

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



N° d'ordre :

N° de Série :

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du
Diplôme de Master
Filière : Microbiologie
Option : Ecologie Microbienne

Thème

**Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la
légumineuse *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans
deux sites différents.**

Présenté par :

NOUAR Maroua
RIABI Kenza

Soutenu le :

23/06/2014

Devant le jury d'Examens:

Mr. A. Hamidechi Professeur - Université Constantine 1,
Mr. Y. Benhizia Professeur - Université Constantine 1,
Mme. I. Guergouri Maitre-assistante - Université Constantine 1,

Président
Rapporteur
Examinatrice

2013/2014

REMERCIEMENTS

Nous remercions ALLAH el tout puissant de nous avoir donné la force et l'abnégation pour terminer nos études et le présent travail.

Nos remerciements s'adressent au Professeur Yacine BENHIZIA du Laboratoire d'Ecologie microbienne, pour nous avoir proposé le sujet de mémoire, encadrées et suivies régulièrement dans la réalisation de ce mémoire.

Nos remerciements sincèrement au professeur Amar BENGUEDOUAR, pour nous avoir acceptées dans son laboratoire, pour nombreuses aides et orientation.

Nos remerciements sincèrement au professeur A.HAMIDECHI pour sa participation au jury d'évaluation de ce mémoire.

Nos remerciements et notre reconnaissance à madame I.GUERGOURI Maitre assistante à l'Université Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Une mention spéciale pour la tutrice Leila BOUKAOUS pour leur soutien moral et nombreux conseils, remarques pertinents surtout sa patience durant la réalisation de notre travail.

Au professeur Douadi KHELIFI pour nous avoir ouvert son laboratoire de Biochimie, Génétique et Biotechnologie Végétale sans aucune restriction et avec une grande modestie, Enfin nos remerciement Professeur Mohamed Laid HADDI pour leur nombreuses conseils, à monsieur Rabah CHABI, à mademoiselle Meriem GACI, et Mouna SAOUDI, maîtres-assistantes à l'Université Constantine 1, et aux doctorantes Radja TIR, Hanane MELLAL, Sabra et Wissam AIMENE, pour leurs soutiens moral et leurs orientation durant la préparation de ce travail.

DEDICACES

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné la force et l'abnégation pour terminer nos études et le présent travail.

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, que je ne cesserai jamais de remercier. Leur amour, leur soutien et leurs encouragements ont été et resteront mes meilleurs atouts pour le futur. Puisse Dieu me les garder.

A mon mari cherif, qui a toujours été à mes cotés, surtout dans les moments les plus difficiles.

Je n'oublierai pas mes frères : Mamdouh, Samir, Taki el dinne, Adel ; chez les quels j'avais trouvé aide, conseils et réconfort.

Quant à mes cousines Messaouda, Nassima , qu'elles sachent que je ne les oublierai pas dans mes dédicaces :elles ont été là quand j'avais besoin d'elles.

A toutes et tous qu'ils trouvent en ce mémoire, ma profonde gratitude et mon éternelle reconnaissance.

Kenza .R.

DEDICACES

*Avant tout je tiens à remercier DIEU, le tout puissant de
m'avoir donné suffisamment de courage et surtout de patience
pour réaliser ce modeste travail.*

*A mon cher PAPA à qui je dois persévérance et volonté,
acharnement et fierté.*

*A ma tendre MAMAN qui m'a toujours aidée par sa présence,
ses conseils et ses prières.*

A la mémoire de mes grands parents

*A mes très chers frères NABIL et ma belle sœur RANIA,
FOUAD et ma belle sœur MAROUA, FAROUK-AMINE,
ISKANDER, ABD ELJALIL.*

A mon adorable petit AMINE-ABD ELSETAR

*A ma très chère tante MOUMIA et ma cousine AIDA-KHAWLA
A tous mes camarade de promotion.*

Maroua N.

TABLE DES MATIERES

Introduction Général	1
-----------------------------------	---

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Les légumineuses.....	2
1.1. Les Caesalpinoideae.....	2
1.2. Les Mimosoideae.....	2
1.3. Les Papilionoideae.....	2
2. Le macro-symbiont : Plante hôte.....	4
2.1. Genre <i>Hedysarum</i>	4
2.1.1. <i>Hedysarum pallidum</i> Desf.....	4
2.1.2. Classification.....	5
2.1.3. Ecologie et distribution.....	5
2.1.4. Description de la plante.....	5
3. Micro-symbiont: Rhizobium (sulla).....	8
3.1. Caractères morphologiques.....	8
3.1.1. La forme végétative.....	8
3.1.2. La forme bactéroïdes.....	9
3.2. Caractères biochimiques.....	9
3.3. Caractères physiologiques.....	9
3.4. Caractères cultureux.....	10
3.5. Caractères génétiques.....	10
4. La nodulation.....	10
4.1. Les étapes de la nodulation.....	11
4.1.1. Echange de signal d'infection.....	11
4.1.2. Infection.....	12
4.1.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes.....	12

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	13
1.1. Description de la zone d'étude.....	13
1.2. Collecte des nodules.....	13
1.3. Conservation des nodules.....	14
1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules.....	15
1.2.1. Stérilisation des nodules.....	15
1.2.2. Test de stérilisation.....	15
1.2.3. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés....	15
1.4.3.1. La première méthode.....	15
1.4.3.2. La deuxième méthode.....	16
2. Caractères morphologiques et cultureux.....	17

2.1. Principaux milieux de culture utilisés.....	17
2.2. Purification des isolats.....	17
2.3. Examen microscopique.....	18
2.3.1. Coloration de Gram.....	18
2.4. Conservation des souches.....	18
2.5. Absorption du rouge Congo.....	18
3. Caractérisation phénotypique des isolats.....	18
3.1. Mesure de la vitesse de croissance.....	18
3.2. Tests nutritionnels.....	19
3.2.1. Assimilation de la source de carbone.....	19
3.2.2. Utilisation de la source d'azote.....	19
3.2.3. Besoins en vitamines.....	19
3.2.4. Examen de la mobilité.....	20
3.3. Test biochimiques.....	20
3.3.1. Réduction des nitrates.....	20
3.3.2. Hydrolyse de l'urée.....	20
3.3.3. Activité cellulosique.....	21
3.4. Tests physiologiques.....	21
3.4.1. Tolérance au Chlorure de sodium.....	21
3.4.2. Effet de pH.....	21
3.4.3. Effet de la température.....	22
3.5. Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques.....	22
3.5.1. Résistance aux métaux lourds.....	22
3.5.2. Résistance aux antibiotiques.....	22
4. Détermination du profil protéique par électrophorèse SDS-PAGE.....	23
4.1. Principe.....	23
4.2. Protocole.....	23

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Test de stérilisation.....	24
2. Caractères morphologiques et culturaux.....	24
3. Caractérisation phénotypique des isolats.....	28
3.1. Mesure de la vitesse de croissance.....	28
3.2. Tests nutritionnels.....	28
3.2.1. Assimilation de la source de carbone.....	28
3.2.2. Utilisation de la source d'azote.....	29
3.2.3. Besoins en vitamines.....	32
3.3. Test biochimiques.....	33
3.3.1. Réduction des nitrates.....	33
3.3.2. Hydrolyse de l'urée.....	33
3.3.3. Activité cellulosique.....	35
3.4. Tests physiologiques.....	36
3.4.1. Tolérance au Chlorure de sodium.....	36
3.4.2. Effet du pH.....	37

3.4.3. Effet de la température.....	39
3.5. Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques.....	40
3.5.1. Résistance aux métaux lourds.....	40
3.5.2. Résistance aux antibiotiques.....	42
4. Détermination du profil protéique par électrophorèse SDS-PAGE.....	43
Conclusion Générale.....	46
Références Bibliographiques.....	47
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Phylogénie des <i>Leguminosae</i> après l'analyse des séquences du gène Chloroplastique <i>rbcl</i> (Doyle <i>et al.</i> , 1998)	03
Figure 2 : <i>Hedysarum pallidum</i> Desf., dans les deux sites.....	04
Figure 3 : Description de la plante dans les deux sites.....	06
Figure 4 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (<i>cropview.wordpress.com</i>).....	10
Figure 5 : Localisation géographique de la zone de prélèvement.....	13
Figure 6 : Conservation des nodules (Vincent, 1970).....	14
Figure 7 : Isolement par la méthode des quatre quadrants (Vincent, 1970).....	16
Figure 8 : Test de stérilisation.....	24
Figure 9 : Caractères culturels et microscopique des souches isolées.....	25
Figure 10 : Croissance des isolats sur YMA+BTB.....	28
Figure 11 : Utilisation des différentes sources de carbone par les souches.....	30
Figure 12 : Utilisation des différentes sources d'azote par les souches.....	30
Figure 13 : Utilisation des vitamines par les souches.....	30
Figure 14 : Tests biochimiques des isolats et souches témoins.....	34
Figure 15 : Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de références après 24 heures d'incubation.....	36
Figure 16 : Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de références après 48 heures d'incubation.....	37
Figure 17 : Tolérance au pH des isolats et des souches de références après 24 heures d'incubation.....	38
Figure 18 : Tolérance au pH des isolats et des souches de références après 48 heures d'incubation.....	38
Figure 19 : Effet des métaux lourds sur la croissance des isolats et souches témoins.....	41
Figure 20 : Effet des antibiotiques sur la croissance des isolats et souches témoins.....	41
Figure 21 : Profils protéiques des différentes souches.....	43
Figure 22 : Dendrogramme du profil protéique sur SDS-PAGE des isolats avec les souches de références.....	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Position systématique d' <i>Hedysarum pallidum</i>	05
Tableau 2 : Les solvants des antibiotiques utilisés (Somasegaran et Hoben, 1994).....	23
Tableau 3 : Assimilation des différents sucres par les isolats et les souches de référence.....	29
Tableau 4 : Utilisation des différentes sources d'azote par les isolats et les souches de référence	31
Tableau 5 : Assimilation des vitamines par les isolats et les souches de référence.....	32
Tableau 6 : Résultats des tests biochimiques.....	35
Tableau 7 : Température de croissances testées.....	39
Tableau 8 : Résistances et sensibilité des souches aux métaux lourds.....	40
Tableau 9 : Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques.....	42
Tableau 10: Coefficient de similitude entre les différentes souches de référence et isolats.....	44

Résumé

La présente étude est une contribution à la caractérisation des souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaire d'une espèce végétale endémique Nord-africaine ; *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans deux sites différents.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique, des tests biochimiques, nutritionnels et physiologiques ainsi qu'une détermination de la résistance et de la sensibilité des souches aux métaux lourds et aux antibiotiques et en fin un profil protéique sur SDS-PAGE.

Les résultats obtenus et l'analyse des caractères des 8 isolats supposent qu'il existe un certain polymorphisme entre les bactéries isolées à partir des nodules de la plante *Hedysarum pallidum* Desf.

Mots Clés : *Hedysarum pallidum* Desf, SDS-PAGE, polymorphisme.

Abstract

This study contributes to the characterization of bacteria isolated from root nodules of a North African endemic plant, *Hedysarum pallidum* Desf., growing in two different areas.

Strain characterization involves a morphological study biochemical, nutritional and physiological tests as well as determination of the resistances and sensitivities of strains to heavy metals, antibiotics. Finally a protein total profile on SDS-PAGE.

The results obtained and the analysis of characters of 8 isolates, assume that there is a polymorphism between bacteria isolated from nodules of *Hedysarum pallidum* Desf.

Keywords: *Hedysarum pallidum* Desf, SDS-PAGE, polymorphism.

ملخص

هذا الدراسة تساهم في وصف سلالات بكتيرية معزولة من العقد الجذرية لنوع نباتي مستوطن شمال إفريقي *Hedysarum pallidum* Desf نامي في موقعين مختلفين .

الدراسة الوصفية للسلالات قامت على دراسة مرفولوجية و اختبارات بيوكيميائية، و غذائية و فسيولوجية إضافة إلى تحديد مقاومة وحساسية السلالات للمعادن الثقيلة والمضادات الحيوية وفي الأخير دراسة المحتوى البروتيني بتقنية SDS-PAGE .

النتائج المحصلة وتحليل صفات 8 عزلات بينت وجود بعض التنوع المظهري بين البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية لنبات السلّة *Hedysarum pallidum* Desf .

الكلمات المفتاحية :

Hedysarum pallidum Desf, SDS-PAGE, التنوع المظهري.

INTRODUCTION

Les associations symbiotiques fixatrices d'azote sont très diversifiées et sont responsables de près de la moitié de la fixation biologique d'azote moléculaire du globe ; les plus connues et les mieux étudiées sont établies entre des bactéries du sol de type rhizobia et les plantes de la famille des légumineuses (De Faria *et al.*, 1989).

Le genre *Hedysarum*, fait partie de la famille des légumineuse, appelé communément « Sulla » ou Sainfoin d'Espagne, et composé d'un grand nombre d'espèces avec une répartition très étendue dans le monde. Il existe une soixantaine d'espèces réparties en Asie, Afrique, Amérique septentrionale et en Europe, parmi les quelles se trouvent des espèces endémiques (Coste, 1903 ; Titin *et al.*, 1967).

En Algérie, on compte neufs espèces appartenant au genre *Hedysarum* (Quezel et Santa, 1962). Celles-ci se localisent dans diverses régions caractérisées par des microclimats variables (Abdelguerfi-Berrekia, 1985) et qui représentent une grande importance agronomique (Hannachi *et al.*, 2004) et dans l'alimentation animale (fourrage vert) en tant que source principale de protéines (Gguignard, 1983).

Parmi ces espèces, *Hedysarum pallidum* Desf., est une plante vivace, cespiteuse, pousse spontanément au Maroc, en Tunisie et également dans l'Est Algérien, sans pour autant atteindre les zones Sahariennes. Cette espèce se rencontre sur les sols riches en calcaire total, à teneur variable en potassium (Abdelguerfi-Berrekia, 1985).

Ce présent travail repose sur un isolement et une caractérisation phénotypique des bactéries isolées des nodules racinaires de la légumineuse fourragère *Hedysarum pallidum*. Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

- Isolement des souches à partir des nodules.
- Etude morphologique et microscopique des souches isolées.
- Caractérisation phénotypique des isolats comprenant une série de tests.
- Analyse des profils protéique par SDS-PAGE.

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les légumineuses

Les légumineuses ou Fabaceae sont classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones à gousses (Sprent, 1995). Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*, avec 727 genres et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.*, 2006). Les espèces vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (Judd *et al.*, 2001).

Les formes arborescentes prédominent les pays chauds tandis que les formes herbacées caractérisent les régions tempérées (Guignard et Dupont, 2005). En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinoideae*) (Guignard et Dupont, 2005). 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.*, 2000). Elles sont extrêmement diversifiées, cependant elles présentent un point commun, leur fruit est une gousse (Caratini, 1984).

1.1. Les Caesalpinoideae

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles extérieurement (Judd *et al.*, 2001).

1.2. Les Mimosoideae

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd *et al.*, 2001).

1.3. Les Papilionoideae

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « papillon » (Guignard et Dupont, 2005). La sous-famille monophylétique des *Papilionoideae* renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent, 1995). Elle est cosmopolite et compte 12000 espèces réparties en 429 genres (Young *et al.*, 2003). Dans cette sous-famille, 97% des

espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent, 1995). La majorité des espèces sont herbacées; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales: un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd *et al.*, 2001).

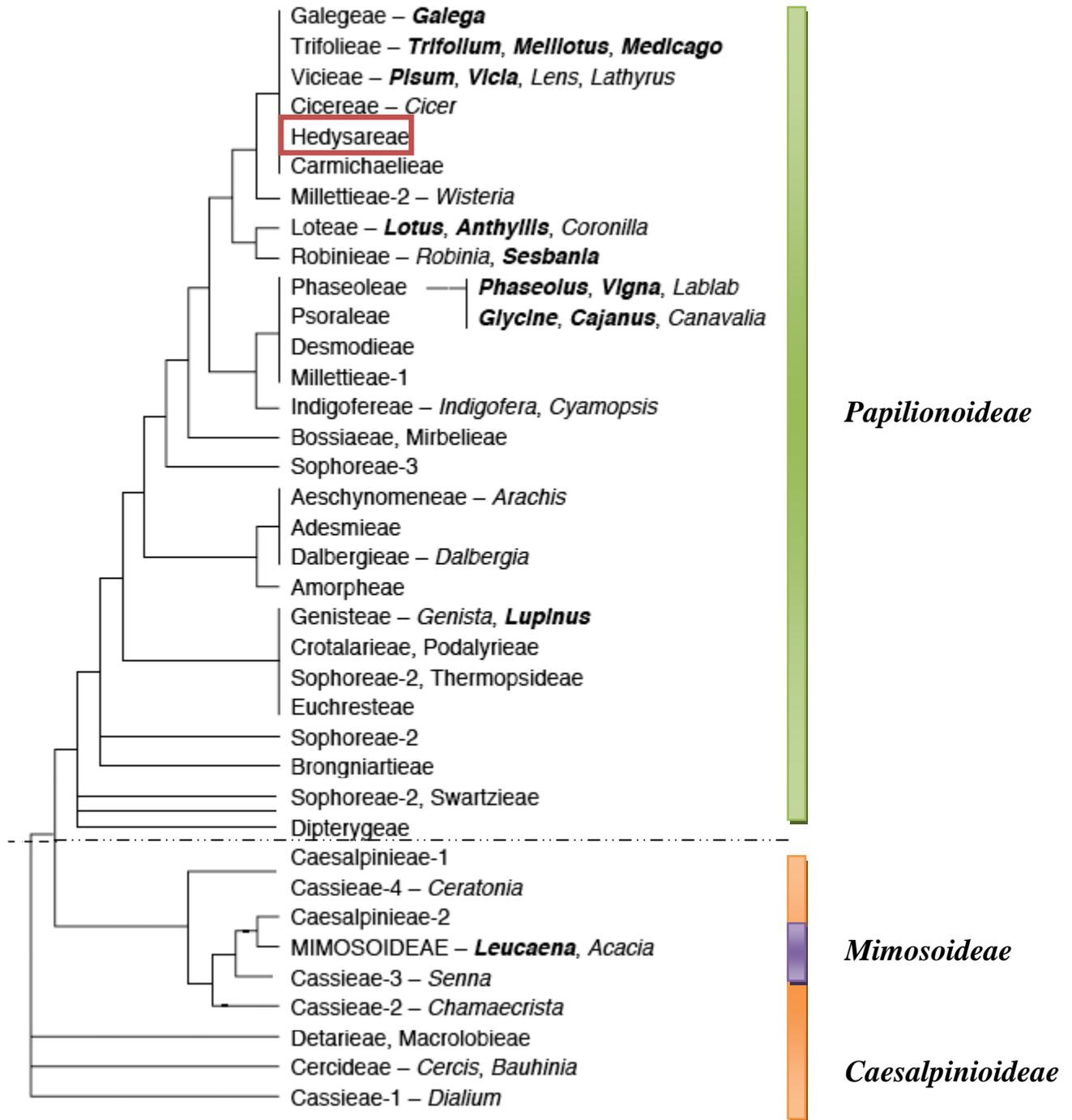


Figure 1 : Phylogénie des *Leguminosae* d’après l’analyse des séquences du gène Chloroplastique *rbcl*. (Doyle *et al.*, 1998).

