

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en
Contrôle de Qualité et Analyse

Thème

*Etude de la croissance et de la production
d'exopolysaccharides chez des bactéries
isolées dans la rhizosphère du blé dur
« *Triticum durum L.* »*

Présenté par :

- * M^{elle} MOUHOUBI KATIA.
- * M^{elle} TARAHI SALOUA.

Membres de jury :

- * **Président** : Mr BOUKHALEFA F.
- * **Promotrice** : M^{me} FELLA-TEMZI S.
- * **Examinatrices** : M^{elle} BRAHMI F.
et M^{me} SMAIL L.

Promotion : 2012/2013

Liste des abréviations

CPS : les polysaccharides capsulaires.

DO : densité optique.

DRB : deleterious rhizobactéria (Délétères rhizobacteries).

EPS: Extra Polymeric Substances (Exopolysacharrides).

Gal NAc : N-acetylgalactosamine.

GN : Gélose Nutritive.

Glc A : acide glucuronique.

Glc NAc : N-acétylglucosamine.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria (rhizobacteries prooteurs de la croissance végétale).

UndP: undecaprenyldiphosphate.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma générale de la rhizosphère d'une plante.....	3
Figure 2: Biosynthèse de xanthane	9
Figure 3 : Structure chimique du levane.....	10
Figure 4 : Structure chimique de xanthane.....	10
Figure 5 : Structure chimique du dextrane.....	11
Figure 6 : Aspect des EPS bactériens après précipitation à l'éthanol.....	19
Figure 7: Schéma représentatif de la technique de lyophilisation.....	22
Figure 8 : Morphologie des colonies des bactéries productrices des exopolysaccharides.....	24
Figure 9: Croissance cellulaire des trois souches cultivées sur le milieu RCV-saccharose après 48h d'incubation à 30°C.....	27
Figure 10 : Production des exopolysaccharides des trois souches après 48h d'incubation à 30°C sur le milieu RCV-saccharose.....	27
Figure 11 : Résultats de la productivité obtenus sur le milieu RCV-saccharose	28
Figure 12 : Effet du pH sur la croissance cellulaire des trois souches après 48h d'incubation à 30°C.....	30
Figure 13 : Effet du pH sur la production des exopolysaccharides des trois souches après 48h d'incubation à 30°C.....	30
Figure 14 : Résultats de la productivité des trois souches en fonction du pH.....	31
Figure 15 : Effet du NaCl sur la croissance cellulaire des trois souches après 48h d'incubation à 30°C.....	32
Figure 16 : Effet du NaCl sur la production des exopolysaccharides des trois souches après 48h d'incubation à 30°C.....	33
Figure 17 : Résultats de la productivité des trois souches en fonction du NaCl.....	33

Liste des tableaux

Tableau I : Sites des prélèvements des souches étudiées.....	16
Tableau II : Caractères cellulaires des souches bactériennes et leur croissance en milieu liquide.....	23
Tableau II : Caractères culturelles des souches bactériennes	25
Tableau IV : Effet de la nature des substrats carbonés sur les souches productrices d'EPS	29

Sommaire

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction 1

Étude bibliographique

1. Rhizosphère	3
1.1. Rhizodéposition.....	4
2. Effet des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance de la plante	4
2.1 Rhizobactéries	5
3. Polysaccharides bactériens.....	6
3.1. Exopolysaccharides	6
3.1.1. Classification des exopolysaccharides	7
3.1.1.1. Sur le plan structure.....	7
3.1.1.2. Sur le plan composition.....	7
3.1.2. Voie de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires	8
4. Quelques exemples des polysaccharides extracellulaires	9
5. Propriétés des exopolysaccharides	11
5.1. Rôle des exopolysaccharides.....	11
5.2. Domaines d'application des exopolysaccharides.....	13
5.2.1. Cosmétique.....	13
5.2.2. Diagnostique microbiologique	13
5.2.3. Domaine médical	13
5.2.4. Applications agro-alimentaires	14
5.2.5. Domaine de l'environnement	15

Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes	16
2. Revivification des bactéries productrices d'EPS	16
3. Purification des bactéries productrices d'EPS	17
4. Etude des caractères morphologiques	17
5. Comparaison des niveaux de production des exopolysaccharides.....	17
6. Etude de l'influence de quelques facteurs du milieu sur la croissance des bactéries productrices d'exopolysaccharide	18
6.1. Effet des substrats carbonés	18
6.2. Effet du pH	18
6.3. Effet du Na Cl	18
7. Extraction des exopolysaccharides	19
8. Dosage des EPS par la méthode colorimétrique à l'anthrone	19
9. Mesure de la croissance bactérienne (dosage des protéines)	20
10. Lyophilisation	21
10.1. Technique de la lyophilisation.....	22

Résultats et discussion

1. Etude des caractères morphologiques	24
2. Comparaison des niveaux de production des exopolysaccharides.....	27
3. Etude de l'influence de quelques facteurs du milieu sur la croissance des bactéries productrices d'exopolysaccharide	29
3.1. Effet des substrats carbonés	29
3.2. Effet du pH	30
3.3. Effet du NaCl	33

Conclusion

Références bibliographiques.

Annexes.

La rhizosphère, zone du sol très riche en nutriments entourant la racine, revêt un attrait particulier du fait de sa grande diversité taxonomique et fonctionnelle. Cette diversité a un impact considérable sur la croissance et le rendement des plantes ; ainsi, la dynamique microbienne de la rhizosphère est fortement influencée par la présence des racines, de ses exsudats et les fonctions exercés par ces effets microbiens ont été modelées par cette niche particulière (Berge, 2011).

Les bactéries colonisatrices de la rhizosphère ayant un effet bénéfique sur la plante sont appelées rhizobactéries. Ce sont des bactéries qui ont vraisemblablement Co-évoluées avec les légumineuses. Elles produisent souvent des polysaccharides de surface, appelés polysaccharides exocellulaires ou encore exopolysaccharides (EPS), sont définis comme étant des polymères extracellulaires d'origine biologique, participant à la formation d'agrégats microbiens (Garrido *et al.*, 2002).

Les propriétés de cette couche hydrophile secrétée autour des bactéries, semblent importantes pour leur survie en milieu naturel. Les EPS influencent la manière dont les bactéries interagissent avec le milieu extérieur, qu'il soit liquide ou solide. Il occupe une place importante dans l'adaptation de la bactérie aux conditions physico-chimiques d'un environnement (Roger, 2002).

Grâce à leur charge, certains EPS, peuvent fixer des molécules nutritives et des ions présents dans leur entourage immédiat, permettant ainsi de les transférer aux bactéries, ou alors de les garder en réserve. En dehors de son intervention dans l'adhésion, l'EPS occupe une place importante dans la protection contre un grand nombre d'agressions que peuvent subir les bactéries en conditions naturelles, en évitant la dessiccation, la prédation, l'action des antibiotiques, ainsi que l'effet des toxines, des poisons et la reconnaissance par les anticorps (Geesey et Jang, 1991).

Ils sont étudiés et sélectionnés pour leurs applications possibles dans les domaines de l'environnement, de l'industrie alimentaire, de la cosmétique, de la médecine et de la pharmacologie (Garrido *et al.*, 2002).

Dans ce travail nous avons jugé intéressant d'étudier :

- ✓ Les caractères morphologiques des différentes souches isolées à partir de différents sols.

- ✓ L'influence de quelques facteurs du milieu de culture (substrats carbonés, pH et Na Cl) sur la croissance des bactéries et la production des EPS.

1. La rhizosphère :

Le terme rhizosphère a été introduit en 1994 par Lorenz Hiltner, « rhizo » vient du grec « rhiza » signifiant racine et « sphère » est le champ d'action ou d'influence. Hiltner a décrit la rhizosphère comme étant l'étroite partie du sol, lieu d'une intense activité microbienne autour des racines des légumineuses. Elle correspond non seulement à l'étroite zone (1-2 mm) à proximité immédiate de la surface racinaire, mais aussi à la région de quelques centimètres de la racine, où ont lieu les échanges d'eau et de nutriments (Chenu C., 1993).

La rhizosphère est le lieu, en outre, d'activités microbiologiques et biochimiques intenses en raison de la microflore par flux de carbone exsudé par les racines elles-mêmes sont capables de mobiliser les métaux contenus dans les phases solides du sol, par modification des concentrations ioniques de la rhizosphère, du potentiel rédox, et du pH ou formation de complexes organo-métalliques (Chaignon, 2001) (**figure1**).

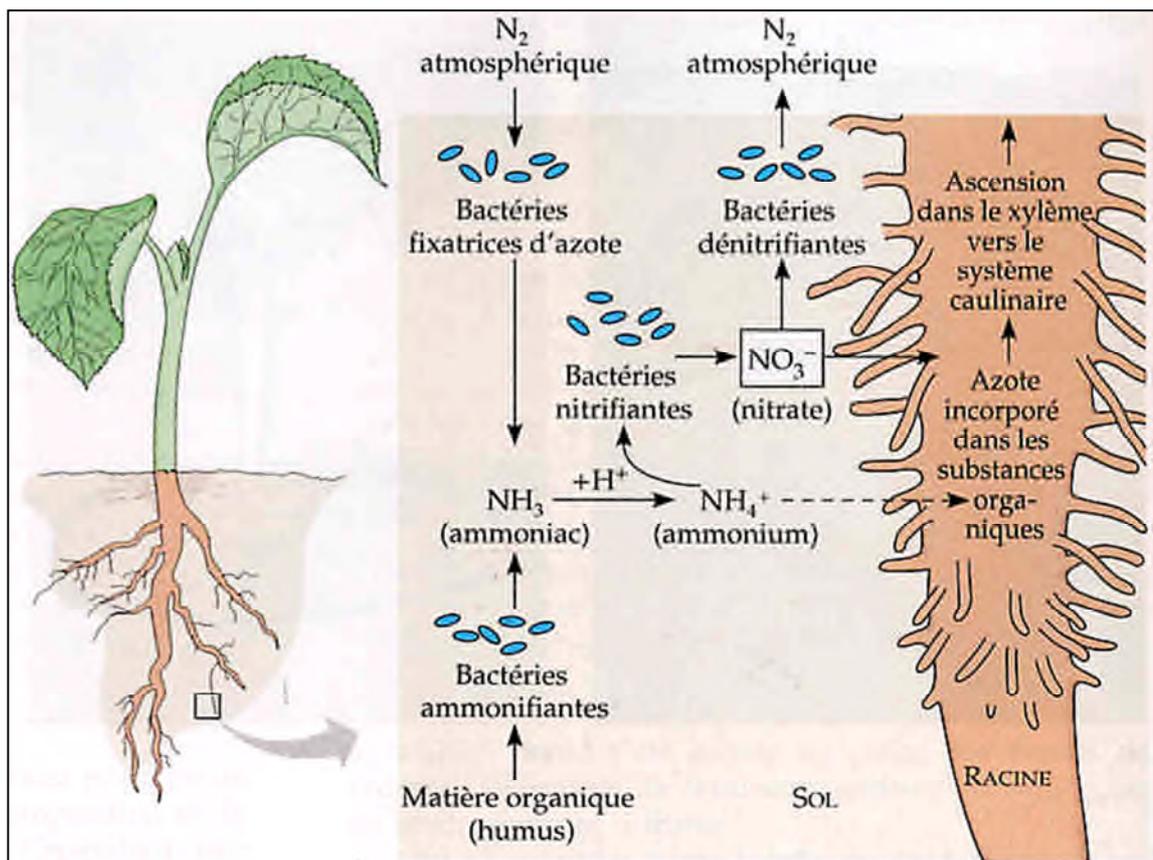


Figure 1 : Schéma générale de la rhizosphère d'une plante (anonyme 1, 2013).

