*, *H*, codent pour la décoration des facteurs Nod (Hopkins, 2003).

III-2-2-Les gènes *nif*

Les bactéries fixatrices d'azote possèdent une vingtaine de gènes *nif* qui contrôlent la synthèse d'un complexe enzymatique (nitrogénase) responsable de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac (Dénarié, 2008). Ils interviennent seulement après la formation du nodule, (Dupuy et Nougier, 2005).

III-2-3-Les gènes *fix*

Les gènes *fix* ne sont présents que chez les fixateurs symbiotiques et impliqués aux étapes de développement tardives de nodule lors de la fixation symbiotique de l'azote (Brewin *et al.*, 1992 ; Hopkins., 2003).

III-2-4-Les gènes de la plante hôte

Ce sont des gènes spécifiques qui codent les protéines de types nodulines dont les unes participent à la formation des nodosités, les autres ne s'expriment qu'après la formation du nodule ; c'est le cas du gène de la globine de leghémoglobine ou encore des enzymes intervenant dans la synthèse des phytohormones, des acides aminés et des acides organiques (Dupuy et Nougier, 2005).



CHAPITRE 02
MATERIEL ET METHODES

I- Isolement des bacteries nodulant le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.)

Les nodules ont été obtenus à partir de l'espèce végétal *Trigonella foenum-graecum* L. qui a été cultivé dans des conditions climatique et pédologique, Les échantillons cultivés dans la région Amira Arrese et Ferdjioua wilaya de Mila (43) (latitude 36°27'N et longitude 6° 15' 52''E) et Ain Reguada Wilaya de Guelma (24) (latitude 36°15'0" N et longitude 7°15'0" E) (Carte1).

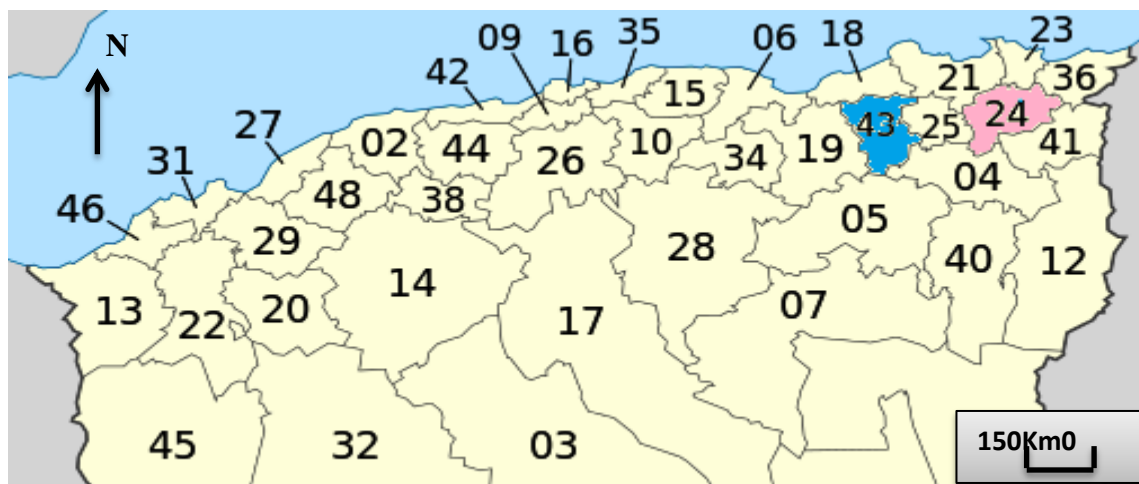


Figure 5: Localisation géographique des sites de prélèvement.

I-1- Collecte des nodules

Les nodules ont été collectés à partir des plantes durant la saison de croissance végétative lorsque les nodules sont de couleur rouge brun, bien développés et visibles au niveau des racines et d'une couleur rougeâtre qui peut indiquer la présence de la leghémoglobine.

L'opération effectuée selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994):

- On creuse environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur pour extraire la plante et son appareil racinaire.
- On débarrasse soigneusement le sol lié au niveau des racines pour ne pas endommager les nodules, enfin on place le tout dans un sac en plastique.

- Au laboratoire, les racines sont délicatement lavées à l'eau courante pour éliminer toute trace de terre. Les nodules sont détachés à 1-2mm du site d'attache, puis rincés et séchés par du papier filtre.

I-2- Conservation des nodules

Pour une courte conservation et pour une utilisation immédiate, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h (ne jamais les congeler afin d'éviter la destruction des nodules par les cristaux de glace).

Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrite par Vincent., (1970) et (Somasegaran et Hoben., 1994). Qui consiste à remplir la moitié des flacons stériles par CaCl₂ (meilleure absorption de l'humidité). Ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les nodules (**Figure 6**).

Chaque flacon sera identifié par une étiquette portant les informations suivantes:

- le nom latin de la légumineuse (genre et espèce),
- le lieu et date de prélèvement,
- la date de conservation.

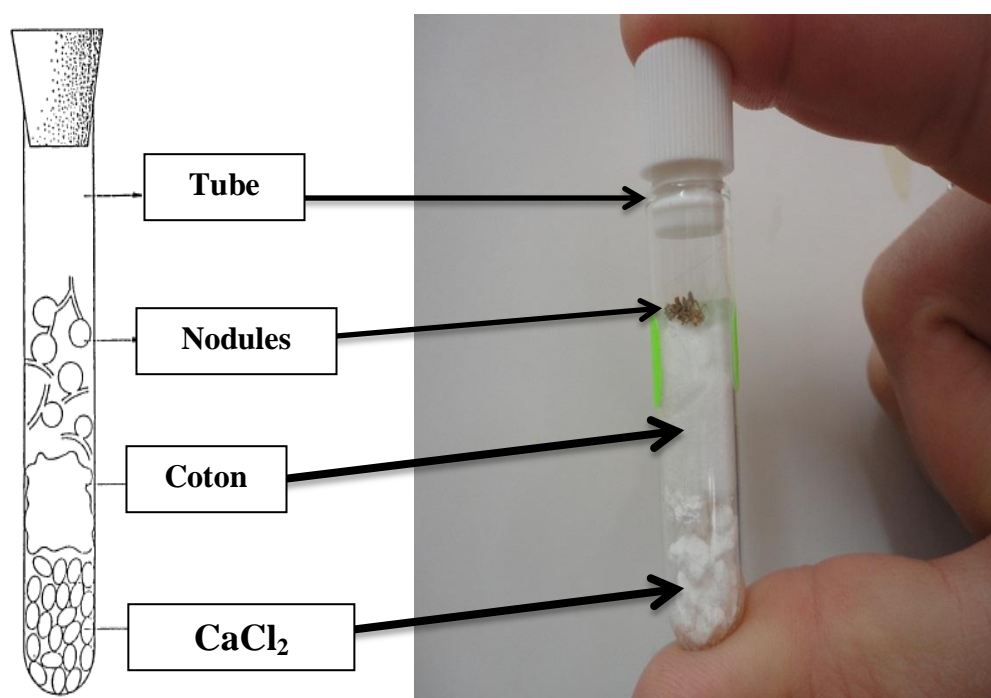


Figure 6: Conservation des nodules Issus de la plante *Trigonella foenum-graecum* L.

I-3- Isolement des souches à partir des nodules

Les nodules fraîchement lavés sont détachés de la racine à l'aide d'une pince et utilisés directement alors que ceux qui seront conservés par dessiccation sont réhydratés durant une nuit au réfrigérateur dans de l'eau distillée, puis laissés pendant une heure à température ambiante (Vincent., 1970; Somasegaran et Hoben., 1994).

I-3-1- Stérilisation de nodules

Les nodules intacts sont transférés dans un tube stérile et immergée dans l'éthanol 95° Pendant 5 à 10 secondes, puis transférées rapidement dans l'hypochlorite de calcium 3% (p/v) pendant 3 minutes. On effectue ensuite un rinçage des nodules 10 fois dans l'eau distillée stérile.

I-3-2- Isolement des souches

L'isolement est réalisé selon la technique de Vincent (1970).

- Les nodules stériles sont déposés séparément dans une boîte de pétri stérile; chacun est immergé par une goutte d'eau distillée.
- Les nodules sont écrasés avec une pince stérile par immersion dans l'éthanol et flambage au bec Bunsen.
- A l'aide d'une anse de platine, flambé au bec Bunsen, le jus du nodule est prélevé etensemencé sur des boites de pétri contenant les milieux Yeast Mannitol Agar (YMA) + rouge Congo et Glucose Peptone Agar (GPA) (**Annexe1**).

L'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre quadrants de manière à isoler des simples colonies (**Figure7**). Les boites de pétri sont incubées pendant 24 à 72 heures à 28°C.

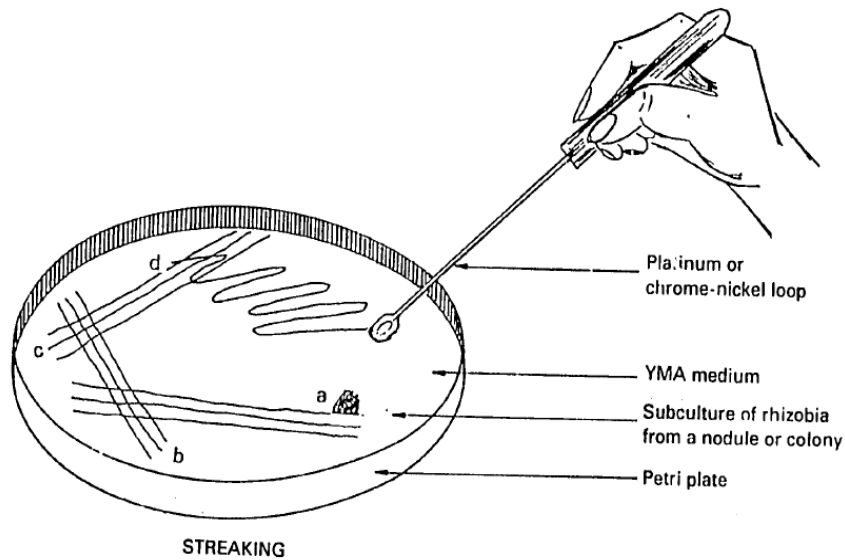


Figure 7: Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

II- Caractères cultureux

II-1- Principaux milieux de culture utilisés:

Plusieurs milieux sont utilisés pour cette première étape de la partie expérimentale, dont la composition est exprimée en gramme par litre d'eau distillée (**Annex1**).

Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries, pour cela nous avons préparé les milieux spécifiques suivants:

- Milieu liquide: YMB (Yeast Mannitol Broth)

- Milieux solides: YMA (Yeast Mannitol Agar)

YMA + RC (Yeast Mannitol Agar+ Rouge de Congo)

YMA + BTB (Yeast Mannitol Agar + Bromothymol Blue)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar + Bromocrésol Pourpre)

II- 2- Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux, des repiquages réguliers jusqu'à l'obtention des isolats homogènes sont nécessaires pour leur purification.

La méthode consiste à ensemencer des tubes contenant le YMB puis incubées à 28°C pendant 24h à 48h. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologique sont enfin réalisés.

II-3- Examen microscopique et macroscopique

II-3-1- Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de les classer les bactéries en deux grands groupes: bactéries dites Gram+ et bactéries dites Gram- (**Annexe 2**).

II-3-2- Examen de la mobilité:

Par une anse de platine contient une suspension bactérienne de 24 heures faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité.

- Incubé à 28°C pendant 24 heures.

II-4- Conservation des isolats:

La technique de conservation utilisée est celle décrite par (Vincent., 1970). Le milieu YMA (**Annexe1**) additionné de 1 à 3g/L de CaCO₃ comme agent neutralisant de l'acidité, des stries de la souche à conserver sont effectuées sur la surface de la gélose. La technique permet une conservation de 6 à 12 mois à 4°C (Vincent., 1970).

Tableau 2: isolats et souches de références utilisés.