Les trois sous-familles *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae* sont représentées par les barres verticales de couleur. = *Hedysareae*.

2. Le macro-symbiont : Plante hôte

2.1. Genre *Hedysarum*

Le genre *Hedysarum* appartient à la sous famille des *Papilionaceae* qui est très répandue dans le monde, pousse sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes, et présent ainsi une grande diversité. Les espèces de ce genre sont rencontrées à l'état naturel dans tout le bassin méditerranéen, en particulier en Afrique du Nord. Ces espèces d'intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation d'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les sols arides et semi-arides (Hannachi *et al.*, 2004).

Selon Quezel et Santa (1962), le genre *Hedysarum* comporte neuf espèces (annuelles et vivaces) dont plusieurs sont des endémiques très localisées, comme *H. naudinianum* Coss et *H. perrauderianum* Coss., qui ne se développent qu'en Algérie. *H. carnosum* Desf., et *H. pallidum* Desf., Qui sont endémiques de l'Afrique du Nord, et c'est cette dernière espèce qui ait le sujet de notre présente étude (**Figure 2**) (Benhizia, 2001).

2.1.1 *Hedysarum pallidum* Desf.

Très peu de données existent sur *H. pallidum* Desf., espèce décrite pour la première fois par Desfontaines. C'est une légumineuse à vocation fourragère, pousse spontanément en Algérie, au Maroc et Tunisie. Elle a une écologie peu marquée, se rencontre dans des milieux assez divers (Benhizia, 2001).



Figure 2 : (a) -*Hedysarum pallidum* Desf., dans la région d'amoucha à setif.
(b) -*Hedysarum pallidum* Desf., dans la région d'Ain M'lila à Oum El Bouaghi.

2.1.2. Classification

Tableau 1 : Position systématique de *Hedysarum pallidum*. (*Ikon.altervista.org*).

Régne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Super- division	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Hedysarum</i>
Espèce	<i>Hedysarum pallidum</i> Desf

2.1.3. Ecologie et distribution

En Algérie, *H. Pallidum* se rencontre à Sétif, Constantine et dans les Aurès (Quezel et santa, 1962). Elle se développe généralement dans l'Est algérien, sans pour autant atteindre les zones sahariennes (Quezel et Santa, 1962). Selon ces mêmes auteurs, elle se trouve généralement dans les forêts et broussailles. Cette espèce est également signalée dans la région de Tiaret, Nador et Gar-rouban (Pomel, 1874), Tébessa (Abdelkrim, 1984), près de Ain Tedeles, Saida, à Arzew, Oran et près d'El Aouinet (Abdelguerfi – Berrekia *et al.*, 1988).

2.1.4. Description de la plante

Selon Quezel et Santa (1962), la clé de détermination de l'espèce *Hedysarum pallidum* est basée sur les caractères suivants :

- une fleur formée d'un calice en cloche, à cinq dents égale ou inégale, pétales à onglet très court, carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité et étamines diadelphes (9-1) à tube fendu en dessus, les fleurs sont rosées ou blanches de pourpre (**Fig 3.b.d**).
- avec une gousse aplatie, divisée en articles monospermes ovales, orbiculaires ou quadrangulaires, se séparant à maturité et des feuilles imparipennées à deux stipules latérales (**Fig 3.e**).

- des graines connues par leur aspect lisse et brillant, de couleur marron clair à marron foncé et poids variable de 10 à 14 mg (**Fig 3.f**)



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 3 : (a) et (b) - Pied et fleur d'*Hedysarum pallidum* Desf., (Amoucha).
(c) et (d) - Pied et fleur d'*Hedysarum pallidum* Desf., (Sebkha).
(e) - Gousses, (f) – Graines.

3. Micro-symbiont : *Rhizobium* (sulla)

Le premier isolement de bactéries à partir des nodules de sulla remonte au 19^{ème} siècle (Mottareale, 1898). Ces rhizobiums ont été étudiés et décrits dans plusieurs travaux de recherche et il a été recommandé de les nommer provisoirement *Rhizobium hedysari* (Casella *et al.*, 1984 ; Selenska-Pobell *et al.*, 1996 ; Toffanin *et al.*, 1996). Par ailleurs des études plus approfondies sur l'identification des souches isolées à partir de nodules d'*Hedysarum coronarium* ont montré qu'elles sont relatives à *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* et *Sinorhizobium meliloti* (Tighe *et al.*, 1994). Avec le développement des techniques moléculaires, il y a eu une meilleure caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses, en particulier la ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) de l'ADNr 16S et la comparaison des séquences de ADNr 16S; les bactéries nodulant le sulla ont par conséquent été baptisés *R. sullae* (Squartini *et al.*, 2002).

D'autres études plus récentes ont mis en évidence que des bactéries du groupe Gamma-protéobactéries peuvent également noduler les légumineuses en les isolant à partir des nodosités d' *Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004).

Dernièrement, de nouvelles espèces de bactéries auxquelles on a attribué le nom *Rhizobium alamii* sp. Nov. ont été isolées à partir des racines de tournesol (*Helianthus annuus* L.) et des nodules de *Medicago ruthenica* L. Ces espèces qui appartiennent à la lignée des alpha-protéobactéries sont génétiquement les plus proches de l'espèce *R. sullae* (Berge *et al.*, 2009).

3.1. Caractères morphologiques

Les rhizobiums sont des bactéries à Gram négatives, non sporulantes, on distingue deux formes :

3.1.1. La forme végétative

Les rhizobiums sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles péritriches et apparaissent sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5 à 0,9 µm de largeur sur 1,2 à 3 µm de longueur (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobiums à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles péritriches. Les rhizobiums à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.1.2. La forme bactéroïdes

A l'intérieur des cellules du cortex racinaire, les rhizobiums se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry *et al.*, 2004). Il existe des bactéroïdes réguliers et des bactéroïdes irréguliers. Chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarium*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.2. Caractères biochimiques

Les rhizobiums sont des bactéries chimioorganotrophes ; ils utilisent des carbohydrates relativement simples comme le glucose, le mannitol, le saccharose et des composés aminés. Certaines espèces exigent des vitamines pour leurs croissances (Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums à croissance rapide peuvent croître dans une large gamme de carbohydrates, mais ils ont une croissance meilleure en présence du glucose, le mannitol ou le saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose. (Somasegaran et Hoben, 1994). Les rhizobiums n'assimilent pas l'azote en dehors de la plante et ont besoin d'une source d'azote ammoniacal ou aminé pour se développer à l'état libre (Pelmont, 1995).

3.3. Caractères physiologiques

Le rhizobium est un micro-organisme aérobic ou microaérophile et peut se contenter d'une faible tension en oxygène (pression de 0,01 atm). Le pH optimum de la croissance se situe entre 6 et 7, plus exactement 6.8, mais certaines souches tolèrent un milieu acide (pH = 4) comme *Rhizobium japonicum*. La température idéale se situe entre 25-30°C (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.4. Caractères cultureux

Deux groupes de rhizobiums, le premier comporte les rhizobia à croissance rapide qui produisent une turbidité dans le milieu liquide en 2-3 jours et une vitesse de dédoublement chaque 2-4 heures. Le deuxième est le groupe des rhizobia à croissance lente, ce sont les *Bradyrhizobium*. Ils produisent une turbidité dans le milieu liquide dans 3-5 jours et ils ont une vitesse de dédoublement de 6-8 heures (Somasegaran et Hoben, 1994). Le Yeast Mannitol Agar (YMA) est un des milieux solides les plus utilisés pour la culture des rhizobiums (Vincent, 1970). Sur ce milieu les colonies apparaissent sous forme circulaire, blanche, opaque ou laiteuses, humides, translucides, elles peuvent être brillantes. Les colonies jaunes sont pâles rencontrées surtout dans les cultures âgées (Somasegaran et Hoben, 1994).

3.5. Caractères génétiques

La génétique du *Rhizobium* n'est pas chose simple, en raison du grand nombre de gènes impliqués dans la symbiose et les nombreuses particularités d'une souche à l'autre (Pelmont, 1995). Les souches de *Rhizobium* nodulant les légumineuses sont considérées particulièrement sensibles en raison de leurs caractéristiques génétiques (Patrícia *et al.*, 1998 ; Raposeiras *et al.*, 2002).

Le génome du *Rhizobium* est particulièrement intéressant, il peut y avoir trois types de réplicons pour un chromosome de taille supérieur à 4 Mb, un mégaplasmide (1-2 Mb) et un plasmide de taille inférieur à 1 Mb, selon les espèces (Laranjo *et al.*, 2002). La présence d'un mégaplasmide (psym) est une caractéristique intéressante dans toutes les souches de *Rhizobium meliloti*. Les gènes responsables de la nodulation (Nod) et de la fixation de l'azote (Fix, Nif) des souches de *Rhizobium* sont situés sur ce simple réplicon symbiotique (Werner, 1992 ; Pelmont, 1995 ; Patricia *et al.*, 1998).

4. La nodulation

La nodulation est considérée comme la première caractéristique de l'association symbiotique qui est strictement contrôlée par des mécanismes d'autorégulation interne de la plante hôte (Figueiredo *et al.*, 2008 ; Lohar *et al.*, 2009).

4.1. Les étapes de la nodulation

La formation des nodules est le résultat d'un dialogue moléculaire entre le microsymbiote et la plante hôte (Foucher et Kondorosi 2000 ; Limpens et Bisseling 2003) (Figure 4).

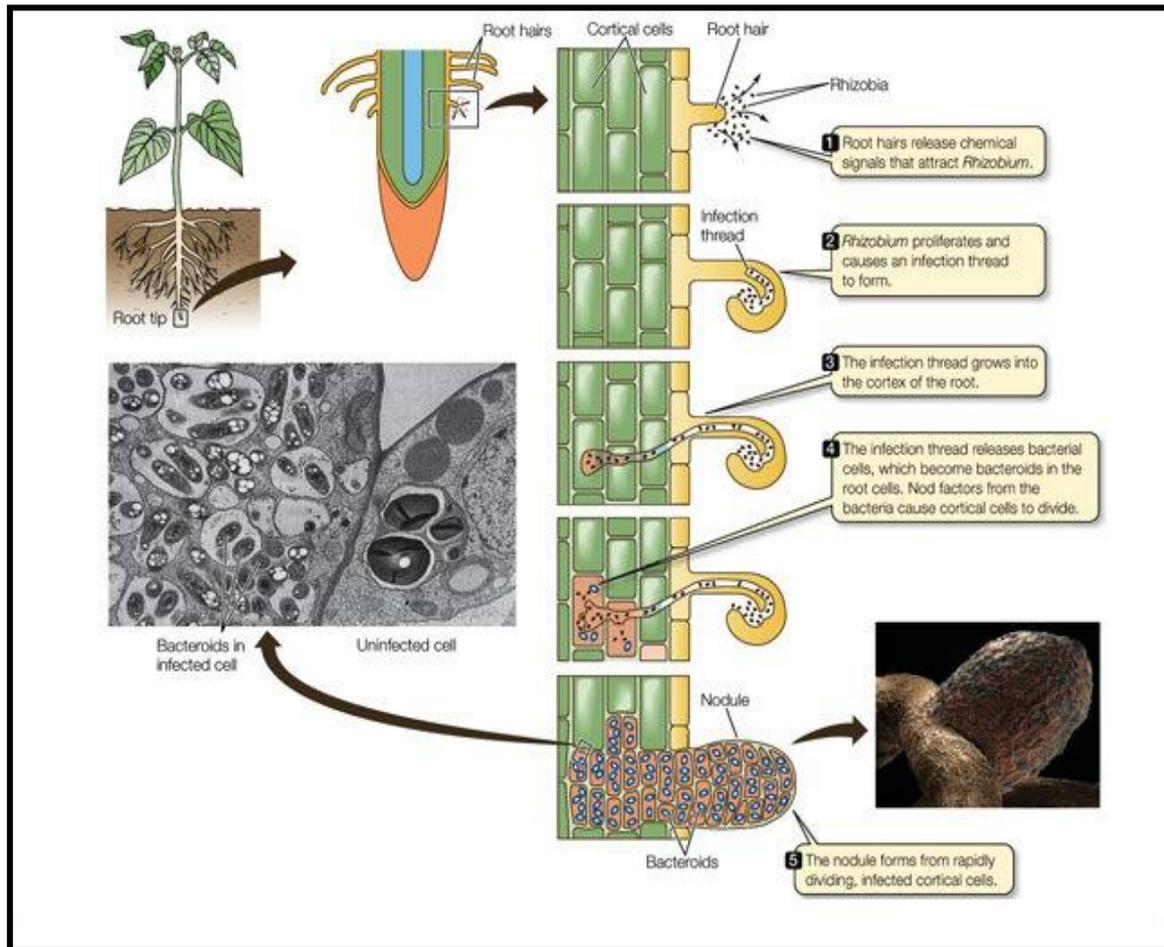


Figure 4 : Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice de l'azote (cropview.wordpress.com).

4.1.1. Echange de signal d'infection

Le processus de nodulation commence par un échange de signaux entre la plante hôte et la bactérie. Les racines rejettent par leur métabolisme normal, des substances qui ont des

effets attracteurs sur certains microorganismes du sol. Certaines d'entre elles appartiennent au groupe des flavonoïdes tels que les flavones, isoflavones, flavonone (Rasanen, 2002). Ce signal, une fois perçu par le rhizobium, induit la production de facteurs Nod (Oldroyd, 2001).

4.1.2 Infection

Les bactéries s'attachent aux racines par l'intermédiaire de la rhicadhésine ainsi que d'autres protéines spécifiques localisées à la surface des cellules (Dardanelli *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2004). Les facteurs Nod émis par les rhizobiums, induisent une dépolarisation de la membrane plasmique accompagnée d'une oscillation du flux de Ca^{2+} . Cette étape se poursuit par une induction de l'expression de gènes spécifiques (Pelmont, 1995 ; Gage, 2004) et une modification de la croissance polaire des poils absorbants formant une structure dite en « crosse de berger » qui enferme les rhizobiums (Esseling *et al.*, 2003).

4.1.3. Développement du nodule et maturation des bactéroïdes

Une fois que les parois des cellules de poils sont digérées, une structure tubulaire appelée le fil d'infection est formée. Elle se compose de cellules de la paroi nouvellement synthétisée qui formeront le matériel entourant le *Rhizobium*. Le centre du tube est une glycoprotéine contenant quelques produits bactériens et quelques glycoprotéines de la plante hôte (Gage, 2004).

Ces changements majeurs dans la forme des cellules et la croissance dirigée sont causées par des altérations significatives dans le cytosquelette de la plante. La dépolymérisation de l'actine est l'un des effets observés dans les poils absorbants suite à l'exposition au facteur Nod (Gage et Margolin, 2000).

Les bactéries prolifèrent à l'intérieur du cordon et vont se libérer dans le cytoplasme des cellules corticales, via ce cordon, provoquant ainsi l'apparition du méristème dont l'activité est à l'origine de la formation du nodule, dans laquelle les bacilles se différencient irréversiblement en bactéroïdes (Lindström *et al.*, 2002).

Ces dernières, de forme irrégulière, ont un volume supérieur à celui des formes libres. Ils ne se divisent plus et ne synthétisent plus de protéines Nod, par contre les bactéroïdes se concentrent dans la production des nitrogénases indispensables à la fixation de l'azote atmosphérique.

Les bactéroïdes sont séparés du cytoplasme végétal par une membrane spéciale «péri bactéroïdes» ou membrane de séquestration servant de plaque d'échange entre les bactéries et les cellules de la plante hôte. Dans cette membrane les bactéries différenciées forment les bactéroïdes de fixation de l'azote (Pelmont, 1995 ; Corbière, 2002).

Le nodule prend forme avec la multiplication des cellules du cortex. Il se charge de pigments appelés leghémoglobine, synthétisés à l'intérieur du cytoplasme des cellules de la plante (Corbière, 2002). L'action de la leghémoglobine est de maintenir l'oxygène à faible concentration dans l'environnement de l'enzyme, compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote (Rasanen, 2002 ; Simms et Taylor, 2002).