Dans la rhizosphère on distingue :

- Le rhizoplan (surface racinaire) ;
- L'endorhizosphère (habitat intra-racinaire de certaines bactéries) ;
- L'exorhizosphère ou sol rhizosphérique (le volume du sol proche de la racine) (Bottner et Billes, 1987 ; Gobat *et al.*, 2003).

1.1. La rhizodéposition :

Le sol adhérent constitue un espace de transition obligatoire, non seulement de l'eau et des nutriments qui sont prélevés par la plante, mais aussi pour les composés libérés par la plante dans le sol : **la rhizodéposition**. La nature de ces composés organiques revêt une importance particulière dans le processus d'agrégation. C'est ainsi que le caractère hydrophobe contribue à consolider la structure du sol et à augmenter sa longévité (Tarchitzky *et al.*, 2000), par rapport à celle qui est hydrophile, dont la persistance dans la rhizosphère est faible, donc très rapidement biodégradable (Piccolo *et al.*, 1999).

La rhizodéposition comprend :

- **Les exsudats** : comme les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les flavonoïdes, les hormones et les vitamines (Kuzyakov et Demin, 1998 ; Gobat *et al.*, 2003).
- **Les substances sécrétées** : les mucilages, les polymères de carbohydrates et les enzymes.
- **Les lysats** : libérés quand la cellule s'autolyse, ils incluent les cellules de la coiffe et les membranes cellulaires (Gobat *et al.*, 2003).
- **Les gaz** : comme l'éthylène et le CO₂, et autres composés volatiles.

Les micro-organismes du sol jouent ainsi le rôle de biotransformation en utilisant une gamme de métabolites diverse et variée ; ils participent ainsi à la structuration du sol et au recyclage du carbone organique. L'ensemble de ces échanges occasionnent une modification des équilibres ioniques et gazeux de la rhizosphère (Lemenceau et Heulin, 1998).

2. Effet des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance de la plante :

Les racines des plantes établissent des relations symbiotiques spécifiques avec certains microorganismes du sol. Plusieurs types d'associations existent dans la rhizosphère (Smith et Read, 1997).

La rhizosphère est une zone privilégiée d'interaction entre les microorganismes, la plante et le sol, elle est le siège d'une activité importante qui a des répercussions sur la diversité. Les racines de la plante, via la rhizodéposition, sont la source clef d'énergie et de nourriture pour les microorganismes présents dans la rhizosphère (Whipps, 2001). Les bactéries particulièrement bien adaptées à la vie dans la rhizosphère sont appelées rhizobactéries.

2.1. Rhizobactéries :

Les rhizobactéries sont des bactéries dominantes dans la rhizosphère d'un certain nombre de plantes (blé dur, blé tendre, tournesol, colza, ...), mises en culture dans des sols de régions tempérées, semi-désertiques ou désertiques. Les rhizobactéries qui colonisent les racines peuvent être :

- **Saprophytes** : sont largement hétérotrophes, ce qui veut dire qu'ils dépendent d'une source de matières organiques pour en tirer leur énergie et se multiplier ; on parle aussi de microorganismes décomposeurs.
- **Délétères (DRB, deleterious rhizobactéria)**, c'est le cas des bactéries pathogènes : sont des bactéries qui endommagent les tissus racinaires des plantes ou produisent des métabolites toxiques ce qui empêche la croissance et le développement des racines. Brian *et al* (1951) ont démontré que les métabolites de quelques micro-organismes de sol pouvaient défavorablement affecter le développement des plantes (Woltz *et al.*, 1978 ; Suslow *et al.*, 1982).
- **Bénéfiques**, c'est le cas des bactéries qui favorisent la croissance de la plante (**PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria**) : ce sont des micro-organismes qui colonisent la rhizosphère en utilisant les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante. Cet effet bénéfique peut être direct, lorsque la bactérie stimule la croissance racinaire, accélère l'émergence des graines, induit une floraison précoce, augmenter la récolte de leur hôte végétal (symbiose associative entre la bactérie PGPR et sa plante-hot), ou indirecte lorsqu'elle contrôle des organismes phytoparasites (Alami *et al.*, 2000).

3. Les polysaccharides bactériens :

Les polysaccharides ou polyosides sont des hydrates de carbone, plus ou moins polymérisés, très répandus dans la nature puisqu'ils représentent la majeure partie des glucides chez les êtres vivants.

Les polysaccharides sont constitués de nombreuses sous-unités qui sont, soit des sucres simples, soit leurs dérivés. Ils peuvent former des chaînes linéaires, ramifiées ou non (Martens *et al.*, 1992). Ils présentent une hydrophilie importante, ce qui permet de les utiliser pour modifier les propriétés des systèmes aqueux, comme par exemple une viscosité élevée à faibles concentrations, des propriétés gélifiantes, une bonne solubilité dans l'eau et des propriétés adhésives permettant aux bactéries qui les synthétisent, de se lier fortement à des supports (Sanin *et al.*, 2003).

Les bactéries telluriques, comme d'autres micro-organismes, synthétisent des polysaccharides qui peuvent être classés en trois groupes selon leur localisation dans la cellule :

- Le premier groupe rassemble les polysaccharides intracellulaires (du cytosol) ; ils servent de source de carbone et d'énergie à la cellule : représenté essentiellement par le glycogène bactérien (Tavernier, 1997).
- Le second groupe concerne les constituants de la paroi (les polysaccharides pariétaux) tels que les acides téichoïques et les peptidoglycanes.
- Le troisième groupe réunit les polysaccharides extracellulaires qui peuvent eux-mêmes se présenter sous deux formes : les polysaccharides capsulaires (CPS) qui sont intimement liés à la surface cellulaire et les exopolysaccharides (EPS) au sens strict du terme qui sont excrétés dans le milieu extérieur en entourant parfois les cellules dans une gangue muqueuse appelée « slim » (Carlson, 1982 ; Zevenhuizen, 1995 ; Skorupska *et al.*, 2006).

3.1. Les exopolysaccharides :

Le terme "exopolysaccharides" (EPS) ou "polysaccharides exocellulaires" a été proposé par Sutherland (1972) et Cerning (1994) comme appellation générale pour ce groupe (Dirk, 2002).

Les exopolysaccharides d'origine microbienne sont des polymères biosynthétiques ou biopolymères. Geesy (1982) les définit comme des : « substances polymériques extracellulaires d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbiens ». D'autres auteurs tels que Characklis et wilderer (1989), vont plus loin en définissant les EPS comme des : « polymères organiques qui sont souvent responsables dans les biofilms de la cohésion des cellules et de leur adhésion sur substrats (Garrido *et al.*,2002).

Les EPS sont localisés à l'extérieur des cellules microbiennes, ils peuvent être étroitement associés à leur surface sous forme de capsule ou bien être largués dans l'environnement local des micro-organismes (Hena Valencia, 2008 ; Skorupska *et al.*, 2006).

3.1.1. Classification des exopolysaccharides :

3.1.1.1. Sur le plan structure :

La structure des EPS est constituée d'unités répétitives (8 à 12 monomères), composés en général d'hexoses (le plus souvent du glucose et du galactose) plus ou moins substitués par des pyruvates, des succinates ou des acétates. Ils peuvent être : linéaires ou ramifiés. Les sucres sont reliés entre eux par une grande variété de liaisons (alpha ou bêta, 1-2, 1-3 etc.) (Chataigné, 2007).

3.1.1.2.Sur le plan composition :

En fonction de la nature des monomères constitutifs de l'unité de répétition des EPS (composition chimique) on distingue les hétéropolysaccharides et les homopolysaccharides.

a) Les homopolysacchrides :

Les homopolysaccharides ou polysaccharides homogènes, résultent de la condensation d'un grand nombre de molécules d'un même ose (glucose et galactose) ou d'un même monomère osidique ; leurs propriétés varient considérablement selon leur structure. La cellulose et le dextrane, par exemple, montrent des comportements différents concernant leur pouvoir épaississant, bien que seul le D-glucose compose leur chaîne.

b) Les hétéropolysaccharides : (polysaccharides hétérogènes)

Les hétéropolysaccharides résultent de la condensation d'un grand nombre de divers oses (jusqu'à 5 oses différents) ou de divers monomères osidiques, avec une masse molaire de l'ordre de 106 Daltons (Sutherland, 1977 ; Hena Valencia, 2008). En général, le D-glucose,

le D-galactose, le D-mannose, le L-fructose et le L-rhamnose représentent les monosaccharides les plus souvent rencontrés. Ces polysaccharides bactériens peuvent également contenir du N-acétylglucosamine (Glc NAc), du N-acetylgalactosamine (Gal NAc) et de l'acide glucuronique (Glc A), en plus des substituants non glucidiques tels que le phosphate, l'acétyl, le glycérol, ... (Kaci, 2006).

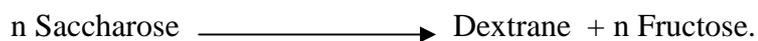
3.1.2. Voie de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires :

Le site de synthèse des EPS et la nature des précurseurs permettent de distinguer deux types de biosynthèse chez les bactéries : une synthèse extracellulaire produisant des homopolysaccharides et une synthèse intracellulaire (membrane) produisant des hétéropolysaccharides.

a) Synthèse extracellulaire :

Dans le cas des homopolysaccharides, la synthèse se déroule grâce à des enzymes sécrétées soit à l'extérieur de la cellule, soit au niveau de la membrane.

Par exemple les dextrans, composés exclusivement de glucose, sont synthétisés par des bactéries (*Stréptococcus* et *Leuconostoc*), la biosynthèse fait intervenir une seule enzyme, la dextrane sucrase qui est une D-glycosyl-transférase et qui va transférer le D-glucose du saccharose (substrat spécifique de la synthèse) sur un accepteur approprié (la chaîne de dextrane en élongation) (Whitfield, 1988). Ce mécanisme correspond donc à une élongation de glucose avec libération du fructose.



Dextrane-sucrase

b) Synthèse intracellulaire :

Dans ce type de mécanisme, les polysaccharides sont produits par un processus intracellulaire. Ce dernier est impliqué dans la synthèse des hétéropolysaccharides (Whitfield, 1988).

La biosynthèse des EPS représente un des processus multi-étapes et dépend d'un complexe protéique localisé à la fois sur les membranes internes et externes. Elle débute par la formation d'un précurseur, nucléotide de sucre diphosphorylé (par exemple UDP-glucose),

transféré sur un accepteur le undecaprenyldiphosphate (UndP). L'unité répétitive est formée dans le cytoplasme et sera ensuite transférée vers le périplasma dans lequel se déroule la polymérisation. Le polysaccharide est acheminé vers la membrane externe par des transporteurs spécifiques (Henao valencia, 2008). La figure suivante illustre la biosynthèse du xanthane (figure 2).

