

153

2/2

34702
09
09
09

Rapport de stage

Juillet-octobre 1999

Caractérisation Taxonomique des Bactéries Fixatrices d'Azote nodulant *Acacia nilotica* var. *adansonii* et var. *tomentosa* (*Mimosoideae*, sous famille des *Acacieae*).

Par

Ibrahima Ndoye
Maître de conférences

UCAD

Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale

091568

Et

Chercheur associé au Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'IRD,
Dakar, Sénégal

Stage effectué au laboratoire des Symbioses Tropicales et
Méditerranéennes

(LSTM, Laboratoire Commun IRD-CIRAD/INRA-ENSAM)

Campus du CIRAD, Baillarguet, Montpellier.

Dans le cadre du programme de bourses SSHN

(Pour séjour scientifique de haut niveau).

Fonds Documentaire IRD
Cote: B * 21676 Ex: Unique



010021676

IRD / CIRAD - DAKAR
Date: 24/02/2000
N: 2 12790
COTE COURANT RAP 499.000/4

Remerciements

Ce stage a été effectué au laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM, Laboratoire Commun IRD-CIRAD/INRA-ENSAM) situé sur le Campus du CIRAD de Baillarguet à Montpellier.

J'ai eu le privilège d'être accueilli par Monsieur Bernard Dreyfus directeur de recherche IRD et chef du laboratoire. Qu'il trouve ici toute ma sincère gratitude pour le soutien et l'intérêt porté à mes recherches. Je le remercie tout particulièrement de son amitié et de sa confiance.

Je suis sincèrement reconnaissant au Dr. Eric Giraud pour m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire; ses nombreux conseils et remarques pertinentes ont été très bénéfiques. L'assistance de Mme Clémence Chaintreuil, Mrs. Abdoulaye Sy et Salif Bâ m'a été très précieuse.

Je remercie également le Dr Philippe deLajudie pour avoir dirigé mes recherches dans le cadre de la caractérisation taxonomique chez les rhizobiums.

Le laboratoire de microscopie et de cytologie est un laboratoire très moderne. Le Dr. Yves Prin nous a fait profiter de son expérience sur les différentes approches et méthodes d'étude de l'organogenèse des nodules de légumineuses.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Mme Nathalie Puget pour la part prépondérante qu'elle a prise pour rendre notre séjour très effectif et agréable.

Je remercie tous les membres de l'équipe du laboratoire pour la très bonne ambiance qui a prévalu pendant tout notre séjour.

Mes remerciements vont également à l'ORSTOM (actuel IRD) qui a pris en charge ce stage dans le cadre de son programme de Bourses SSHN (pour séjour scientifique de haut niveau).

I. Introduction

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont d'une importance considérable en agriculture et en foresterie à cause de leur capacité à former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses. Ces légumineuses peuvent jouer un rôle important dans la protection de l'environnement et l'amélioration de la fertilité des sols

À côté des applications potentiellement importantes de ces légumineuses, les recherches portent également sur l'adaptation de leurs rhizobiums aux conditions édaphiques défavorables des sols surexploités (épuisés) et leur caractérisation taxonomique par une approche polyphasique.

L'objectif de ces séjours annuels est de renforcer la collaboration scientifique entre partenaires de l'UMR symbioses à laquelle nous sommes associés. Il sera développé en particulier au LSTM des programmes sur les rhizobiums tropicaux par des techniques phénotypiques (électrophorèse SDS-PAGE des protéines de la cellule bactérienne), de biologie moléculaire et de cytologie qui pourront ensuite être transférées pour la recherche et l'enseignement à l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD).

C'est dans ce contexte que se situe ce présent travail

Notre programme portera sur l'étude des symbioses fixatrices d'azote concernant certaines légumineuses tropicales spontanées et arbustives en vue de leur utilisation pour l'amélioration des sols agricoles, des jachères et pour la foresterie. Il abordera en outre l'étude de l'ontogenèse des nodules de ces légumineuses pour une meilleure compréhension de ces systèmes.

Le travail au LSTM comportera plusieurs approches complémentaires :

(1) Une approche taxonomique polyphasique sur une collection de souches de rhizobia incluant l'analyse comparative des protéines totales des profils électrophorétiques en gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE), l'analyse par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de l'ADN codant pour l'ARNr 16S, le séquençage de l'ADNr 16S de certaines souches, et les hybridations ADN-ADN. À partir de cette étude, nous définirons des sondes moléculaires spécifiques utilisables pour des études d'écologie moléculaire portant sur la dynamique des populations dans les sols.

(2) Une étude sur l'ontogenèse des nodules de *Cassia absus* et d'*Acacia nilotica* par cytologie et microscopie, les *Cassia* étant considérées comme primitives, et les *Acacia* comme des légumineuses plus évoluées.

(3) La mise au point d'une stratégie pour valoriser ces résultats à la fois sur le terrain par l'inoculation de pépinières forestières et par la rédaction de publications communes UCAD-IRD dans des revues internationales.

II. Matériels et Méthodes

2. Matériel végétal

2.1. Culture des plantes

Les graines d'*Acacia nilotica* sont désinfectées et scarifiées à l'acide sulfurique concentré, puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite déposées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 8% et mises à germer à l'étuve 30°C. Le temps de traitement à l'acide est de 2 heures pour les deux variétés *A. nilotica* var *tomentosa* et *A. nilotica* var. *adansonii*. Un temps de 48 heures est nécessaire pour une bonne germination.

2.2. Culture des plantes

Après deux jours de germination, Les jeunes pousses sont mises en culture sur des tubes (tubes Gibson) contenant un milieu nutritif (Jensen) gélosé sans azote. Les plantules sont ensuite placées en chambre de culture dans des conditions contrôlées.

3. Inoculation et test de nodulation chez les plantes

Au bout de 48h, les racines des jeunes plants obtenus sont inoculées avec 1 ml d'une suspension des souches en phase exponentielle de croissance en milieu YM. La formation et le développement des nodules ont été suivis.

L'effectivité des souches a été estimée en faisant le poids sec des parties aériennes.

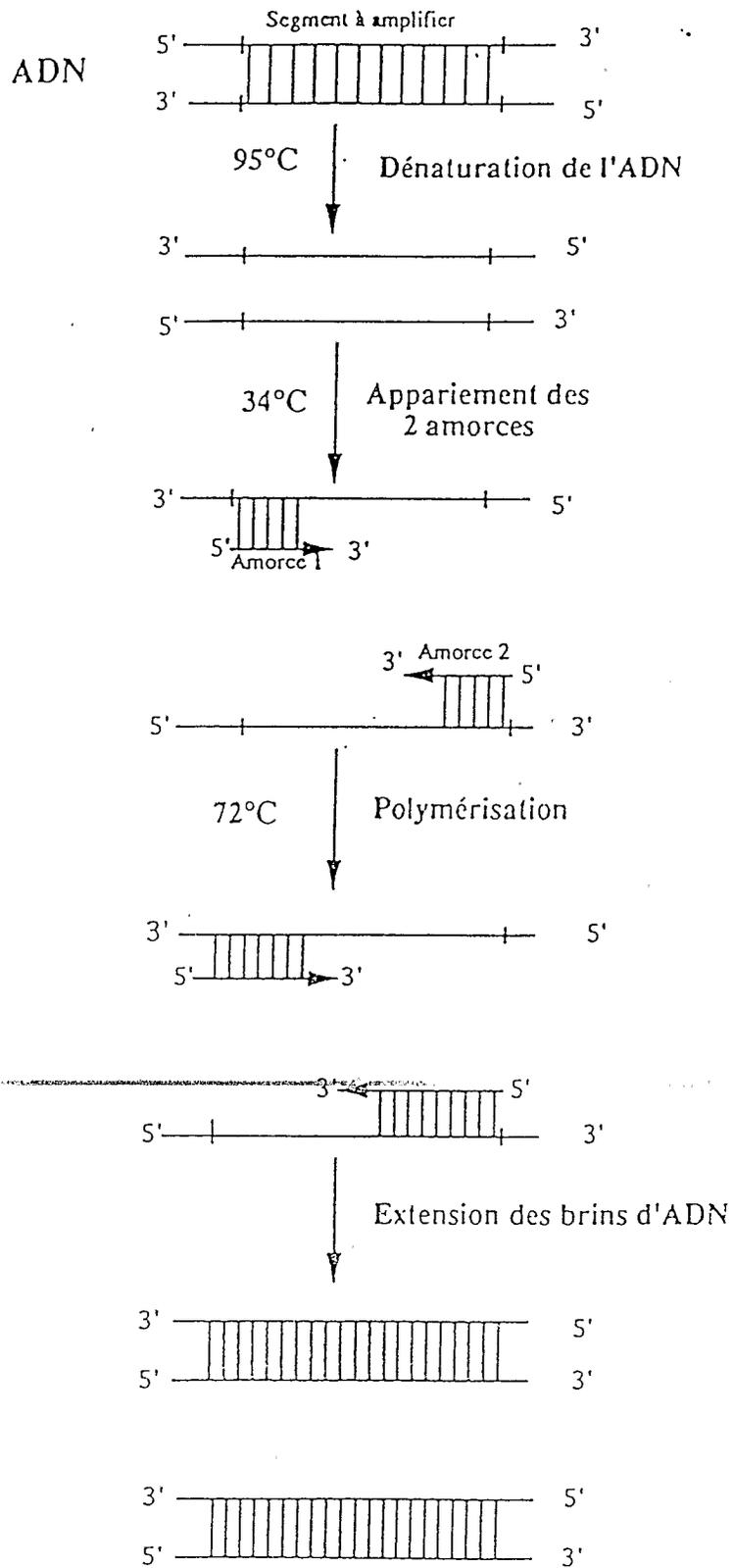
La liste des souches, leurs plantes d'isolement ainsi que leur origine géographique est donnée au tableau (2).