MATÉRIEL

ET

MÉTHODES

2. Isolement des bactéries à partir des nodules

2.1. Description de la zone d'étude

Les nodules ont été obtenues à partir du genre végétal *Hedysarum* qui pousse spontanément dans deux régions de l'Est Algérien différentes sur le plan climatiques et pédologiques.

Le premier échantillonnage a été réalisé au niveau de la région de Amoucha (latitude $36^{\circ}22'59''N$ et longitude $5^{\circ}25'0''E$) wilaya de Sétif. et le deuxième échantillon a été cultivé de la région de Ain M'lila, La Sebket Ezzmoul est localisée dans Wilaya de Oum El Bouaghi et située dans la dépression formée par la gamme côtière des montagnes, au nord la Kabylie et au sud du massif de l'Aurès (latitude $35^{\circ} 50'$ à $35^{\circ} 55'N$ et longitude $6^{\circ} 30'$ à $6^{\circ} 35'Est$).

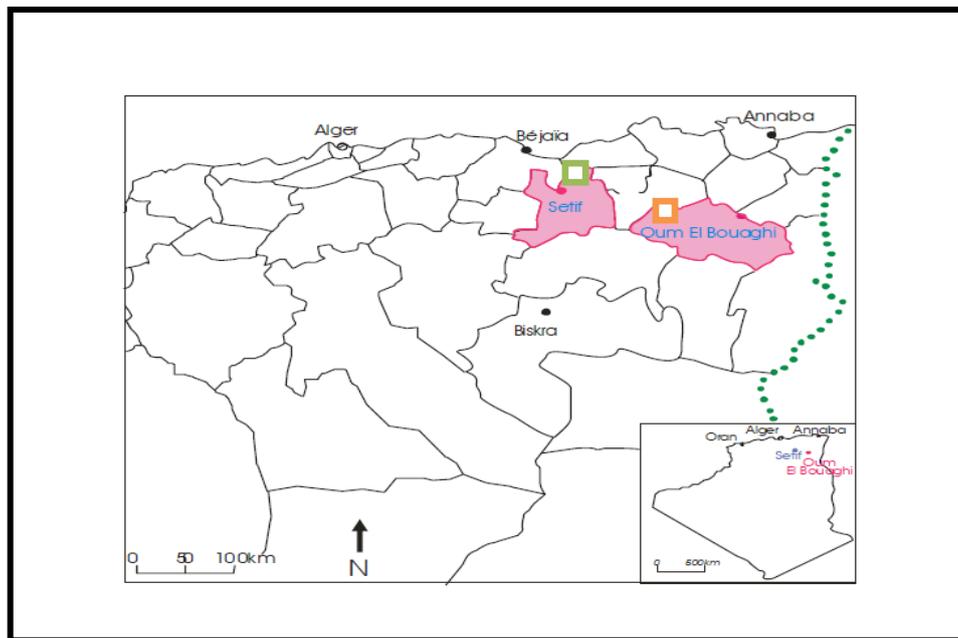


Figure 5 : Localisation géographique de la zone de prélèvement.

1.2 Collecte des nodules

La collecte est réalisée selon la technique préconisée par Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Il s'agit de : - Creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire.

- Manuellement, éliminer le sol lié aux racines sans toutefois endommager ou perdre les nodules.
- Récupérer la plante et la mettre dans un sachet en plastique.
- Répéter l'opération sur plusieurs pieds pour avoir le maximum de nodules.
- Au laboratoire, la partie aérienne est enlevée, et la partie racinaire est lavée soigneusement à l'eau courante.
- Couper les nodules à 1-2 mm du site d'attache, puis sécher avec du papier absorbant.

1.3. Conservation des nodules

En vue d'un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C pour une durée qui ne dépasse pas les 48 heures, Pour une longue période de stockage la dessiccation des nodules est recommandée, ce qui permet une longue conservation.

La dessiccation est réalisée dans des flacons en verre contenant le chlorure de calcium (CaCl_2) et une couche de coton sur laquelle reposent les nodules. Chaque flacon est identifié et portera le nom de la plante hôte, la date et lieu de prélèvement et la date de la mise en conservation.

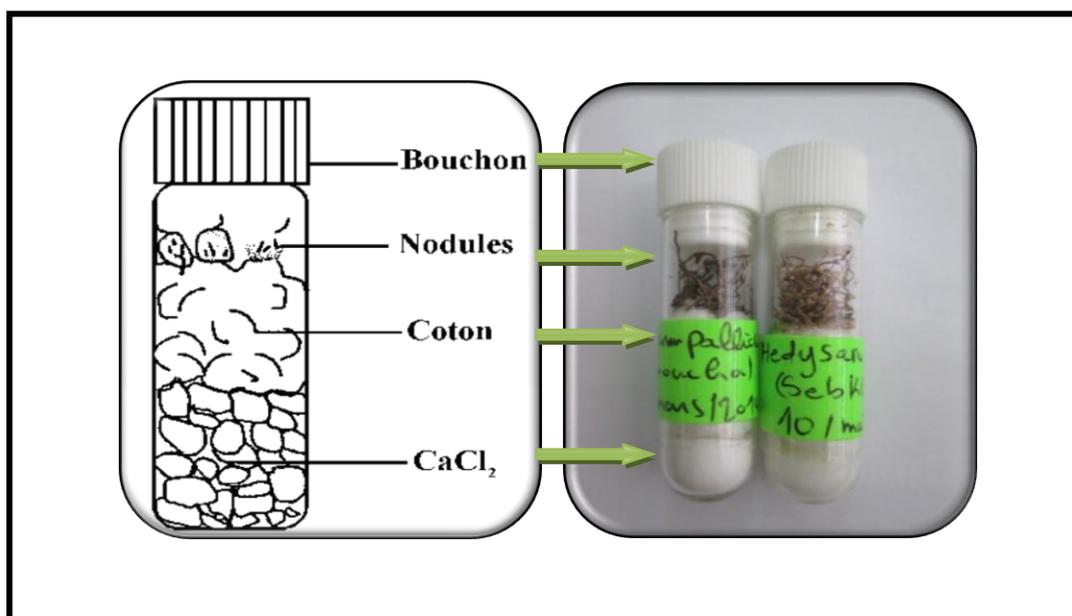


Figure 6 : Conservation des nodules (Vincent, 1970).

1.4. Isolement des bactéries à partir des nodules

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). Les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés en les plaçant dans l'eau distillée pendant 24 heures au réfrigérateur à 4C°, puis sont utilisés directement après une heure à température ambiante.

1.4.1. Stérilisation des nodules

Sous la hotte à flux laminaire, les nodules sont immergés dans l'éthanol 95 % pendant 5 à 10 secondes, puis transférés rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0,1% (1g HgCl₂ + 5 ml HCl + 1l d'eau distillée) pendant 3 minutes. Enfin, les nodules sont rincés 10 fois à l'eau distillée stérile.

Cette stérilisation superficielle des nodules a pour but de limiter la contamination des milieux de culture par d'autres microorganismes externes ou liés intimement aux tissus superficiels de ces nodules.

1.4.2. Test de stérilisation

Prendre le nodule stérile et l'ensemencer en le faisant passer sur le milieu YMA+Rouge Congo (Annexe 1), puis l'incuber à 30°C pendant 24 heures, et cela pour vérifier la technique de stérilisation utilisée et stérilité externe du nodule.

1.4.3. Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Dans notre étude on a utilisé deux méthodes :

1.4.3.1. La première méthode

L'isolement est réalisé selon la méthode préconisée par Vincent, (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte ou deux d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri stérile avec une pince flambée.

1.4.3.2 La deuxième méthode

Les nodules sont réhydratés avec de l'eau distillée stérile (pendant une nuit) dans des tubes Eppendorf. Après avoir éliminé l'eau, les nodules sont stérilisés par immersion dans de l'hypochlorite de Calcium à 3 % ou bien dans la solution de chlorure de mercure pendant 3 min. Ensuite, ils sont rincés 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace d'hypochlorite de Calcium. Les nodules sont ensuite écrasés dans les tubes Eppendorf stériles (dans deux gouttes d'eau stérile).

Les opérations sont réalisées dans des conditions d'asepsie totale sous la hotte à flux laminaire (Kotterman 8511, Tu V, Norddeuschaland (GS) gepufte Sicherheit).

Le broyat obtenu à partir de ces deux méthodes est ensemencé à l'aide d'une ose sur des boîtes de Petri contenant le milieu YMA+ Rouge Congo (Annexe 1) et le milieu GPA+Bromocrésol pourpre (Annexe 1) l'ensemencement est réalisé selon la technique des quatre quadrant et avec flambage d'ance de platine (**figure 6**) de manière à avoir des colonies bien isolées les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 à 48 heures.

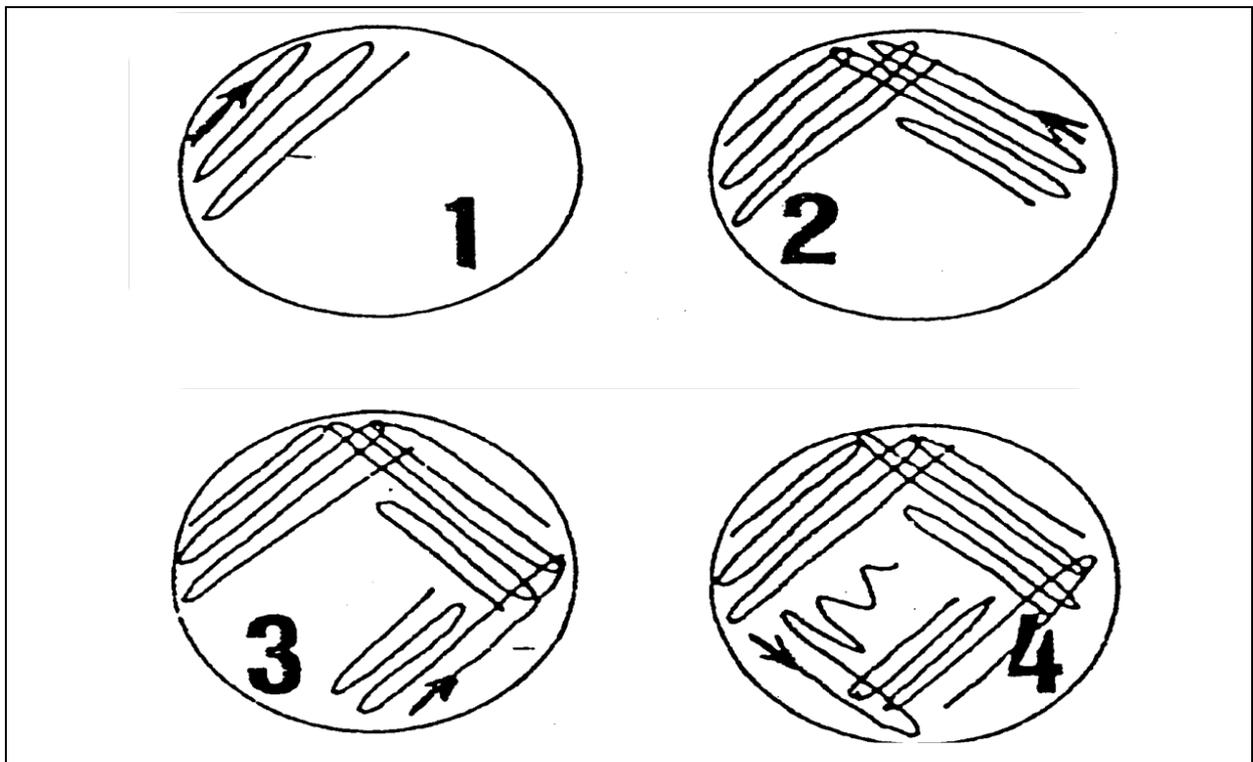


Figure 7 : Isolement par la méthode des quatre quadrants (Vincent, 1970).

2. Caractères morphologique et culturaux

2.1 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.

Les milieux de culture doivent contenir la source d'énergie et source de carbone nécessaire à la croissance des bactéries ; pour cette raison on doit utiliser :

- Milieu liquide: YMB (yeast manitol broth)
- Milieux solides: YMA + RC (Yeast Manitol Agar)

YMA + BTB (Yeast Manitol Agar + Bromothymol Bleu)

GPA + BCP (Glucose Peptone Agar + Bromothymol Poudre)

Toutes les souches prises en compte sontensemencées dans des tubes à essai contenant 5 ml du milieu YMB. et l'ensemencement se fait à partir de cette culture obtenue, sur les différents milieux solides utilisés, l'incubation dure 24 heures à 30°C.

2.2 Purification des isolats

Après identification des isolats selon les caractères morphologiques par culture sur les différents milieux (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994), 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 les tubes sont vortexés et incubés à 30°C pendant 24 h. Le bouillant étant trouble, l'ensemencement se fait sur le milieu YMA+RC. Des examens microscopiques (coloration de Gram) et morphologiques sont enfin réalisés.

2.3. Examen microscopique

2.3.1 Coloration de Gram

Des observations microscopiques sont réalisées sur des lames dont une préparation de culture en YMA est étalée en couche mince, séchée et fixée. Puis les lames subissent une coloration de Gram (Annexe 2).

L'examen microscopique a une importance majeure lors de la purification, car une lame homogène, suppose une bonne purification des souches.

2.4 Conservation des souches

Les souches pures sont conservées sur des boîtes et des tubes en gélose inclinée contenant le milieu YMA additionné de CaCO₃ (3g/l) qui joue un rôle d'un neutralisant de l'acidité (Vincent, 1970). Après incubation, les souches sont stockées au réfrigérateur à 4°C en vue de leurs caractères.

2.5 Absorption du rouge Congo

Le test consiste à cultiver les isolats et souches témoins dans le milieu YMA (Annexe 1) contenant 0.0025 % de rouge Congo et incuber à 30°C pendant 24 heures.

Les colonies typiques aux rhizobia absorbant faiblement le rouge Congo (Jordan 1984 ; Somasgaran et Hoben, 1994) par rapport aux contaminants ou les souches inefficients occupant le nodule.

3. Caractérisation phénotypique des isolats

3.1 Mesure de la vitesse de croissance

La vitesse de croissance des Rhizobia est étudiée, en les cultivant sur milieu YMA additionné de Bleu de Bromothymol (Annexe 1). Sur ce milieu les souches provoquent une acidification révélée par un virage de la couleur au jaune.

Le temps nécessaire à cette réaction colorimétrique distingue les bactéries à croissance rapide, qui modifient le pH après 24 heures d'incubation, tel que les genres (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*...); et les bactéries à croissance lente dont l'acidification peut atteindre 4 à 5 jours, tel que le genre *Bradyrhizobium*.

3.2. Tests nutritionnels

Les tests nutritionnels regroupent l'aptitude des bactéries à assimiler une gamme d'hydrates de carbones et différentes sources d'acide aminés aussi que leurs besoins en vitamines.

3.2.1 Assimilation de la source de carbone

L'utilisation des différentes sources de carbone par les souches bactériennes est testée sur le milieu YMB où l'extrait de levure a été réduit à 0.05g/l et le mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants : D-Xylose, D-Saccharose, D-Fructose, D-Galactose, D-Maltose, D-Glucose, lactose (Somasogaran et Hoben, 1994). On utilise un témoin avec le mannitol.

-L'incubation des boîtes ensemencées dure 24 à 72 heures à 30°C.

3.2.2 Utilisation de la source d'azote

Pour ce test les souches sont cultivées sur le milieu défini 8 (Vincent, 1970) (Annexe 1) dépourvu du Glutamate de Na mais en rajoutant à chaque fois un des acides aminés suivants :

Proline, Isoleusine, Leucine, Cystéine, Tyrosine, Histidine, Méthionine, Acide Glutamique, Sérine, Glycine, Asparagine et le Na-Glutamate utilisé comme témoin.

-Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72 heures.

3.2.3 Besoins en vitamines

Les isolats sont cultivés sur le milieu TY (Annexe 1) additionné chaque fois de 1µg/l de TY de l'une des vitamines suivantes : Thiamine H Cl et Penthotenate de Ca et un mélange des deux vitamines précédentes. Un milieu TY standard dépourvu de vitamines est utilisé pour une croissance témoin.

Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 heures.

3.2.4 Examen de la mobilité

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, prélevé à partir de la suspension bactérienne de 24 heures, faire une piqûre centrale dans un tube de milieu Mannitol mobilité. Incuber pendant 24 h à 30°C puis observer.

3.3 Test biochimiques

Le but est de rechercher la présence de diverses enzymes synthétisées par nos bactéries isolées et souches témoins qui jouant un rôle dans la symbiose tels que la nitrate réductase, la cellulase et un à un degré moindre l'uréase.

3.3.1 Réduction des nitrates

La recherche d'une nitrate réductase se fait par la mise en évidence de la transformation des nitrates en nitrites et pour cette raison des tubes de TY contenant 0.1 % de KNO_3 (p/v) sont ensemencés et incubés pendant 4 jours à 30°C.

Après la période d'incubation, on dépose à la surface de la culture 3 à 4 gouttes des réactifs (Réactif I et Réactif II) du nitrate réductase (Guiraud, 1998).

La réaction positive se manifeste par une coloration rouge ou rose qui traduit la réduction des nitrates (Guiraud, 1998). Un résultat négatif nécessite l'addition d'une poudre de Zinc métallique et l'observation après quelques minutes la teinte obtenue (la couleur rouge signifie la non réduction des nitrates, alors qu'un milieu incolore indique que le stade est dépassé, donc la souche possède la nitrate réductase).