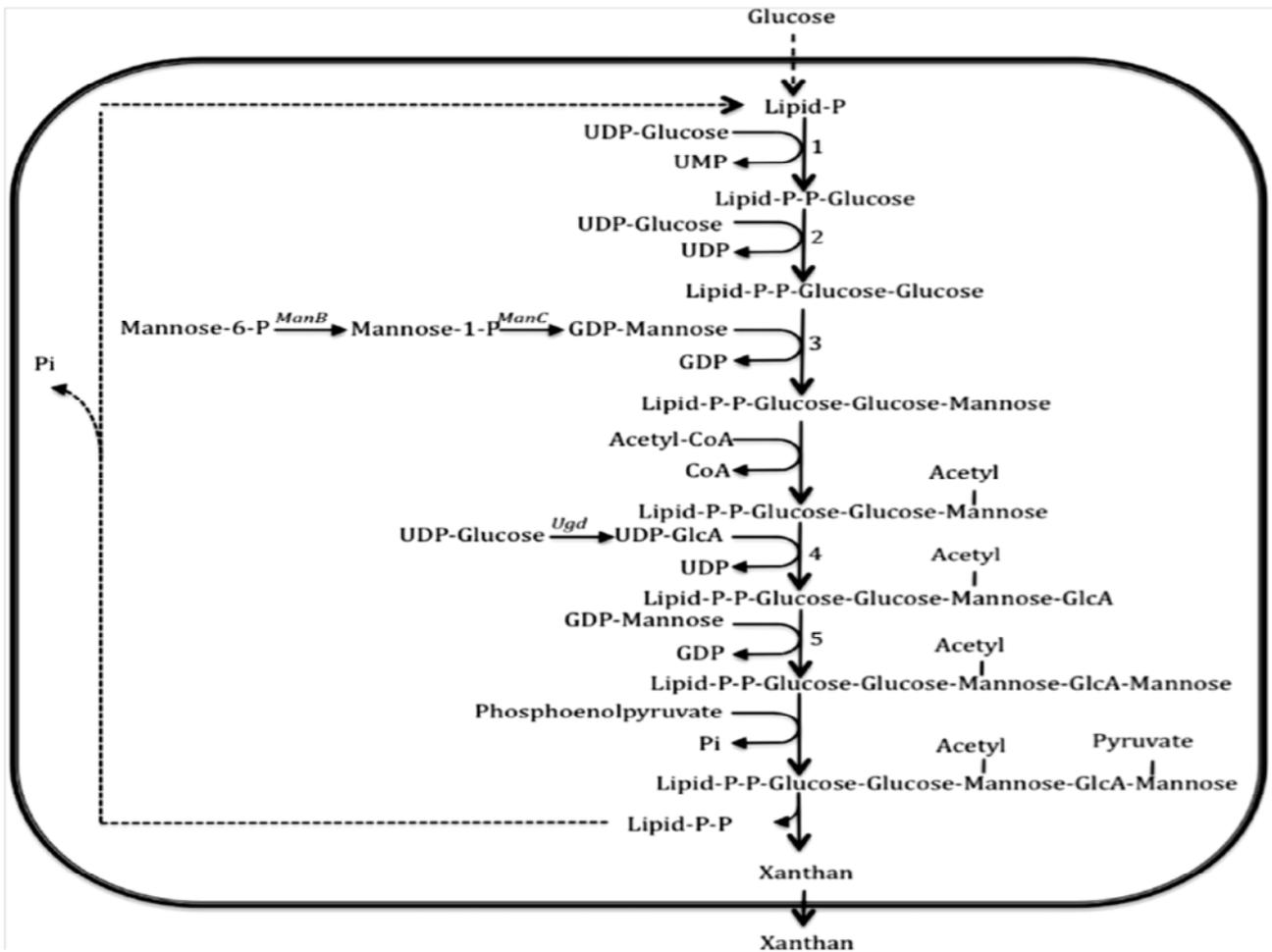


Figure 2: Biosynthèse de xanthane (Vandamme E. *et al.*, 2002).

ManB: phosphomannomutase; ManC: PIB mannose pyrophosphorylase; UGD: Déshydrogénase UDP glucose, 1,2,3,4,5: glycosyltransférases.

4. Quelques exemples des polysaccharides extracellulaires :

- **Levane** : est un exopolysaccharide, où les unités fructoses sont essentiellement reliées par des liaisons glycosidiques β -(2,6), avec certaines chaînes ramifiées liées par des liaisons β -(2,1). Différents micro-organismes peuvent produire le levane tels que :

Pseudomonas sp., *Xanthomonas sp.*, *Bacillus sp.* et *Streptococcus sp.* (Moosavi-Nasab *et al.*, 2010) ; (figure 3).

- **Dextrane** : est un homopolysaccharide constitué d'unités D-glucose, au moins 50% des liaisons sont des α -(1,6), mais elles peuvent aussi être des α -(1,3), α -(1,4) ou α -(1,2). Le plus courant est produit par la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* ; (figure 4).
- **Le xanthane** : est un polysaccharide hétérogène sécrété par *Xanthomonas campestris*. Ce poly-électrolyte anionique consiste en une chaîne cellulosique principale avec une chaîne latérale trisaccharidique. Il est constitué d'une combinaison de quatre composés : le glucose, le mannose, l'acide glucuronique et l'acide pyruvique (Alvarez *et al.*, 2009) ; (figure 5).

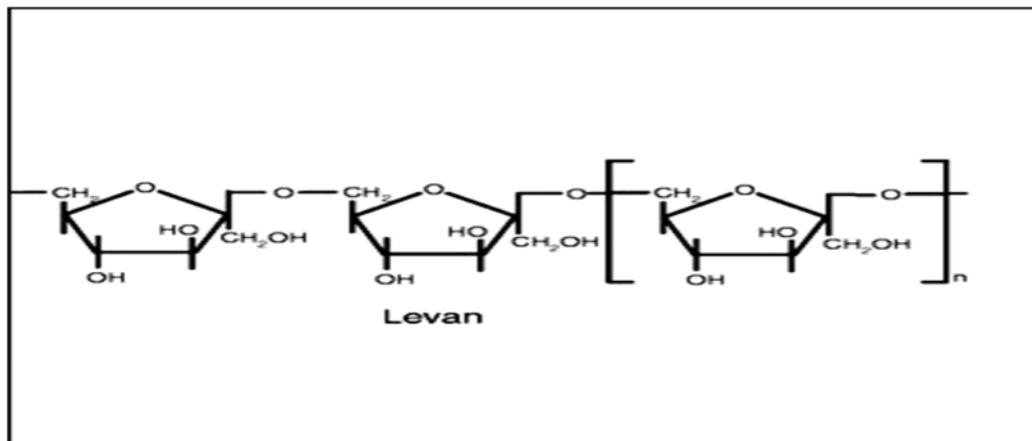


Figure 3 : La structure chimique du levane (Monsan P. *et al.*, 2001).

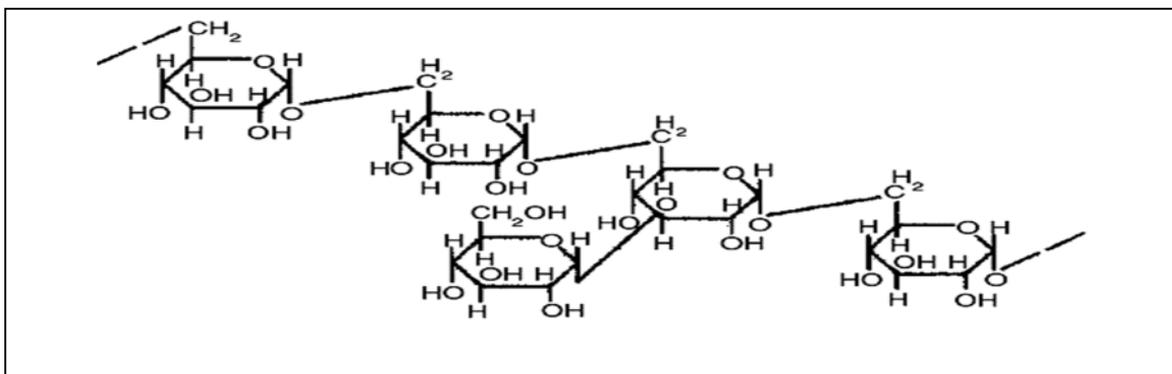


Figure 4 : La structure chimique du dextrane (anonyme 2, 2013).

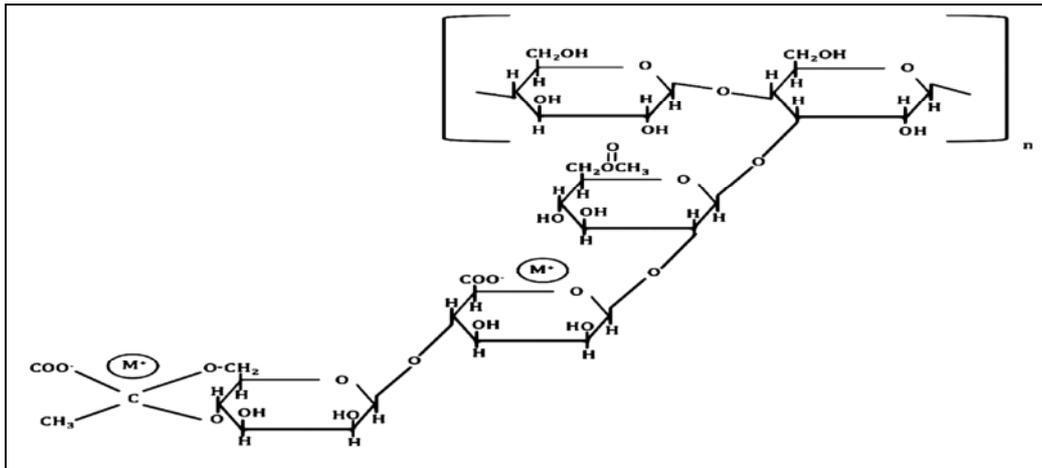


Figure 5 : Structure chimique de xanthane (Rosalam *et al.*, 2006).

M+: Na, K, 1/2 Ca.

5. Les propriétés des exopolysaccharides :

Les propriétés des exopolysaccharides résultent à la fois des caractéristiques physico-chimiques de leurs oses constitutifs et de celles dues à leur architecture moléculaire. Ainsi que les caractéristiques rhéologiques de ces polymères, c'est-à-dire leur comportement mécanique en solution, font de cette famille de molécules organiques, la source principale d'agent hydratant, texturant, épaississant, émulsifiant et solidifiant pour les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques (Ashtaputre *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 1995).

5.1. Rôle des exopolysaccharides :

Les rôles attribués aux exopolysaccharides bactériens sont nombreux et dépendent des caractéristiques du milieu environnant et de la nature des polymères synthétisés.

a) Protection :

La production d'exopolysaccharides constitue une réponse physiologique, offrant à la bactérie qui les synthétise :

- La protection contre l'élévation de la température du substrat édaphique, la gangue muqueuse formée par les polysaccharides pouvant jouer le rôle d'isolant thermique (Lowendorf, 1980 ; Costerton et Irvin, 1981).

- La protection contre le stress osmotique et/ou salin. Les exopolysaccharides peuvent agir comme une barrière osmotique, ou comme osmorégulant permettant à la cellule de s'opposer à l'entrée massive de solutés et à la sortie d'eau (Brenner, 1994).
- La capacité à s'enrober dans une couche d'EPS avec une forte teneur en eau, rend également la cellule plus résistante à la dessiccation (Petit, 2005).

b) Nutrition :

Les exopolysaccharides, grâce à leur caractère anionique, peuvent fixer des ions et des substances nutritives qui circulent dans leur voisinage immédiat, permettant ainsi leur transfert à la bactérie. Ces EPS constituent ainsi une réserve de nutriments, indispensables au maintien et à la prolifération des bactéries (Sutherland, 1972 ; Costerton et Irvin, 1981).

c) Adhésion :

Des études montrent ainsi, que les exopolysaccharides sont impliqués dans l'adhésion des bactéries sur les surfaces : ils composent les biofilms qui entourent la colonie, l'adhésion et le biofilm permettent aux bactéries de se développer et de capturer leurs nutriments.

Les exopolysaccharides interagissent avec les ions pouvant ainsi participer au transport de solutés chez les micro-organismes. Ils représentent donc une zone d'adsorption et d'échange, ils peuvent jouer le rôle de tampon, ou de protection vis-à-vis de l'environnement (Petit, 2005).

d) Agrégation du sol :

De nombreux micro-organismes telluriques, en particulier les bactéries qui prolifèrent et se développent au contact des racines sont capables de produire des polysaccharides. L'influence de ces composés sur l'agrégation du sol a été démontrée directement, en mélangeant les EPS à de argiles (Chenu et Guérif, 1991), ou encore en inoculant le sol avec des bactéries produisant ces polymères (Amellal *et al.*, 2001 ; Kaci *et al.*, 2005).

L'agrégation par les polysaccharides du sol pourrait donc résulter de la formation de liaisons hydrogène ou ioniques avec les particules du sol, notamment en présence d'argiles (Chenu, 1993 et 1995).