Code des souches	Souches	Plante-hôte	Origine géographique	Source
F	<i>Rhizobium Sullae</i> RHF	Hedysarum coronarium	Constantine Algérie	A.Benguedouar Constantine
102	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	Cicer arietinum	Constantine, Algérie	Dakiche Constantine
TG1	isolat	<i>T.foenum</i> – <i>graecum</i> L.	Guelma, Algérie	Note étude
TG4	isolat	<i>T.foenum</i> – <i>graecum</i> L.	Guelma, Algérie	Note étude
TM1	isolat	<i>T.foenum</i> – <i>graecum</i> L.	Mila, Algérie	Note étude
TM2	isolat	<i>T.foenum</i> – <i>graecum</i> L.	Mila, Algérie	Note étude
TM3	isolat	<i>T.foenum</i> – <i>graecum</i> L.	Mila, Algérie	Note étude
TM4	isolat	<i>T.foenum</i> – <i>graecum</i> L.	Mila, Algérie	Note étude

III- Caractères phénotypiques des isolats:

III-1- Tests nutritionnels

III-1-1- Utilisation des sucres comme seul source de carbone

Les isolats sont cultivés sur le milieu YMB (**Annexe1**) où l'extrait de levure est réduit à 0.05g/l et le mannitol remplacé par l'une des sources de carbone suivants: Fructose, Galactose, Glucose, Xylose, Sorbitol, Maltose, Mannitol.

- Incubés à 28°C pendant 24 heures puis mesurer la croissance des souches à 600 nm (après avoir fait un balayage du spectrophotomètre il a été remarqué que le pic de la DO était à 600nm).

III-1-2- Utilisation des acides aminés comme seul source d'azote

Les isolats sont cultivés sur le milieu Défini 8 (gélosé) (Vincent., 1970) (**Annexe1**) ou le Glutamate de sodium (source d'azote) est remplacé chaque fois de divers acides aminés: Tyrosine, Leucine, Proline, Thréonine, Isoleucine, Sérine, Phénylalanine, Méthionine, Tryptophane.

- Incubé à 28°C pendant 24 heures.

III-1-3- Besoin en vitamines

Les souches sont cultivées sur le milieu TYA (annexe1) contenant 1ml/l des vitamines suivantes : Thiamines HCl; Panthotenate de Ca.

Pour préparer une solution stock en dissolvant 1g de vitamine dans 100ml de solvant et stérilisée par filtration (filtre 0,20µm) puis rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C.

- Incubé à 28°C pendant 24 heures.

III-2- Tests biochimiques (recherche de certains enzymes)

III-2-1- Réduction des nitrates

La nitrate-réductase est mise en évidence après culture sur le milieu liquide Tryptone Yeast Agar (TYA) (Beringer., 1974) (**Annexe1**) contenant 0,1 % de KNO₃ (p/v) puis incubé à 28°C pendant 4 jours.

La réduction des nitrates en nitrites est recherchée par adjonction successive de 3 à 4 gouttes de chacun des réactifs de la nitrate-réductase nitrate I et nitrate II. La réaction positive se manifeste par une coloration rouge ou rose qui traduit la réduction des nitrates. L'absence de cette coloration nécessite l'addition d'une pincée de zinc métallique et l'observation après quelques minutes de la teinte obtenue.

III-2-2- Hydrolyse de l'urée

Les souches sont cultivées sur milieu YMA (**Annexe1**), contenant 2% (p/v) d'urée et 0.012g/l de rouge de phénol (indicateur de pH).

La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0.2µm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C sous la hotte à flux laminaire puis incubé à 28°C pendant 48heures.

III-2-3- Activité cellulosique

Les souches sont mises en culture sur le milieu YMA (**Annexe1**) contenant 0.25 % (p/v) de Carboxy Methyl Cellulose (CMC) pendant 5 jours. Après incubation à 28°C, les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante puis remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées pendant 30 mn dans l'étuve à 28°C.

La solution colorante est remplacée par une solution de NaCl 1M, les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 min puis vidées de cette solution.

Les colonies apparaissent sur fond rouge, avec un halo jaune orangé mettant en évidence l'activité endoglucanasique.

III-3- Tests physiologiques : (facteur intrinsèques)

III-3-1- Tolérance au NaCl

Pour étudier la capacité des isolats à l'osmotolérance, les souches sont cultivées sur milieu Lactate-aspartate de sodium (Gloux et Le Rudelier, 1989) (**Annexe1**), avec différentes concentrations de NaCl (0.1%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%) (P/v) (17.1mM, 171mM, 342mM, 513mM, 1710mM).

- Incuber à 28°C pendant 24h.

- Mesurer la DO à 600 nm.

III-3-2- Effet de la température

Dans le but d'estimer les températures maximales et optimales de croissance, les isolats sont mis en culture sur milieu TYA et incubés à différentes températures: 4°C, 28°C, 37°C, 44°C.

III-3-3- Effet du pH

On vaensemencer des bouillons YMB ajustés à des différents pH : (3, 4, 5.5, 6.8, 8, 10).

- La DO est mesuré après 24heures d'incubation à 28°C.

III-4- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

III-4-1- Métaux lourds

Pour déterminé la concentration minimale inhibitrice en cultivant les différents isolats sur milieu TYA contenant différentes concentrations de métaux lourds suivants: chlorure de mercure (HgCl_2), chlorure de zinc (ZnCl_2), Sulfate de cuivre (II) (CuSO_4), le plomb Pb (CH_3COO)₂ et sulfure de cadmium (Cds) de 0.5 à 3000 $\mu\text{g/ml}$ de TYA.

- L'incubation se fait pendant 3 à 7jours à 28°C.

III-4-2- Antibiotiques

La résistance aux antibiotiques à été fréquemment utilisée dans l'étude des Rhizobium, comme un moyen d'identification (Beck *et al.*, 1993).

La méthode utilisée est celle de dilution en milieu gélosé utilisant des stocks de solutions d'antibiotique rajoutées au milieu TYA refroidi à 45°C.

Pour préparer une solution stock en dissolvant 1g d'antibiotique dans 100ml de solvant correspondant qui est stérilisée par filtration (filtre 0.22 μm).

Les antibiotiques utilisés sont: Erythromycine, Chloramphénicol, Carbénicilline, Kanamycine et Acide nalidixique. Avec des concentrations de 0.5 à 500µg/ml

- L'incubation varie de 1 à 7 jours selon l'antibiotique à 28°C.

Tableau 3: les solvants des antibiotiques utilisés

Antibiotiques	Solvants
Erythromycine	Ethanol 95%
Chloramphénicol	Ethanol 95%
Carbénicilline	Eau distillée
Kanamycine	Eau distillée
Acide nalidixique	NaOH

III-5- Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

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

Une aliquote de 100µl de chaque culture bactérienne, en phase de croissance exponentielle en milieu YMB (annexe1), est centrifugée à une vitesse de 7000 tours/min pendant 15 min à 4°C et le culot mis en suspension dans 50 µl de tampon de lyse.

Préparation des plaques de gel

- Monter les plaques dans le couleur.
- Couler le gel de séparation (**Annexe1**) et recouvrir d'eau + butanol
- Retirer l'eau + alcool et couler le gel de concentration (**Annexe1**)
- Placer rapidement les peignes
- Laisser polymériser, démonter et retirer les peignes

- Placer 1 ou 2 plaques dans l'appareil à électrophorèse et remplir avec le tampon de migration (**Annexe1**).
- Ajouter le SDS et β - mercaptoéthanol, la solution est portée à l'étuve à 60° pendant 30 min pour une dénaturation complète des protéines. Ce traitement est nécessaire pour la rupture des ponts disulfure. Ensuite 40 μ l de chaque souche est coulé dans chacun des puits du dispositif électrophorétique.

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

Enfin le gel est décoloré dans l'eau distillé sous faible agitation jusqu' à l'apparition des bandes polypeptidiques.

CHAPITRE 03

RESULTAT ET DISCUSSION

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale pour l'identification et la séparation des bactéries nouvellement isolées. Elle constitue chez rhizobiums les mieux étudiés, la base de la description formelle de taxon, depuis les espèces et les sous espèces jusqu' aux genres et familles (Vandamme *et al.*, 1996).

I- Caractères cultureux

Les colonies des isolats TM1, TM2, TG1, TG4, TM3, TM4 sur le milieu YMA ont des formes circulaires, un contour régulier, la taille varie de 0.5 à 10 mm, une surface bombée et une consistance visqueuse, texture homogène lisse et brillant (**Figure 8-a**).

La croissance sur le milieu YMA+Rouge de Congo est détectable après 24 à 48 heures; donne des colonies lisses, visqueuses qui absorbent peu ou pas le rouge de Congo, de taille qui varie de 1 à 3mm après 48 heures d'incubation de forme ronde et bombée (**Figure 8-b**).

En général les rhizobia produisent des colonies blanches ou absorbent faiblement le rouge de Congo. Malgré que ce dernier soit souvent rajouté aux milieux de culture pour assurer l'isolement des rhizobia ou tester la purification des cultures rhizobiales, il ne peut pas être considéré comme un agent sélectif pour distinguer les rhizobia des autres bactéries.

Sur le milieu GPA, le développement des bactéries se fait sans acidification du milieu après 24 heures.

Sur le milieu YMA + bleu de bromothymol on observe un virage de couleur du vert vers le jaune pour les isolats TG1, TG4, TM1, TM3, TM4 et aussi la souche de référence F après 24 heures mais la souche de référence 102 et l'isolat TM2 après 48 heures. Ce virage de couleur signifie une acidification de milieu ce qui prouve que les isolats ont une croissance rapide (Beck *et al.*, 1993).

Le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du BTB vers le jaune.

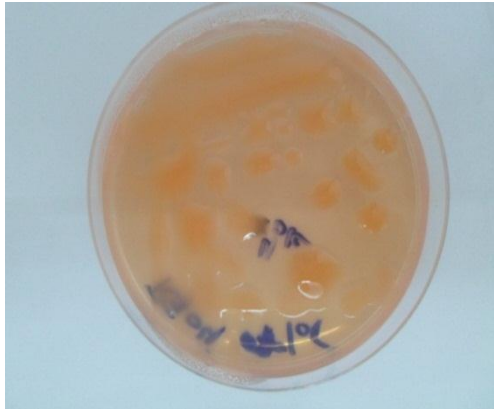
Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleu (El Hilali., 2006) (**Figure 8-c**).

I-1- Examen microscopique

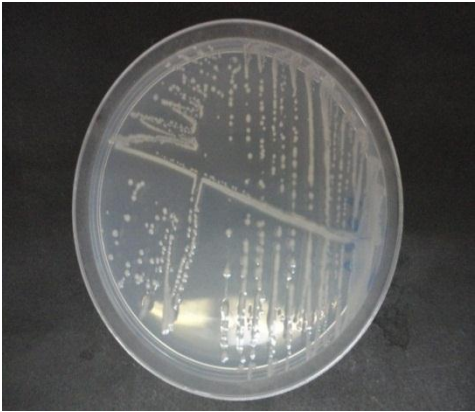
L'examen microscopique des cellules bactériennes va permettre de visualiser des bactéries de forme bâtonnet à extrémité arrondies, Gram négatif et de différentes tailles (**Figure 8-d**).

I-2- Mobilité des souches

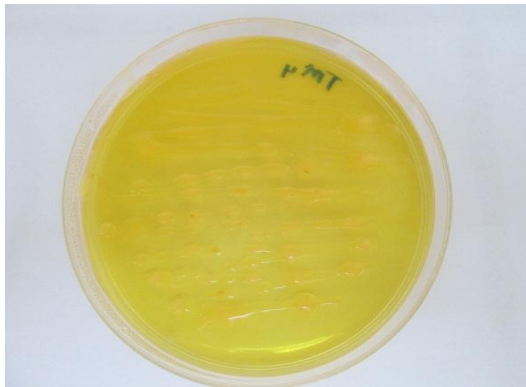
Le milieu Mannitol mobilité confirme la mobilité de nos souches isolées à partir des nodules de la plante *Trigonilla foenum-graecum* L. avec une acidification du milieu (**Figure 8-e**).