3.3.2. Hydrolyse de l'urée

Pour mettre en évidence l'uréase, les isolats et souches témoins sont cultivés sur le milieu YMA (Annexe 1) contenant 2 % (p/v) d'urée et 0.012 g/l de rouge de phénol comme indicateur de pH (Jarvis *et al*, 1977).

La solution d'urée est stérilisée par filtration (0.22µm) et rajoutée au milieu préalablement stérilisé par autoclavage et, maintenue à 45°C sous la hotte à flux laminaire puis incubation à 30°C pendant 48 heures. Une couleur rouge représente l'alcalinisation du milieu ce qui indique l'hydrolyse de l'urée.

3.3.3. Activité cellulosique

Les bactéries cultivées sur milieu TY sont ensemencées sur YMA (Annexe 1) contenant 0.25% (w/v) de CMC (Carboxy-Methyl-Cellulose) pendant 5 jours à 30°C.

Les colonies issues de ce milieu sont rincées délicatement à l'eau courante. Les boîtes ensuite remplies d'une solution de rouge Congo (1mg/ml) et incubées 30 min dans l'étuve à 30°C. La solution colorante est remplacées par une solution de NaCl 1N, les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 min puis sont vidées de cette solution.

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

3.4. Tests physiologiques

La population bactérienne peut être influencée par plusieurs facteurs environnementaux comme le stress osmotique, stress acide et choc thermique, la toxicité due aux métaux lourds et inhibition de la croissance bactérienne en présence de marqueurs tels que les antibiotiques.

La tolérance de nos isolats à ces différents facteurs à été évaluée par cinq tests différents en présence de souches de références.

3.4.1. Tolérance au Chlorure de sodium

Les souches sont cultivées sur le milieu TYB (Annexe 1) avec diverses concentration de NaCl : (0.1%, 2%, 5%, 10%). La croissance est évaluée dans chaque tube par la mesure de la densité optique à 600 nm après 24 h et 48h d'incubation à 30°C.

3.4.2. Effet de pH

Les souches sont cultivées sur le milieu liquide TYB (Annexe 1) à différents pH : 2, 4, 6.8, 8, 10. La croissance des souches est estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm à 24h et 48h heures.

3.4.3 Effet de la température

Afin d'estimer les températures optimales et maximales de croissance, les souches sont ensemencées sur le milieu YMA (Annexe 1) par la méthode des stries simples et incubées à différentes température : 4°C, 30°C, 37°C, 45°C.

Les lectures sont effectuées après 24 à 48 heures d'incubation. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

3.5. Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

3.5.1. Résistance aux métaux lourds

Plusieurs études ont prouvé que certains métaux lourds, Plomb, Mercure, Cuivre, Zinc et autres, peuvent influencer la croissance et la physiologie des microorganismes (Sofia Cocoilo *et al*, 2005).

les isolats et les différentes souches de références sont cultivé sur boites de milieu TY (Beringer, 1974) (Annexe 1) contenant des concentrations croissantes des métaux lourds suivantes : CuSO₄ (50,250,500) et ZnCl₂ (50,250,500µg/ml), HgCl₂ (20,50,200) et Pb (50,500,1000µg/ml).

Les boites sont incubées à 30°C pendant 5 à 7 jours.

3.5.2 Résistance aux antibiotiques

On prépare les solutions stock en dissolvant 1 g d'antibiotique dans 100 ml de solvant correspondant. La solution préparée est stérilisée par filtration (0.22µm).

Le test est réalisé en ajoutant la quantité désirée d'antibiotique au milieu de culture Mueller Hinton (MH) refroidi à 45°C. L'incubation varie de 1 à 7 jours selon l'antibiotique.

Les antibiotiques utilisés : Erythromycine, Kanamycine et le Chloramphénicol, et la gamme de concentration varie de 50 à 300 µg/ml.

Tableau 2 : Les solvants des antibiotiques utilisés (Somasegaran et Hoben, 1994).

Antibiotiques	Concentration	Solvants
Erythromycine	50-100-300	Ethanol 95 %
Kanamycine	50-100-300	Eau distillée
Chloramphénicol	50-100-200	Ethanol 95 %

4. Détermination du profil protéique par électrophorèse SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

4.1. Principe

Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) est un détergent anionique qui dénature les protéines et confère une charge négative au polypeptide proportionnellement à sa longueur.

Les complexes SDS-Protéines qui se forment sont chargés négativement à pH 7 et toutes les protéines possèdent la même densité de charge. Donc, dans les séparations dénaturantes de SDS-PAGE, la migration est déterminée non pas par la charge intrinsèque du polypeptide, mais par le poids moléculaire exprimé en Daltons (Bengedouar, 2000 ; Coyne *et al.*, 2002).

4.2. Protocole

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 sur milieu TY (Annexe 1) est centrifugée à une vitesse de 10 000 tours/minute pendant 20 minutes à 4°C, puis le culot est mis en suspension dans 50µl de tampon de lyse (Annexe 4) et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% (Annexe 4).

Après migration et démoulage, le gel est mis dans une solution de coloration contenant le bleu de Coomassie et l'acide trichloracétique (60%) (Annexe 4) pendant une nuit sous une faible agitation.

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

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

Dans cette étude nous avons tenu compte de 8 isolats **L1, L2, L3, L4** (Sebkha) et **S2, S3, S4, S5** (Amoucha) ont été isolées à partir des nodules de la légumineuse *Hedysarum pallidum* Desf., prélevées à partir de deux sites différents. Les isolats ont été identifiés par comparaison avec des souches de références A6 : *Rhizobium sullae* sp.nov. RHA6, F : *Rhizobium sullae* RHF, 102 : *Mesorhizobium ciceri*.

Notre protocole d'identification a été choisi selon les méthodes préconisées par Vincent (1970) et Somasegaram et Hoben (1994).

1. Test de stérilisation

Ce test nous permet de vérifier que la technique utilisée pour la stérilisation des nodules a été efficace, et ceci se manifestera par l'absence de croissance de bactéries sur le milieu YMA+RC, ce qui a été le cas pour nos nodules (**Figure 8**).

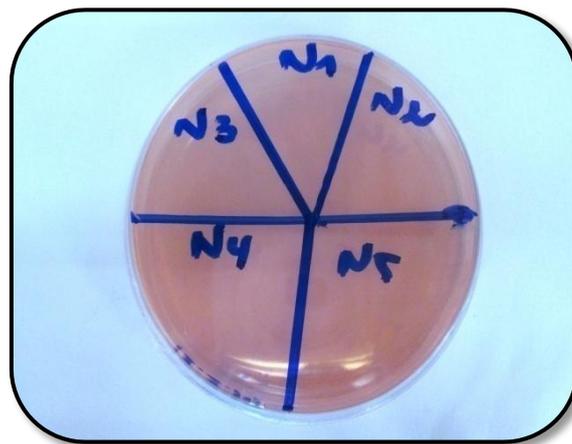
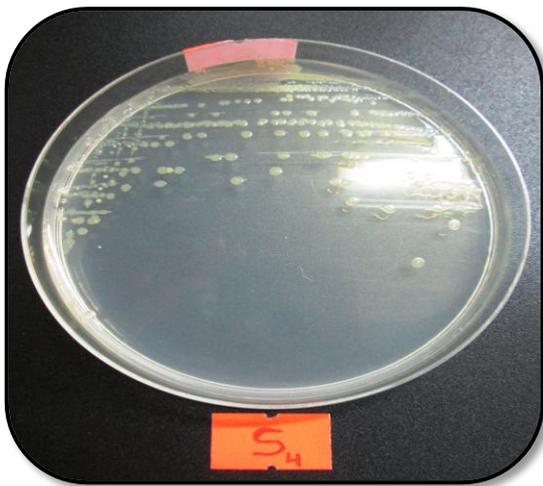


Figure 8 : Test de stérilisation.

2. Caractères morphologiques et cultureux

- **Milieu YMA**

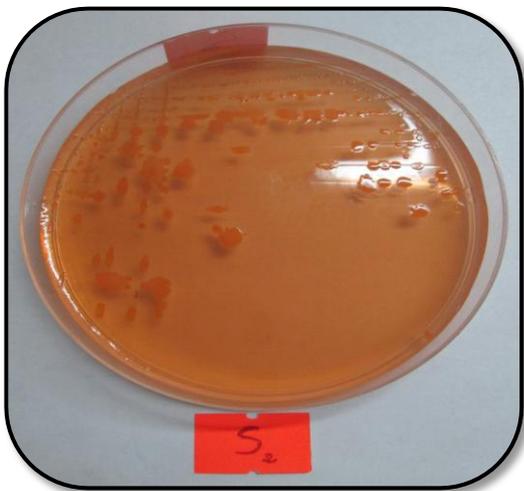
La plupart des nodules d'*Hedysarum pallidum*, ont donnée des bactéries qui ont bien poussé sur le milieu YMA au bout de 24 h à 48 heures, les souches isolées ont des formes rondes, avec un contour régulier, une surface bombées, plate et une consistance crémeuses et visqueuses avec une production de granules et de polymères d'acide β -hydroxyburate (PHB). Elles sont d'une couleur blanchâtre ou crème, texture homogène et translucide, lisse et brillantes (**Fig 9.a.b**).



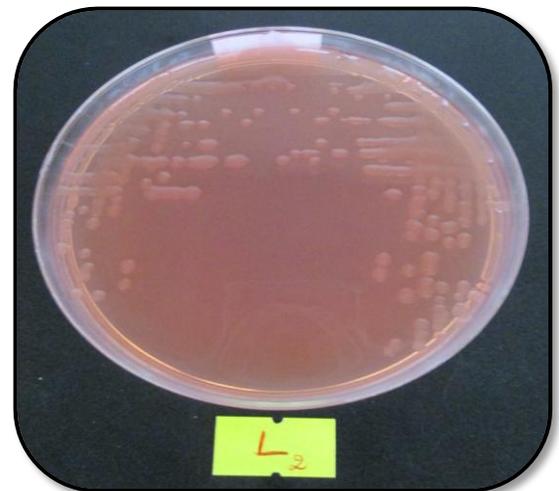
a. Croissance sur YMA (Amoucha)



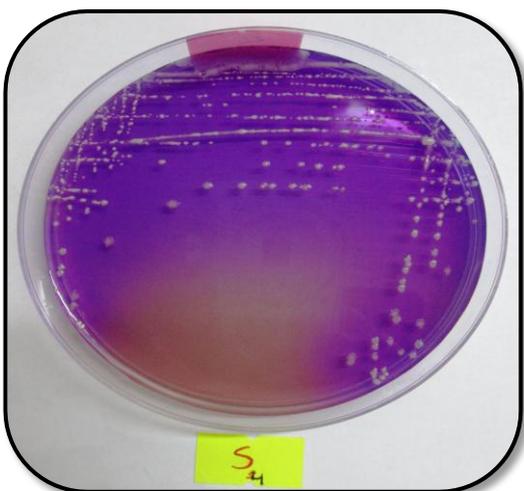
b. Croissance sur YMA (Sebkha)



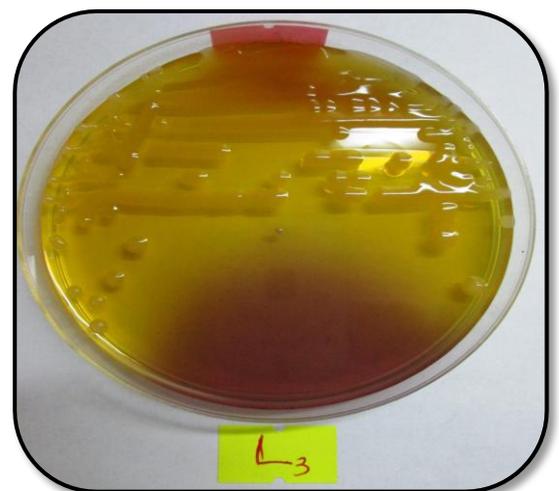
c. Croissance sur YMA+RC (Amoucha)



d. Croissance sur YMA+RC (Sebkha)



e. Croissance sur GPA+BCP (Amoucha)



f. Croissance sur GPA+BCP (Sebkha)

Figure 9 : Caractères cultureux et microscopique des souches isolées.

- **Milieu YMA+RG**

L'ensemencement du broyat nodulaire sur le milieu YMA + rouge Congo, à donné des colonies qui absorbent faiblement (**Fig 9.c**) et celles qui n'absorbent pas le colorant et gardent leur couleur blanchâtre (**Fig 9.d**).

En générale, les rhizobia donnent des colonies blanches ou absorbent faiblement le rouge Congo. Malgré que ce dernier soit souvent rajouté aux milieux de culture pour isoler ou pour tester la purification des cultures rhizobia des autres bactéries (Torche, 2006).

- **Milieu GPA+BCP**

Sur le milieu GPA, le développement des bactéries se fait avec acidification (**Fig 9.e**) et alcalinisation du milieu après 24 heures. (**Fig 9.f**).

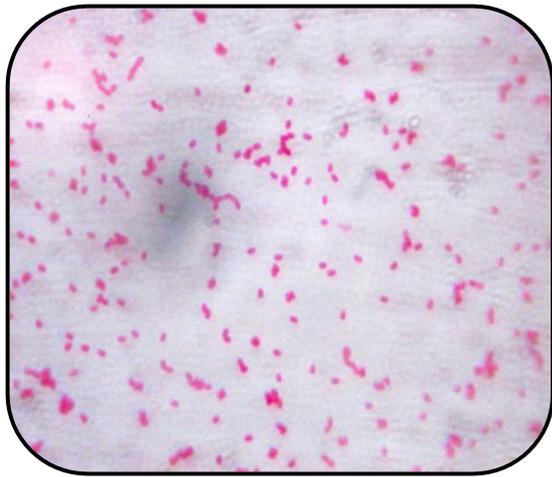
- **Coloration de Gram**

L'observation microscopique permet d'observer des bâtonnets de différentes tailles (**Fig 9.h**) et des coccobacilles roses à Gram négatif (**Fig 9.g**) compatibles avec l'aspect microscopique des rhizobia.

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à la morphologie, l'aspect des colonies et l'examen microscopique suggèrent que les isolats ont la description des rhizobia.

- **Mobilité des souches**

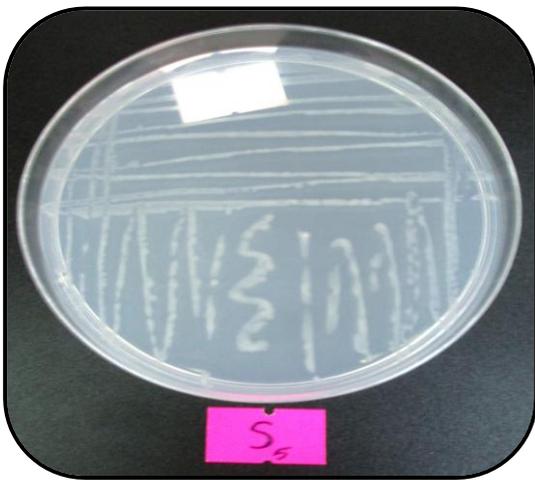
Les souches sont mobiles et provoquent une acidification sur le milieu Mannitol mobilité avec virage vers le jaune sans production de gaz (**Fig 9.k**).



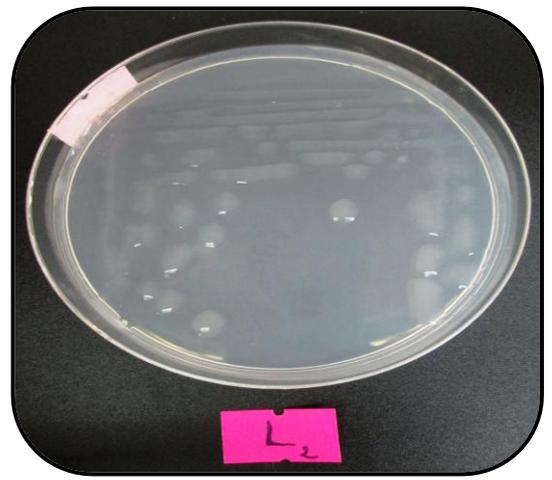
g. Coloration de Gram (Amoucha)



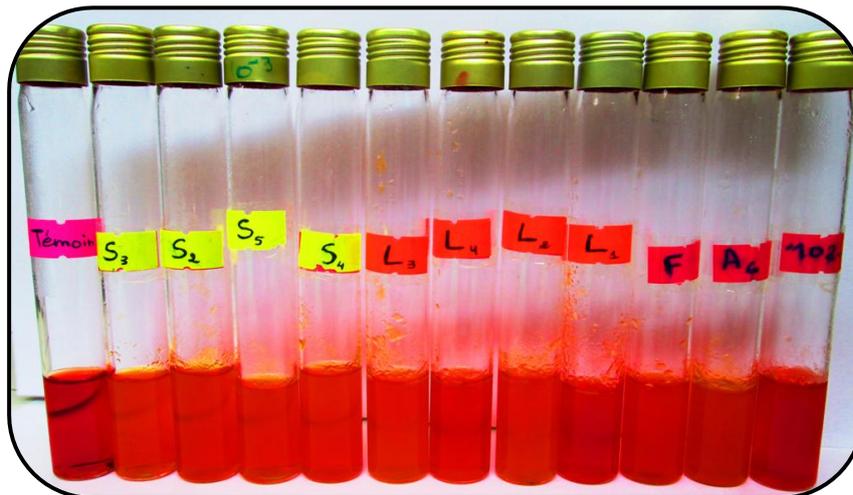
h. Coloration de Gram (Sebkhha)



i-Croissance sur YMA+RC 0.0025% (Amoucha)



j. Croissance sur YMA+RC 0.0025%(Sebkhha)



k. Mobilité sur le milieu mannitol-mobilité

Caractères cultureux et microscopique des souches isolées.