4. Analyse des protéines bactériennes totales par SDS-PAGE

Plus de 2000 protéines différentes sont présentes dans une cellule bactérienne, ce qui constitue une source d'information très riche pour la caractérisation, la classification et la connaissance d'un organisme bactérien.

La séparation des protéines d'une souche bactérienne par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) donne un profil ou électrophorégramme caractéristique de la souche et reproductible si les techniques employées sont standardisées. Chaque bande d'un profil électrophorétique est composée de plusieurs protéines de structure différente mais de mobilité identique. Cette technique de l'électrophorèse, utilisée depuis plusieurs années dans la systématique microbienne, est très sensible, et donne surtout des informations sur l'analogie des souches qui se trouvent dans les mêmes genres, espèces ou sous-espèces. Le protocole expérimental est basé sur des techniques qui ont été décrites par Laemmli (1970) et modifiées par Kiredjan *et al.* (1986).

Figure 1 : Les étapes de la PCR pour 1 cycle d'amplification



4.1. Préparation des extraits protéiques

4.1.1. Culture des bactéries

Le milieu de culture doit être le même et doit optimiser la croissance bactérienne pour toutes les souches à comparer ; il doit être riche et tamponné, afin que le pH de celui-ci reste constant pendant la croissance bactérienne. Pour les rhizobiums, on utilise du milieu TY tamponné. La constance de la qualité et de la marque des produits est primordiale pour la reproductibilité de la technique.

La quantité d'une öse de platine remplie de bactéries est inoculée sur un milieu TY tamponné gélosé en boîte de Petri ou incliné en tubes de verre. Après 48 heures, cette culture est homogénéisée dans 3 ml de solution de tampon phosphate stérile à 0,01 M, pH 7. Le mélange est réparti dans des boîtes stériles de milieux TY tamponnés gélosés (5 boîtes par souche). Celles-ci sont ensuite incubées pendant 48 heures à 28°C.

4.1.2. Récolte des bactéries

La culture est mise en suspension dans un tampon phosphate de sodium 0,01M, pH 7,3 (tampon NaPBS). La suspension est centrifugée pendant 10 min à 10000 tours par minute après avoir été filtrée sur un morceau de gaze en coton. Les cellules sont ensuite lavées (resuspendues) et récoltées (recentrifugées) encore deux fois dans le même tampon.

4.1.3. Extraction des protéines

Au moins 80 mg de la matière bactérienne de chaque souche est mise en suspension dans un volume de 0,9 ml de tampon STB. En effet, une bonne extraction nécessite environ 50 à 100 mg de biomasse bactérienne pour chaque souche.

La lyse des cellules s'effectue après addition de 0,1 ml SDS 20 %, et chauffage des échantillons pendant 10 min à 95°C. Les extraits protéiques sont refroidis et centrifugés pendant 10 min dans une centrifugeuse Eppendorf à température ambiante. Le surnageant est prélevé, partagé en deux parties ; une partie est conservée à -80°C et l'autre pour l'usage courant à -20°C.

4.1.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en présence de SDS est réalisée sur des appareils de type Hoefer SE 600 ou LKB 2001 (gels verticaux).

Le principe est que les protéines, polymères d'acides aminés, possèdent une charge nette positive ou négative due aux groupements positifs ou négatifs des acides aminés de leur surface. Si on applique un champ électrique à une solution contenant une molécule protéique, la protéine migrera à une vitesse qui dépend de sa charge nette, de sa taille et de sa forme. L'électrophorèse se faisant en conditions dénaturantes (en présence de SDS), les protéines dénaturées migrent alors en fonction de leur poids moléculaire. Il existe une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire et la mobilité d'une protéine. La migration de protéines témoins de masses moléculaires connues permet de déterminer celles des protéines étudiées.

4.2. Analyse des électrophorégrammes

4.2.1. Comparaison visuelle

C'est la méthode la plus employée pour l'interprétation des profils d'extraits protéiques bactériens. Mais elle devient d'usage difficile si le nombre de souches à analyser est élevé et les profils très hétérogènes.

4.2.2. Analyse par ordinateur

Dans le cas d'un grand nombre de souches, l'analyse par ordinateur est plus objective. Elle consiste à utiliser des programmes informatiques pour stocker les données, c'est-à-dire mémoriser les bandes, ceci par l'intermédiaire d'un densimètre (type Ultrosan Laser LKB 2202, programmes Gel-scan). La standardisation et la comparaison des données se font à l'aide d'un programme Gelcompar. La normalisation s'effectue par rapport, d'une part à une souche de référence, *Psychrobacter immobilis* (LMG 1125), dont le profil est constitué de bandes bien séparées, et d'autre part à des marqueurs protéiques de poids moléculaires connus. La similarité des bandes est calculée grâce au coefficient de corrélation de Pearson (r) converti en pourcentage. Le programme Gelcompar permet de présenter les résultats sous forme de dendrogramme

5. Analyse moléculaire de l'ADN génomique par PCR-RFLP

5.1. Amplification enzymatique de l'ADN par PCR :

(Polymérase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne)

La réplication in vitro d'un brin d'ADN est possible à partir d'amorces (oligomères de 10 à 25 bases possédant une extrémité 3'OH libre) et une enzyme (ADN polymérase).

La technique de la PCR (Saiki *et al.*, 1985 ; Mullis et Faloona, 1987) est classiquement réalisée à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante (la Taq DNA polymérase) isolée à l'origine d'une bactérie *Thermus aquaticus*. Elle consiste en la répétition de trois étapes thermiques réalisées successivement (étapes d'un cycle d'amplification) dont le choix des paramètres (temps et température) détermine l'efficacité de la réaction (fig.1). Cette enzyme a un optimum d'activité pour une température se situant entre 70°C et 80°C. Elle peut supporter des températures allant jusqu'à 96°C. La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier et utilisé comme matrice, les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences qui encadrent la cible à amplifier (qui s'hybrident avec les séquences situées aux extrémités 5' de la zone à amplifier), l'ADN polymérase et un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) nécessaire à la synthèse de nouveaux brins d'ADN.

- La dénaturation de l'ADN est réalisée par chauffage à 92-95°C, généralement pendant 1 à 2 minutes ou plus si le pourcentage en GC de l'ADN à amplifier est important.

- L'hybridation (annealing) des deux amorces oligonucléotidiques (primers) se fait à une température comprise entre 37°C et 55°C, pendant 30 secondes à 1 minute selon la concentration en amorces et la spécificité recherchée. La détermination de cette température est primordiale pour l'efficacité de la réaction : la règle générale est de choisir la température voisine de la température de dissociation des amorces (température à laquelle la moitié des molécules d'amorces est hybridée à l'ADN matrice). Ainsi, les amorces pourront se fixer sur les séquences totalement homologues.