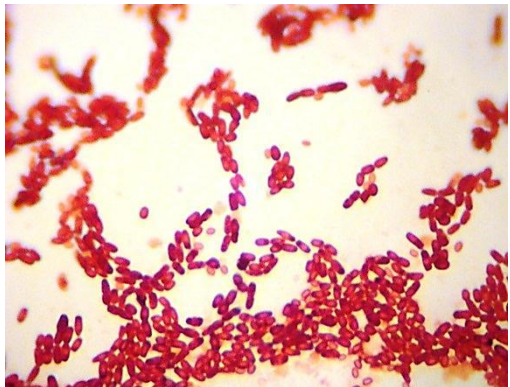
(a)
Croissance sur YMA+RC à 0.25%



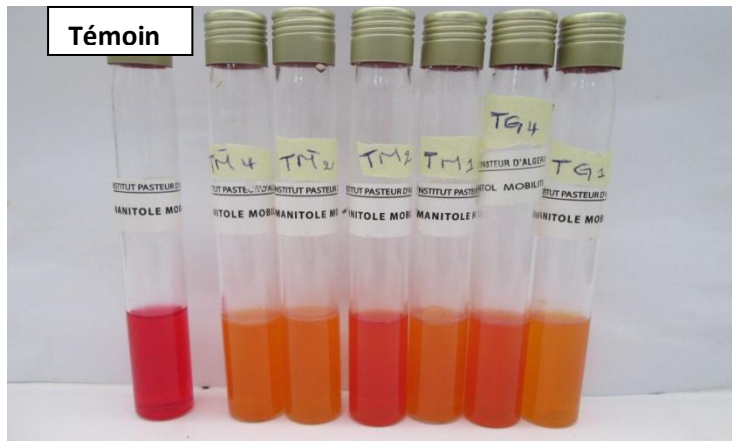
(b)
Croissance sur YMA



(c)
Acidification du milieu
YMA+BTB



(d)
Coloration de Gram



(e)
Résultat de Mannitol-mobilité

Figure 8-: Caractères cultureux et microscopiques des souches isolées.

II- Caractérisation phénotypique des bactéries

II-1- Tests nutritionnels

II-1-1- Source de carbone

L'évolution de la croissance observée après 24 heures d'incubation révèle que nos souches (isolats et souches de références) ont assimilé les substances carbonées testées de manière variable.

Une bonne croissance observée pour tous les souches surtout l'isolat TM2 qui a une excellente croissance avec tous les sucres, les isolats TM1, TM4 et souches de références F, 102 assimilent bien le Mannitol, Galactose, Glucose, Maltose alors que le Maltose est moins assimilé par la souche TG1 (**Figure 9**).

Le Mannitol est le sucre le mieux assimilé par tous les isolats aussi que les souches de références.

Les souches de références et les souches isolées peuvent utiliser une large gamme d'hydrates de carbone ces résultats sont en accord avec les travaux de Struffi *et al.*,(1998) et Chabbi(2010) qui a indiqué la capacité des isolats et souches de références à utiliser plusieurs substances carbonés comme seul source de carbone et n'exige pas uniquement le mannitol.

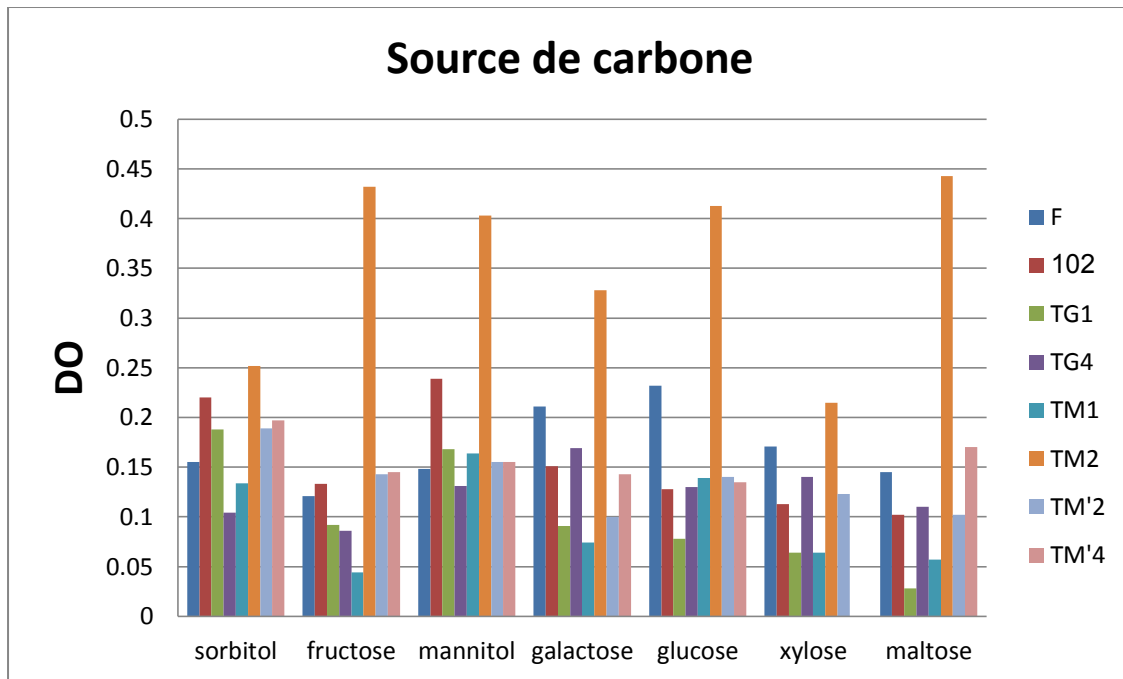


Figure 9: Utilisation des sucres comme source de carbone par toutes les souches.

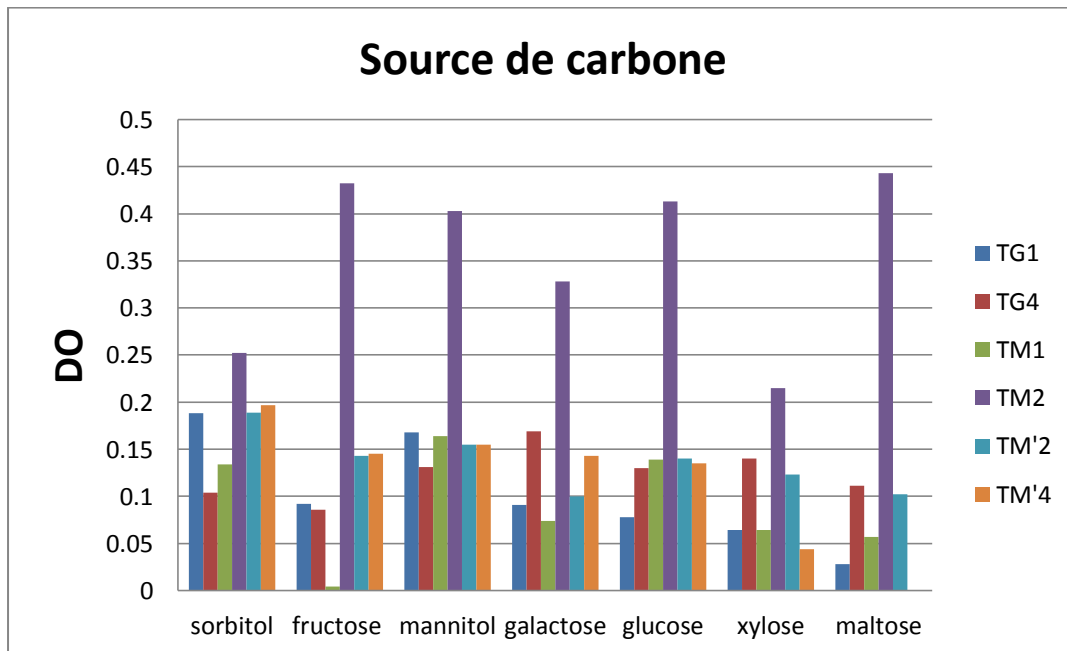


Figure 10: Utilisation des sucres comme source de carbone par tous les isolats.

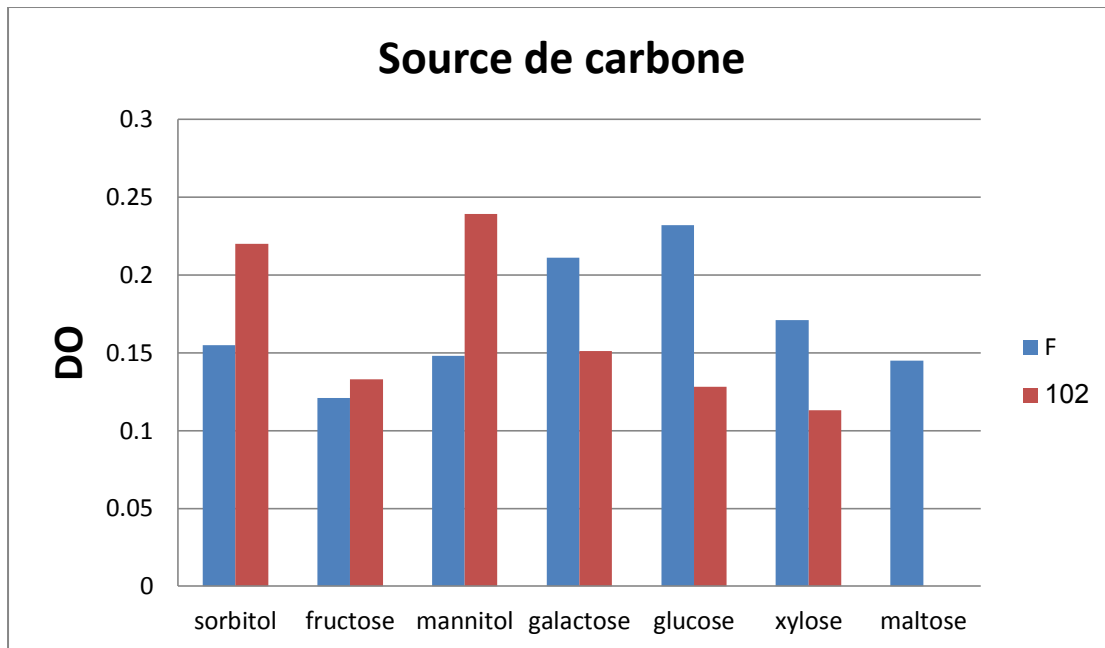


Figure 11: Utilisation des sucres comme source de carbone par les souches références.

II-1-2- Source de d'azote

La croissance des souches sur le milieu défini 8 est variable selon la source d'azote et l'acide aminé additionné.

On a observé une excellente croissance des isolats et souches de références en présence de Glutamate de sodium et la Proline, le Phénylalanine pour les souches TM3, TM4 et Isoleucine, Tyrosine, Serine pour la souche TG4.

Les souches TG1, TG4, TM1, TM2 ne peuvent pas pousser en présence de Tryptophane et Phénylalanine (**Tableau4**).

Donc on peut dire que nos isolats peuvent utiliser divers acides aminés comme source d'azote mais utilisent préférentiellement le Glutamate de sodium et la Proline. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Squatrini *et al.*, (2002) dans la description du *Rhizobium sllae*, que le glutamate, la valine, la proline, l'isoleusine, l'arginine et l'asparagine sont tous utilisés comme source d'azote.

Tableau 4: Utilisation des acides aminés comme source d'azote.

	Glutamate -Na	Proline	phénylalanine	Isoleucine	Tyrosine	Méthionine	Leucine	Thréonine	Serine	Tryptophane
F	+++	+++	±	±	+	±	-	±	+	±
102	++	+	-	±	±	±	±	++	±	-
TG1	++	++	-	±	+	±	+	++	-	-
TG4	+++	+++	-	+++	+++	±	+	±	+++	-
TM1	+++	+	-	+	+	±	+	±	±	-
TM2	++	+	-	+	+	+	+	±	++	-
TM3	+++	+++	++	-	+	-	±	-	-	±
TM4	++	++	++	-	±	-	±	-	+	±

Forte croissance+++ Moyenne croissance + Faible croissance ±

II-1-3- Besoin en vitamines

Les deux vitamines testées ont été utilisées par la majorité des souches (**Tableau5**).