3. Caractérisation phénotypique des isolats

3.1. Mesure de la vitesse de croissance

Les souches à croissance rapide sont considérées comme des bactéries acidifiantes (virage de la couleur du BTB vers le jaune), contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries alcalinisantes qui donnent un virage de couleur au bleu (Jordan, 1984 ; Beck, *et al.*, 1993 ; Pagano, 2008).

Pratiquement tous nos isolats modifient le pH sur milieu YMA+BTB après 24 à 48 heures d'incubation, et cela s'est produit par acidification totale du milieu dans les boîtes (**Figure 10**). Ce qui indique que nos souches présentent une croissance rapide.

Menna *et al* (2006) ont rapporté que les souches testées de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* ont pu acidifier le milieu YMA, alors que les souches de *Bradyrhizobium* on toutes donné des réactions alcalines.

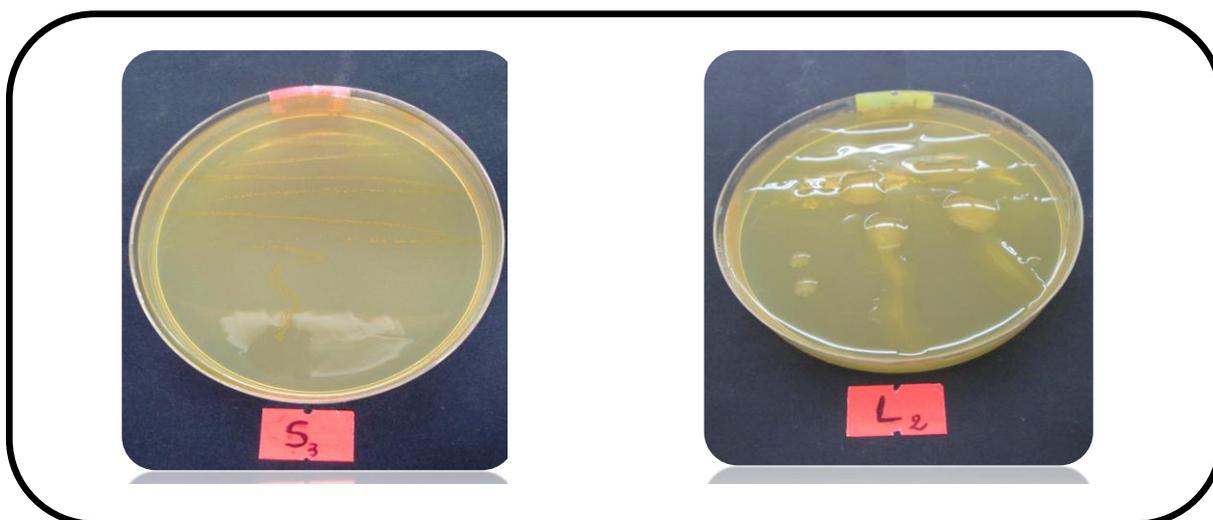


Figure 10 : Croissance des isolats sur YMA+BTB.

3.2. Tests nutritionnels

3.3.2. Assimilation de la source de carbone

L'évaluation de la croissance après 48 heures d'incubation montre que les sucres testés comme seule source de carbone sont assimilables par les souches (isolats et souches témoin) avec une fréquence de dégradation variable (**Tableau 3**).

Nos isolats dans cette catégorie affichant une bonne croissance pour la majorité des sucres (Saccharose, Mannitol, Glucose, lactose, Galactose), (**Figure 11**).Aucun isolat n'a pu utiliser le Xylose et le Fructose (à propos du Fructose seul la souche **L2** l'assimile après 6 jours), ainsi que pour les souches de références.

Wei *et al* (2008) ont rapporté que certains souches nodulant *Astragalus*, *Lespedeza* et *Hedysarum* ne peuvent utiliser le Xylose comme seule source de carbone. Ce qui prouve que les souches des deux sites utilisent une large gamme d'hydrates de carbone.

Tableau 3 : Assimilation des différents sucres par les isolats et les souches de référence.

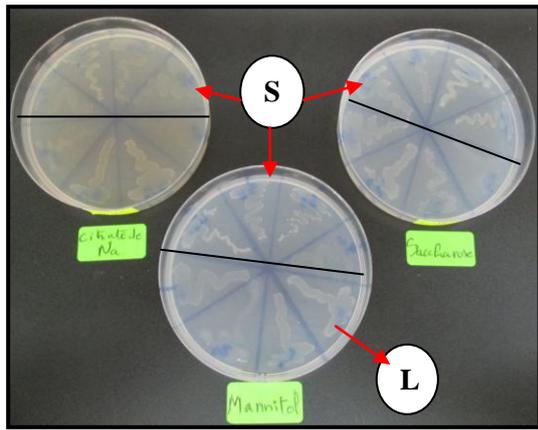
	Lactose	Glucose	Mannitol	Saccharose	Galactose	Maltose	Fructose	Xylose
S2	+	±	+++	+++	+	±	-	-
S3	±	±	+++	+++	+	+	-	-
S4	+	+	+++	+++	+++	+	-	-
S5	+	+	+++	+++	±	±	-	-
L1	+	+	+++	+++	++	+	-	-
L2	+++	+++	+++	+++	+++	++	(+)Après 6 jours	-
L3	±	±	+++	+++	-	±	-	-
L4	+	±	+++	+++	±	±	-	-
102	-	-	+++	+++	±	±	-	-
A6	+	++	+++	+++	+	++	-	-
F	++	++	+++	+++	++	+++	-	-

(+++): Forte croissance, (++) : moyenne croissance, (+): croissance, (±): faible croissance,

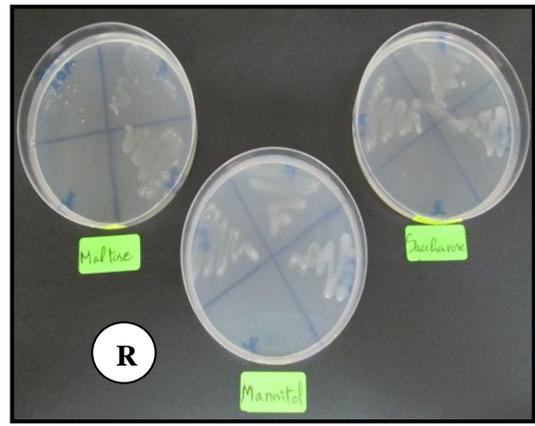
(-) : pas de croissance.

3.2.2 Utilisation de la source d'azote

Jordan (1984) et Somasegaran et Hoben (1994) ont constaté que beaucoup d'acides aminés peuvent servir comme source d'azote pour les rhizobia.

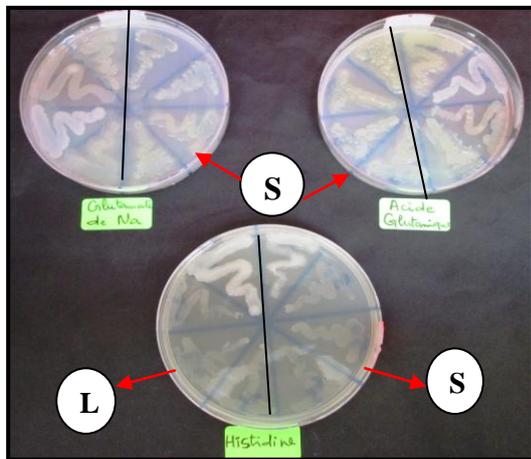


(a)



(b)

Figure 11 : Utilisation des différentes sources de carbone par les souches.
 (a): Isolats (S : Amoucha, L : Sebkh) (b) : (R : souches référence)



(a)



(b)

Figure 12: Utilisation des différentes sources d'azote par les souches.
 (a): Isolats (S : Amoucha, L : Sebkh) (b) : (R : souches référence)

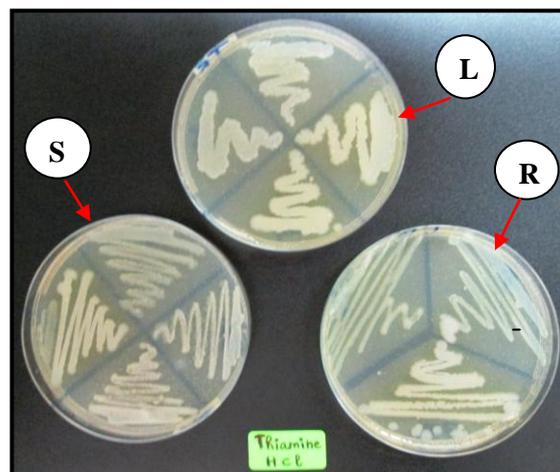


Figure 13 : Utilisation des vitamines par les souches.
 Isolats (S : Amoucha, L : Sebkh) (R : souches référence)

Les souches (isolats et souches témoins) peuvent pousser en présence de la plupart des acides aminés comme source d'azote durant l'étude (**Tableau 4**). La majorité des isolats et souche témoin **102** n'utilisent pas la Glycine (sauf pour les souches **A6, F et L2**), ainsi que pour le Tryptophane.

La majorité des souches utilisent aussi moyennement la Leucine, la Méthionine, L'histidine, la Tyrosine, L'isoleucine, la Serine. En ce qui concerne l'Asparagine, la Proline, l'Acide Glutamique, le Glutamate de Na sont les acides aminés les mieux assimilés par tous les isolats ainsi que les souches témoins (**Figure 12**).

Tableau 4 : Utilisation des différentes sources d'azote par les isolats et les souches de référence.

	Asparagine	Proline	Serine	Acide Glutamique	Méthionine	Histidine	Tyrosine	Cystéine	leucine	Isoleucine	Glutamate de Na	Tryptophane	Glycine
A6	+++	+++	+++	+++	-	(+/-)	+++	++	+++	+	+++	+	++
F	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
102	++	(+/-)	-	++	+	++	+	-	+	-	++	-	-
S2	+++	+++	+	+++	+	++	++	(+/-)	++	++	+++	-	-
S3	+++	+++	+	+++	+	++	++	(+/-)	++	++	+++	-	-
S4	+++	+++	+	+++	+	++	++	-	++	++	+++	-	-
S5	+++	+++	+	+++	+	++	++	(+/-)	++	++	+++	-	-
L1	+++	+++	(+/-)	+++	+	+++	++	(+/-)	++	++	+++	-	-
L2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L3	+++	+++	+++	+++	-	++	++	-	++	++	+++	-	(+ -)
L4	+++	+++	++	+++	-	++	+++	-	++	++	+++	-	-

(+++) : Forte croissance, (++) : moyenne croissance, (+) : croissance, (±) : faible croissance, (-) : pas de croissance.

3.2.3 Besoins en vitamines

Toutes les vitamines testées ont été utilisées par les souches isolées des deux sites et les souches de références qui présentent une forte croissance après 24 heures incubation (**Figure 13**) (**Tableau 5**).

Werner (1992) démontre que le besoin en vitamines chez les rhizobia est très variable et qu'en générale la croissance du *Baradyrhizobium* est stimulée par la biotine et de *rhizobium* par la Thiamine et Penthoténate de Ca. Globalement, cela suggère que l'approvisionnement en vitamine limite la croissance des rhizobiums dans la rhizosphère et le sol (Karunakaran *et al*, 2006).

Tableau 5 : Assimilation des vitamines par les isolats et les souches de référence.

	Témoin	Thiamine	Penthoténate de Ca	Thiamine + Penthoténate de Ca
L1	+	+	+	+
L2	+	+	+	+
L3	+	+	+	+
L4	+	+	+	+
S2	+	+	+	+
S3	+	+	+	+
S4	+	+	+	+
S5	+	+	+	+
A6	+	+	+	+
102	+	+	+	+
F	+	+	+	+

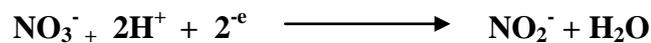
(+) : Bonne croissance

3.3 Tests biochimique

3.3.1 Réductase des nitrates

La majorité des souches réduisent les nitrates en donnant une couleur rouge après l'addition des réactifs I et II de la nitrate réductase, sauf les souches **L3**, **L4**, et **S2**, **S3**, **S4**, **S5** qui ont données une réaction négative, mais après l'addition de la poudre de zinc apparaît la couleur rougeâtre (**Figure 14.e**).

La coloration rouge ou rose traduit la décomposition des nitrates en nitrites.



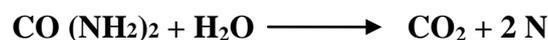
La réaction peut être rendue négative par la réduction des nitrites formés; il faut donc contrôler, dans le cas de l'absence de coloration, et pour vérifier la présence des nitrates on ajoutant au milieu un peu de poudre de zinc qui les réduit et entraîne une coloration (Guiraud, 1998).

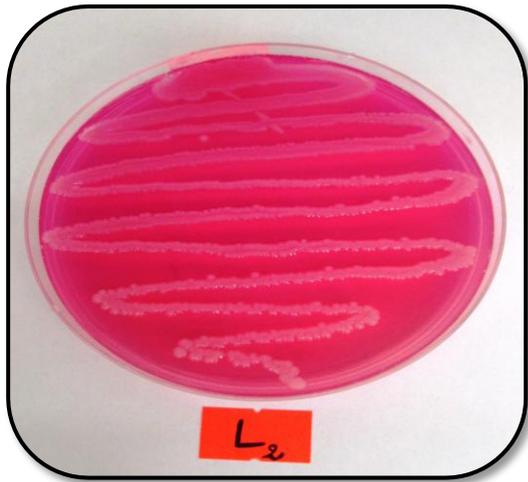
Lucinski *et al.*, (2002) montrent que la présence du nitrate inhibe l'activité de la nitrogénase dans les nodules des plantes légumineuses et que l'activité de la nitrate réductase a été observée dans plusieurs associations symbiotiques entre les légumineuses et les rhizobia dont 97 % de cette enzyme est localisée dans les bactéroïdes

3.3.2. Hydrolyse de l'urée

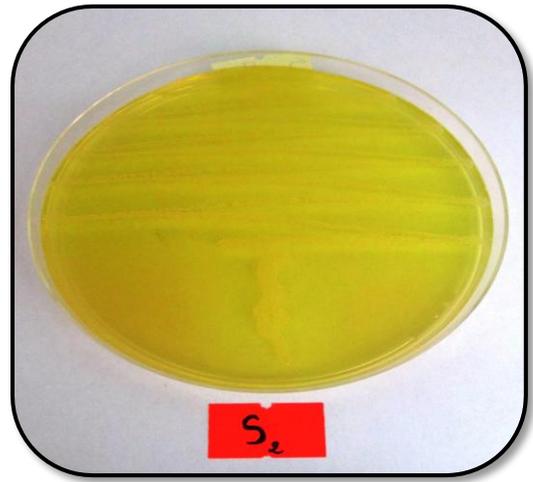
La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis *et al.*, (1977) en utilisant le rouge de phénol comme indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rouge foncé ou le rouge indigo.

En plus des souches témoins seul les isolats **L2** et **L3** alcalinisent fortement le milieu par un virage de couleur de l'oranger rouge au rose fuchsia (**Figure 14.a**), Ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (Uréase +) comme s'est montré dans l'équation (Guiraud, 1998) :

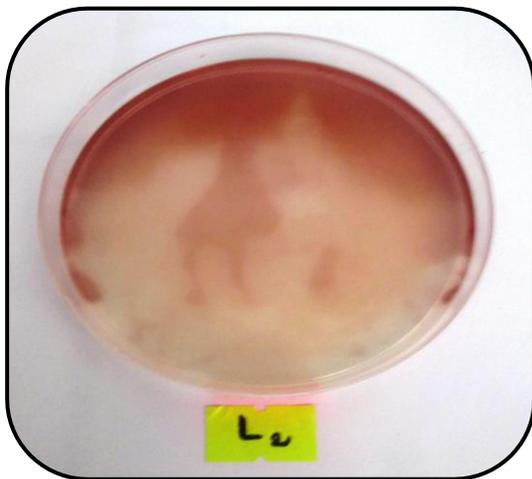




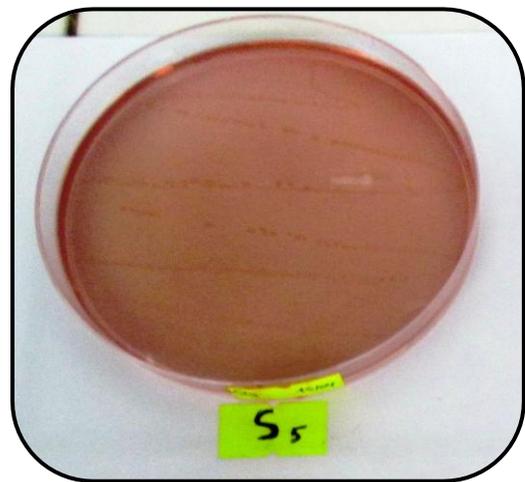
a. Test d'uréase positif



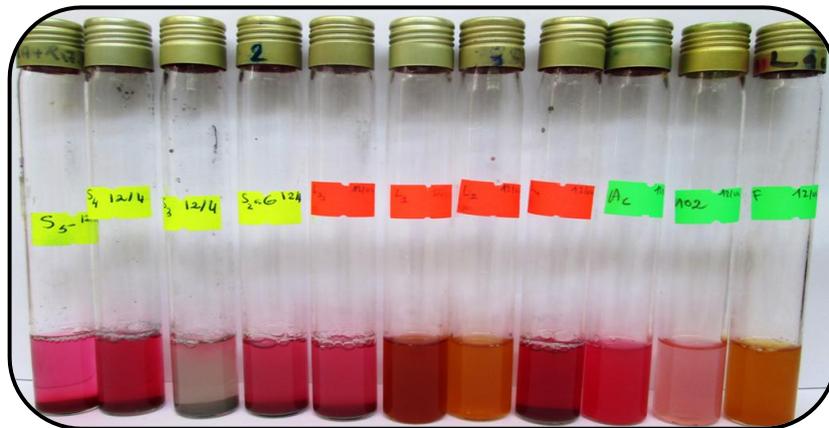
b. Test d'uréase négatif



c. Test de cellulase positif



d. Test de cellulase négatif



e. Réduction des nitrates par les isolats et souches témoins

Figure 14 : Tests biochimiques des isolats et souches témoins.