- L'élongation (extension ou polymérisation) des brins d'ADN par une ADN polymérase s'effectue pendant un temps proportionnel à la longueur de l'ADN à amplifier. La température d'extension correspond à la température d'activité optimale de la polymérase (72°C). Les brins synthétisés doivent être ensuite séparés par dénaturation des brins parentaux pour initier le cycle suivant.

L'originalité en fait de la PCR est d'effectuer cette extension d'amorce en même temps sur les deux brins d'ADN et pour cela deux amorces sont choisies pour être chacune complémentaire d'un des deux brins d'ADN. Cette synthèse conduit à une duplication de la séquence matrice initiale. La spécificité et le rendement de l'amplification reposent sur la qualité de cette hybridation amorces/matrice. Les produits de l'amplification (brins néosynthétisés) vont à leur tour, après dénaturation, devenir des matrices.

5.2. Analyse par RFLP

L'unité ribosomique est constituée de séquences contenant des domaines conservés, répétée en tandem et séparée par une séquence inter-génique moins conservée, l'IGS (fig.2). Des mutations ponctuelles dans ces régions peuvent avoir pour effet l'apparition ou la disparition de sites de restriction.

L'approche PCR-RFLP conduit à comparer le polymorphisme des fragments de restriction d'une région choisie du génome préalablement amplifié par PCR et utilisé comme substrat d'enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui reconnaissent spécifiquement une séquence courte (4 à 8 bases) et coupent la chaîne d'ADN chaque fois qu'elles reconnaissent cette séquence élémentaire. L'ADN se retrouve ainsi fragmenté en morceaux de différentes longueurs séparées en fonction de leur taille par électrophorèse sur un support physique. Un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court. Un polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) est ainsi mis en évidence.

Les profils observés permettent l'analyse de la diversité des souches :

- Caractérisation d'un isolat-- d'une souche
- Estimation des divergences de séquences entre isolats/souches et donc l'établissement de leur proximité phylogénétique.

Cette méthode apparaît comme un outil convenable et rapide pour la différenciation et l'estimation des relations génétiques entre les espèces.

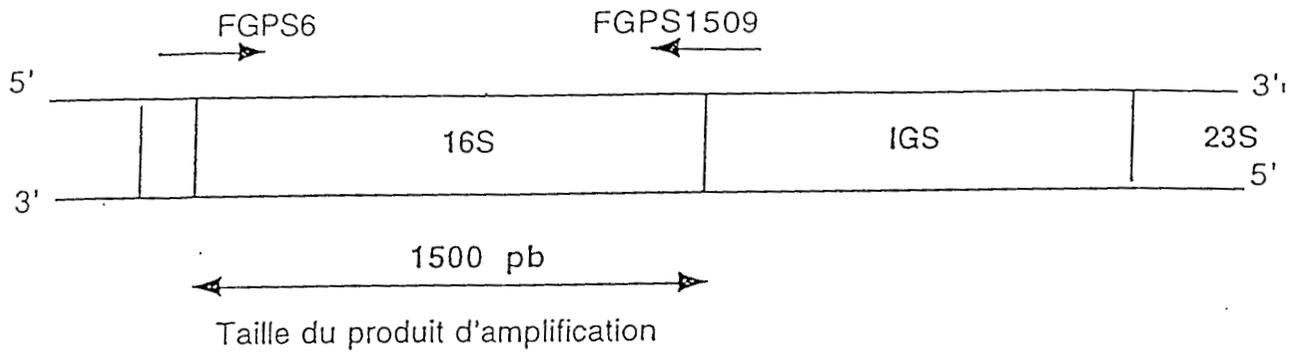


Figure 2: Représentation simplifiée de l'organisation nucléaire de la région 16S de la petite sous-unité ribosomale (rRNA). Les flèches indiquent approximativement la position des primers utilisés (FGPS6 et FGPS1509) de même que la taille du fragment.

5.2.1. Préparation des échantillons pour la PCR

5.2.1.1. Extraction de l'ADN génomique bactérien

Cette technique d'extraction d'ADN génomique comprend plusieurs étapes :

1. Culture de bactéries dans 5 ml de milieu YM, à 37°C pendant 48h
2. Centrifugation de la culture pendant 10 mn à 5000 tpm.
3. Lavage du culot 1 fois avec 5 ml de tampon Tris EDTA (TE, Tris 10 mM pH 8 et EDTA 1mM) : vortexer avant centrifugation 10 mn à 5000 tpm.
4. Resuspendre le culot dans un tube Eppendorf de 2 ml avec 500 µl de tampon TE contenant 1 mg/ml de lysosyme (Bioprobe), vortexer. La lysosyme détruit la paroi des cellules bactériennes.
5. Incuber à 37°C pendant 30 mn
6. Ajouter 30 µl d'un détergent (SDS à 10 %) + 10 µl de protéinase K (Merck) à 20 mg/ml d'H₂O déminéralisé.
7. Incubation une nuit à 37°C.
8. Ajouter 20 µl de SDS 10 % (solution opaque), agiter doucement par des inversions lentes pendant 5 mn.
9. Ajouter 130 µl de NaCl 5M, vortexer (obtention d'une émulsion : mousse).
10. Incuber 30 mn dans la glace, vortexer (obtention d'une émulsion)
11. Centrifugation 15 mn à 5000 tpm (culot = protéines, surnageant = ADN).
12. Récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf de 2 ml.
13. Ajouter 700 µl de phénol-Sevag (ph nol-chloroforme-alcool isoamylique 25V/24V/1V). Les protéines sont éliminées par ce traitement. Agiter doucement, (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn) et centrifuger 5 mn à 14000 tpm, à faire 2 fois.
14. Récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf de 2 ml.
15. Ajouter 700 µl de chloroforme-Sevag (chloroforme-alcool isoamylique : 24V/1V), agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn) et centrifuger 5 mn à 14000 tpm, à faire 2 fois.

16. Reprendre le surnageant dans 1/10ème de volume d'acétate de Na 700 μ l (3M, pH 5,2), l'ADN est alors précipité sélectivement. Ajouter 1 ml (ou 500 μ l) d'isopropanol pour ne pas précipiter les polysaccharides. Agiter doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn : Apparition d'une méduse (ADN).

17. Centrifugation 10 mn à 14000 tpm.

18. Laver le culot par 500 μ l éthanol 70 %, vortexer et centrifuger.

19. Sécher le culot d'ADN au Speed Vac pendant 5 à 10 mn.

20. Reprendre le culot dans 50 μ l de Tris (10 mM, pH 8) + 2,5 ml de RNase (Sigma) diluée (4mg/ml) pendant 2 h à 37°C (ADN débarrassé de l'ARN).

21. Ajouter 10 μ l d'acétate de Na 3M + 200 μ l d'éthanol absolu, agité doucement (plusieurs inversions lentes pendant 5 mn) : précipitation de l'ADN.

22. Centrifugation 10 mn à 14000 tpm.

23. Reprendre le culot avec 500 μ l d'éthanol 70 %.

24. Centrifugation 10 mn à 14000 tpm.

25. Sécher au Speed Vac pendant 5 à 10 mn.

26. Reprendre le culot dans 50 μ l de Tris 10 mM, pH 8.

27. Conserver l'ADN au congélateur à (-20°C)

28. Visualiser l'ADN extrait après électrophorèse sur gel d'agarose 1%

5.2.1.2. Cellules traitées sans extraction préalable de l'ADN

Les souches de Rhizobium sont repiquées dans des tubes ou boîtes de Pétri contenant du milieu TY ou YM gélosé. Après une incubation de 48 heures, le tapis bactérien est lavé à l'eau distillée stérile et la densité optique est mesurée. Un volume équivalant à 200 μ l pour une unité de DO 620 est centrifugé à 12000g pendant 2 minutes et le culot est lavé dans l'eau distillée stérile puis, resuspendu dans 100 μ l d'eau distillée stérile. À cette suspension cellulaire sont ajoutés, 100 μ l de Tris-Hcl (10mM, pH 8,3) et 20 μ l de protéinase K (1mg/ml dans l'eau milliQ stérile). Le mélange est incubé 2 heures à 55°C puis 10 minutes dans l'eau bouillante pour dénaturer la protéinase K. On centrifuge et l'on récupère le surnageant. Les tubes sont finalement stockés à -20°C.