La formation des agrégats dans le sol est le résultat de l'action combinée :

- De composés chimiques produits ou en partie de l'activité microbienne ;
- D'une action mécanique directe des micro-organismes filamenteux, par l'intermédiaire de leur longs hyphes (Bethlenfalvay *et al.*, 1999 ; Shreiner *et al.*, 1997), ou encore des systèmes racinaires des plantes (Dexter, 1988).

5.2. Domaines d'application des exopolysaccharides :

Actuellement, ils ont été étudiés et sélectionnés pour leurs applications possibles dans les domaines de l'environnement, de l'industrie alimentaire, de la cosmétique, de la médecine et de la pharmacologie ... (Garrido *et al.*, 2002).

5.2.1. Cosmétique :

L'hydrolyse partielle du polymère ainsi sa remise en solution et en présence de sel, forme un gel fort qui trouve une application dans le domaine de la cosmétique en tant que patches anticernes.

L'hydrolyse poussée du polymère ainsi que sa désacétylation permettent d'obtenir un polymère présentant des propriétés filmogènes importantes. Il est alors utilisé dans les crèmes nécessitant un effet de tenseur (Heyraud *et al.*, 2008).

5.2.2. Diagnostique microbiologique :

Le comportement rhéologique du polymère est à la base de son utilisation dans le secteur du diagnostique microbiologique.

La substitution de l'agar-agar par le polymère conduit à la création d'un milieu de culture gélifié qui est solide à température ambiante et semi liquide à température d'incubation (42°C). Cette aptitude est mise à profit dans un test développé pour la détection de salmonelles (Heyraud *et al.*, 2008).

5.2.3. Domaine médical :

L'étude du mécanisme d'action des EPS par l'équipe du professeur Fischer (HEGP Paris) a montré que, tout comme l'héparine, ce dérivé inhibe la génération de thrombine.

Par ailleurs, le dextrane est utilisé comme additif dans le plasma sanguin pour moduler l'écoulement du sang (Bergmaier., 2002).

De plus, les EPS possèdent des propriétés intéressantes en termes de régénérations osseuses et dermiques (Quérellou *et al.*, 2010).

Enfin, les EPS peuvent être exploités en chirurgie comme peau artificielle provisoire pour diminuer les pertes d'eau ou pour empêcher la déshydratation des tissus (Jonas *et al.*, 1998).

5.2.4. Applications agro-alimentaires :

Les polysaccharides d'origine microbienne sont toujours en compétition dans les applications avec d'autres polymères d'origine naturelle ou synthétique. Souvent les polysaccharides d'autres origines sont presque toujours meilleurs à produire; c'est pourquoi les EPS doivent avoir un avantage majeur, comme par exemple un bénéfice pour la santé du consommateur, afin d'arriver à percer sur le marché. En général, les polymères d'origine microbienne sont des produits uniformes et purs, dont on cite quelques exemples de leur utilisation :

- **Le pullulane** : est utilisé au Japon comme film d'emballage alimentaire. Une solution du polymère peut être appliquée directement sur l'aliment et former une couche sans odeur et sans goût.
- **Le gellane** : est permis comme additif alimentaire aux Etats Unis et en Europe. Le gel est caractérisé par une bonne saveur et est stable sur une vaste gamme de valeur du pH.
- **Le xanthane** : peut être utilisé dans une vaste gamme d'aliment, car il est compatible avec la plus part des autres ingrédients alimentaires. De plus, il est stable dans des conditions acides et il est souvent utilisé en combinaison avec d'autres polysaccharides.
- **Le dextrane** : est utilisé pour la stabilisation et épaississement des sirops.
- **Le curdlane** : est utilisé au Japon pour améliorer et modifier la texture des aliments comme les pâtes de poissons et les gels de fèves (Bergmaier., 2002).

5.2.5. Domaine de l'environnement :

Dans le domaine de l'environnement, les EPS sont étudiés par exemple pour leur utilisation dans la biodétoxification des milieux contaminés (Guezennec, 2004). En effet, les EPS peuvent fixer et permettre l'accumulation dans des biofilms les cations tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} , mais aussi des éléments tels que le plomb, le Zinc et le cadmium...

Il a été montré que les micro-organismes tolèrent de plus fortes concentrations de désinfectants et d'antibiotiques lorsque les cellules se trouvent au sein d'un biofilm; donc elles peuvent faciliter la dégradation des substances difficilement biodégradables (Foley et al., 1996).

1. Souches bactériennes :

Les souches bactériennes utilisées dans le cadre de cette étude ont été isolées à partir du sol rhizosphérique et des racines du blé dur de variété Waha (*Triticum durum L.*) cultivées dans trois sols différents : Boudjelil (Bejaia), Tindouf et Sebkha (Oran).

Tableau I : Sites de prélèvement des souches étudiées.

Souches	Sources
SS-3	Sol de Sebkha.
RO ₅	Racine cultivée dans le sol d'Oran.
RB-2	Racine cultivée dans le sol de Boudjelil.
RT ₁₃	Racine cultivée dans le sol de Tindouf.
RO ₈	Racine cultivée dans le sol d'Oran.

2. Revivification des bactéries productrices d'EPS :

Les bactéries isolées ont été conservées sur milieu RCV-saccharose à 4°C en tubes à essais inclinés.

Le milieu RCV-saccharose est utilisé pour l'isolement et la sélection des souches bactériennes productrices d'EPS, il est très riche en saccharose (20g/l) de manière à stimuler la production des EPS et les colonies bactériennes dites productrices d'EPS sont reconnaissables par leur aspect gommeux et visqueux.

La revivification de ces bactéries, s'opère par prélèvement des colonies à partir du milieu RCV-saccharose en tubes à essais inclinés pour les repiquer sur le milieu liquide RCV-saccharose. L'incubation se fait à 30°C pendant 48h.

3. Purification des bactéries productrices d'EPS :

La purification est l'étape la plus importante puisqu'elle conduira à la souche pure, ce qui facilitera sa caractérisation.

La purification de ces bactéries s'opère par ensemencements en surface sur des boîtes de Pétri contenant le milieu RCV-saccharose en étalant 0.1 ml prélevé à partir du milieu liquide RCV-saccharose. Après, on réalise des repiquages sur milieu gélose nutritive puis une autre fois sur milieu RCV-saccharose pour mieux confirmer que ces bactéries sont productrices d'EPS.

Cette procédure est répétée autant de fois jusqu'à obtention d'une souche pure. Après chaque incubation, des examens macroscopiques et microscopiques sont réalisés afin de vérifier la pureté des souches.

L'incubation se fait à 30°C pendant cinq jours pour chaque ensemencement.

Les isolats sont conservés dans le milieu RCV-saccharose à 4°C en tubes à essais inclinés.

4. Etude des caractères morphologiques :

Les isolats sélectionnés, ont été examinés à partir des cultures de cinq jours, obtenus sur milieu RCV-saccharose à 30°C.

a) Caractères cellulaires :

Cette étude est basée sur des observations microscopiques ($\times 100$) permettant de différencier le type de Gram (annexe 3), la forme et la disposition des cellules.

b) Caractères coloniales :

Les critères descriptifs pour les colonies sont les suivants : forme, aspect, élévation, brillance, opacité, élasticité (EPS) et couleur.

5. Comparaison des niveaux de production des exopolysaccharides :

La production des EPS chez les trois souches : SS-₃, RO₅ et RB-₂ a été réalisée dans des tubes à essai contenant 10ml du milieu RCV-saccharose, inoculés par 1ml de préculture de 48h. L'incubation se fait à 30°C ; après 48h nous avons procédé au dosage des protéines ainsi que les EPS.

6. Etude de l'influence de quelques facteurs du milieu sur la croissance des bactéries productrices d'exopolysaccharide :

6.1. Effet des substrats carbonés :

Afin d'apprécier l'influence de la nature de la source de carbone sur la croissance de ces bactéries et la production des EPS, on ensemence les cultures bactériennes dans des milieux solides : RCV-saccharose, RCV-glucose, RCV-fructose et RCV-mannitol. Puis les incubées à 30°C pendant cinq jours.

6.2. Effet du pH :

L'effet du pH du milieu de culture sur la croissance et la production des EPS chez les souches SS-3, RO5 et RB-2 est déterminé dans des tubes à essais renfermant 10 ml de milieu RCV-saccharose ajusté à pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10. Ces tubes sont inoculés par des colonies prélevées à partir des milieux solides RCV-saccharose et sont ensuite incubés à 30°C pendant 48 heures.

Après 48 heures nous avons procédé à la mesure de la croissance et à l'évaluation de la teneur des surnageants des cultures en EPS.

6.3. Effet du Na Cl :

L'effet du Na Cl sur la croissance des bactéries productrices d'EPS de nos souches est déterminé en tubes à essais contenant 10 ml du milieu RCV-saccharose additionné de quantités croissantes du Na Cl : 25, 50, 75, 100, 116.66 et 133.33 (milli molaire).

Les tubes ainsi préparés sont inoculés par des colonies prélevées à partir des milieux solides RCV-saccharose et sont ensuite incubés à 30°C pendant 48 heures.

Après 48 heures nous avons procédé à la mesure de la croissance et à l'évaluation de la teneur des surnageants des cultures en EPS.

N. B :

L'étude de l'effet du pH, du Na Cl du milieu sur la croissance et la production des EPS a été réalisée sur les trois souches ayant les critères requis (production d'EPS, élasticité et viscosité).

7. Extraction des exopolysaccharides :

La production d'EPS bactérien est réalisée en milieu liquide RCV-saccharose (20 g/l). Après 48 heures d'incubation, les bouillons de culture sont centrifugés à 7000 g/12 minutes.

Le surnageant est ensuite récupéré et les EPS de haut poids moléculaire (HPM) sont précipités à l'éthanol pur et froid, dans un rapport volumique : 1 volume de surnageant/ 2 volumes d'éthanol alors que les EPS de bas poids moléculaire (BPM) demeurant en suspension dans le surnageant éthanolique, ces derniers nécessitent une deuxième centrifugation.

Il est quelques fois nécessaire de placer les mélanges « surnageant-alcool » à 4°C pendant une nuit pour faciliter la précipitation. A la suite de ce traitement, les solutions sont centrifugées à 7000 g pendant 12 minutes (Kaci, 2006).

Ces opérations permettent de recueillir les EPS sous forme d'une gomme à l'aide d'une pipette pasteur (figure 6), les laver (par l'éthanol et l'eau), puis les remettre en suspension afin de les doser par la méthode à l'antrone sulfurique.



Figure 6 : Aspect des EPS bactériens après précipitation à l'éthanol.

8. Mesure de la croissance bactérienne (dosage des protéines) :

La croissance qui peut être assimilée à l'évolution de la biomasse protéique cellulaire a été évaluée sur les souches par la mesure de la teneur en protéines des culots cellulaires obtenus après centrifugation des cultures à 7000g pendant 12 minutes.

a) Principe :

La technique de dosage des protéines est celle préconisée par Bradford (1976), le test est basé sur l'observation que le maximum d'absorbance pour une solution acide de bleu de

Goomaisie G250 (annexe 5) poste à partir de 465 nm (forme cationique rouge) à 595 nm (forme anionique du colorant, entraînant un changement de couleur visible).

b) Mode opératoire :

- Des aliquotes de cultures de 10 ml sont centrifugées à 7000g pendant 12 minutes pour sédimenter les cellules ;
- A 0,2 ml d'échantillon (culot cellulaire), ajouter un volume égal de NaOH 2N ;
- Agiter longuement pour remettre le culot en suspension ;
- Porter le mélange au bain-marie à 100°C pendant 30 minutes.

c) Dosage des protéines :

- A 0,2 ml d'échantillon pur ou dilué, ajouter 2 ml de réactif au bleu de Goomaisie G250 (annexe 5) ;
- Agiter par vortex ;
- Laisser reposer 3 minutes à l'obscurité;
- Lire l'absorbance à 595 nm.