Werner (1992) démontre que le besoin en vitamines chez les rhizobia est très variable et qu'en général la croissance du *Bradyrhizobium* est stimulée par la biotine et celle de *Rhizobium* par la thiamine et la pantothénate. Les autres vitamines ne sont pas exigées pour la croissance des rhizobia.

Tableau 5: Résultat des vitamines.

	F	102	TG1	TG4	TM1	TM2	TM3	TM4
Thiamine-HCl	++	+	+++	+	++	++	+	+++
Pentothénate-ca	+	+	+++	++	++	++	+	++

Forte croissance+++ Moyenne croissance + Faible croissance ±

II-2- Tests biochimique (recherche de certains enzymes)

II-2-1- Réduction de nitrate

L'apparition de la couleur rouge ou rose après addition de 2 à 3 gouttes des réactifs I et II du nitrate réductase indique la réduction des nitrates en nitrites par les isolats TG4, TM2, TM4 et la souche de référence F ce qui signifie qu'elles possèdent l'enzyme nitrate réductase. La réduction des nitrates ou des nitrites constitue des caractères taxonomiques importants (Joffin *et al.*, 2006).

La réduction des nitrates se fait selon la réaction suivante:



La réaction peut être rendu négative pour les souches TG1, TM1, TM3 par la réduction des nitrates formés; il faut donc contrôler dans le cas de l'absence de coloration s'il reste des nitrates en ajoutant au milieu un peu de poudre de zinc qui les réduit et entraîne une coloration rose.

II-2-2 Hydrolyse de l'urée

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries d'hydrolyser l'urée grâce à l'uréase.

Après l'incubation des boîtes pendant 48 heures nous avons observé qu'il y a eu virage de couleur vers le rose pour les isolats TM1, TM3, TM4 et la souche de référence F cela traduit par une alcalinisation du milieu suite à l'hydrolyse de l'urée et la libération des ions d'ammonium (**Figure 12-a**) comme l'équation suivante:



Donc nos souches ont l'enzyme d'uréase. Par contre les isolats TG1, TG4, TM2 acidifier le milieu et donne un virage du couleur de rouge vers le jaune (Uréase -) (**Figure 12-b**).

L'uréalyse est une propriété très répandue dans le monde bactérien et se traduit par la libération de l'ammonium qui a une importance très répandu dans le monde agricole (Mobly, 1992).

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière. En fait, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des rhizobia sur la surface des racines (Sherwood *et al.*, 1984) ainsi que sur leur capacité infective et effective (Davidson et Robson, 1986; Arreseigor et al., 1997).

II-2-3 Activité cellulolytique

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à décomposer la cellulose.

Nous observons un halo jaune orange autour des colonies des isolats TM1, TM3, TM4 et les souches de références F et 102, donc mettant en évidence l'activité

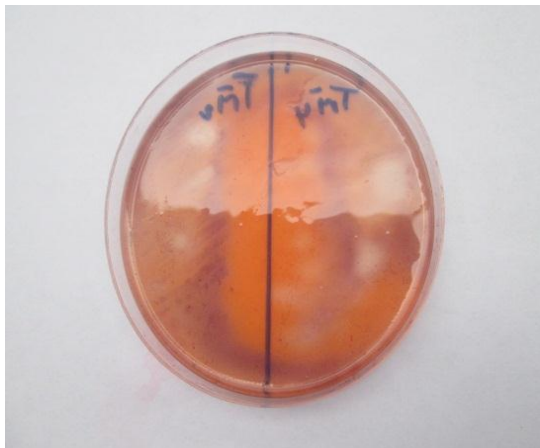
d'un endoglucanase (**Figure 12-c**). Par contre les isolats TG1, TG4, TM2 ne possèdent pas un enzyme de cellulase (**Figure 12-d**).

Les hémicellulose et surtout la cellulose sont des constituants majeurs des cellules végétales (Davet., 1996), la démonstration de la présence de la cellulase et de l'hémicellulase en plus de pectinase chez les *Rhizobia* suppose que ces dernière s'infectent la plante légumineuse en hydrolysant la paroi des cellules racinaires dans le site d'infection (Martinez-Molina., 1979).

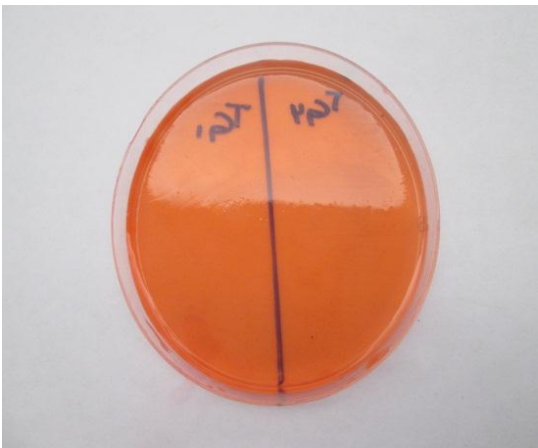


(a): Test d'uréase positif (+)

(b): Test d'uréase négatif (-)



(c): Test de cellulase positif (+)



(d): Test de cellulase négatif (-)



(e): Test de Nitrate réductase.

Figure 12: Résultat des testes biochimiques

II-3-Tests physiologiques

II-3-1 Tolérance au NaCl

Nous avons observé une bonne croissance à des concentrations de NaCl variant de 0.1% à 3% après 24 heures d'incubation et une faible croissance à la concentration 10% de NaCl pour tous les isolats et souches références (**Figure 13**).

Les résultats obtenus montrent une variabilité relative de tolérance vis-vis de la salinité chez les souches étudiées dans ce travail (Chabbi., 2010).

La salinité diminue la survie des rhizobia et inhibe l'expansion et la courbure des poils absorbants ainsi que la fixation des rhizobia sur les poils semble être sensible au stress salin, ce qui entraîne une réduction du nombre de ces organes symbiotiques (Saadallah *et al.*, 2001; Benkhaled., 2003) et également affecte le processus de nodulation en retardant l'initiation ou la croissance de nouveau nodule ainsi que la fixation symbiotique de l'azote (Roe *et al.*, 2002).

Miller et Wood (1996) ont rapporté que le *Rhizobium* est une bactérie sensible à la salinité surtout durant le processus de symbiose, mais il peut tolérer des concentrations élevées; il est doté d'un mécanisme d'adaptation qui le rend capable de surmonter l'effet de stress salin.

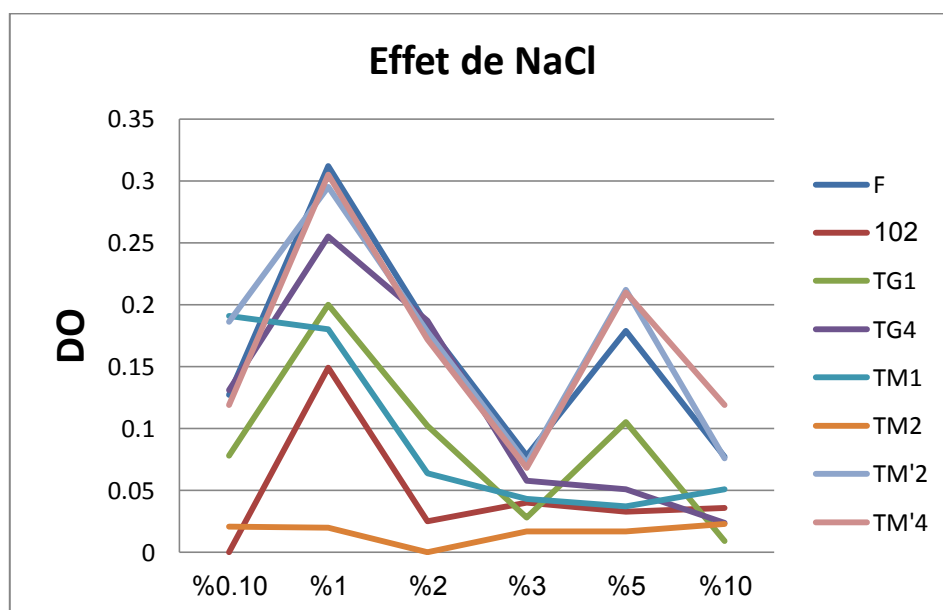


Figure 13 : Effet du NaCl sur la croissance de toutes les souches étudiées

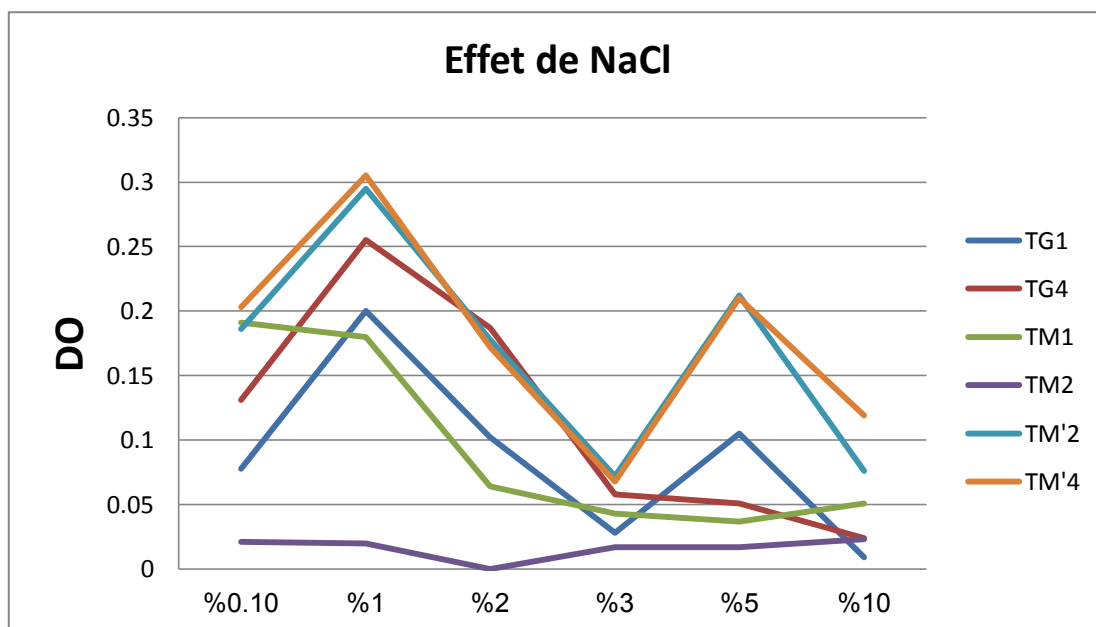


Figure 14: Effet du NaCl sur la croissance des isolats

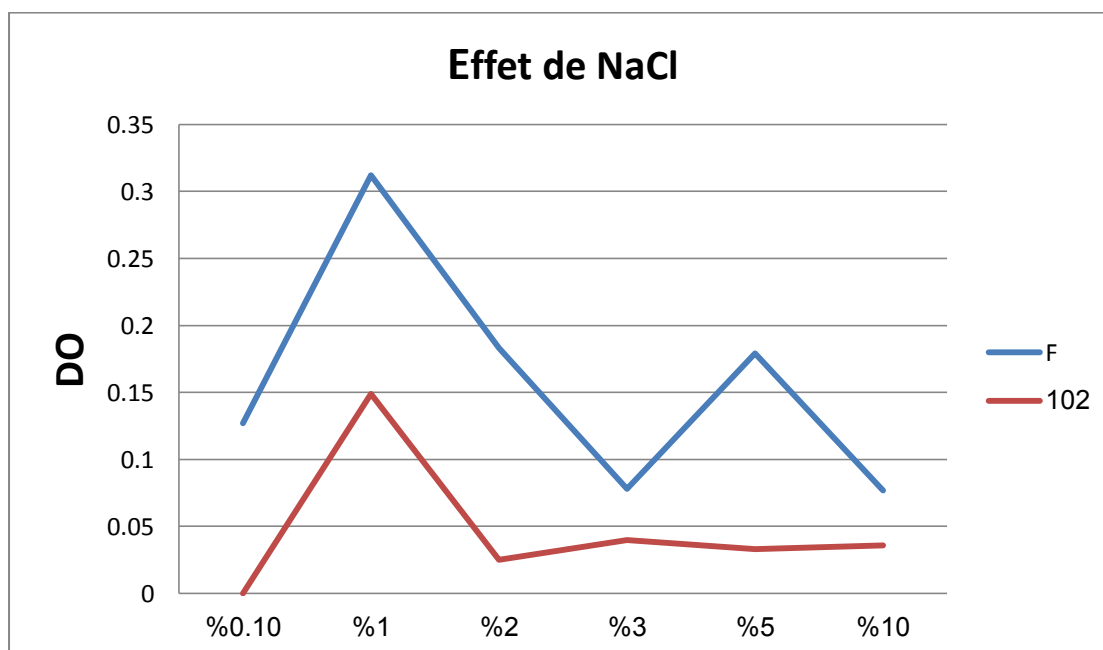


Figure 15: Effet du NaCl sur la croissance des souches références

II-3-2- Effet du pH

La majorité des souches sont capable de pousser entre une gamme de pH allant de 3 à 10 avec un optimum de croissance situant entre pH 5 et 6.