5.2.1.3. Réaction d'amplification

Une région a été amplifiée dans cette étude :

- Le fragment du gène 16 S rRNA chez les souches bactériennes en utilisant les paires d'amorces (séquences conservées de l'ADNr16S) : la FGPS6 et la FGPS1509 (Normand, 1995) (fig.2)

Le tableau (1) donne les séquences des amorces utilisées ainsi que leur localisation au niveau de l'opéron ribosomal.

La méthode utilisée est décrite par Laguerre *et al.*, 1994.

La réaction de PCR est réalisée en utilisant un thermocycleur Perkin-Elmer 2400 (ou 9700) (Perkin-Elmer Corp. Norwalk, Conn.) dont les différents programmes sont donnés pour tous les fragments étudiés.

5.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

5.3.1. Préparation du gel

Selon la consistance du gel, l'agarose est pesée et mélangée à du tampon TAE ou TBE. Elle est fondue au four micro-ondes, refroidie jusqu'à environ 60°C. Le gèle ainsi obtenu est coloré au BET (Bromure d'Ethidium) et coulé dans une porte gel où un peigne a été soigneusement placé. Après polymérisation complète, le peigne est enlevé

5.3.2. Dépôt des amplifiats

Le gel ainsi solidifié est placé à l'intérieur d'une cuve d'électrophorèse et recouvert de tampon TBE 1X ou TAE 1X (voir annexe). Dans chaque puits, est déposé, quelques ml d'ADN (amplifiats) préalablement mélangés avec du tampon de charge (voir annexe) Un marqueur de taille moléculaire, le Smart (Eurogentec) (voir schéma) est déposé sur le gel pour vérifier la taille de l'ADN amplifié.

5.3.3. Migration de l'ADN et visualisation

La vérification de l'amplification des fragments d'ADN est réalisée par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1 % dans du tampon TAE à 120 volts durant 30 mn à 1 h de migration (le front de migration est identifié au bleu de charge situé à environ 2 cm de la partie inférieure du gel). Le marqueur 100 pb DNA (Promega) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire ; il permet d'observer des fragments allant jusqu'à 1500 paires de bases (pb).

Le gel est ensuite déposé sur une plaque de lumière ultraviolette et les fragments d'ADN amplifiés sont ainsi visualisés et ensuite photographiés. Le BET est le colorant le plus pratique pour détecter l'ADN dans les gels d'agarose, car il s'intercale entre les bases de l'ADN et le complexe ion e-ADN émet des radiations fluorescentes sous illumination par les UV. Les gels sont visualisés sous ultraviolet puis photographiés sur film Polaroid.

5.4. Etude du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP)

La digestion enzymatique ou RFLP de l'ADN amplifié des souches a été réalisée sur la région 16S rDNA. Cinq enzymes de restriction à 4 bases, CfoI (HhaI), MspI, RsaI, HinfI et NdeII (Parmacia, Boehringer Mannheim ou Gibco BRL) ont été utilisées pour la description du polymorphisme de taille du fragment amplifié. Chaque enzyme de restriction reconnaît des sites de clivage qui lui sont spécifiques.

La visualisation des fragments de restriction obtenus est effectuée dans les mêmes conditions que pour l'analyse des produits PCR. À cause de la petite taille des fragments de restriction générés, l'électrophorèse se fait sur un type d'agarose plus résolutif (agarose Métaphore Nusieve à 3%) dans du tampon TAE à 90 volts durant au moins 2 heures. Une coloration additionnelle de 20 minutes dans le BET avant la visualisation est souvent nécessaire.

Le marqueur VIII (Boehringer Mannheim) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire (voir schéma).

La réaction de digestion a été effectuée comme suit :

Mélange (1) :

-Tampon de l'enzyme 10X : 1,5 μ l .

-Enzyme 1 μ l

-H₂O filtré 5 μ l

Mélange réactionnel pour chaque souche (2) :

-Produit PCR 7,5 μ l

- Mélange (1) 7,5 μ l

La digestion s'est fait dans le mélange réactionnel (2) de 15 μ l plus une incubation au bain-marie à 37°C pendant au moins 2 heures. 15 μ l du mélange réactionnel + 5 μ l de bleu de charge ont été chargés dans les puits.

5.4.1. Analyse des Profils de restriction

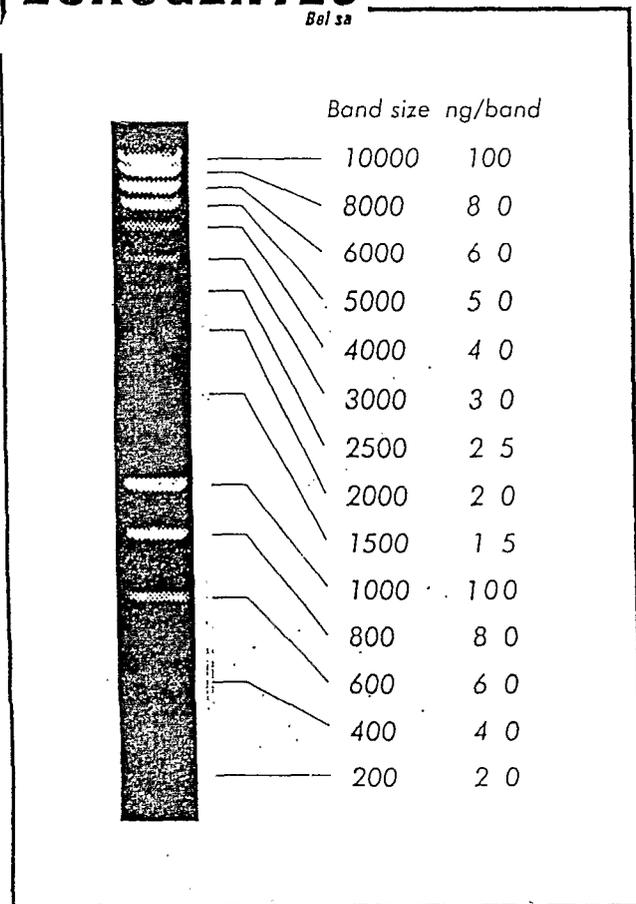
L'analyse des profils de restriction se fait par ordinateur avec le programme Gelcompar (cf.4.2.2). Les résultats seront présentés sous forme de dendrogramme.

Pour étudier le polymorphisme des fragments de restriction d'ADN des rhizobiums d'*Acacia nilotica*, nous avons comparé 33 souches d'*Acacia nilotica* (tableau 2) avec 24 souches de référence appartenant aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Azorhizobium* (tableau 3).

Tableau 1 : amorces choisies pour la réaction d'amplification des fragments 16SrRNA

<u>Amorces*</u>	<u>Séquences 5'3'</u>	<u>Localisation</u>	<u>Références</u>
FGP6	GGAGAGTTAAGATCTTGGCTC AG	I6SrRNA	Normand., 1995
FGPS1509	AAGGAGGGGATCCAGCCGCA	16SrRNA	Normand., 1995

*: Le nom de l'amorce tient compte de la position en 5' du premier nucléotide de l'amorce sur le gène cible.



SmartLadder
DATA SHEET

The SmartLadder is a ready-to-use molecular weight marker, specially designed for easy quantification as well as size determination. The SmartLadder is available in two sizes:

- 200 lanes (MW-1700-02)
- 1000 lanes (MW-1700-10).

Sizing: The SmartLadder produces a pattern of 14 regularly spaced bands, ranging from 200 to 10 000 bp. The 1000 and 10 000-bp bands have a higher intensity than the others to allow quick and easy identification. To make sizing as smart as possible, the size of each band is an exact multiple of 100 bp.

Quantification: Using a standard loading of 5 μ l, each band correspond to an exact quantity of DNA (see table on reverse side)

Storage: The SmartLadder can be stored at 4 °C for 6 months. Long term storage should be at -20 °C. Avoid multiple freeze-thaw cycles.