Par contre les autres isolats ont tous présentées une acidification marquée par un virage de couleur de l'orange rouge vers le jaune (Uréase -) (**Figure 11.b**).

3.3.3. Activité cellulolytique

Pour mettre en évidence l'activité cellulolytique, les boites contenant nos souches sont mise sur un fond rouge qui nos a permis de constater l'halo jaune orangé qui traduit l'activité cellulolytique, et cela s'est produit pour toutes les souches de référence ainsi que les souches isolées **L1, L2, L3, S2, S3, S4**, (**Figure.11.c**), d'un coté on remarque l'absence du halo (une activité cellulolytique négative) pour nos isolat la **S5** et **L4** (**Figure 14.d**).

Les bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* laissent apparaitre une activité cellulolytique négative (Benhizia, 2006).

Tableau 6 : Résultats des tests biochimiques.

Enzymes Souches	Nitrate réductase	Uréase	Cellulase
L1	+	-	+
L2	+	+	+
L3	-	+	+
L4	-	-	-
S2	-	-	+
S3	-	-	+
S4	-	-	+
S5	-	-	-
A6	+	+	+
F	+	+	+
102	+	+	+

3.4 Tests physiologiques

3.4.1. Tolérance au Chlorure de sodium

Beaucoup d'espèces bactériennes ainsi que les rhizobia s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire des corps organiques de faibles poids moléculaires appelés les osmolytes (Zahran, 1991).

La salinité inhibe la fixation symbiotique de l'azote en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène dans les nodosités ayant pour conséquence une inhibition de l'activité de l'activité de la nitrogénase (Saadallah *et al.*, 2001).

Au bout des premières 24 heures d'incubation jusqu'à 48 heures, la majorité de nos isolats ainsi que les souches témoins poussent en présence des différentes concentrations de NaCl variant de 0,1%, 2% jusqu'à 5%, avec une absorbance appréciable à la concentration de 10%, donc on peut les considérer comme osmotolérants (**Figure 15.16**).

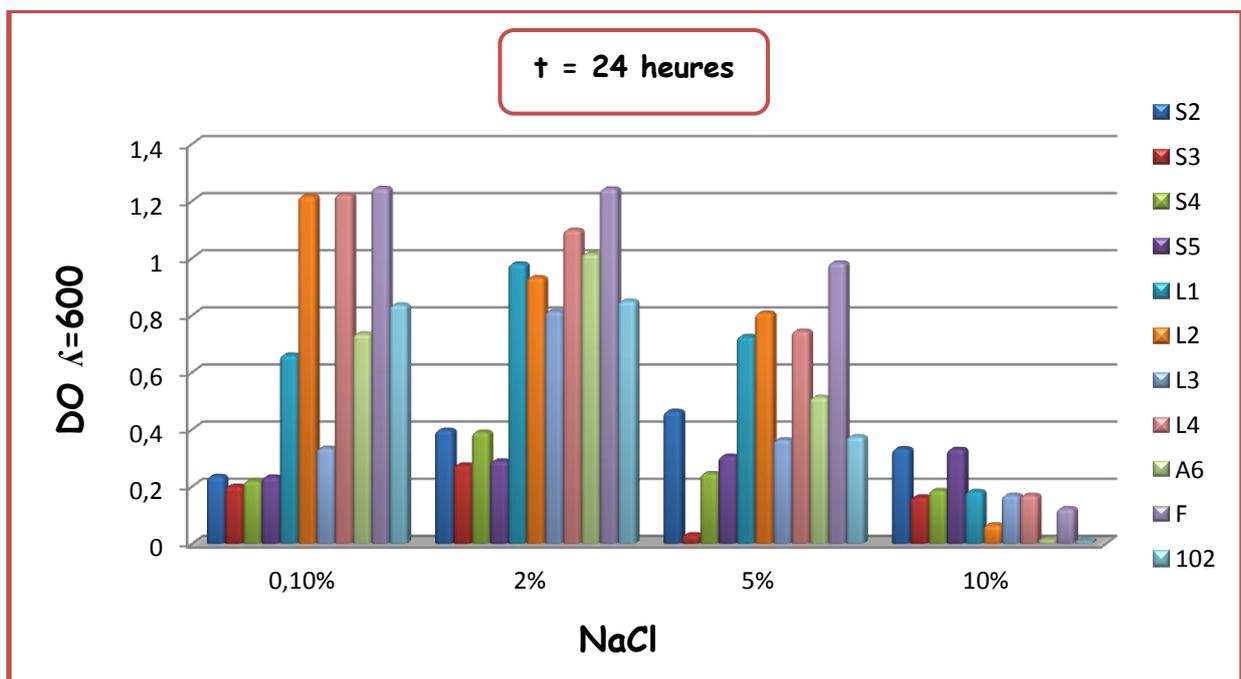


Figure 15 : Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de références après 24 heures d'incubation.

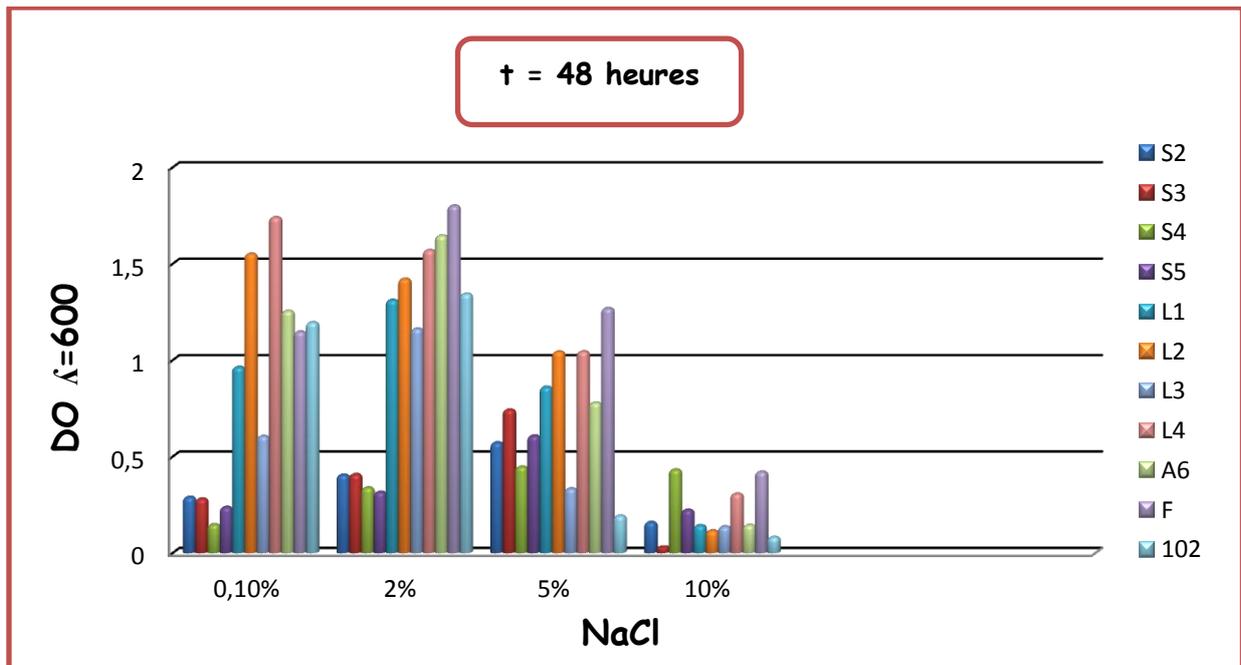


Figure 16 : Tolérance au sel (NaCl) des isolats et des souches de références après 48 heures d'incubation.

3.4.2. Effet du pH

La $DO_{\lambda 600nm}$ montre que dans l'ensemble de nos souches (isolats et souches référence) tolérant les cinq valeurs des pH utilisés (2, 4, 6.8, 8, 10).

Un optimum de croissance de toutes les souches testées est remarqué entre pH 6.8 et 8. D'une façon globale nos isolats et souches témoins sont tolérantes à l'alcalinité (pH=10) et l'acidité (pH=2 à 4) et à la neutralité (pH=6.8) (**Figure 17.18**).

Vincent (1970) et Jordan (1984) ont constaté que le pH optimum de la croissance des rhizobiums est entre 6 et 7.

Graham *et al* (1994) ont montré, que les rhizobia sont tolérante aux pH acide sont généralement plus performante en condition d'acidité du sol dans le champ.

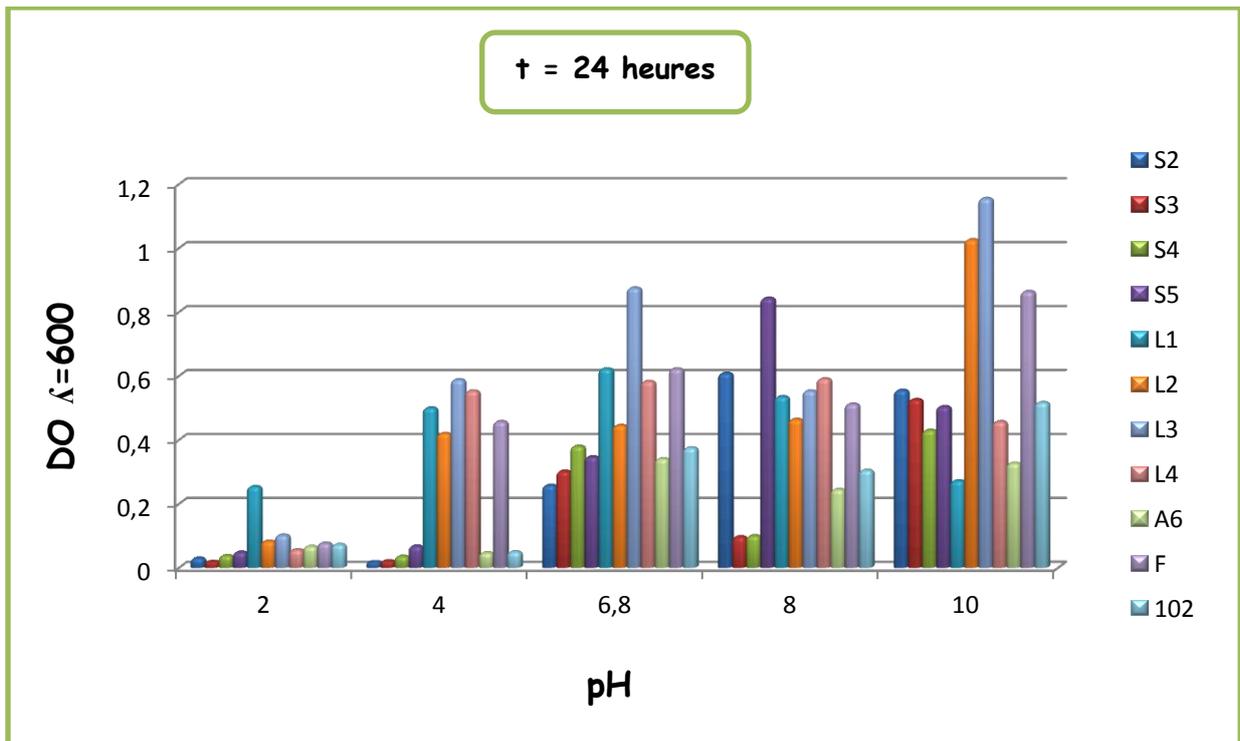


Figure 17 : Tolérance au pH des isolats et des souches de références après 24 heures d'incubation.

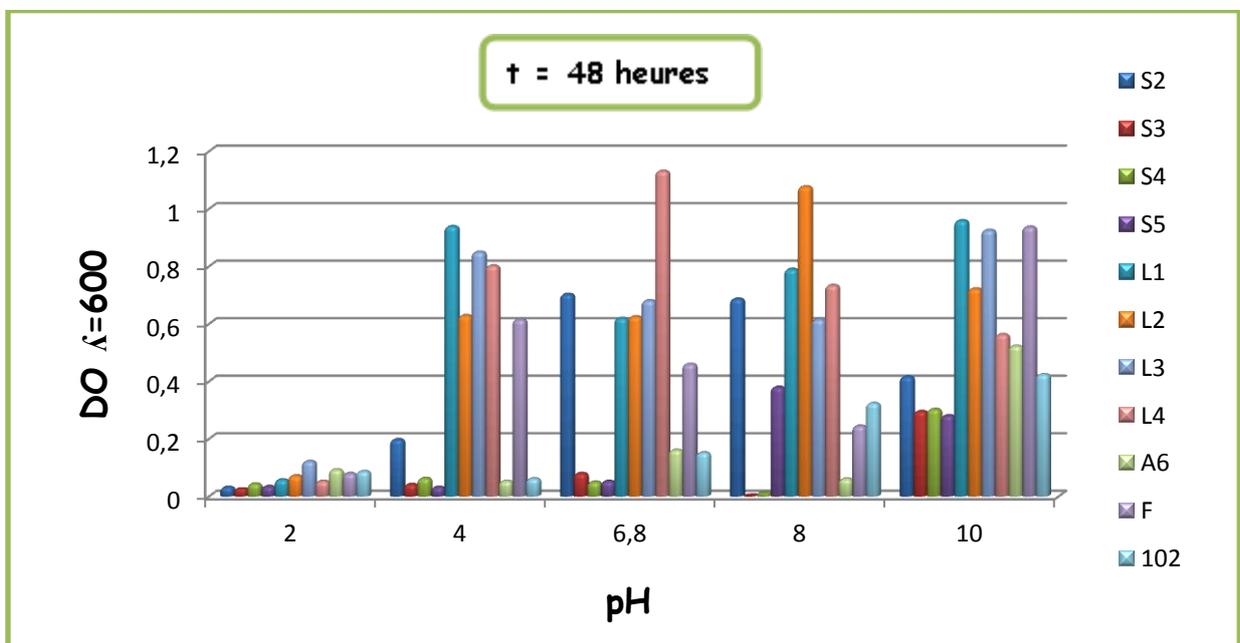


Figure 18 : Tolérance au pH des isolats et des souches de références après 48 heures d'incubation.

3.4.3 Effet de la température

Nos isolats sont capables de croître à une température allant de 4°C jusqu'à 44°C et montrent une croissance optimale dans l'intervalle de 30°C à 37°C. Ce qui laisse supposer que nos isolats sont thermo-tolérants. Les mêmes résultats ont été observés chez les souches de références (**Tableau 7**)

Tableau 7 : Température de croissances testées.

	4°C	30°C	37°C	44°C
L1		+++	+++	++
L2	+ (5 j)	+++	+++	++
L3	+ (5 j)	+++	+++	++
L4	+ (5 j)	+++	+++	++
S2	+ (4 j)	+++	+++	++
S3	+ (4 j)	+++	+++	++
S4	+ (4 j)	+++	+++	++
S5	+ (3j)	+++	+++	++
A6	+ (3j)	+++	+++	+
102	+ (4 j)	+++	+++	+ 3 j
F	+ (4 j)	+++	+++	+

(+++) : Forte croissance, (++) : Moyenne croissance, (+) : croissance.

3.5 Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

3.5.1. Résistance aux métaux lourds

L'effet des métaux lourds dépend de la durée d'exposition, de la dose et du type de métal utilisé (Giller *et al.*, 1998).

En présence de certains métaux lourds, les souches (isolats et témoins) se comportent différemment. Toutes les souches affichent une résistance pour le Pb jusqu'à (1000) µg/ml, et pour CuSO₄ (500) µg/ml sauf pour les isolats (L₄, S₂, S₃, S₄, S₅) (250) µg/ml.

Pour le HgCl₂ (20-200) µg/ml et le ZnCl₂ (50-500) µg/ml les isolats L₂, L₃ et souches témoins montrent une résistance ce qui n'est pas observé chez les isolats L₁, L₄, S₂, S₃, S₄, S₅ (Tableau 8) (Figure 19).

Tableau 8 : Résistances et sensibilité des souches aux métaux lourds.