La teneur des culots cellulaires en protéines est déterminée par comparaison avec une courbe d'étalonnage DO à 595 nm = f (albumine-bovine) (annexe 10).

Les résultats obtenus avec cette méthode de dosage sont exprimés en mg de protéines/ml du milieu (mg protéines/ml).

9. Dosage des EPS par la méthode colorimétrique à l'antrone :

L'antrone (annexe 4), d'après Morris, réagit avec tous les oses, diosides et polysaccharides, dont notamment l'amidon et les diverses dextrans. Morris a aussi montré que l'antrone développe pratiquement la même couleur pour un composé sucré ou les produits d'hydrolyse de ce composé (Bachelier *et al.*, 1966).

a) Principe :

Le principe de cette méthode repose sur le fait que l'ajout d'acide sulfurique provoque l'hydrolyse des polysaccharides et la formation de 5-hydroxyméthyl-furfural qui donne, en présence d'éthanol, une coloration orangée. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité de sucre présent et est directement mesurable par spectrophotométrie. La réaction est sensible et la couleur est stable. De petites quantités de

carbohydrates peuvent être détectées et la présence de protéines ou de peptides n'influence pas le dosage (Dupon, 1998).

b) Mode opératoire :

- A 1 ml de la solution d'EPS est ajouté 2 ml de réactif à l'anthrone (annexe 4) ;
- Agiter par vortex ;
- Laisser reposer dans la glace pendant 5 minutes ;
- Porter au bain-marie bouillant (100°C) pendant 10 minutes ;
- Refroidir à nouveau dans la glace ;
- Lecture de la densité optique à 625 nm.

La teneur de surnageant des cultures en sucres totaux est déterminée par comparaison avec une courbe d'étalonnage DO à 625 nm = f (glucose) (annexe 11). Les résultats obtenus avec cette méthode de dosage sont exprimés en (μg d'EPS/ml).

10. Lyophilisation :

La lyophilisation, appelée autrefois cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans un produit.

Sublimier la glace d'un produit initialement congelé : l'eau incluse dans le produit passe directement de l'état solide à l'état gazeux.

Elle autorise une conservation à long terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit (Marin *et al.*, 2000 ; Marvillet, 2001).

10.1. Technique :

Des cultures bactériennes sont produites dans des flacons, contenant 50 ml du milieu RCV-saccharose. Ces flacons sontensemencés avec une culture bactérienne, l'incubation est réalisée sous agitation à 30°C pendant 7 jours.

Après 7 jours les cultures sont centrifugées à 7000 g à 4°C pendant 12 minutes ; le surnageant contenant la fraction d'EPS a été filtré sous vide respectivement sur des membranes de 8 μm , 5 μm , 3 μm , 1 μm , 0.45 μm (de diamètre de pores) pour éliminer les impuretés et les cellules résiduelles.

Le filtrat est traité avec 2 volumes d'éthanol absolu et froid, servant à précipiter les EPS à haut poids moléculaire. Ceux-ci sont recueillis, lavés (éthanol) puis congelés dans les boîtes de Pétri en verre pendant une nuit puis on réalise la lyophilisation (figure 7).

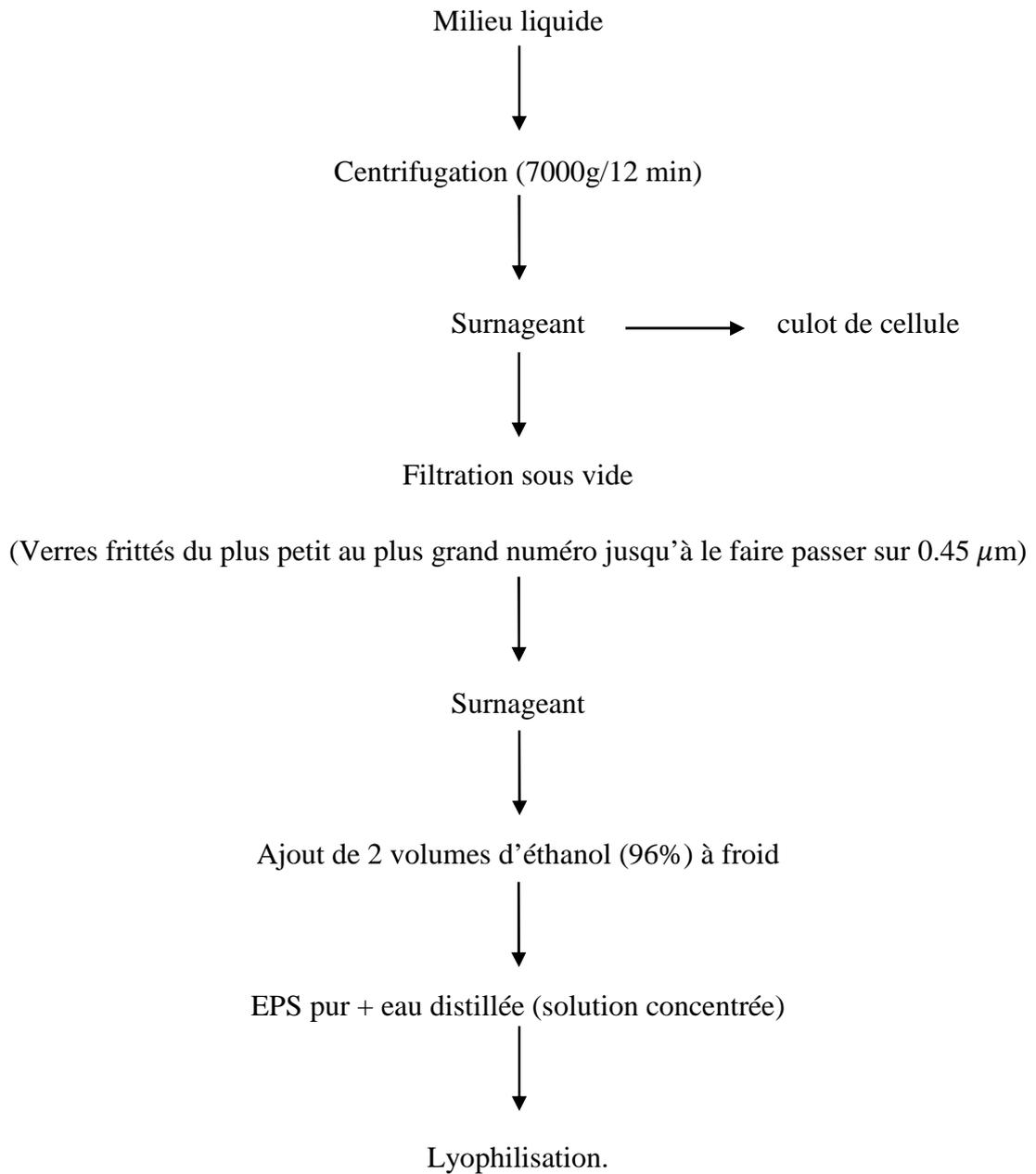


Figure 7 : Schéma représentatif de la technique de lyophilisation.

1. Etude des caractères morphologiques :

La caractérisation a porté sur (05) souches bactériennes productrices d'exopolysaccharides nommées : SS-3, RO₅, RB-2, RT₁₃ et RO₈.

a) Caractères cellulaires :

Pour le critère cellulaire, les examens microscopiques révèlent que les souches sont toutes Gram négatif à l'exception de la souche RO₈ qui est Gram positif (tableau 2).

Les souches bactériennes présentent des formes cellulaires différentes, dont RO₅ et RT₁₃ sont des petits bacilles, SS-3 est de longs bacilles tandis que RO₈ et RB-2 sont respectivement diplococcobacilles et courts bâtonnets.

La croissance des souches étudiées dans le milieu liquide, se manifeste par l'apparition d'un dépôt pour l'ensemble des souches à l'exception de RO₈ qui présente un trouble.

Tableau II: Caractères cellulaires des souches bactériennes et leur croissance en milieu liquide.

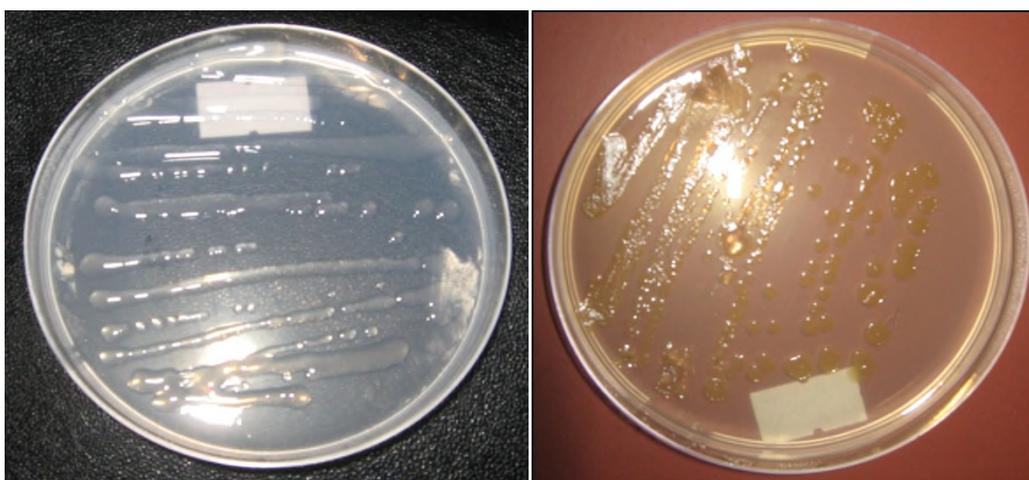
caractères souches	Caractères cellulaires		Croissance en milieu liquide.
	Forme	Gram	
RO ₅	Petit bacille	-	Dépôt
RT ₁₃	Petit bacille	-	Dépôt
SS-3	Long bacille	-	Dépôt
RB-2	Court bâtonnet	-	Dépôt
RO ₈	Diplococcobacille	+	Trouble

b) Caractères coloniales :

Les colonies des différentes souches sur le milieu RCV- saccharose sont toutes arrondies, convexes, régulières, brillantes et gommeuses (tableau 3).

Les colonies formées par les souches RO₅, RO₈ et RT₁₃ sont translucides et présentent une couleur transparente, alors que celles formées par les souches SS-₃ et RB-₂ sont opaques avec une couleur beige.

Pour le critère d'élasticité, les colonies formées par les souches RO₅, RB-₂, RO₈ et RT₁₃ sont toutes visqueuses sauf la souche SS-₃ qui présente une très bonne élasticité.



(a)

(b)



(c)

Figure 8 : Morphologie des colonies des bactéries productrices des exopolysaccharides.

(a) : Morphologie de colonies de la souche RO₅ sur milieu RCV-mannitol.

(b) : Morphologie de colonies de la souche SS-₃ sur milieu GN.

(c) : Morphologie de colonies de la souche RO₅ sur milieu GN.

Tableau III: Caractères culturels des souches bactériennes.

	Caractères culturels						
	Forme	Aspect	Elévation	Brillance	Opacité	Elasticité (EPS)	Couleur
RO₅	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Translucide	–	Transparente
RB-2	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Opaque	–	Beige
RO₈	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Translucide	–	Transparente
RT₁₃	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Translucide	–	Transparente
SS-3	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Opaque	+++	Beige

Discussion :

Les souches bactériennes retenues dans le cadre de cette étude, cultivées sur milieu RCV-saccharose, se présentent sous forme de colonies muqueuses, après cinq jours d’incubation. Cet aspect muqueux, lié à la production d’EPS, répond à un besoin de protection de la part des bactéries. C’est ainsi qu’une concentration de 2% de saccharose occasionne un stress hydrique et osmotique, les bactéries produisent des EPS pour dresser une zone tampon entre les cellules bactériennes et le milieu environnant (Roberson et Firestone, 1992).