If you have questions about this or any other Eurogentec product, please contact us at:
EUROGENTEC Bel s.a. - Parc scientifique du Sart Tilman - 4102 Seraing - Belgium.
 Tel. +32 4 366 01 50 - Fax +32 4 365 51 03 - E-mail: info@eurogentec.be
 Visit our web page <http://www.eurogentec.be>

For research purposes only. Not for use in diagnostic procedures for clinical purposes. FOR IN VITRO USE ONLY.

DNA Molecular Weight Marker VIII (0.019-1.11kbp)

Cat. No. 1336 045

50 µg \triangleq 1 A₂₆₀ unit

Product description

Solution in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.

Concentration: 0.25 µg/µl.

Fragment mixture prepared by cleavage of pUCBM21 DNA with restriction endonucleases *Hpa* II and *Dra* I plus *Hind* III.

The mixture contains DNA-fragments with the following base pair lengths (1 base pair \triangleq 660 daltons): 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34 (2x), 26, 19 (determined by computer analysis of the pUCBM21 sequence).

After gel electrophoresis of 1 µg of the fragment mixture in a 2% Agarose MP* gel 13 bands are visible. The 501 bp and 489 bp fragments as well as the fragments 37-19 bp run as one band.

Typical analysis: The DNA fragment mixture shows the typical pattern with 13 bands in agarose gel electrophoresis.

Stability: stable at -20 °C.

Storage: This product is shipped on dry ice and should be stored at -20 °C until use. Once thawed we recommend further storage at 4 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided.

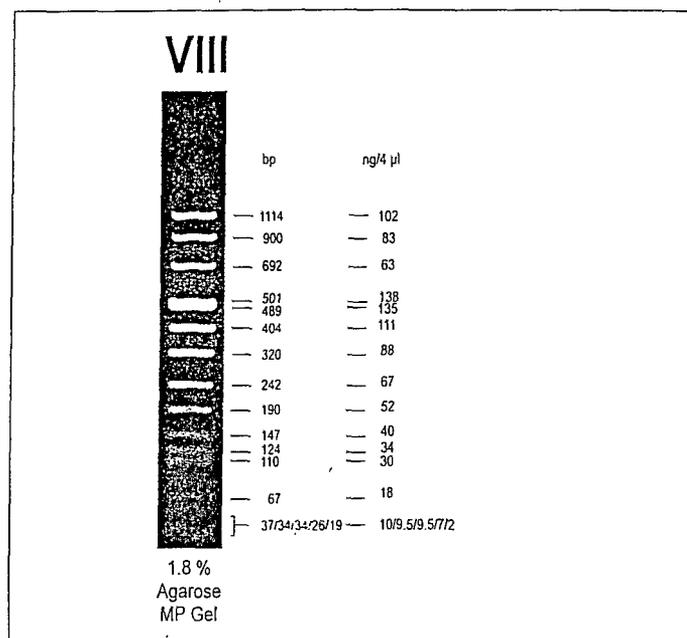


Fig.: Separation of 1 µg DNA molecular weight marker VIII on a 1.8% Agarose MP gel. Ethidiumbromide stain

* available from Boehringer Mannheim GmbH (Cat. Nos. 1444 964, 1388 983, 1388 991)

Tableau 2 : Liste des souches de rhizobiums d'*Acacia nilotica* utilisées dans ce travail

Souches	Code STM	Croissance sur YMA	Plante d'isolement	Origine géographique
ORS 3156	STM 534	Rapide	Acacia nilotica var. Tomentosa	Fann
ORS 3157	STM 535	Rapide	A. nilotica tomentosa	Cascas
ORS 3158	STM 536	Rapide	A. nilotica adansonii	Diarra
ORS 3159	STM 537	Rapide	Adansonii	Matam
ORS 3160	STM 538	Rapide	Tomentosa	Fann
ORS 3161	STM 539	Rapide	Tomentosa	Goumel Niandane (Podor)
ORS 3162	STM 540	Rapide	Tomentosa	Cascas
ORS 3163	STM 541	Rapide	Adansonii	Dahra
ORS 3164	STM 542	Rapide	Adansonii	Dagana
ORS 3165	STM 543	Rapide	Adansonii	Goumel Niandane (Podor)
ORS 3166	STM 544	Rapide	Tomentosa	-
ORS 3167	STM 545	Rapide	Tomentosa	Diarra
	STM 546	Rapide	Tomentosa	Fann
ORS 3168	STM 547	Rapide	Tomentosa	Cascas
ORS 3169	STM 548	Rapide	Adansonii	Cascas
ORS 3170	STM 549	Rapide	Adansonii	Matam
ORS 3171	STM 550	Rapide	Adansonii	Dagana
ORS 3172	STM 551	Rapide	Adansonii	Goumel Niandane (Podor)
ORS 3173	STM 552	Rapide	Adansonii	Diarra
ORS 3174	STM 553	Rapide	Adansonii	Dagana
ORS 3175	STM 554	Rapide	Adansonii	Goumel Niandane (Podor)
ORS 3176	STM 555	Rapide	Adansonii	Dagana
ORS 3177	STM 556	Rapide	Adansonii	Goumel Niandane (Podor)
ORS 3178	STM 557	Rapide	Adansonii	Diarra
ORS 3179	STM 558	Rapide	Adansonii	Kébémér
ORS 3180	STM 559	Rapide	Adansonii	Diarra
ORS 3181	STM 560	Rapide	Adansonii	Diarra
ORS 3182	STM 561	Rapide	Adansonii	Fann
ORS 3183	STM 562	Rapide	Adansonii	Diarra
ORS 3184	STM 563	Rapide	Adansonii	Diarra
ORS 3185	STM 564	Rapide	Adansonii	-
ORS 3186	STM 565	Rapide	Adansonii	Goumel Niandane (Podor)
ORS 3187	STM 566	Rapide	Adansonii	Diarra
ORS 3188	STM 570	Rapide	Adansonii	Dagana

Tableau 3 : Nomenclature et origine des souches de référence utilisées dans ce travail

Souches	Code LMG	Plante D'isolement	Origine Géographique
Bradyrhizobium sp.			
ORS 188	LMG10727	<i>Acacia albida</i> -	Sénégal-
ORS 1782	-	-	-
ORS 1785	-	-	-
Sinorhizobium saheli			
ORS 611	LMG 8310 ^T	<i>Sesbania grandiflora</i>	Sénégal
ORS 609 ^T	LMG 7837 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Sénégal
Sinorhizobium Terangae			
ORS 10009 ^T biovar acacieae	LMG 7834 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Sénégal
ORS 51 biovar sesbanieae	LMG 7843	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal
Sinorhizobium meliloti			
ORS 665 ^T	-		
ORS 634	-		
Rhizobium galegae			
ORS 668 ^T	-		
ORS 103	-		
Rhizobium giardinii			
STM 234	-		
Rhizobium tropici			
ORS 651	-		
ORS 102	-		
Rhizobium léguminosarum			
ORS 662	-		
ORS 661	-		
Mesorhizobium loti			
ORS 1753	-		
ORS 664 ^T	-		

Mesorhizobium huakuii			
ORS 1752	-		
Mesorhizobium plurifarum			
ORS 1001	LMG 7836	<i>Acacia sénégál</i>	Sénégal
ORS 1032 ^T	-	<i>Acacia Sénégál</i>	Sénégal
Azorhizobium undicola			
ORS 992 ^T	-		
ORS 995	-		

III. Résultats

1. Constitution d'une collection de souches de rhizobiums d'*Acacia nilotica*

Une collection de 33 souches a été constituée à partir d'isolats des nodules de racines de deux variétés d'*Acacia nilotica*, *A. nilotica* var. *tomentosa* et *A. nilotica* var. *adansonii* (tableau 2). Les nodules ont été obtenus à partir de piégeages sur des sols prélevés à différents endroits des aires de répartition des deux *Acacia nilotica* (tableau 2).

Un premier criblage fait sur la base de la vitesse de croissance des souches sur milieu yeast-extract mannitol agar (YMA) en boîtes de Petri a montré que toutes les souches testées d'*Acacia niloticae* sont des souches à croissance rapide (tableau 2).