Métaux lourds []	ZnCl ₂			HgCl ₂			CuSO ₄			Pb		
	50	250	500	20	50	200	50	250	500	50	500	1000
L ₁	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
L ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L ₄	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
S ₂	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
S ₃	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
S ₄	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
S ₅	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
A ₆	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Croissance

(-) : Pas de croissance

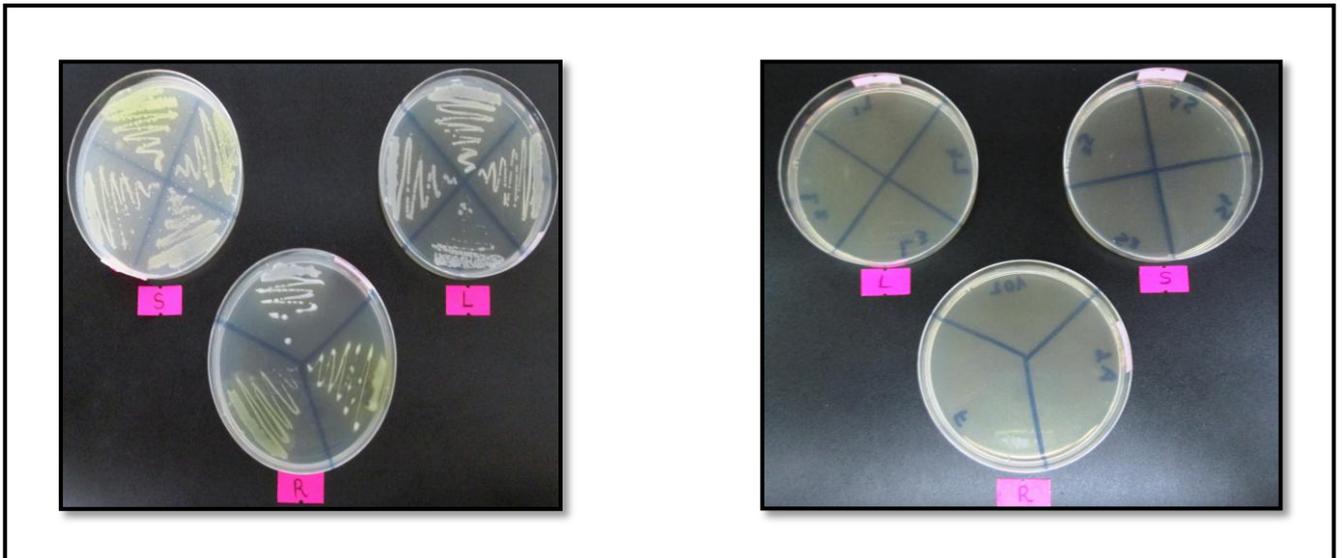


Figure 19 : Effet des métaux lourds sur la croissance des isolats et souches témoins.
Isolats (**S** : Amoucha, **L** : Sebkha) (**R** : souches référence).

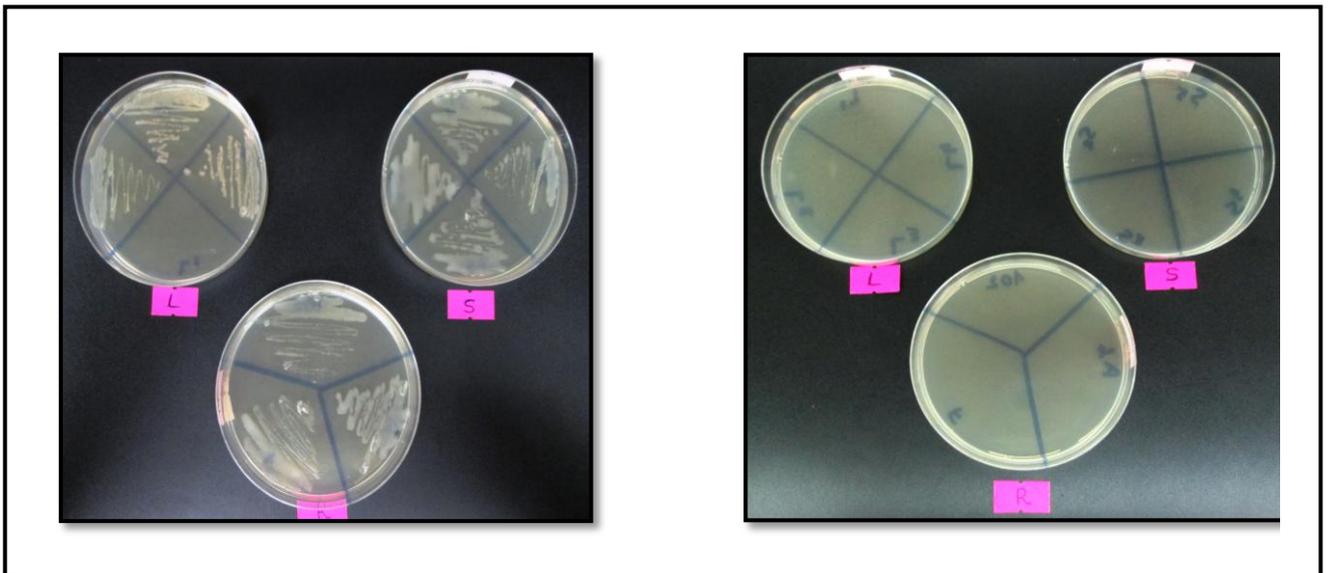


Figure 20 : Effet des antibiotiques sur la croissance des isolats et souches témoins.
Isolats (**S** : Amoucha, **L** : Sebkha) (**R** : souches référence).

3.5.2. Résistance aux antibiotiques

Pour les antibiotiques les souches (isolats et souches témoins) ont montré une nette résistance à l'Erythromycine 300µg/ml sauf pour l'isolat **L1** qui a montré une sensibilité.

Une sensibilité marquante à la kanamycine (50-300) µg/ml pour toutes les souches et le chloramphenicol (50- 200) µg/ml pour toutes les souches sauf pour les isolats **L4** et **S2**, **S3**, **S4**, **S5** qui affichent une croissance entre (50-100) µg/ml (**Tableau 9**) (**Figure 20**).

Tableau 9 : Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques.

Antibiotiques [] Souches	Erythromycine			Kanamycine			Chloramphenicol		
	50	100	300	50	100	300	50	100	200
L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L4	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S2	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S3	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S4	+	+	+	-	-	-	+	+	-
S5	+	+	+	-	-	-	+	+	-
A6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
F	+	+	+	-	-	-	+	-	-
102	+	+	+	-	-	-	+	-	-

(+) : Croissance

(-) : Pas de croissance

4. Analyse du profil protéique par SDS-PAGE

Les profils électroforétiques obtenue par SDS-PAGE (**Figure 21**) des isolats et des souches de référence ont été comparés entre eux en calculant le coefficient de similitude (**Tableau 10**) à partir du diagramme type (Annexe 5).

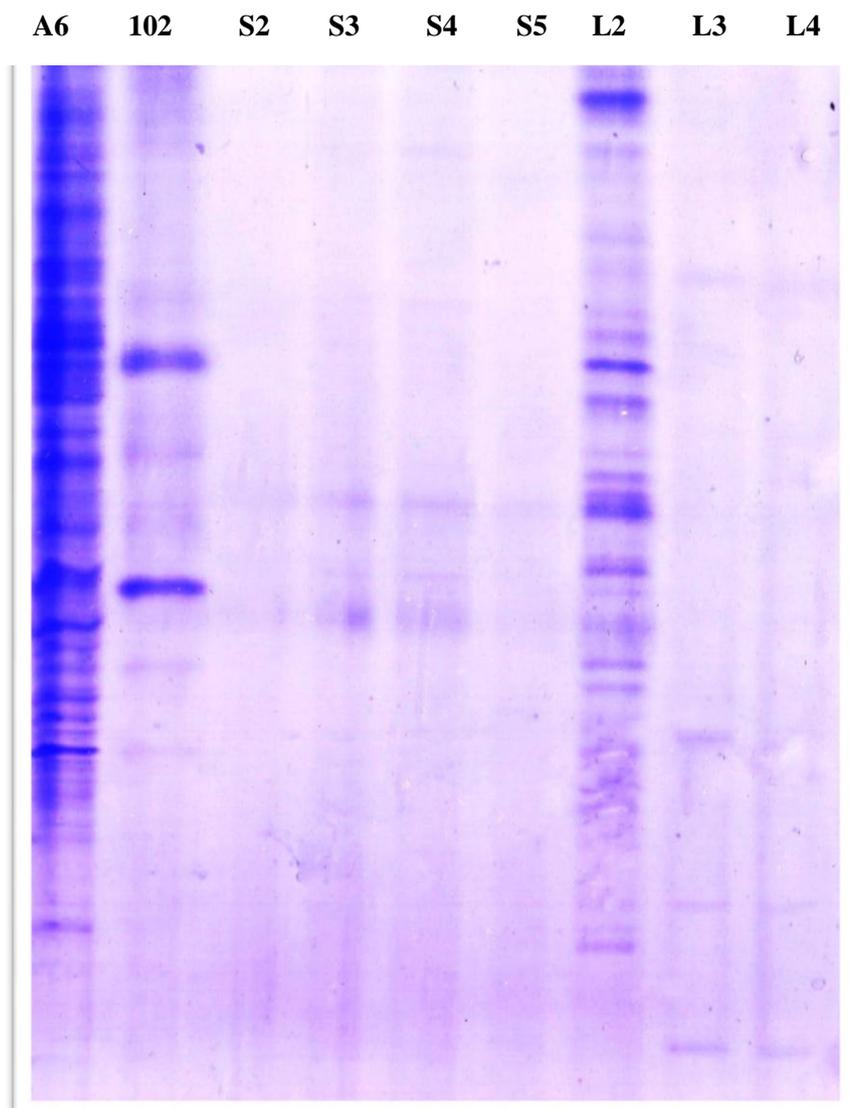


Figure 21 : Profils protéiques des différentes souches.

Isolats : **S2, S3, S4, S5, L2, L3, L4** souches référence : **A6 et 102**

Le coefficient de similitude permet de déterminer le degré de ressemblance entre les profils protéiques des différents isolats et souches de référence. Ce coefficient est calculé sur la base de la présence et absence des bandes des souches comparées deux à deux (Annexe 5).

$$C_s = [(N_p + N_a) / N_t] \times 100$$

N_p : Nombre de bandes présentes.

N_a : Nombre de bandes absentes.

N_t : Nombre total des bandes.

Tableau 10: Coefficient de similitude entre les différentes souches de référence et isolats.

	A₆	102	S₂	S₃	S₄	S₅	L₂	L₃	L₄
A₆	100	24,44	20,00	26,66	22,22	17,77	66,66	17,77	17,77
102	24,44	100	80,00	84,44	84,44	80,00	35,55	15,55	15,55
S₂	20,00	80,00	100	88,88	88,88	97,78	40,00	84,44	84,44
S₃	26,66	84,44	88,88	100	100	86,66	42,22	71,11	71,11
S₄	22,22	84,44	88,88	100	100	86,66	42,22	71,11	71,11
S₅	17,77	80,00	97,78	86,66	86,66	100	37,77	84,44	84,44
L₂	66,66	35,55	40,00	42,22	42,22	37,77	100	42,22	42,22
L₃	17,77	15,15	84,44	71,11	71,11	84,44	42,22	100	100
L₄	17,77	15,15	84,44	71,11	71,11	84,44	42,22	100	100

Le dendrogramme obtenu après analyse numérique par le logiciel XLSTAT 2014, à permis de distinguer deux grands cluster différents.

Les deux souches **A₆** et **L₂** occupent une position à part sur le dendrogramme en formant le premier cluster C1 avec une similarité de **66,66 %**.

Le deuxième cluster C2 est composé de quatre sous cluster : S.Ca regroupe nos isolats **S₅** et **S₂** avec une similitude de **97,78 %**, ce groupe avec les souches **S₄** et **S₃** forment le sous cluster S.Cb, le groupe d'isolats du S.Ca et S.Cb forment un S.Cc avec la souche témoin **102** avec une similitude de **80,00%** pour **S₂**, **S₅** et de **84,44%** pour **S₃**, **S₄**. Le dernier sous cluster regroupe le sous cluster S.Cc et les deux isolats **L₃** et **L₄** et forment ainsi le sous cluster S.Cd.

La particularité est que nos isolats **S3** et **S4** représentent une similitude de **100%** ce qui est observé aussi pour les isolats **L3** et **L4**.

La comparaison des profils des protéines totales obtenue par électrophorèse en présence de SDS hautement standardisée fait ressortir un polymorphisme total entre les isolats et souches de référence.

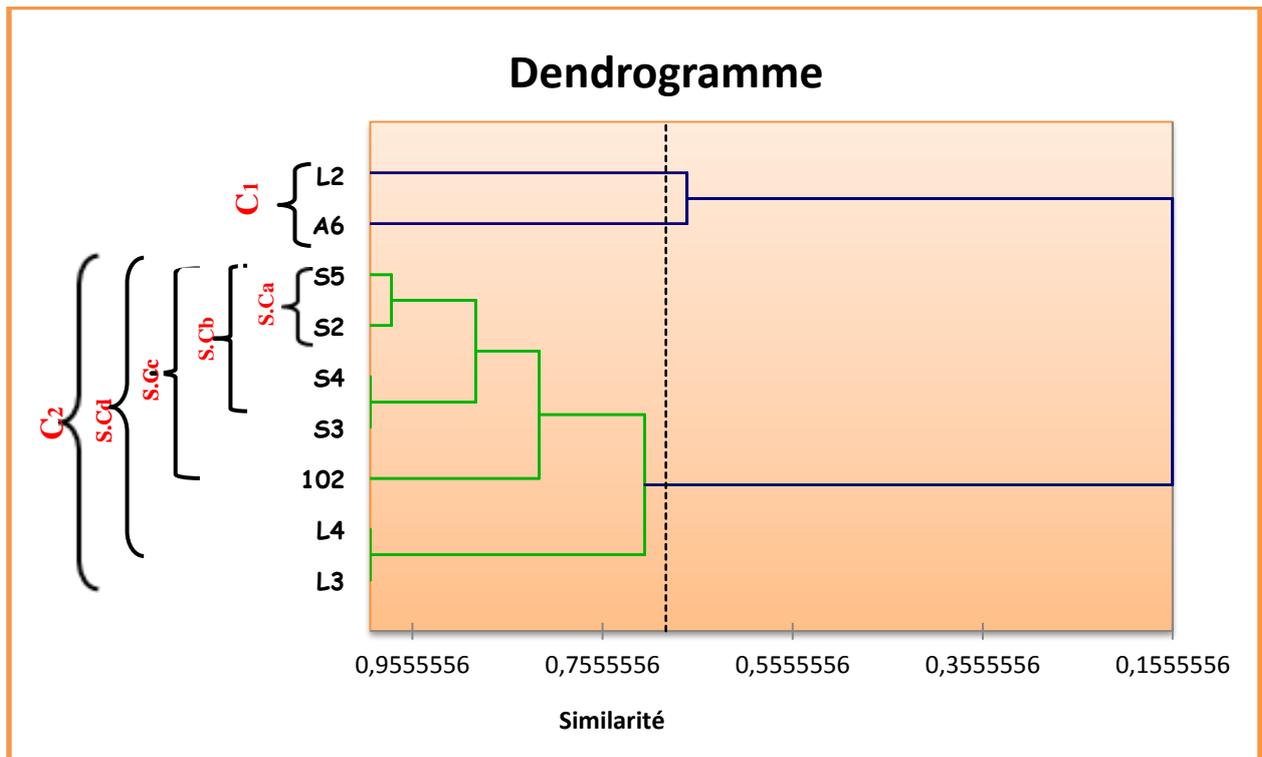


Figure 22 : Dendrogramme du profil protéique sur SDS-PAGE des isolats avec les souches de références.

CONCLUSION

Notre étude porte sur la caractérisation des souches isolées à partir des nodules racinaires d'une espèce végétale *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans deux sites différents. Cette dernière a pour but la détermination de la position taxonomique des isolats par une étude phénotypique en présence des souches de référence dont leur position taxonomique est connue ; A6 : *Rhizobium sulla* sp. nov. RHA6, F : *Rhizobium sulla* RHF, 102 : *Mesorhizobium ciceri*.

Les souches isolées présentent une morphologie et des caractères culturels proches des bactéries de la famille de *Rhizobiaceae*. Une ressemblance apparaît dans la culture de ces souches sur les différents milieux de culture qui ont montré au bout de 24 heures une croissance rapide sur YMA et YMA+RC (avec une différence dans l'absorption du rouge Congo), aussi sur YMA+BTB et modifient le pH sur le milieu GPA+BCP.

L'examen microscopique des isolats donne des bacilles de différentes tailles et des coccobacilles à Gram négatif.

Les isolats possèdent les enzymes spécifiques au processus d'infection avec les souches de référence. Ce qui les englobe dans le groupe des bactéries nodulant les légumineuses (BNL).

Nos isolats répondent à la majorité des caractères du genre *Rhizobium*, dans l'influence des facteurs abiotiques (effet du pH, effet du NaCl, température), l'assimilation des sources de carbone et d'azote et leur résistance aux métaux lourds et les antibiotiques.

Le profil des protéines cellulaires totales obtenu par électrophorèse en conditions dénaturantes avec la construction d'un dendrogramme montre un polymorphisme remarquable.

Les résultats obtenus et l'analyse des caractères des 8 isolats supposent qu'il existe un certain polymorphisme entre les bactéries isolées à partir des nodules de la plante *Hedysarum pallidum* Desf.

Il est donc judicieux d'approfondir cette approche par des investigations complémentaires, notamment le critère symbiotique, l'infectivité in vitro des bactéries associées aux espèces du genre *Hedysarum* ; d'autre part comprendre l'interaction des deux partenaires au niveau génomique, par l'application de l'outil moléculaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Abdelguerfi -Berrekia R., 1985.** Contribution à l'étude du genre *Hedysarum L.*, en Algérie. Thèse de Magister, option phytotechnie. I. N. A. 131 p.
- Abdelguerfi -Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N., Guittonneau G.G., 1988.** Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum L.* en Algérie. I- Etude auto écologique. Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach. 12: 191-219.
- Abdelkarim H., 1984.** Approche phytoécologique et phytosociologique de quelques nappes alfatières des régions de Djelfa et Tébessa. Thèse de Magister. INA. Alger. 1-19 p.