La taille des colonies semble plutôt dépendre d’EPS sont reconnaissables par leur aspect visqueux, sont secrétés dans le milieu sous forme d’une gangue muqueuse (Reubert *et al.*, 1991).

L’analyse des caractères cellulaires des cinq souches montre que la plupart des souches sont Gram négatif. C’est ainsi (Fuchs, 1999), a montré que les bactéries à Gram positif comme les *Bacillus* ne sont guère influencées par la rhizosphère, les bactéries à Gram négatif telles

les *Pseudomonas* y répondent très fortement. Les genres de bactéries les plus connues comme colonisatrices de la rhizosphère sont des bactéries à Gram⁻ (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Entérobactéries*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhodopseudomonas*, *Nitrobacter*, ...) et Gram⁺ (*Bacillus*, *Arthrobacter*) (Amellal, 1996 ; Chataigné, 2007).

2. Comparaison des niveaux de production des exopolysaccharides :

La figure 9, montre que la biomasse protéique la plus importante est observée pour la souche RO₅ suivie de la souche RB₋₂ avec des valeurs respectives de 0,023 mg de protéine/ml et de 0,019 mg de protéine/ml puis la souche SS₋₃ avec une valeur de 0,011 mg de protéine/ml.

Les résultats de dosage des EPS (figure 10), montre une variation très importante de la production des exopolysaccharides entre les différentes souches sur le même milieu (RCV-saccharose), la souche SS₋₃ s'avère la plus productrice avec une valeur de 144,94 (µg EPS/ml). Tandis que, les valeurs des souches RB₋₂ et RO₅ sont respectivement de 124, 85(µg EPS/ml) et de 67,66(µg EPS/ml).

Pour avoir une meilleure appréciation de la production des exopolysaccharides et pour exclure les variations dues à la densité cellulaire, on introduit la notion de productivité, qui a une signification physiologique plus précise que les simples niveaux de production des exopolysaccharides à l'unité protéique.

Productivité : exopolysaccharides produits / protéines cellulaires.

Les résultats de la productivité obtenus (figure 11), permettent de classer nos souches en trois types :

- **Souche très productive** : c'est le cas de la souche SS₋₃, qui a un taux de productivité de 13483,43 µg d'EPS /mg de protéine.
- **Souche moyennement productive** : c'est la souche RB₋₂ avec un taux de productivité 6656,75 µg d'EPS /mg de protéine.
- **Souche peu productive** : c'est la souche RO₅ avec un taux de productivité 2991,77 µg d'EPS /mg de protéine.

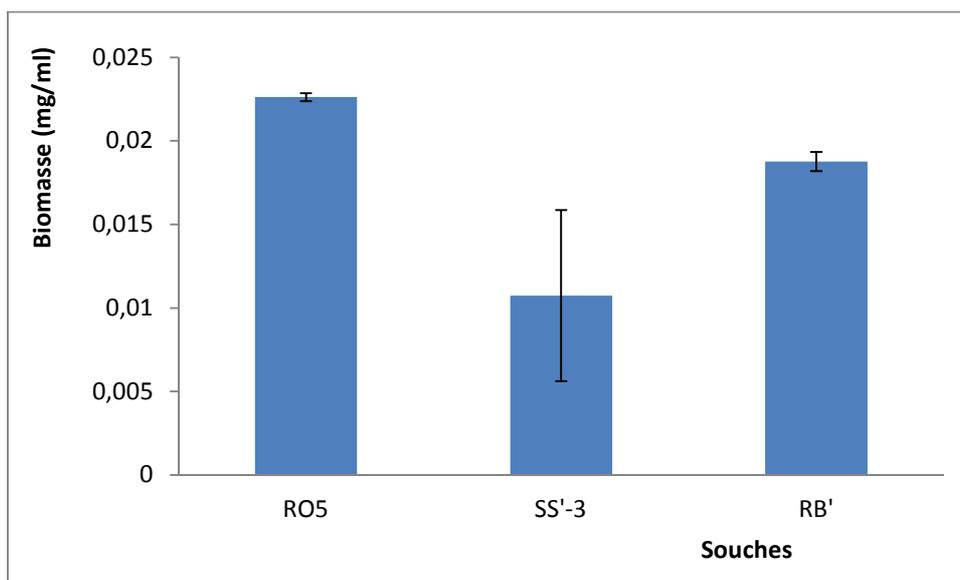


Figure 9: Croissance cellulaire des trois souches cultivées sur le milieu RCV-saccharose après 48h d'incubation à 30°C.

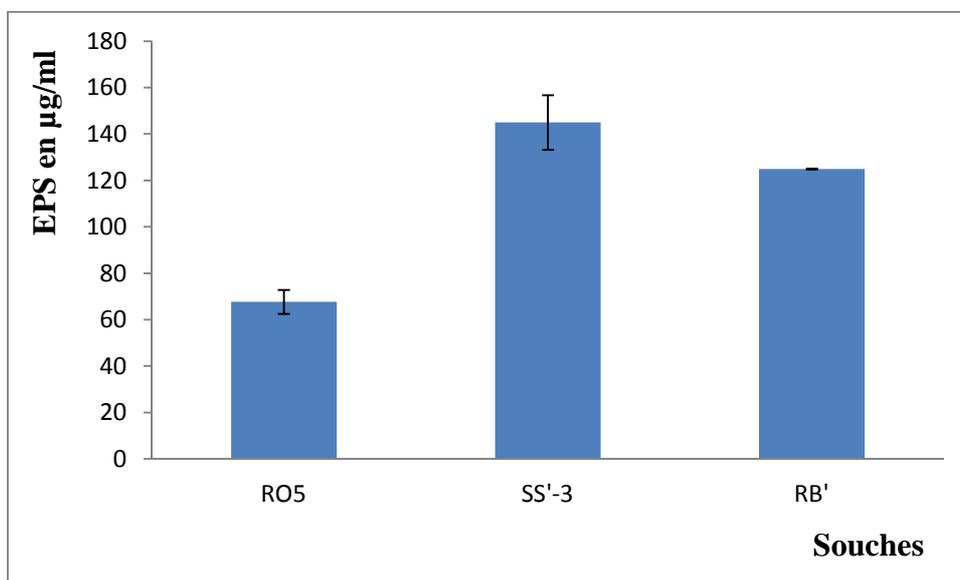


Figure 10 : Production des exopolysaccharides des trois souches après 48h d'incubation à 30°C sur le milieu RCV-saccharose.

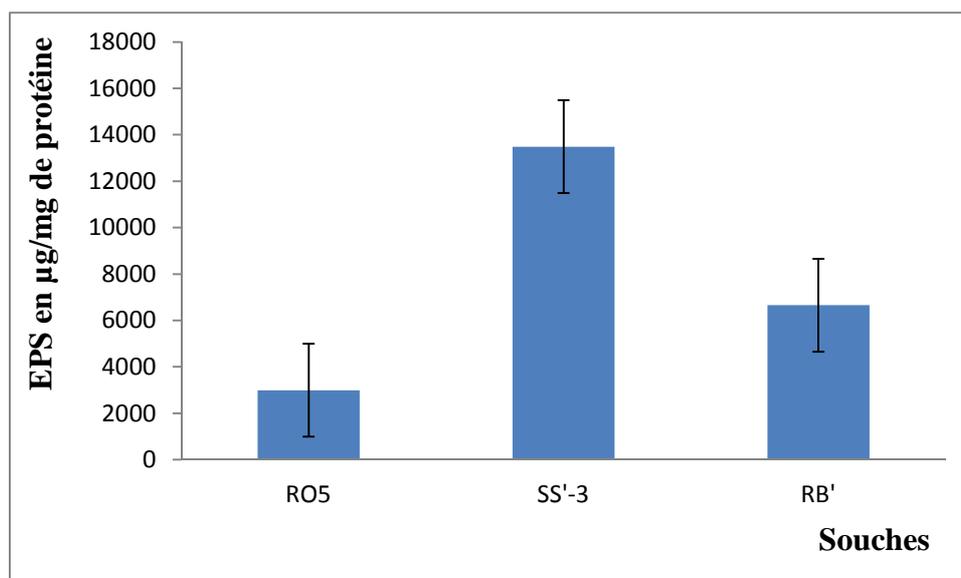


Figure 11 : Résultats de la productivité obtenus sur le milieu RCV-saccharose.

3. Etude de l'influence de quelques facteurs du milieu sur la croissance des bactéries productrices d'exopolysaccharide :

3.1. Effet des substrats carbonés :

En présence de quatre sources de carbone (saccharose, glucose, fructose et mannitol), nous avons relevé une différence de croissance des souches productrices d'EPS.

L'effet le plus remarquable étant obtenu en présence du saccharose à une concentration de 20 g/l, tandis que dans le milieu RCV-glucose et RCV-fructose, aucune souche n'est aperçue. Dans le milieu RCV-mannitol, la souche RO₅ présente la même croissance que dans le milieu RCV-saccharose, alors que celle de RT₁₃ et SS-₃ est faible (tableau 4).

✚ Discussion :

En général, nos résultats sont en accord avec les données de la littérature ; la nature du substrat carboné a un effet sur la croissance des bactéries productrices d'exopolysaccharides et peut s'exercer de différentes manières :

- D'une façon indirecte : en réduisant la croissance bactérienne, dans ces conditions une réduction ou une augmentation de la population peut être seule à l'origine des variations du niveau de production des EPS.

- D'une manière directe : la nature de substrat carboné peut exercer son effet sur le métabolisme de la cellule et plus particulièrement sur celui responsable de la synthèse des EPS (Noureddine, 1997).

Souches	Milieu RCV- saccharose	Milieu RCV- glucose	Milieu RCV- fructose	Milieu RCV- mannitol
RO ₅	++	-	-	++
SS- ₃	+	-	-	+
RT ₁₃	+	-	-	+
RO ₈	+	-	-	-
RB- ₂	+	-	-	-

+ : Croissance des souches productrice d'EPS.

- : Absence de la croissance des souches productrice d'EPS.

++ : Très bonne croissance.

Tableau IV: Effet de la nature des substrats carbonés sur les souches productrices d'EPS.

3.2 Effet du pH :

- Sur la croissance des bactéries :

Les résultats du dosage des protéines (figure 12) montrent que les trois souches RO₅, SS-₃ et RB-₂ sont capables de proliférer dans une gamme de pH comprise entre pH4 et pH10 et que leur croissance est sensible aux variations du pH. Bien que la souche RO₅ semble avoir une croissance élevée avec un optimum enregistré à pH8, les autres souches RB-₂ et SS-₃ ont une croissance moyenne dans toute la gamme de pH testée avec des optimums enregistrés respectivement à pH8 et pH10 avec une croissance très faible à pH4 pour la souche RB-₂.

- Sur la production des EPS :

Comme pour la croissance, le pH a un effet direct sur la synthèse des EPS chez les trois souches. En effet la figure 13 montre que la production des EPS est plus importante chez la souche RB-₂ à une gamme de pH alcalin située entre pH7 et pH10 avec un optimum de production situé à pH9 évalué à 209.67 µg d'EPS/ml de culture et absence de production

d'EPS à pH4 pour cette souche ainsi que pour la souche SS-3. Par ailleurs et bien qu'ils soient faibles, les optimums de synthèse d'EPS chez les autres souches sont de 181.87 μg d'EPS/ml de culture à pH6 pour la souche SS-3 et de 170.90 μg d'EPS/ml de culture à pH10 pour la souche RO5.