2. Spécificité d'hôtes

La capacité des souches à induire la nodulation d'*Acacia nilotica* a été étudiée. Les deux variétés *A. nilotica* var. *tomentosa* et *A. nilotica* var. *adansonii* ont été testées. Le tableau (4) montre que les souches de *nilotica* forment des nodules (figure 3) sur les racines de presque toutes les deux variétés sauf la souche ORS 3169 sur *tomentosa* et ORS 3160 sur *adansonii*. Les nodules formés sont la plupart effectifs sur *tomentosa* par contre, ceux qui sont formés sur *adansonii* sont presque tous partiellement effectifs. À l'exception de quelques rares souches de référence, les deux variétés semblent répondre de manière identique à l'inoculation des souches de référence. Les souches 3172, 3174 ainsi que la souche de référence ORS 1001 sont très effectives (TE) sur *tomentosa*. Les souches ORS 3159, 3165 3188 et la souche de référence 1001 sont effectives (E) sur *adansonii*. Nous les recommandons pour l'inoculation des pépinières forestières.

3. Analyse des protéines totales (SDS-PAGE)

Les extraits protéiques des souches d'*A. nilotica* ont été obtenus et envoyés au laboratoire de microbiologie de Gand-Belgique pour analyse. Des souches de référence seront incluses dans ce travail pour comparaison ; elles représentant les différentes espèces de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, et *Mesorhizobium*.

Les résultats des analyses ne sont pas encore disponibles.

4. Amplification du gène 16SrRNA

Cette étude a été menée sur un ensemble de 57 isolats (33 souches d'*A. nilotica* et 24 souches de référence).

Nous avons réalisé les réactions d'amplification en appliquant les cycles de température suivants :

Un premier cycle a consisté à dénaturer l'ADN à 94°C pendant 5 min, puis une série de 35 cycles a été appliquée, chaque cycle se déroulant comme suit :

une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces (annealing) à 55°C pendant 30 secondes, une phase d'extension ou polymérisation avec une température de 72°C pendant 1 minute et 30 secondes. La polymérisation est achevée avec un dernier cycle de 72°C pendant 7 minutes

Pour chaque électrophorèse, un marqueur de poids moléculaire (Smart) a été déposé pour vérifier la taille de l'ADN amplifié.

Dans les puits du gel d'agarose à 1 %, nous avons chargé : 5µl d'amplifiat + 3µl de bleu de charge et 5µl de marqueur de PM (Smart)+3µl de bleu. La tension appliquée a été de 120 volts et la migration, 30mn à 1 heure.

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S a donné une bande unique de taille approximative 1500 pb qui correspond bien à la taille attendue de l'ADNr 16S parmi les bactéries (Weisburg *et al.*, 1991)(voir figure 4)

4. Analyse du polymorphisme des fragments de restriction du 16S

Pafetti *et al.*(1996) ont montré que l'on pouvait utiliser le polymorphisme du gène 16SrRNA obtenu par PCR-RFLP pour séparer, identifier les isolats de rhizobia suivant leur espèce génomique

Les profils de restriction de la plus grande partie des souches ont été effectués. Les figures (707 et 787) montrent deux exemples de profils de restriction de la région de l'ADNr16S amplifiée digérée avec des enzymes de restriction MspI et NdeII.

Les fragments de restriction des isolats étudiés et des souches de références seront comparés deux à deux pour la présence ou l'absence d'un fragment. L'analyse des profils de restriction sera effectuée au laboratoire de microbiologie de Gand-Belgique en adoptant le programme Gelcompar

Tableau 4 : Nodulation et effectivité de souches de rhizobium et de référence sur les racines de deux variétés d'*Acacia nilotica*

Souches testées	<i>Acacia nilotica</i>	
	var. <i>tomentosa</i>	var. <i>adansonii</i>
Rhizobium sp.		
ORS 3156	e	e
ORS 3157	NT	e
ORS 3158	E	e
ORS 3159	E	E
ORS 3160	e	o
ORS 3161	E	e
ORS 3162	e	e
ORS 3163	NT	o
ORS 3164	e	NT
ORS 3165	E	E
ORS 3166	e	e
ORS 3167	E	e
ORS 3189	NT	NT
ORS 3168	e	e
ORS 3169	o	e
ORS 3170	e	e
ORS 3171	NT	NT
ORS 3172	TE	e
ORS 3173	e	e
ORS 3174	TE	e
ORS 3175	E	e
ORS 3176	E	e
ORS 3177	E	e
ORS 3178	E	e
ORS 3179	E	e
ORS 3180	E	e
ORS 3181	E	e
ORS 3182	E	e
ORS 3183	E	e
ORS 3184	e	e
ORS 3185	E	e
ORS 3186	e	NT
ORS 3187	e	e
ORS 3188	E	E
ORS 2452	e	NT
Souches de référence		
ORS 1001	TE	E

ORS 611	E	o
ORS 609	o	o
ORS 132	E	NT
ORS 634	e	o
ORS 51	o	e
ORS 1032	e	e
ORS 995	E	o
ORS 1009	o	o
ORS 103	o	o
ORS 604	E	e
ORS 668	o	o
ORS 651	e	e
ORS 992	E	e
ORS 1752	o	o
ORS 2738	o	o
ORS 662	o	o
ORS 665	e	e

TE: nodulation très effective; E: nodulation effective; e: nodulation peu effective; 0; pas de nodulation; NT; non testé(à revoir).



FIGURE 3 : Nodule d'Acacia Nilotica

M*

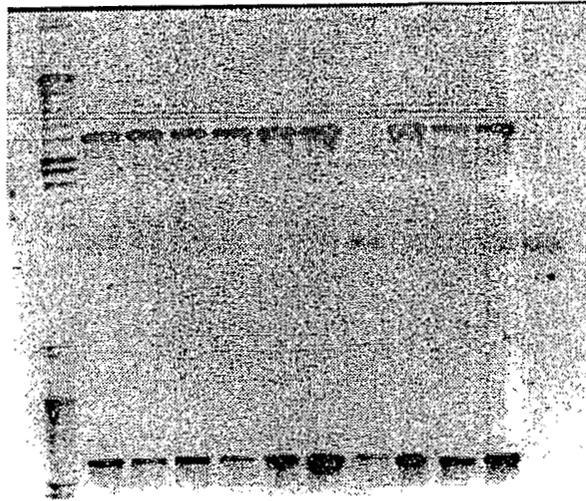


Fig 4. Profils d'amplication du 16S rDNA de souches d'*Acacia nilotica*
M* : marqueur

Figure 707: Profil de restriction du gène 16S rRNA chez les souches d'*Acacia nilotica*