Küçük et Kivanç (2008) ont trouvé que les souches qui nodule la légumineuse *Cicer arietinum* L. sont capable de vivre aux variations du pH de 3 à 9.

Les isolats TM3, TG4 et la souche de référence 102 possèdent une très bonne croissance à différents pH allant du pH 4 jusqu'à pH 6,8 (**Figure16**).

Les mécanismes possibles comprennent la réglementation de pH cytoplasmique sont: l'exclusion et / ou l'extrusion des protons, la production des exopolysaccharides et les changements d'hydrophobicité de la membrane plasmique. Dans plusieurs bactéries, comme *R. leguminosarum* bv Trifolii ces mécanismes ont été décrits comme étant une réponse adaptative au pH du milieu (Correa et Barneix., 1997). Donc, la sélection des souches de rhizobium plus tolérante au faible pH permet d'améliorer la tolérance des légumineuses à l'acidité (Correa et Barneix., 1997).

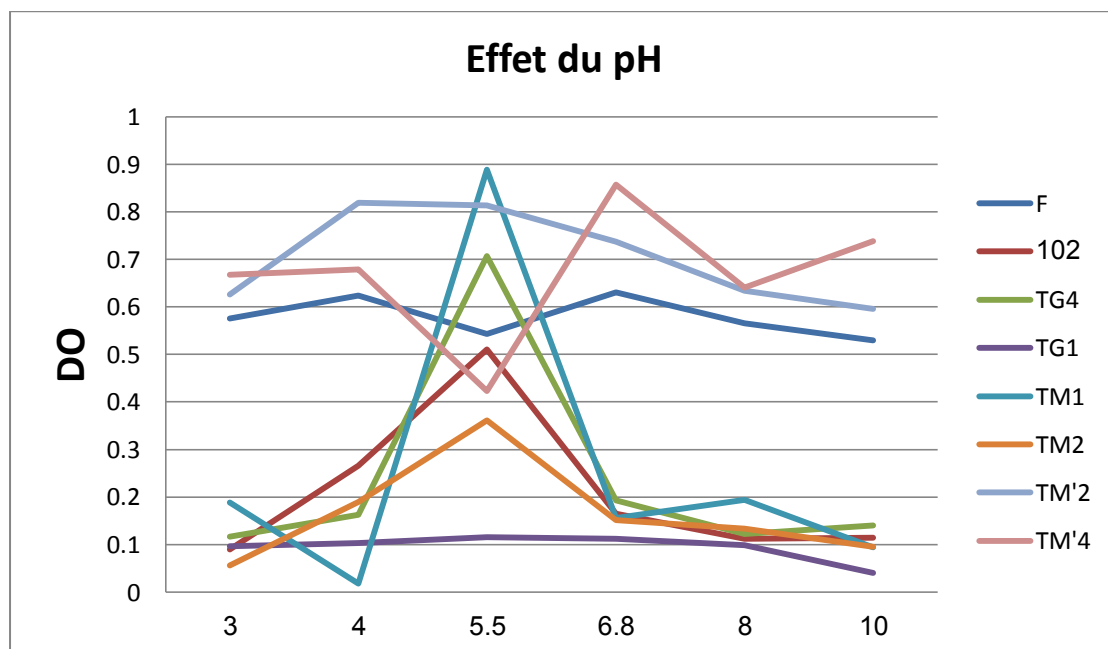


Figure 16: Effet du pH sur la croissance de toutes les souches étudiées.

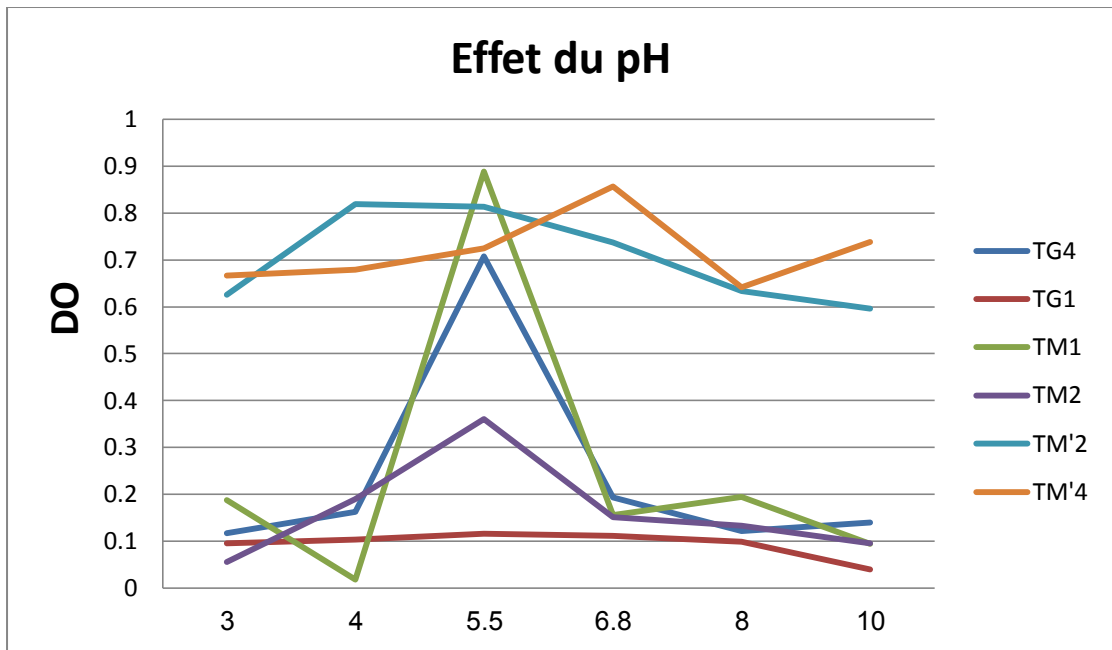


Figure 17: Effet du pH sur la croissance des isolats.

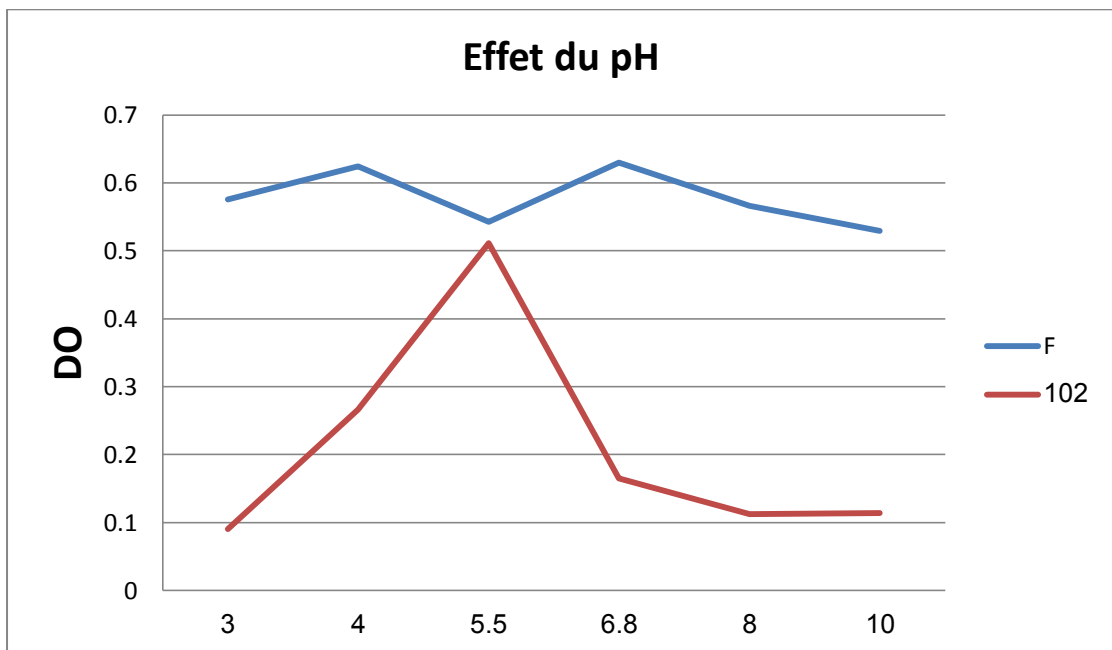


Figure 18: Effet du pH sur la croissance des souches références.

II-3-3- Effet de la température

La plupart des souches sont capables de croître à une température allant de 4°C (les isolats TM 3, TM4, TG4 et la référence F) jusqu'à 45°C (pour les isolats TM1, TM2, TG1 et la référence F) avec un optimum de croissance entre 28°C et 37°C (**Tableau 6**).

Ces résultats sont correspondants à celui indiqué pour les rhizobia par Jordan (1984).

La meilleure température d'incubation correspond à 28°C en donnant une très bonne croissance pour tous les isolats. Plus de 45°C il n'y a aucune croissance. Ces résultats sont en accord avec ceux de Zahran (1999) qui indiquent une grande variabilité de la thermo-tolérance rapportée chez les diverses espèces et souches de rhizobia.

Les souches résistantes aux températures très élevées n'ont pas une bonne capacité pour la fixation de l'azote atmosphérique et que cette thermorésistance est probablement liée à la capacité des bactéries à survivre dans des périodes chaudes (Räzänen., 2002).

Tableau 6: Croissance des isolats et souches de référence à différentes températures.

	4 ° C	28 ° C	37 ° C	44 ° C
F	+(3j)	++	++	+(3j)
102	-	+(2j)	+	-
TG1	-	++	++	++
TG4	+(3j)	+	-	-
TM1	-	++	++	(+2j)
TM2	-	++	++	+
TM3	+(3j)	++	++	-
TM4	+(4j)	++	-	-

II-4- Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

II-4-1- Résistance aux métaux lourds

Les souches tolèrent les métaux lourds à des concentrations différentes. La concentration minimale inhibitrice est différente selon les souches et les métaux lourds.

La majorité des souches tolèrent la présence du $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ et la concentration minimale inhibitrice est observée à des concentrations importantes.

Toutes les souches résistantes à la présence des concentrations 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de CdCl_2 , 200 et 500 $\mu\text{g/ml}$ de CuSO_4 . La sensibilité des souches apparaît avec le HgCl_2 et elle est différente selon les souches. La concentration inhibitrice supérieure à 20 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches TM3 et TM4 et inférieure de 20 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches TG1, TG4, TM1, TM2 et les références F et 102 (**Tableau 7**).

Des mécanismes de résistance aux métaux lourds tels que la biominéralisation, la séquestration, ou la conversion enzymatique diffèrent des véritables résistances aux métaux lourds qui sont eux liés à la présence de gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. Ceux-ci portent des déterminants de résistance qui assurent l'extrusion des métaux (CDF «Cation Diffusion Facilitator», RND «Resistance-Nodulation-Cell Division », ATPases de type P) (Monchy, 2007).