-B-

- Beck D.P., Materon L.A., Afandi F., 1993.** Practical Rhizobium- Legume Technology Manual. ICARDA, Syria.
- Benguedouar A., 2000.** Etude de la symbiose : *Rhizobium – Hedysarum coronarium*. Essai de la caractérisation de l'espèce *Rhizobium hedysary*. thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie.
- Benhizia H., 2001.** Etude caryologique d'une espèce endémique Nord-Africaine, *Hedysarum pallidum* Desf, provenant d'un milieu contaminé par l'antimoine. Thèse de Magister en Biologie Végétale. Université de Constantine, Algérie.
- Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A., 2004.** Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. System. Appl. Microbiol. 27 : 462-468.
- Benhizia Y., 2006.** Caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules de la légumineuse du genre *Hedysarum* : *H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum subsp. capitatum* Desf., et *H. pallidum* Desf. Thèse de doctorat d'état en microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine, Algérie.
- Beringer J.E., 1974.** R-factor transfer in rhizobium leguminosarum. J. Gen Microbiol.
- Berge O., Lodhi A., Brandelet G., Santaella C., Roncato M.A., Christen R., Heulin T., and Achouak W., 2009.** *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 367-372.

-C-

- Caratini R., 1984.** Les plantes. Bordas, Paris.
- Casella S., Gault R. R., Reynolds K. C., Dyson J. R., Brockwell J. 1984.** Nodulation studies on legumes exotic to Australia (*Hedysarum coronarium L.*) FEMS Microbiol. Letters 22: 37- 45.
- Coste H., 1903.** Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes. Paris VI. Tomel. 416 p.
- Coyne V.E., M.J. Diane., S.J. Reid., E.P. Rybicki., 2002.** Molecular Biology Techniques Manual: SDS POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE). University of Cape Town .Dept Microbiology.

Cronk Q., Ojeda I. and Pennington R.T. 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in plant biology* 9: 99-103 p.

-D-

Dardanelli M., Angelini J., and Fabra A., 2003. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Canadian journal of microbiology* 49: 399-405.

De Faria SM., Lewis GP., Sprent JL., Sutherland JM., 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist*, 111. 607- 619 P.

Doyle J.J., 1998. Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* 3, 473-478 p.

-E-

Esseling J.J., Lhuissier F.G.P., and Emons A.M.C., 2003. Nod Factor-Induced Root Hair Curling: Continuous Polar Growth towards the Point of Nod Factor Application. *Plant Physiology* 132: 1982-1988.

-F-

Figueiredo M.V.B., Martinez C.R., Burity H.A., and Chanway C.P., 2008. Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1187-1193.

Foucher F., and Kondorosi E., 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 43:773-786.

-G-

Gage D. J., 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(2): 280-300.

Gage D., and Margolin W., 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology* 3(6): 613-7.

Graham P. H., Draeger K., Ferrey M.L., Conroy M.J., Hammer B.E., Martines E., Naarons S.R., et Quito C., 1994. Acid PH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* 40: 198-207.

Guignard J.L., Dupont F., 2005. Botanique. 13^{ème} Edition Masson. Sprent : 164-179 p.

Guignard J. L., 1983. Abréger de botanique. Edition Masson. 259 p.

Guiraud J.P., 1998. Microbiologie alimentaire .DUNOD, Paris. Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. 234-256 p.

-H-

Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Figier J., Boussaid M., Marrakchi M., Triffarah N., 2004. Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI – FAO, 130: 65 - 72.

-J-

Jarvis B.D.W, Mc lean T.S, Robertson I.G.C et Fanning G.R., 1977. Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. New Zealand J. Agric. Res. 20: 42-52.

Jordan D.C., 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. P. 234-254. In N. R. Krieg and J.G. Holt (Ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1 the Williams & Wilkins Co. Baltimore. 234-256 p.

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

-K-

Karunakaran R., Ebert K., Harvey S., Leonard M. E., Ramachandran V., Poole P. S., 2006. Thiamine Is Synthesized by a Salvage Pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* Strain 3841. Journal of Bacteriology Vol 188. N°18, 6661–6668 p.

-L-

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. J. Biol. Chem. 237: 680-685.

Limpens E., Bisseling T., 2003. Signaling in symbiosis. Current Opinion in Plant Biology 6: 343-350.

Lindström K., Terefework Z., Suominen L., and Lortet G., 2002. Signalling and development of *Rhizobium*-legume symbiosis. biology and environment: Royal Irish Academy 102 (1): 61-64.

Lindström K., Lehtomaki S., 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (galega) compared with other fast-growing rhizobia. FEMS Microbiology Letters 50, 277- 287.

Lohar D., Stiller J., Kam J., Stacey G., and Gresshoff P.M., 2009. Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. Ann. Bot. 104: 277-285.

Laranjo M. C. Branco., R. Soares., L. Alho., M.D.E. Carvalho., S. Oliveira., 2002. Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. Journal of Applied Microbiology. Volume 92 Issue 6 Page 1043.

Lucinski R., Polcyn W., Rotayczak L., 2002. Nitrate reduction and nitrogen in symbiotic association Rhizobium-legumes. Acta Biochimia Polonia. 49 (2): 537-546.

-M-

Menna P., Hungria M., Barcellos F. G., Bangel E.V., Hess P.N., Martinez- Romero E., 2006. Molecular phylogeny based on the 16S RNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. Syst. Appl. Microbiol. 29: 315-332.

Mottareale G., 1898. Di alcuni organi particolari delle radici tubercolifere dello *Hedysarum coronarium* in relazione al *Bacillus radicolica* e alla *Phytomyxa leguminosarum*. Atti R. Ist. incoragg. Napoli. 11: 1-7.

-P-

Pagano M.C., 2008. Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration Plant Soil Environ, 54, 2008 (11). 498-508 p.

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

Patrícia P. Pinto., R. Raposeiras., A.M. Macedo., L. Seldin., E. Paiv., NadM.H.Sá., 1998. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating Rhizobium strains .Revista de Microbiologie. Print ISSN 0001.

Pelmont J., 1995. Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Office des Publications Universitaires 2: 541-572.

Perry J.J., Stalex J.T. et Lory S., 2004. Microbiologie cours et questions de revision. Edition Dunod. Paris. France.

Peter M. Kopittke., Peter J. Dart, Neal W. Menzies., 2005. Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*).

Pomel N.A., 1874. Nouveaux matériaux pour la flore atlantique. Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique du Nord. 19 : 48-128 p.

-Q-

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

-R-

Raposeiras, R., P. P. Patrícia., V.M. P Raul., S. Lucy., E. Paiva., M. R. Scotti., N. M.H. Sá., 2002. Variability of isolated colonies in bean nodulating Rhizobium strains before and after exposure to high temperature. Brazilian Journal of Microbiology. Print ISSN 1517-8382.

Rasanen L., 2002. Biotic and abiotic factors influencing the development of N₂-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia*. Thèse de doctorat de l'université de Helsinki. Finlan Oldroyd. 220 p.

Raven P. H., Evert R. F. Et Eichlorn S. E., 2000. Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.

-S-

Saadallah K., Drevon J.J., Abdely C., 2001. Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie* 21: 627-634.

Selenska-Pobell S., Evguenieva-Hackenberg E., Radeva G. and Squartini A., 1996. Characterization of *Rhizobium hedysari* by RFLP analysis of PCR-amplified DNA and by genomic PCR fingerprinting. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 517-528.

Sofia Caçoilo C., Gusmao A.I., Lima, Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira., 2005. The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* Cd exposure.

Somasegaran P., Hoben H.J., 1994. Hand book for Rhizobia. Springer verlag, New York. Inc. 450 p.

Sprent J.I., 1995. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem* 27: 401-407.

Squartini A., Struffi P., Do-ring H., Seleska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Dazzo F. B., Casella S. and Nuti M. P., 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *Rhizobium hedysari*): The root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1267-1276.

-T-

Tighe S. W., Amarger N., Squartini A. and Jarvis, B. D. W., 1994. Identification of new and emerging species of *Rhizobium* using cellular fatty acid analysis. 23-27 p. *In Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology May 1994*, Las Vegas, NV, USA.

Titin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Vallentine D. H., Walters S. M., et Webb D. A., 1967. *Flora Europea* 2. Rosaceae to Umbelliferae. Cambridge University Press. 185-187 p.

Toffanin A., Wu Q., Maskus M., Casella S., Abruna H. D. and Shapleigh J. P., 1996. Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the nondenitrifying *Rhizobium hedysari* strain HCNT1. *Appl Environ. Microbiol.* 62 :4019-4025.

Torche A., 2006. Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum*. Thèse de magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine, Algérie.

-V-

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

-W-

- Wei G.H., Zhang Z.X., Chen C., Chen W. M et Ju W.T., 2008.** Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. *Microbiol. Research*. 163: 651-662.
- Werner D., 1992.** The Rhizobium-Bradyrhizobium-Fabales symbiosis. In *Symbiosis of plants and Microbes*. Chapman & Hall. 49-55. ISBN: 0412362309.
- Woronin M. S., 1866.** Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und bei der gewöhnlichen Gartenlupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelschwellungen. *Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de St. Pétersbourg*, VII Series, vol. X.

-Y-

- Young N.D., Mudge J., and Ellis T.H., (2003).** Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol* 6, 199-204.

-Z-

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

<http://www.IKon.altervista.org>. le 05/06/2014 à 20:36.

<http://www.cropview.wordpress.com> le 16/06/2014 à 18:30.

ANNEXES

ANNEXE 01

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
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	0.20
Na Cl	0.10
Extrait de levure	0.50
Eau distillée	1000ml
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

YMB	1000 ml
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA+ Rouge Congo en g/l

YMB	1000 ml
Solution stock de rouge Congo	10 ml
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 bromothymol	5 ml
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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	10 ml
Eau distillée	1000ml
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

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

Composition de la solution YMA + Carbonates de Calcium. en g/l. (Vincent, 1970)

YMB	1000 ml
CaCO ₃	1
Agar	18
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu Défini 8 en g/l (Lindstrom et lehtomaki, 1988)

KH ₂ PO ₄	0.3
Na ₂ HPO ₄	0.3
MgSO ₄	0.21
CaCl ₂	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
Panhotenate-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 TYA (Tryptone Yeast Agar) en g/l (Beringer, 1974)

Tryptone	5
Extrait de levure	3
CaCl ₂ H ₂ O	0.74
Eau distillée	1000 ml
Agar	12
pH	6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Milieu Mannitol-Mobilité (prêt à l'emploi, acheté à partir de l'institut pasteur).

Mueller Hinton (prêt à l'emploi, acheté à partir de l'institut pasteur).

ANNEXE 02

Coloration de Gram

Préparer des frottis à partir des cultures sur YMA, on prépare des lames bien étalées en couche mince, séchées et fixées, puis colorées selon les étapes suivantes :

- ✚ Couvrir la lame de violet de Gentiane pendant une minute.
- ✚ Chasser le violet avec du Lugol, 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, sécher la lame et observer à immersion à l'objectif $\times 100$.

ANNEXE 03

Les résultats de la mesure de la densité optique $\lambda=600$ des différents tests.

Effet du NaCl

Souches/ NaCl (Mm)	Temps	0.1%	2%	5%	10%
S₂	24 h	0.236	0.398	0.464	0.333
	48 h	0.291	0.406	0.574	0.161
S₃	24 h	0.202	0.276	0.032	0.164
	48 h	0.282	0.409	0.744	0.033
S₄	24 h	0.220	0.391	0.246	0.187
	48 h	0.149	0.340	0.448	0.433
S₅	24 h	0.234	0.290	0.307	0.331
	48 h	0.239	0.317	0.609	0.224
L₁	24 h	0.661	0.980	0.726	0.183
	48 h	0.965	1.313	0.862	0.144
L₂	24 h	1.217	0.932	0.808	0.066
	48 h	1.553	1.422	1.045	0.117
L₃	24 h	0.335	0.814	0.364	0.170
	48 h	0.607	1.164	0.335	0.138
L₄	24 h	1.222	1.098	0.745	0.170
	48 h	1.742	1.572	1.046	0.308
A₆	24 h	0.735	1.015	0.513	0.015
	48 h	1.256	1.647	0.780	0.146
F	24 h	1.245	1.243	0.984	0.124
	48 h	1.149	1.802	1.270	0.422
102	24 h	0.836	0.850	0.375	0.009
	48 h	1.197	1.345	0.194	0.084

Effet du pH

Souches/pH	Temps	2	4	6.8	8	10
S₂	24 h	0.030	0.018	0.258	0.608	0.555
	48 h	0.032	0.198	0.703	0.687	0.416
S₃	24 h	0.019	0.021	0.302	0.097	0.526
	48 h	0.027	0.042	0.080	0	0.296
S₄	24 h	0.038	0.036	0.380	0.100	0.430
	48 h	0.044	0.063	0.050	0.012	0.303
S₅	24 h	0.049	0.068	0.347	0.843	0.504
	48 h	0.035	0.032	0.053	0.380	0.281
L₁	24 h	0.254	0.500	0.662	0.535	0.272
	48 h	0.058	0.939	0.619	0.790	0.959
L₂	24 h	0.083	0.420	0.445	0.464	1.026
	48 h	0.072	0.629	0.625	1.077	0.722
L₃	24 h	0.102	0.588	0.875	0.553	1.157
	48 h	0.122	0.850	0.681	0.615	0.926
L₄	24 h	0.056	0.553	0.583	0.591	0.457
	48 h	0.053	0.802	1.131	0.734	0.563
A₆	24 h	0.067	0.047	0.341	0.245	0.327
	48 h	0.093	0.053	0.161	0.061	0.523
F	24 h	0.077	0.457	0.622	0.512	0.864
	48 h	0.080	0.615	0.460	0.245	0.937
102	24 h	0.073	0.050	0.375	0.305	0.517
	48 h	0.087	0.062	0.152	0.324	0.424

ANNEXE 04

Différents matériels du SDS-PAGE (Laemmli 1970)

Tampon de lyse

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

Solutions de stocks (Solutions mères)

Solution d'acrylamide

Acrylamide 30%	60 g
Bis acrylamide 0.8%	1.6 g
H ₂ O QSP	200 ml

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

Tris 3M	72.7g
SDS 0.8%	1.6g
Mercaptoéthanol (MCE)	0.8ml
H ₂ O QSP	200 ml

Ajuster à pH 8.8 avec HCl.

Tampon du gel de séparation (stacking gel buffer) : Tris-HCl 0.5M pH 6.8

Tris 0.5M	12.1g
SDS 0.4%	0.8 g
(MCE) 0.2%	400 μ l

H₂O QSP 200 ml

Ajuster à pH 6.8 avec HCl

Préparation des gels

Gel de séparation (resolving gel) à 12%

Solution d'acrylamide 10.4 ml

Tampon resolving 3.14 ml

Tetraméthylènediamine (TEMED) 12.5 µl

H₂O QSP 25 ml

Gel de concentration (stacking gel) à 7.5 %

Solution d'acrylamide 5 ml

Tampon stacking 5ml

TEMED 20 µl

H₂O QSP 20 ml

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

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

Resolving gel 140 µl

Stacking gel 200 µl

Tampon de migration pH 8.3

Tris 0.025M 1.06 g

Glycine 0.192M 5.04 g

SDS 0.1% 0.35 g

(MCE) 0.05% 175 µl

H₂O QSP 350ml

ANNEXE 05

Tableau : Présence et absence des bandes protéiques pour chaque souche.

	A6	102	S2	S3	S4	S5	L2	L3	L4
B1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
B2	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B3	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B4	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B5	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B6	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B7	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B8	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B9	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B10	1	0	0	0	0	0	1	1	1
B11	1	1	0	1	1	0	1	0	0
B12	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B13	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B14	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B15	1	1	0	1	1	0	1	0	0
B16	1	0	0	0	0	0	1	1	1
B17	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B18	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B19	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B20	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B21	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B22	1	1	1	1	1	1	1	0	0
B23	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B24	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B25	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B26	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B27	1	1	0	1	1	0	0	0	0
B28	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B29	1	0	1	1	1	0	1	0	0
B30	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B31	1	1	0	0	0	0	1	0	0
B32	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B33	1	0	0	0	0	0	1	1	1
B34	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B35	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B36	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B37	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B38	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B39	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B40	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B41	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B42	0	0	0	0	0	0	1	1	1
B43	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B44	1	0	0	0	0	0	1	0	0
B45	0	0	0	0	0	0	0	1	1

1 : Présence de la bande protéique

0 : Absence de la bande protéique

NOUAR Maroua
RIABI Kenza

Date de soutenance : 23.06.2014

Titre : Isolement et caractérisation des bactéries nodulant la légumineuse *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans deux sites différents.

Nature du diplôme : Master en **Ecologie Microbienne**

Résumé :

La présente étude est une contribution à la caractérisation des souches bactériennes isolées à partir des nodules racinaire d'une espèce végétale endémique Nord-africaine ; *Hedysarum pallidum* Desf., poussant dans deux sites différents.

La caractérisation des souches porte sur une étude morphologique, des tests biochimiques, nutritionnels et physiologiques ainsi qu'une détermination de la résistance et de la sensibilité des souches aux métaux lourds et aux antibiotiques et en fin un profil protéique sur SDS-PAGE.

Les résultats obtenus et l'analyse des caractères des 8 isolats supposent qu'il existe un certain polymorphisme entre les bactéries isolées à partir des nodules de la plante *Hedysarum pallidum* Desf.

Mots Clés : *Hedysarum pallidum* Desf, SDS-PAGE, polymorphisme.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature de la Vie, Université Constantine 1.

Rapporteur : Mr. Y.Benhizia, Professeur.Université Constantine 1.

Membre de jury :

Président : Mr. A.Hamidechi, Professeur. Université Constantine 1.

Examinatrice : Mme. I.Guergouri, Maitre-assistante. Université Constantine 1.