M 545 554 557 559 560 M 561 564 565 566 M

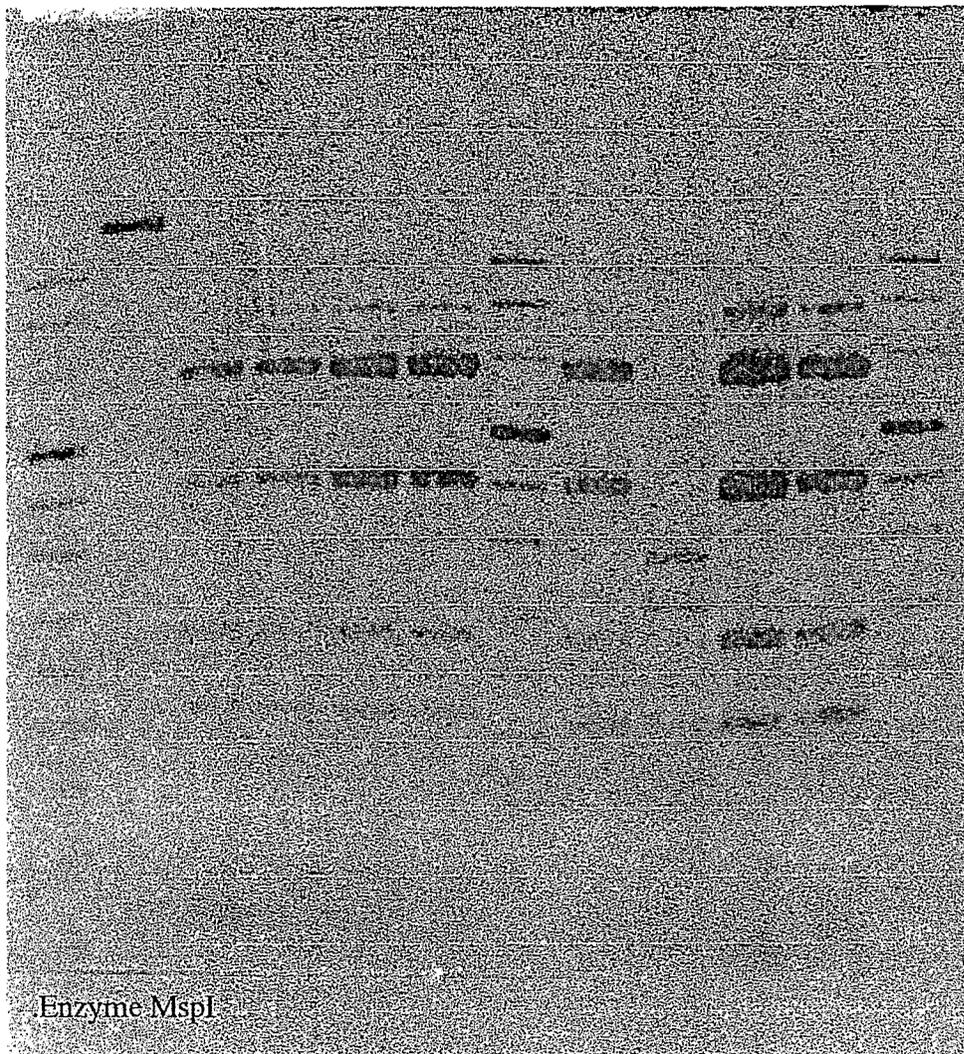
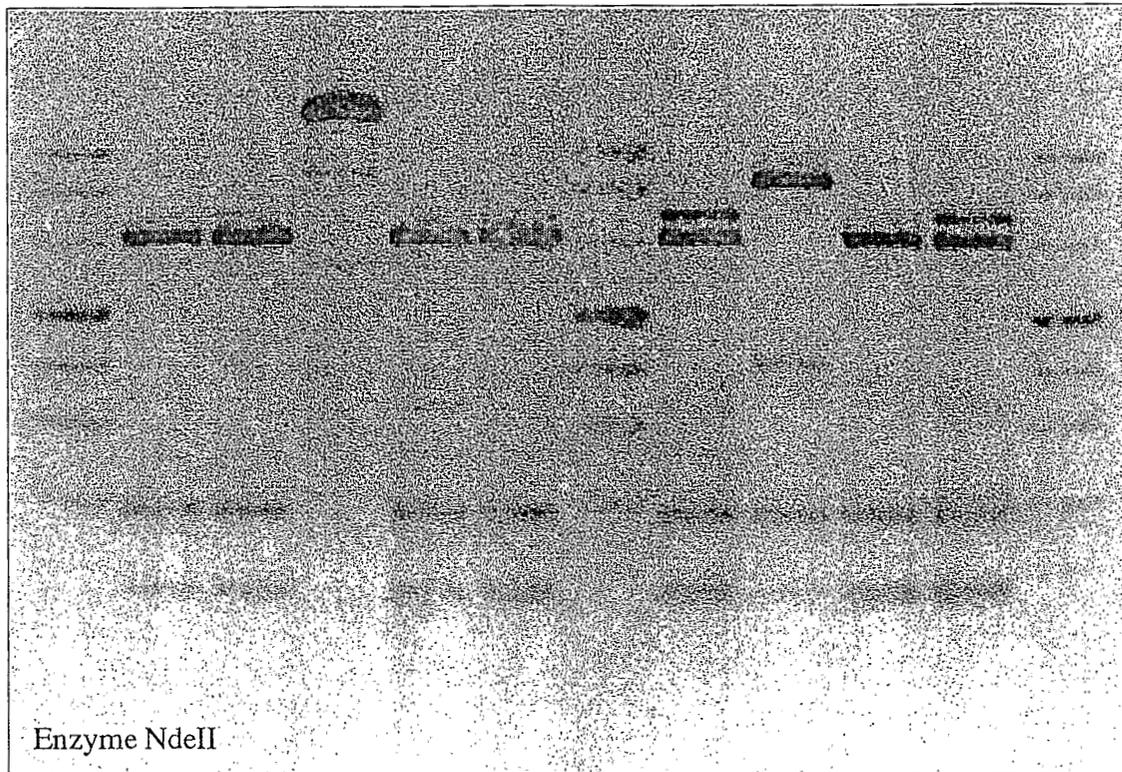


Fig. 787 : Comparaison des profils de restriction du gène 16S rRNA chez les souches d'*Acacia nilotica*.

M 545 554 557 559 560 M 561 564 565 566 M



IV. Conclusion et perspectives

Nous avons pu entreprendre un travail important d'identification des isolats de rhizobium nodulant *Acacia nilotica* par des études de spécificité d'hôtes de caractérisation phénotypique par SDS-PAGE (analyse des protéines bactériennes) et génotypique par PCR-RFLP (étude du polymorphisme de l'ADNr 16S).

Tous les isolats ont été authentifiés pour leur aptitude à la nodulation dans des conditions contrôlées.

Nous avons montré sur la base de la vitesse de croissance que toutes les souches d'*Acacia nilotica* sont des rhizobiums à croissance rapide. Notre étude a aussi permis de montrer que les deux variétés, *A. nilotica* var. *tomentosa* et var. *adansonii* sont infectées par presque les mêmes souches de rhizobiums, mais les nodules formés avec la variété *tomentosa* sont beaucoup plus effectifs.

Il semble que l'exploitation des premières données sur la caractérisation phénotypique et génotypique ait donné des résultats intéressants.

Cependant, pour que ces résultats soient complets, il est nécessaire que certaines analyses soient poursuivies et approfondies en reprenant et en affinant certaines techniques déjà utilisées. L'interprétation de tous les résultats d'analyses numériques par ordinateurs fondés sur ces différentes études permettra alors de montrer s'il existe réellement une diversité génétique au sein des populations locales de rhizobiums nodulant *Acacia nilotica*.

Dans la perspective d'avoir une vision globale de la diversité des populations locales, de la position taxonomique des rhizobiums et de leurs relations phylogénétiques, il apparaît indispensable de renforcer notre collection de souches de *nilotica* et de conforter les résultats obtenus en utilisant différentes autres approches moléculaires (séquençage de l'ARNr16S, hybridation ADN-ADN)

En outre, la relation groupe d'isolats-spécificité pour la plante hôte et origine géographique (environnement) serait à considérer. Elle apparaît déterminante dans tout processus d'exploitation de la fixation biologique de l'azote à des fins pratiques.

V. Références bibliographiques

Kiredjan, M., Holmes, B., Kersters, K., Guilvout, J. and de Ley, J. 1986. *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. *Int. J. Syst. Bact.* 36 : 282-287.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage-T4. *Nature (London)* 227 : 680-685.

Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F. and Amarger, N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction Fragment Polymorphism analysis of PCR) amplified 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 56-63.

Normand, P. 1995. Utilisation des séquences 16S pour le positionnement phylgénétique d'un organisme inconnu. *Oceanis* . Vol. 21. pp 31-56.

Mullis, K.B. and Faloona, F. 1987. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro:the polymerase chain reaction *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biologie* 51,263-273.

Pafetti, D., Scotti, C., Gnocchi, S., Fancelli, S. and Bazzicalupo, M. 1996 Genetic diversity of an italian *Rhizobium* population from different *Medicago sativa* varieties. *Appl. Environment. Microbiol.* 62 : 2279-2285.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlith, H. A. and Aruhein, N. 1985. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350-1354.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 43 : 305-313.

Annexes

Annexe 1 : Contrôle de la présence d'ADN après extraction

a) Préparation du gel de contrôle

<u>Grand gel</u>		<u>Petit gel</u>
Gel d'agarose	1%	1%
Agarose	type II	type II
TAE (1 X)*	120 ml	75 ml
BET a	2 gouttes	1 goutte

* Généralement le TAE disponible est à 50 X. Prendre donc 20 ml de TAE 50 x pour 1 litre d'eau ultra pure pour avoir TAE 1 X.