Tableau 7: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de différents métaux lourds

	Pb(CH ₃ COO ⁻) ₂	Cd de S	CuSO ₄	ZnCl ₂	HgCl ₂
F	>2000	300	1000	500	>20
102	>2000	300	1000	500	>20
TG1	>2000	300	1000	500	>20
TG4	>2000	300	1000	500	>20
TM1	>2000	300	1000	500	>20
TM2	>2000	300	1000	500	>20
TM3	>2000	300	1000	500	<20
TM4	2000	300	1000	500	<20

II-4-2- Résistance aux antibiotiques

Nous avons utilisé la méthode de dilution pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques (µg/ml). Cette méthode consiste à mettre un inoculum bactérien au contact des concentrations croissantes d'antibiotiques.

Tous les isolats et souches de références résistent à l'érythromycine et à l'acide nalidixique, les concentrations inhibitrices diminuent avec Chloramphénicol et deviennent minimales en présence de Kanamycine pour les isolats TG1, TG4, TM2 (**Tableau8**).

La résistance aux antibiotiques est fréquemment utilisée dans les études rhizobiales en tant que moyen d'identification des souches et est considérée comme un bon trait pour comparer les différentes souches (Beck *et al.*,1993). Les résultats obtenus par Maatallah *et al.* (2002) montrent que les souches sont résistantes aux kanamycine, érythromycine et à l'acide nalidixique.

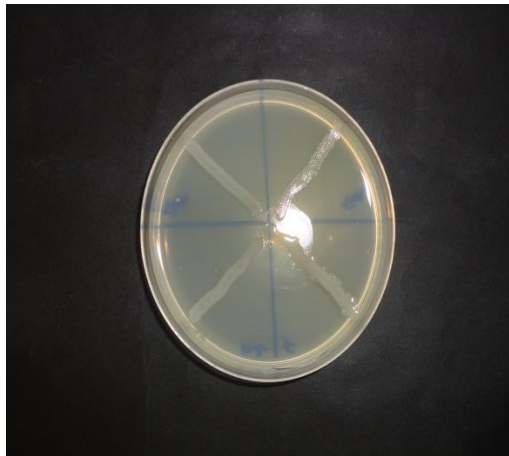
Sur le plan biochimique, les bactéries ont développé des mécanismes d'acquisition de la résistance:

- La production d'une enzyme qui va détoxifier l'antibiotique.

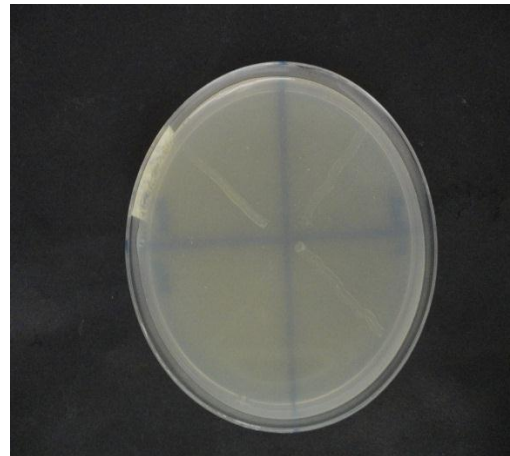
- L'imperméabilité, notamment par diminution du diamètre des porines (pores au niveau de la membrane externe) chez les bacilles à Gram négatif.
- L'efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes (Courvalin., 2008).

Tableau 8: Concentration minimale inhibitrice(CMI) de différents antibiotiques

	Erythromycine	Chloramphénicol	Acide nalixidique	Carbénicilline	Kanamycine
F	>500	>300	>500	>500	300
102	>500	300	>500	>500	<100
TG1	>500	300	>500	<100	<100
TG4	>500	300	>500	>500	<100
TM1	>500	300	>500	>500	>500
TM2	300	300	>500	300	<100
TM3	>500	300	>500	>500	>500
TM4	>500	300	>500	>500	<500



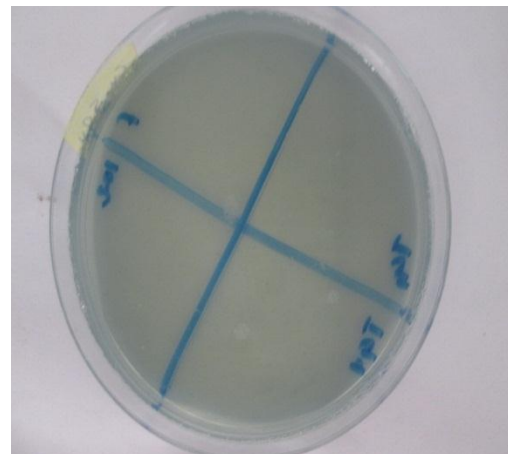
(a) :Résistance des isolats aux antibiotiques



(b): sensibilité des isolats aux antibiotiques



(c): Résistance des isolats aux Métaux lourds



(d): sensibilité des isolats aux Métaux lourds

Figure 19: Résultats de la résistance et la sensibilité aux métaux lourds et Antibiotique.

II-5- Etablissement un dendrogramme à partir des testes phénotypiques

Nous avons réalisé le dendrogramme par logiciel **STATISTICA 6** après avoir les résultats des testes phénotypiques des souches étudiées (**Figure20**).

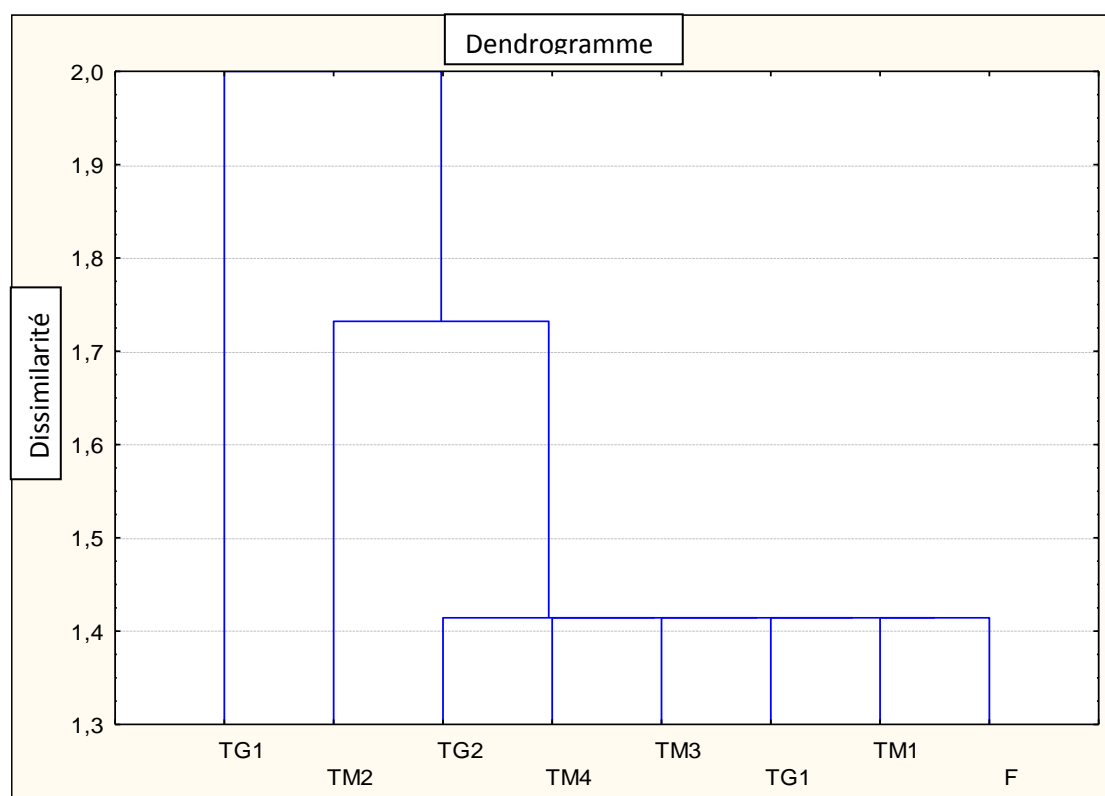


Figure 20: dendrogramme des souches étudiées.

Une classification de nos isolats par rapport à la souche de référence F ressort du dendrogramme en deux clades: **Clade 1** regroupe les isolats TM2, TG2, TM4, TM3, TG1, TM1 avec la souche de référence F; **Clade2** qui contient la souche TG1.

III-Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

III-1-Coefficient de similitude:

Selon la méthode de Jana *et al.* (1992) le Coefficient de similitude permet de déterminer le degré de ressemblance entre les profils protéiques des différentes souches. Ce coefficient est calculé par la formule suivante: nombre de bande communes entre les 2 souches /nombre total de bande) ×100.

$$Cs = Ns / (Ns + Nd) \times 100$$

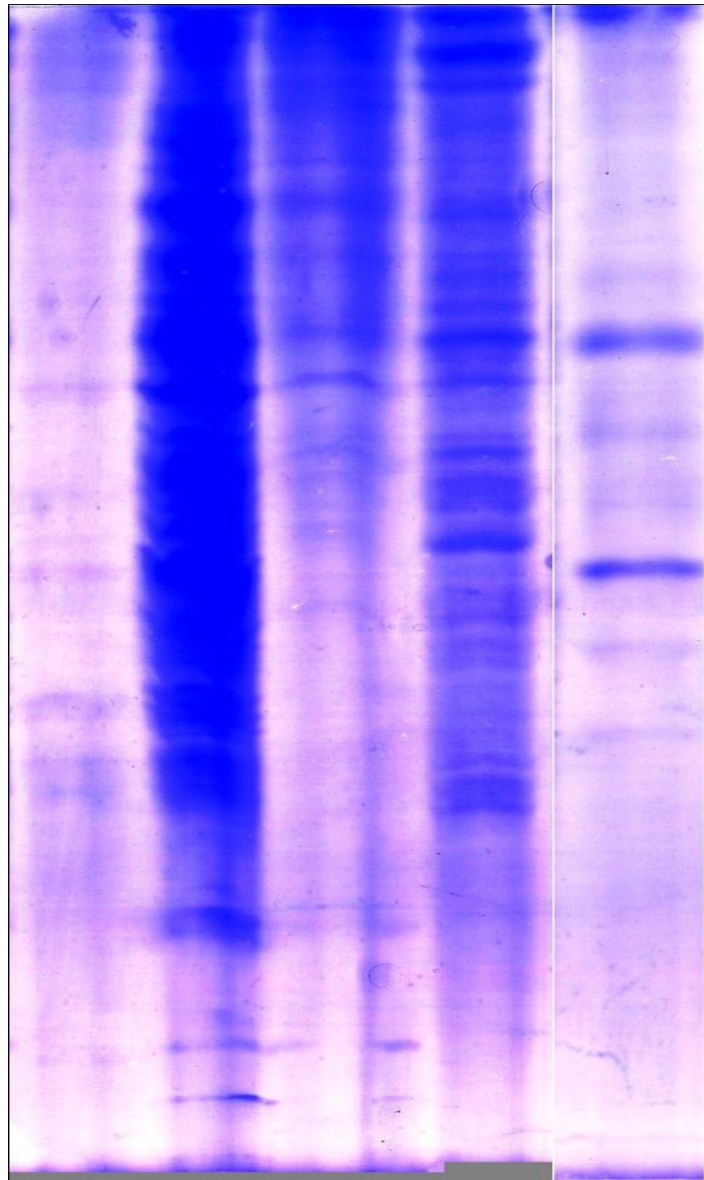
Avec:

Ns : nombre de bandes communes entre les 2 souches.

Nd: nombre de bandes différentes.

Tableau 8: Coefficient de similitude entre les isolats et la souche référence.

	TM1	TM2	TM3	TM4	102
TM1	001	56.6	47.16	39.62	52.83
TM2	56.6	100	77.35	45.28	86.79
TM3	47.16	77.35	100	37.73	62.26
TM4	39.62	45.28	37.73	100	52.85
102	52.83	86.79	62.26	52.85	100



TM1 TM2 TM3 TM4 102

Figure 21: profil protéique des différentes souches

III-2-Etablissement du dendrogramme

La réalisation de dendrogramme se fait par le logiciel **STATISTICA 6** après avoir mesuré la distance de migration de chaque bande protéique pour toutes les souches étudiées (**Figure 22**).