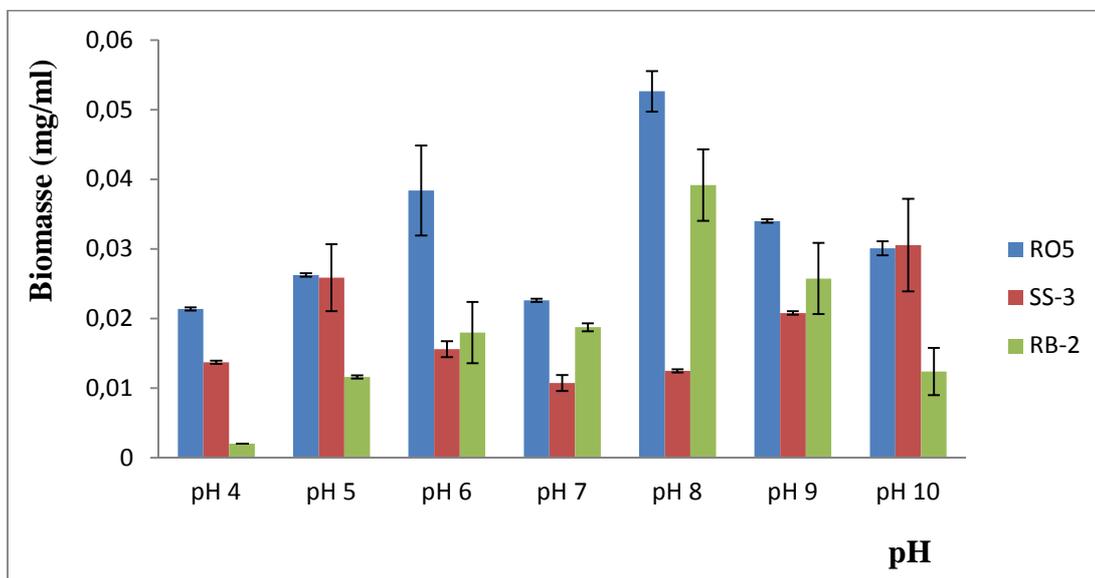


Figure 12 : Effet du pH sur la croissance cellulaire des trois souches après 48h d'incubation à 30°C.

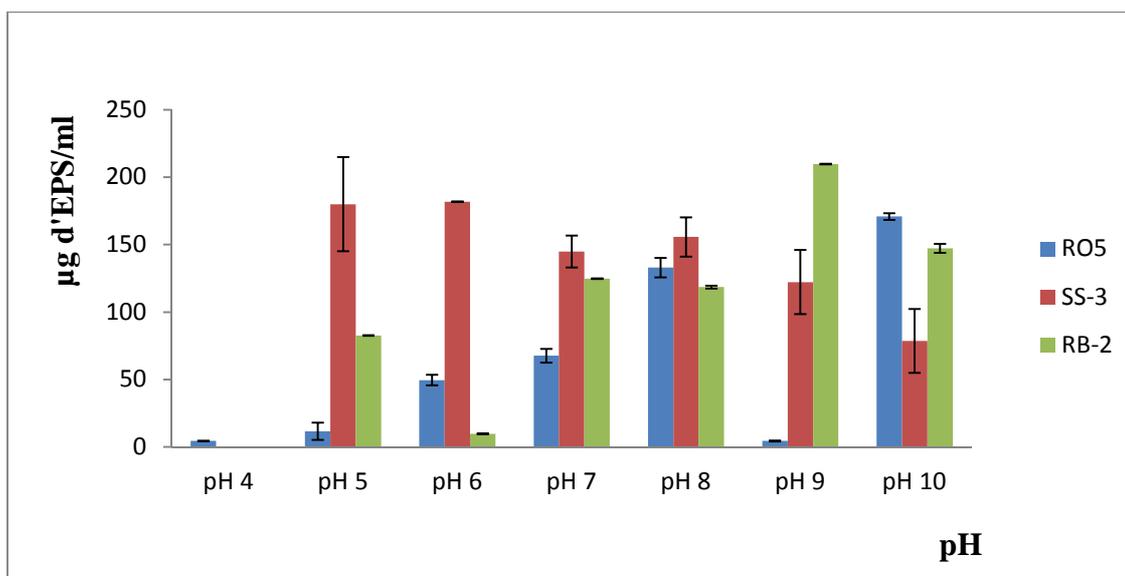


Figure 13 : Effet du pH sur la production des exopolysaccharides des trois souches après 48h d'incubation à 30°C.

- **Sur la productivité :**

Les résultats obtenus (figure 14) indiquent que le niveau de productivité (rendement) de la souche SS-3 à pH7, s'est révélé beaucoup plus élevé que celui des souches RO5 et RB-2 dans toute la gamme de pH testée. Les meilleurs rendements des souches SS-3, RB-2 et RO5 sont respectivement de 16555,83 (µg d'EPS/ml de protéines) à pH7, de 12597,48 (µg d'EPS/ml de protéines) à pH10 et de 6375,96 (µg d'EPS/ml de protéines) à pH8.

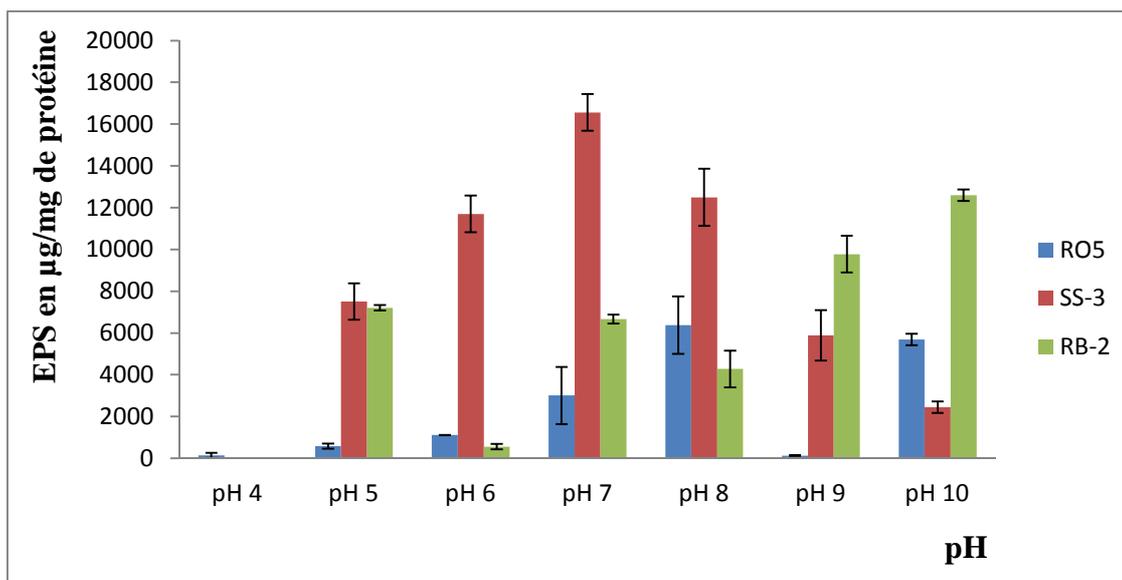


Figure 14 : Résultats de la productivité des trois souches en fonction du pH.

Discussion :

D'après ces résultats, on peut conclure que les souches présentent des optimums de croissance notables au voisinage de la neutralité (pH6 et pH8) nos résultats sont en accord avec la littérature (Vincent, 1981 ; Jordan, 1984) qui considère que les rhizobactéries sont des bactéries neutrophiles.

Les résultats obtenus indiquent que l'alcalinisation du milieu provoque une augmentation de la production des EPS. Il n'est pas exclu, dans notre cas, que même à pH neutre il ya eu une synthèse considérable d'EPS par les trois souches.

L'augmentation des quantités d'EPS constatée chez les trois souches est due au ralentissement de la croissance bactérienne et que l'énergie disponible à cette croissance serait

alors mobilisée pour la synthèse des EPS qui peuvent constituer un moyen de protection contre tout stress tels que l'alcalinisation du milieu (Lowendrof, 1980 ; Vincent, 1981).

3.2. Effet du Na Cl :

- Sur la croissance des bactéries :

Les résultats aux quels nous avons aboutis (figure15) indiquent que l'augmentation de la teneur du milieu en Na Cl exerce un effet sur la croissance des bactéries étudiées. L'optimum des croissances pour les souches SS-3 et RO5, qui semblent avoir une croissance élevée, a été enregistré pour une concentration de 133,33 mM du Na Cl. La souche RB-2 ayant une faible croissance a eu un optimum à 100 mM de concentration du Na Cl.

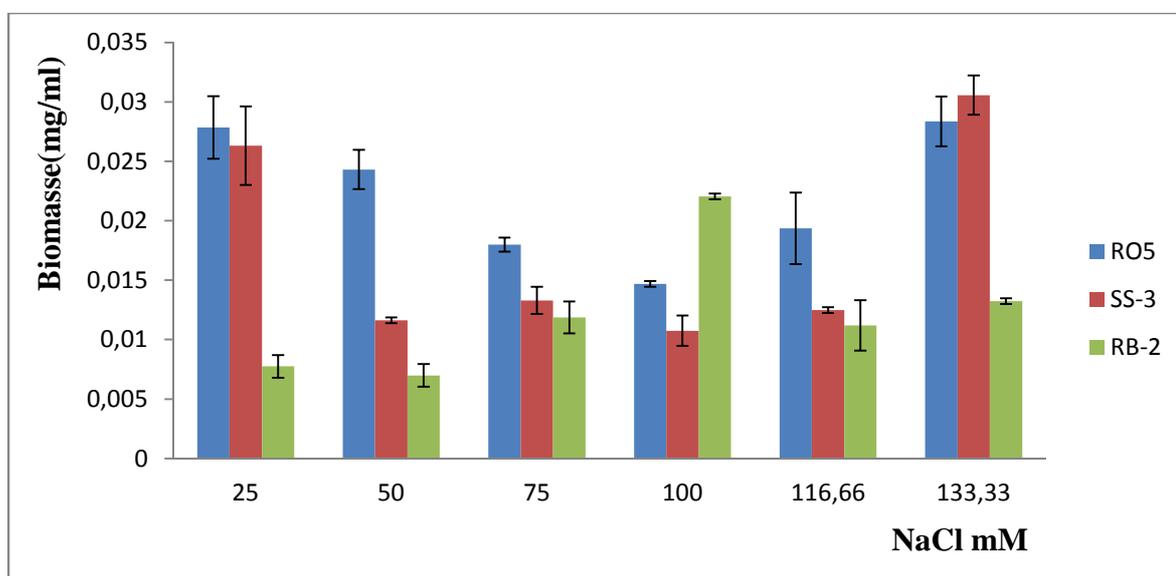


Figure 15 : Effet du Na Cl sur la croissance cellulaire des trois souches après 48h d'incubation à 30°C.

- Sur la production des EPS :

En général, on observe une augmentation de la production d'EPS qui est proportionnelle aux concentrations du Na Cl (figure16). Le taux de production d'EPS le plus important a été remarqué pour la souche RB-2 en présence d'une concentration de 116,66 mM du Na Cl. Les optimums de production d'EPS pour les souches SS-3 et RO5 sont respectivement 20,56 µg d'EPS/ml à 116,66 mM de Na Cl et de 18,36µg d'EPS/ml à 50 mM de Na Cl.

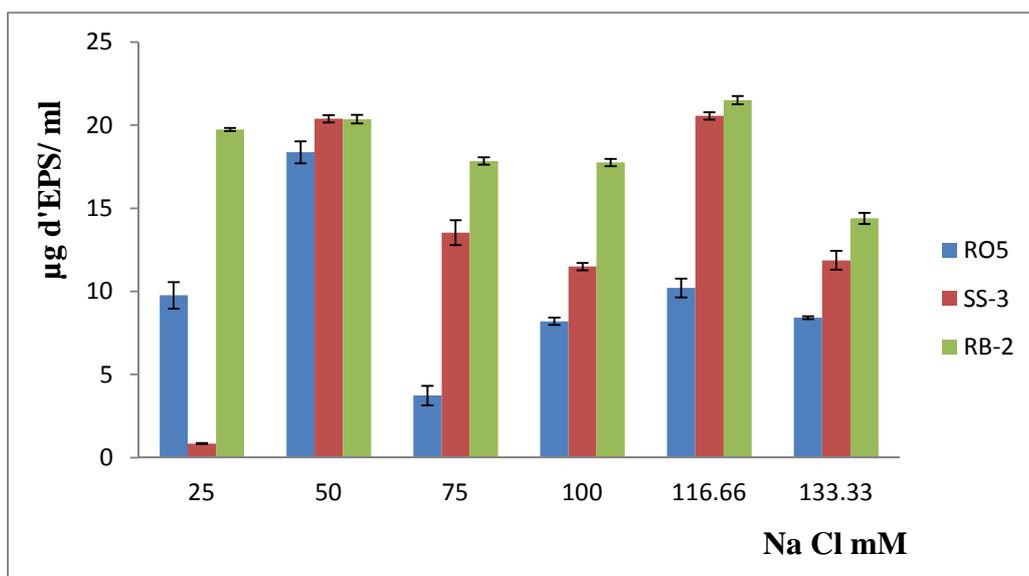


Figure 16 : Effet du Na Cl sur la production des exopolysaccharides des trois souches après 48h d'incubation à 30°C.