** Le BET est à ajouter après avoir fondu l'agarose au four micro-onde 2 à 3 mn

b) mode opératoire

- Migration : 30 mn à 1 h, 120 mvolt
- Mélange à déposer sur le gel : 1 ml d'ADN + 4 ml H₂O + 3 ml de bleu de charge + 5 ml de marqueur de poids moléculaire Smart.

Annexe 2 : tampon d'électrophorèse

TAE : Tris-Acétate-EDTA (TAE à 50X)

Tris-Base	242g
Acide acétique glacial	(57,1ml)
EDTA	100ml (0,5 M, pH 8,0)
H ₂ O	QSP 1000ml
Temps de stérilisation	20mn à 120°C

TBE : Tris-Borate-EDTA (TBE à 10X)

Tris-Base	108g
Acide borique	55g
EDTA	40ml (0,5M, pH 8,0)

EDTA à 0,5M, pH 8,0 : dissoudre 93,075g de EDTA dans 300 ml d'H₂O, ajuster le pH à 8 avec des cristaux de soude, ajuster le volume d'eau jusqu'à 500 ml et filtrer la solution (0,2 µm)

Annexe : liste et composition des solutions et tampons utilisés

Tampons et solutions utilisées :

- Acétate de sodium 3M pH 5,2 :

Acétate de sodium	102 g
Eau déminéralisée	200 ml

Ajuster le pH avec à 5,2 avec de l'acide acétique glacial, puis ajuster le volume à 250 ml et autoclaver.

- Amorces
 - * Dilution de 300 pmol à 20 pmol :

Amorce (à 300 pmol)	10 µl
Eau stérile	140 µl

 - * Dilution de 20 pmol à 3.2 pmol

Amorce (à 20 pmol)	8 µl
Eau stérile	42 µl

- BET (Bromure d'éthidium) :

BET concentré (0,625 mg/ml)	312 µl
Eau stérile	4,688 ml

- Chlorure de sodium 5 M :

NaCl	292,2 g
Eau déminéralisée	800 ml

Chauffer légèrement la solution pour faciliter la dissolution. Ajuster la volume à 1 litre et autoclaver.

- dNTP 2.5mM

dATP (100mM)	10 µl
dCTP (100mM)	10 µl
dGTP (100mM)	10 µl
dTTP (100mM)	10 µl
Eau stérile	360 µl

- EDTA 0.5M, pH8 (solution mère) :

EDTA	93.075 g
Eau déminéralisée	300 ml

Ajuster avec l'eau jusqu'à 500 ml. Le pH est ajusté à 8 avec des cristaux de soude NaOH, puis la solution est filtrée (0.2 µm) et stérilisée 20 min à 120°C.

◦ Phénol-Sevag :

Phénol

25 V (40 ml)

Sévag

25 V (40 ml)

◦ RNase 0.4 mg/ml :

Ribonucléase (34 mg/ml)

2.35 µl

Eau q.s.p.

200 ml

◦ Sevag ou chloroforme-sevag :

Chloroforme

24 V (192 ml)

Isoamylalcool

1 V (8 ml)

◦ TAE 50X (solution mère) :

Tris Base

242 g

Acide acétique glacial

57.1 ml

EDTA (0.5M, pH 8)

100 ml

Ajuster à 1 litre avec de l'eau déminéralisée en chauffant pour dissoudre.

Pour du TAE 1X : 20 ml de TAE 50X / litre d'eau déminéralisée.

◦ TAE 50X modifié (solution mère)

Mêmes ingrédients que pour le TAE 50X, mais seulement 10 ml d'EDTA 0,5M, pH8 sont ajoutés (au lieu de 100 ml).

◦ TE (tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM) :

Tris base

121,1 g

EDTA 0,5 M, pH 8

40 ml

Eau déminéralisée

800 ml

Ajuster le pH à 8 avec HCl.

◦ Tris-HCl pH 8 :

Tris base

121,1 g

Eau déminéralisée

800 ml

Préparation des marqueurs de taille (1kb, 100pb, ...):

10 μ l de ladder (1kb, 100pb, ...)
40 μ l de bleu de charge
50 μ l d'eau stérile

Composition du bleu de charge 10 X:

à utiliser au 1/10^{ème}

0,25% (pds/vol) de bleu de bromophénol
30% de glycérol
10 mM d'EDTA

TAE 50 X:

Tris-base	242,2 g
Na ₂ EDTA, 2 H ₂ O	18,51 g
Acide acétique glacial	57,1 ml
H ₂ O	qsp 1 litre

TBE 10 X:

Tris-base	108 g
Na ₂ EDTA, 2 H ₂ O	7,44 g
Acide borique	55 g
H ₂ O	qsp 1 litre

Solution de BET à 10 mg/ml:

à protéger de la lumière, conserver à 4°C
manipuler impérativement avec des gants

TE buffer, pH 8, 10 X:

Tris-HCl	100 mM	12,11 g
EDTA	10 mM	2,92 g
H ₂ O	qsp 1 litre	
ajuster à pH 8		

Milieux de croissance utilisés :

◦ Milieu liquide YM (Yeast Mannitol) :

Mannitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Glutamate de Na	0.5 g
NaCl	0.05 g
Solution T (MgSO ₄ .7H ₂ O à 10 g/l)	10 ml
Solution U (CaCl ₂ à 40 g/l)	1.0 ml
Solution V (FeCl ₃ .6H ₂ O à 4 g/l)	1.0 ml
Extrait de levure	1.0 g
H ₂ O distillée q.s.p.	1000.0 ml

Le pH est ajusté à 6.8. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

◦ Milieu gélosé YMA (Yeast Mannitol Agar) :

S'obtient par addition de 20 g d'agar (20 g/l) au milieu YM précédent (1 litre), puis stérilisation 20 minutes à 120°C.

Gels d'agarose :

◦ Petit gel

Agar	0,75 g
TAE (1X)	75 ml

◦ Moyen gel

Agar	1,25 g
TAE (1X)	125 ml

Faire chauffer l'agar dans le tampon au micro onde pour le dissoudre, puis ajouter une goutte de BET (3,75 µl) pour le petit gel, 2 gouttes pour le moyen gel.

COMPOSITION DES MILIEUX ET SOLUTIONSMilieu Jensen

K_2HPO_4	0,2 g
$MgSO_4 \cdot (7H_2O)$	0,2 g
NaCl	0,2 g
$CaHPO_4$	1 g
$FeCl_3 \cdot (6H_2O)$	0,14 g
H_3BO_3	2,86 g
$MnSO_4 \cdot (4H_2O)$	2,03 mg
$Zn SO_4 \cdot (7H_2O)$	0,22 mg
$CuSO_4 \cdot (5H_2O)$	0,08 mg
$Na_2MoO_4 \cdot (H_2O)$	0,09 mg
Agar	20 g

Ajuster le pH à 6.7 et stériliser 20 min à 120°C

Milieu Yeast extract-Mannitol Agar (YMA)

Mannitol	10 g
K_2HPO_2	0,5 g
Glutamate de sodium	0,5 g
NaCl (1ml de solution à 50 mg/ml)	0,05 g
Solution T ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10g/l)	10 ml
Solution U ($CaCl_2$, 40g/l)	1 ml
Solution V ($FeCl_3$, 4g/l)	1 ml
Extrait de Levure (Difco)	1 g
H_2O	qsp 1000 ml
Agar (Difco)	20 g

Ajuster le pH à 6,8 et stériliser 20 min à 120°C

Tampons Phosphates

-Tampon 0,01M pH 7 :

(a) 0,2 M KH_2PO_4	27,218 g
(b) 0,2 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	71,63 g
H_2O	qsp 1000 ml

~~Tampon 0,1 M - 195 ml (a) + 305 ml (b) + 500 ml d'eau distillée~~

Milieu TY tamponné

Tryptone Oxoid	5 g
Yeast Extract Oxoid	0,75 g
KH_2PO_4	40,45 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,388 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (13,4g/100ml)	5 ml
Agar LabM	25 g
H_2O	qsp 1000 ml

Tampon NaPBS

0,2 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	40,5 ml
0,2 M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	9,5 ml
NaCl	8 g
H_2O	qsp 1000 ml

Ajuster le pH à 7.3

Tampon STB

Tris-HCl (0,062M)	0,75 g
-------------------	--------