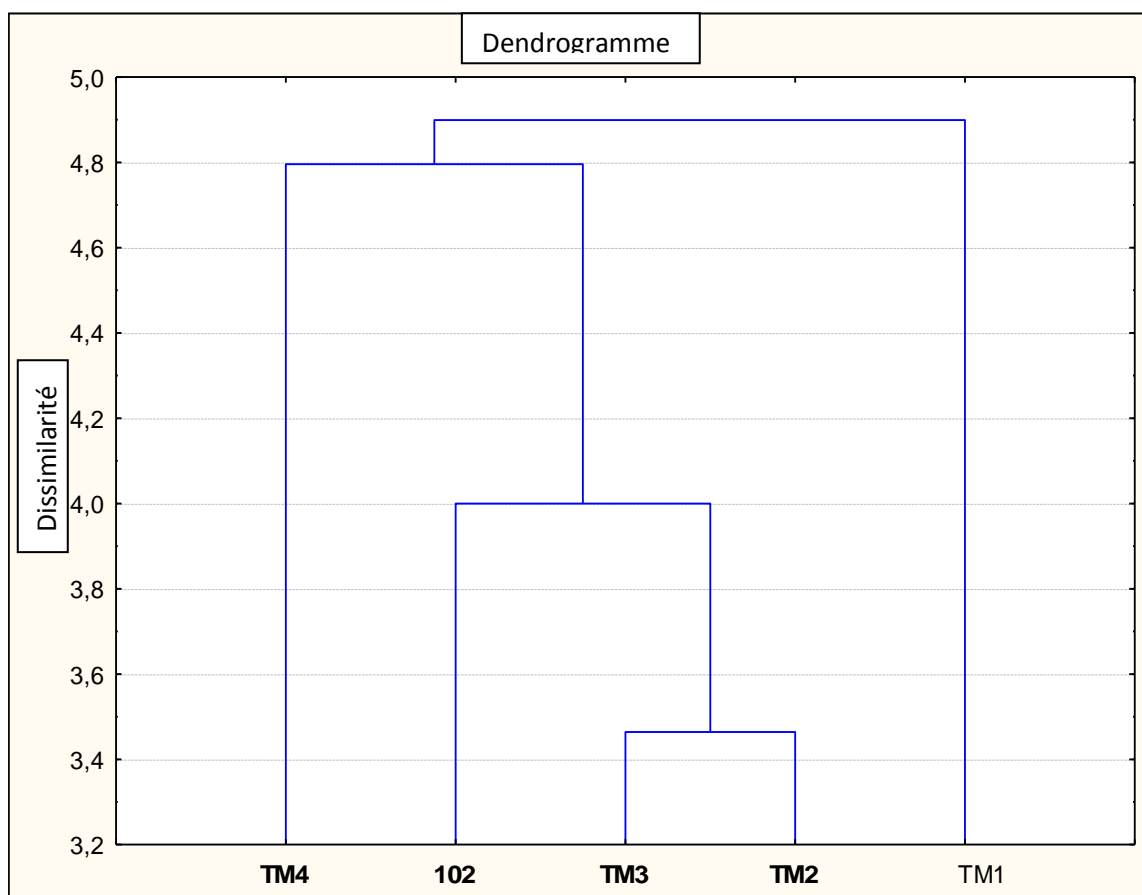


Figure 22: Dendrogramme des souches étudiées.

Une classification de nos isolats par rapport à la souche référence 102 ressort du dendrogramme en trois clades: **Clade 1** contient deux sous clades: **sous clade1** regroupe les isolats TM2, TM3; **sous clade2** regroupe les isolats TM2, TM3 avec la souche de référence 102; **Clade 2** regroupe les souches TM2, TM3, 102 et l'isolat TM4; **Clade3** regroupe les isolats TM1, TM2, TM3, TM4 et la souche référence 102.

L'analyse du profil protéique obtenu (**Figure 21**) représente un polymorphisme entre nos isolats de *Trigonella foenum-graecum* L. et la souche de

référence 102 ce qui traduit une similitude ente eux. A souliger que nos souches étudiées ont une identité proche de la souche de référence 102.



CONCLUSION

L'association symbiotique fixatrice d'azote sont très diversifiées et sont responsables de près de la moitié de la fixation biologique d'azote moléculaire de globe ; les plus connues et les mieux étudiées sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et des plante de la famille des légumineuses, et en limitant les engrais azoté qui sont couteux et polluants.

Dans notre étude nous avons mis en évidence le contenu nodulaire de type de légumineuse de l'espèce *Trigonella foenum-graecum* L. Prélevées à partir de deux régions de l'Est Algérien, de type cultivée de la wilaya de Mila et Guelma.

Nous avons isolé 14 souches et testé 6 souches, toutes les souches ont une croissance rapide sur le milieu YMA additionné de bleu de bromothymol, une faible absorption de rouge de Congo, la morphologie microscopique révèle des bâtonnets Gram négatif et mobiles sur le milieu de Mannitol mobilité.

Les souches testées peuvent pousser dans un large intervalle de température compris entre 4°C et 44 °C avec une température optimale de croissance entre 28°C et 37 °C, qui confirment une grande variabilité de la thermo-tolérance.

Toutes les souches sont osmotolérantes pouvant pousser dans une concentration allée jusqu'a 10% 1710Mm de NaCl. Les souches sont capables également de pousser sur une large gamme de pH allant de 3 à 10 avec un pH optimum de croissance entre 5 et 6.

Nos résultats des tests phénotypiques ont une ressemblance entre nos souches testés avec une identité rapprochée à la souche de référence F (*Rhizobium sllae*) RHF.

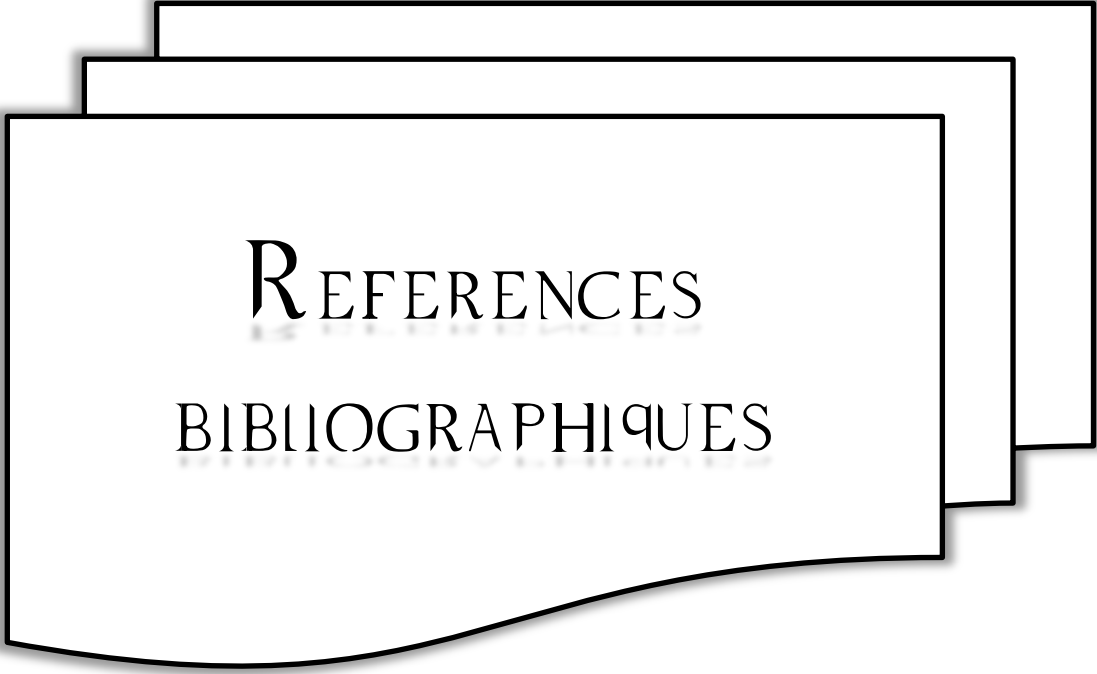
La détermination de la concentration minimale inhibitrice de cinq métaux lourds et cinq antibiotiques, permet de conclure que nos isolats tolèrent le plomb (Pb (CH₃COO⁻)₂) et sulfate de cuivre (CuSO₄) avec des concentrations importantes.

Aussi que toutes les souches résistent les antibiotiques testés à des concentrations élevées.

Le profil protéique a révélé un polymorphisme entre les isolas et la souche de référence 102 (*Mesorhizobium ciceri*).

Au terme de ce mémoire, nous avons obtenu des informations qui pourront être utilisée comme référence dans ultérieurs travaux :

- l'exploitation de la grande tolérance des souches aux différents stress environnementaux (osmotolérance, thermotolérance et croitre dans un large intervalle de pH).
- l'exploitation de la grande résistance des souches aux métaux lourds et aux antibiotiques.
- La détermination du statut taxonomique des souches de *Trigonella foenum-graecum* L. étudiées et d'autre espèces endémiques algérienne par d'autres techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène de l'ADNr 16S. L'hybridation ADN/ADN pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia ou parmi un tout autre genre des protéobactéries.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Arreseigor C., Minchin F. R., Gordon A. J., Nath A. K., 1997: Possible cause of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in response to nitrate. *J. Exp. Bot.* 4: pp 905-913

Baudoin J.P., 2001: Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001 5 (4) pp 221–230.

Beck D.P, Materon L.A, Afandi F., 1993: Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. ICARDA, Syria.

Bélangier E., 1998: Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *Rhizobium sp. (Oxytropis Arctobla)* souche N33. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université de Laval.

Ben khaled L., Gomez A.M., Honrubia M., Oihabi A., 2003: Effet de stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. INRA, EDP science, 2003DOI: 10.1051/agro: 2003030.

Benhizia Y., Goudjil H., Benguedouar A., Rosella M., Giacomini A., Squartini A., 2004: Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System Appl Microbial.* 27 pp 462-468.

Beringer J. E., 1974: R-Factor transfer in rhizobium legume. *J. Gen. Microbiol.* 84: pp 188-189.

Berrada H., Fikri-Benbrahim K., 2014: Taxonomy of rhizobia: Current perspectives. *British Microbiology Reserch Journal.* 4 (6): pp 616-639.

Campbell C.S., Judd W.S., Jules Bouharmont., Kellogg E.A., Stevens P., 2001: Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Edition de boeck.

Chabbi R., 2010: Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre *Trigonella* L. (légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien. Thèse de magister de l'Université Mentouri Constantine. Algérie.

Come D., Françoise C., 2006: Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes, Edition Tec et Doc. Lav.

Correa O.S., Barneix A.J., 1997: Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: pp 153-157.

Couvalin P., 2007 : La résistance des bactéries aux antibiotiques : Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull. Acad. Vét. France* 2008 Tome 161 - N°1 pp 7-12.

Davet P., 1996: vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA. Paris.

Davidson I. A., Robson M. J., 1986: Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N₂-fixation, nodulation and growth of white clover. *Ann. Bot.* **57** pp 331-338.

Dénarié J., 2000: Texte de la 8ème conférence de l'Université de tous les savoirs réalisée le 8 janvier.

Dupuy Y., Nougier P. 2005. Les microorganismes. Du gène à la biosphère. Edition Ellipses.Paris.

El-Hilali I., 2006: La symbiose *Rhizobium-Lupin* : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V Agdal Rabat. Maroc.

FAO (1996) Tunisie: Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur les ressources phytogénétiques, Ministère De L'agriculture Tunis.

Fossou K.R., 2011 : Diversité génétique des rhizobia associées à un champ de pois d'Angole (*Cajanus cajan* L.) à Yamoussoukro (centre de la Côte d'Ivoire). Ecole supérieure d'agronomie de l'institut national polytechnique Félix Houphouët Boigny de Yamoussoukro-Diplôme d'agronomie approfondi.

Harchane H., El Addas H., Amsaguine S., El Amrani N., Radallah D., 2012: Effets l'extrait aqueux des graines du fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) sur l'amélioration du profil et la prise de poids chez le rat. Springer-verlag France: pp 1-6.

Helambe S.S., Dande R.P., 2012: Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): An Overview. International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research. 2(4):pp169-187.

Hopkins W.G., 2003: Les plantes et l'azote. In Physiologie végétale. Deuxième édition. de Boeck et Larciens.a. pp 99-121 .ISBN: 2- 445-0089-5

Ionescu A.M., Roman G.V., 2013: research on biology, productivity and yield quality of *Trigonella foenumgraecum* L. species (fenugreek) in the central part of the south Romanian plain. Scientific papers. Series A. agronomy. LVI.

Jana S.D., Chakrabartty P.K., Mshara A.K., 1992: taxonomic relationship of some members of enterobacteriaceae based on their protein profiles. J. Basic Microbial.32:pp29-33.

Joffin J.N., Leyval G., 2006: Microbiologie technique. Dictionnaire de la technique. Tome1, 4^{ème} édition de Scérén CRDP. Aquitaine, Espagne.

- Jordan D.C., 1984:** Rhizobiaceae. In N. R.Krieg and J.G.Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1. the Williams & Wilkins, Co., Baltimore. pp 234-245.
- Jordan, D.C., 1982:** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants, Int. J. Syst. Bacteriol. 32: pp 136-139.
- Kanak V., Arpita G., Vinay K., Spandan C., Navin S., Kalpesh K., Tanushree T., Surendre K.C., 2012:** De novo transcriptome sequencing in *Trigonella foenum-graecum* to identify genes involved in the biosynthesis of diosgenin. The plant Genome, plantgenome: pp1-31.
- Küçük Ç., Kivanç M., 2008:** Preliminary characterization of *Rhizobium* strains isolated from chickpea nodules African Journal of Biotechnology. 7 (6), pp. 772-775.
- Laemmli U.K., 1970:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature N°227 pp 680-685.
- Maatallah J., Berraho E., Sannjuan J., Lluch C., 2002:** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) grown in Moroccan soils. Agronomie 22: pp 321-329.
- Machrafi Y., 2001:** Inhibition de la symbiose Rhizobium-Légumineuse par les acides phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.
- Martinez-Molina E., Morales V.M., Hubbell D.H., 1979:** Hydrolytic enzyme production by Rhizobium. Appl. Environ. Microbiol. 38(6): pp 1186-1188.
- Mehani M., Segni L., 2012:** Antimicrobial Effect of Essential oil of plant *Trigonella foenum-graecum* on some Bacteria Pathogens. World Academy of Science. Engineering and Technology. 69: pp 358-360.
- Mehrafarin A., Qaderi A., Rezazadeh S.H., Naghdi Badi H., Noormohammadi G.H., Zand E., 2010:** Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Journal of Medicinal Plants. 9(35): pp 1-18.
- Milane, H., 2004:** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat Strasbourg.
- Miller K.J., Wood J.M., 1996:** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. Ann.

Review. Microbail. 50: pp 101-136.

Mobly L.T.H., 1992: Urease Microbial. J Lederberg (ed). Encyclopedia of microbiology. 4: pp 327-346.

Monchy S., 2007: Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de doctorat de l'Université Libre de Bruxelles.

Moradi Kor N., Didarshetaban M.B., Saeid H.R., 2013: Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research. 1(8): pp 922-931.

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C. 2001: Nodulation of legumes by members of the β -sb class of Proteobacteria. Nature N° 411 pp 948-950.

N'zoué A., Domergue O., Moulin L., Avarre J. C., Lajudie P., 2006 : Tropical Legume Nodulating Bacteria. Molecular Biology of Tropical Plants. pp 105-141

Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S., Iaccarino M., 2004: Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol* 234: 201-62.

Perry J.J., Staley J.T., Lory S., 2004: Microbiologie. Edition Dunod, Paris.

phénoliques provenant des écorces de résineux. Mémoire pour l'obtention du grade de maître des sciences. Université Laval.

Pujic P., Normand P., 2009: La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. Biofuture 298 pp 26-29.

Quezel P., Santa S., 1962: Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris. France

Rao D.L.N., Giller K.F., Yea A.R., Flower T.J., 2002: The effects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). Annals of Botany. 89: pp 563-570.

Raven., Evert., Eichhorn., 2007: Biologie végétale. 2e édition. Edition de boeck. Paris France. pp 653-660. oisier.

Räzänen L.A., 2002: Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finland.

Richter G., 1993: Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Edition presse polytechniques et universitaires romandes. pp 341-352.

- Saadalleh K., Drevon J.J., Abdelly C., 2001:** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte salin. *Agronomie* 21: pp627-634.
- Sherwood J. E., Truchet G. L., and Dazzo F. B., 1984:** Effect of nitrate supply on the in vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium trifolii*-binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. *Planta*. **126:** pp 540-547.
- Singh B., Kaur R., Singh K., 2008:** characterization of Rhizobium strain isolated from the roots of trigonella foenum-graecum (fenugreek). *African Journal of Biotechnology*. 7(20): pp 3671-3676.
- Sinskaya, E., 1961:** Flora of cultivated plants of the U.S.S.R. XIII. Perennial leguminous plants, Part I. Medic.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994:** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc .pp 450.
- Spaink H.P., 2000:** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: pp 257-88.
- Sprent J.I., 1999 :**Nitrogen fixation and growt of non-crop legume species in diverse environments.Perspective in Plant Ecology, Evolution and Systematics 2/2 : pp 149-162.
- Squartini A., Struffi P., Doring H., Pobell S.S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P.F., Molina E.M., Dazzo F.B., Caselia S., Nuti M.P., 2002:** *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly ‘rhizobium hedysari’), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systeatic and Evolutionary microbiology.* 52: pp 1267-1276.
- Struffi P., Corich V., Giacomini A., Benguedouar A., Squartini A., Casella S., Nuti M.P., 1998:** Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology.* 84(1) pp 81-89. Supporting bacteria *Current Science.* 89, N°1.
- Talip C., Munevver N. P.,Hasn A., Murat E.,Zeki Aytac., 2011 :**Comparative seed morphology of *Trigonella L.* Species (leguminosae) in Turkey . *African Journal of Agricultural Research* 7(3): pp509-522.
- Vandamme P. B., Grillis P. D. V., Kersters K.,Swing J, 1996:** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.* 60: pp 407-438.

Vandamme, P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., and Swings J., 1996: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: pp 407-438.

Vincent J.M., 1970: The manual for the practical study of nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. United Kingdom.

Werner D., 1992: symbioses of plants and microbes. Philipps-University Marburg Germany. Edition Chapman & Hall.

Zahran H. H., 1999: *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63, N° 4 pp 968–989 .

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willem Willems, A., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie, P., 2004: Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* pp 380-395.

Le Journal canadien de microbiologie <http://fr.spiritus-temporis.com/fabaceae/> (12 Mai 2012).



ANNEXES

Annexe 1

Milieux de culture et solutions utilisés

Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) en g/l (Vincent, 1970)

Mannitol	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20
NaCl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMB (Yeast Mannitol Agar) en g/l (Vincent, 1970)

YMB	1000ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20minutes

Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	18
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

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

Composition de milieu YMA + bleu de bromothymol en g/l

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymo	15ml
Agar	15
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20minutes

Après ajustement de pH on ajoute 10ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Composition de milieu GPA (Glucose Peptone Agar) + pourpre de bromocrésol

(g/l) (Vincent., 1970).

Glucose 10

Peptone 5

Solution stock de pourpre de bromocrésol 10ml

Eau distillée 1000ml

Agar 18

pH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Ajouter du pourpre de bromocrésol (1g BCP dans 100ml d'éthanol), après stérilisation et refroidissement du milieu.

Composition de milieu TYA (Tryptone Yeast Agar) en g/l (Beringer, 1974)

Tryptone 5

Extrait de levure 3

CaCl₂H₂O 0.87

Eau distillée 1000ml

Agar 18

pH 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu Défini 8 en g/l (Vincent, 1970)

KH₂PO₄ 0.3

Na₂HPO₄ 0.3

MgSO₄ 0.21

CaCl₂ 0.21

Glutamate-Na	1
Mannitol	1
Solution stock vitamines	1ml
Oligoéléments	1ml
pH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes.

Solution stock vitamines (mg/l)

Acide nicotinique	100
Thiamine	100
Panthotenate-Ca	100

Dissoudre dans un tampon Na₂HPO₄ (0.05M); pH 7.

La stérilisation de la solution stock vitamines par filtration (0.22µm).

Solution oligoéléments (mg/l)

H ₃ BO ₃	50
FeSO ₄ 7H ₂ O	35
CuSO ₄ 5H ₂ O	8
MnSO ₄ 4H ₂ O	40
ZnSO ₄ 7H ₂ O	16

La stérilisation de la solution oligoéléments est effectuée par autoclavage.

Composition de milieu lactate-aspartate de sodium (Gloux et Le Rudelier, 1989).

Solution A (g/l)

KH ₂ PO ₄	0.3
NaHPO ₄	0.3
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.05
Eau distillée	1000ml

Solution B (mg/l)

H ₃ BO ₃	10
ZnSO ₄	1
CuSO ₄	1
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.5
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.1
Eau distillée	1000ml

Biotine	2g
Acide aspatique	100mg
Acide lactique	0.74mg
Eau distillée	1000ml

Préparation de milieu:

- Prendre 100ml de la solution A.
- Mélanger avec 20ml de la solution B ensuite compléter à 1000ml.
- Additionner l'acide lactique et l'acide aspartique.
- Ajuster le pH à 7.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

La biotine est stérilisée par filtration et additionnée au milieu.

On ajoute dans chaque cas la concentration sélectionnée de NaCl.

Différent matériel du SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Tampon de lyse

Tris	25mM
Glycérol	192mM
SDS	2.5%
B- Mercaptoéthanol	2.5%
Bleu de Bromophénol	5mg
Eau distillée	200ml

Solutions stocks

Solution d'acrylamide

Acrylamide	30% 60g
Bis acrylamide	0.8% 1.6g

H₂O QSP 200 ml

Tampon resolving: Tris- HCl 3M pH 8.8

Tris 3M 72.7g

SDS 0.8% 1.6g

DD 0.8 ml

H₂O QSP 200 ml

Adjuster à pH 8.8 avec HCl.

Tampon stacking: Tris-HCl 0.5M pH 6.8

Tris 0.5M 12.2g

SDS 0.4% 0.8g

MCE 0.2% 400µl

H₂O QSP 200 ml

Adjuster à pH 6.8 avec HCl.

Preparation des gels

Gel de separation (resolving gel) à 12%

Solution d'acrylamide 10.4 ml

Tampon resolving 3.14ml

Tetraméthylènediamine (TEMED) 12.5µl

H₂O QSP 2 5 ml

Gel de concentration (stacking gel) à 7.5%

Solution d'acrylamide 5ml

Tampon stacking 5ml

TEMED 20µl

H₂O QSP 20 ml

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

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

Resolving gel 140µl

Stacking gel 200µl.

Tampon de migration pH 8.3

Tris 0.025M 1.06g

Glycine 0.192M 5.04g

SDS 0.1%	0.35g
MCE 0.05%	175µl
H ₂ O QSP	350 ml

Solution de coloration

Solution mère (bleu de Comassie et de methanol)	25ml
Acide tricholacétique (TCA) 60%	40ml
Eau distillée QSP	200ml

Annexe 2

Coloration de Gram

Fait à partir des cultures sur YMA on prépare des lames bien étalées en couche mince, séchée et fixée. Puis coloré selon les étapes suivantes:

- Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une minute
- Chasser le violet avec du Lugol et ensuite couvrir la lame avec le Lugol pendant 30 secondes.
- Décolorer au mélange alcool-acétone (v/v) jusqu'à la décoloration totale du frottis.
- Laver à l'eau de robinet courante.
- Couvrir la lame d'une solution de Fushine pendant 1 minute.
- Laver à l'eau, séché la lame et observer a immersion.