- Sur la productivité :

Les résultats obtenus (figure17) indiquent que le niveau de productivité de la souche RB-2 s'est révélé beaucoup plus élevé que celui des souches RO5 et SS-3. Les meilleurs rendements des souches RB-2, SS-3 et RO5 sont respectivement de 2913,24 (µg d'EPS/ml de protéines), de 1755,26 (µg d'EPS/ml de protéines) et de 755,47 (µg d'EPS/ml de protéines) à une concentration de 50 mM du Na Cl.

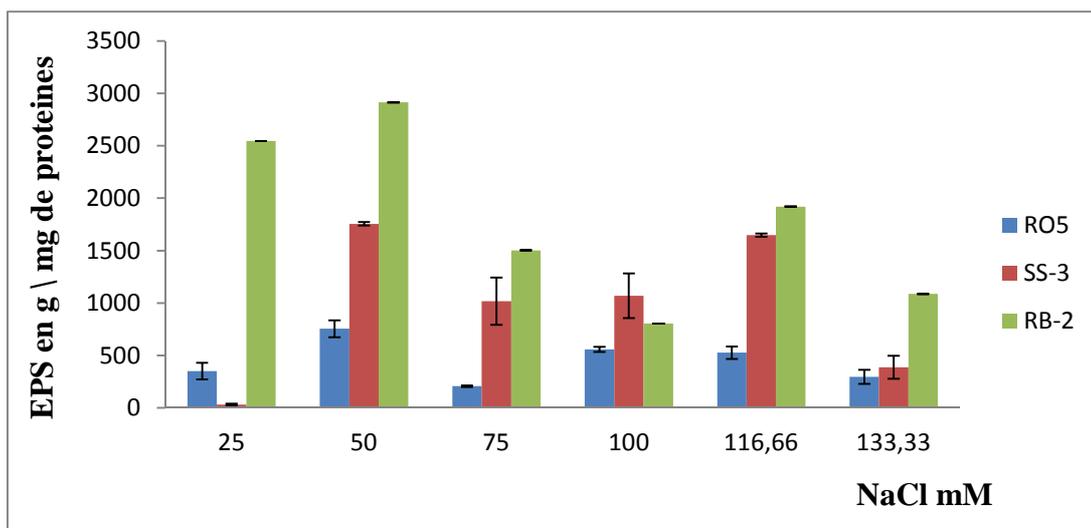


Figure 17 : Résultats de la productivité des trois souches en fonction du Na Cl.

 **Discussion :**

D'après Herbst *et al* (1994), une augmentation brutale de l'osmolarité extérieure provoque un efflux rapide de l'eau et une déshydratation du cytoplasme ayant pour conséquence l'inhibition de la croissance sans que la viabilité des bactéries ne soit touchée (Csnoka et Epstein,1996).

L'augmentation de la concentration du milieu en Na Cl va augmenter l'osmolarité de ce dernier. Cette augmentation de l'osmolarité va exercer sur les cellules un stress osmotique qui peut inhiber le métabolisme cellulaire et par conséquent la croissance de la culture. En effet, dans des conditions de stress hyperosmotique la cellule, pour éviter de perdre son eau, accumule au sein de son cytoplasme des solutés provenant du milieu.

Cette réponse des bactéries au stress osmotique entraîne une augmentation importante de la consommation de l'énergie, augmentation qui serait en grande partie responsable de l'inhibition de la croissance. En effet, dans ces conditions une grande partie de l'énergie de la cellule est mobilisée pour assurer l'osmorégulation; la quantité de l'énergie qui peut être due à la croissance est réduite d'où l'inhibition de cette dernière (Bremer, 1988 et 1994 ; Yancey, 1994).

La stimulation de la production des exopolysaccharides chez les bactéries par la salinité a été déjà signalée dans la littérature. En effet, de nombreux auteurs considèrent que l'accumulation de polysaccharides de haut poids moléculaire à la surface des cellules et/ou dans l'espace périplasmique constitue une véritable barrière osmotique (Costerton et Irvin., 1981).

De plus, la polymérisation des EPS ou de tout autre métabolite excrété dans le milieu extérieur permet à la cellule d'éviter l'augmentation de l'osmolarité de celui-ci et par conséquent l'intensité de stress auquel elle est soumise (Yancey, 1994).

Le but principal de notre travail était de contribuer à l'étude de l'effet de quelques facteurs sur la croissance et la production des exopolysaccharides des bactéries isolées dans la rhizosphère du blé dur « *Triticum durum* ».

Les résultats obtenus sur les caractéristiques morphologiques de ces souches bactériennes, illustrent qu'elles se présentent sous forme bacille ou cocci, muqueuses, visqueuses, de Gram⁻ ou Gram⁺.

La croissance des trois souches bactériennes dans le milieu RCV-saccharose (20g/l) est traduite par une production importante des exopolysaccharides par SS-₃ qui est considérée comme une souche très productive avec un taux de productivité de 13483,43 µg d'EPS /mg de protéine, puis la souche RB-₂ qui est moyennement productive avec un taux de productivité 6656,75 µg d'EPS /mg de protéine et enfin la souche RO₅ qui est peu productive avec un taux de productivité 2991,77 µg d'EPS/mg de protéine.

Cette différence entre les niveaux de production des souches et leurs rendements en EPS peut trouver son explication dans le potentiel synthèse en EPS et aussi dans l'état physiologique des souches.

La nature du substrat carboné a un effet sur la croissance de ces bactéries. La souche RO₅ a eu une très bonne croissance sur les deux milieux RCV-saccharose et RCV-mannitol alors qu'on n'a pas observé de croissance sur les milieux RCV-fructose et RCV-glucose ce qui est le cas pour le reste des souches.

De point de vue pH la synthèse des EPS est fortement stimulée en milieux alcalins et acides ; cette stimulation serait en relation avec la réduction de la croissance ce qui permet la mobilisation de l'énergie pour la synthèse des EPS.

Les concentrations du Na Cl testées, semblent avoir un effet direct sur la croissance et la synthèse des EPS. Cependant, la souche RB-₂ semble mieux tolérer des salinités élevées par rapport aux souches SS-₃ et RO₅.

Bien qu'elle soit partielle, cette étude mérite d'être poursuivie par des études complémentaires pour la caractérisation structurale de ces polymères par différentes méthodes telles que l'HPLC, la CPG et la RMN. D'autre part, il serait intéressant d'identifier nos souches par des tests biochimiques renforcés par des tests moléculaires, afin de définir d'une façon plus précise le degré de rapprochement de nos souches à l'une des espèces de référence.

❖ **Les milieux de culture :**

1. Composition du milieu RCV-saccharose :

Solution I (solution élément) :

- $\text{ZnSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$: 0.43 g.
- $\text{MnSO}_4 (\text{H}_2\text{O})$: 1.30 g.
- $\text{NaMO}_4 (2 \text{H}_2\text{O})$: 0.75 g.
- H_3BO_3 : 2.80 g.
- $\text{CuSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$: 0.026 g.
- $\text{CoSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$: 0.07 g.
- H_2O Qsp: 1000 ml.

Cette solution “élément” et d’une 2^{ème} solution appelée “super salt”.

Solution II (solution super salt):

- $\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$: 2 g.
- $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$: 2 g.
- $\text{FeSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$: 2 g.
- EDTA: 0.4 g.
- Solution I: 20 ml.
- H_2O Qsp: 1000 ml.

Une troisième solution est préparée « Tampon phosphate » composé de :

- KH_2PO_4 : 40 g.
- K_2HPO_4 : 60 g.
- H_2O Qsp: 1000 ml.

Ces solutions sont stérilisées séparément par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes. Pour la confection du milieu RCV-saccharose, il suffit de mélanger :

- Solution II : 50 ml.
- Tampon phosphate : 15 ml.
- Extrait de levure : 0.1 g.
- Saccharose: 20 g.

- H₂O Qsp: 1000 ml.

Le pH du milieu est ajusté à 6.8 et la stérilisation se fait par autoclavage à 110 °C pendant 20 minutes.

Ce milieu de culture est solidifié par addition d'agar agar, à raison de 15 g/l.

Pour les autres sources de carbone on ajoute à la place du saccharose soit du glucose, fructose ou du mannitol à raison du 20 g/l du milieu de culture RCV on obtient alors : RCV-glucose, RCV-fructose ou bien RCV-mannitol.

2. Milieu GN :

Composition du bouillon nutritif (milieu de base, complexe et liquide.) :

- Extrait de viande sec 5 g.
- Bacto-peptone : 10 g.
- Chlorure de Sodium : 5 g.
- Eau distillée : 1000 ml.

pH : 7.2-7.4.

Stérilisation par autoclavage, 15 minutes à 120 °C.

La gélose nutritive est obtenue par l'ajout, avant autoclavage, de 20 g d'agar agar au bouillon nutritif.

3. Coloration du Gram :

A partir d'une culture en milieu liquide :

- Déposer une goutte de bouillon au centre d'une lame de verre, étaler la goutte et laisser sécher.
- Fixer par flambage.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane phéniqué et laisser agir une minute.
- Rincer rapidement à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.
- Recouvrir la lame de lugol ("Liquide de lugol stabilisé PVP") et laisser agir une minute.
- Rincer à l'eau du robinet et éliminer l'excès d'eau.

- Différencier (décolorer) avec un mélange alcool-acétone (“Différenciateur rapide”). Ce temps est le plus délicat de la coloration de Gram (cf. démonstration réalisée au cours des travaux pratiques).
- Rincer abondamment à l’eau du robinet.
- Recouvrir la lame de fuchsine de Ziehl 1/10 et laisser agir une minute.
- Rincer à l’eau du robinet.
- Sécher puis observer au microscope (objectif $\times 100$ à immersion).

A partir d’une colonie :

- Déposer une goutte d’eau sur une lame de verre.
- Prélever un fragment de colonie à l’aide d’une pipette Pasteur boutonnée.
- Dissocier soigneusement l’inoculum dans la goutte d’eau et laisser sécher.
- Fixer par flambage à l’alcool à 95°.

❖ Les réactifs :

4. Réactif à l’anthrone :

- Anthrone en poudre : 0.4 g.
- Ethanol (95%) : 10 ml.
- H₂SO₄ (75%) : 200 ml.
- BN : mettre à l’abri de la lumière.

5. Réactif de bleu de Goomassie :

- Bleu de Goomassie G250 : 10 mg.
- Acide phosphorique à 85% : 10 ml.
- Eau distillée : 90 ml.

❖ Les solutions :

- Solution Na OH (1N) :
- Na OH : 4 g.
- Eau distillée : 100 ml.

6. Solution de Na OH (2N) :

- Na OH : 16 g.
- Eau distillée : 200 ml.

7. Solution de H Cl (1N) :

- H Cl: 18 ml.
- Eau distillée : 200 ml.

8. Solution H₂SO₄ (24 N) à 75% :

- H₂SO₄ (96%) : 153 ml.
- Eau distillée : 47 ml.

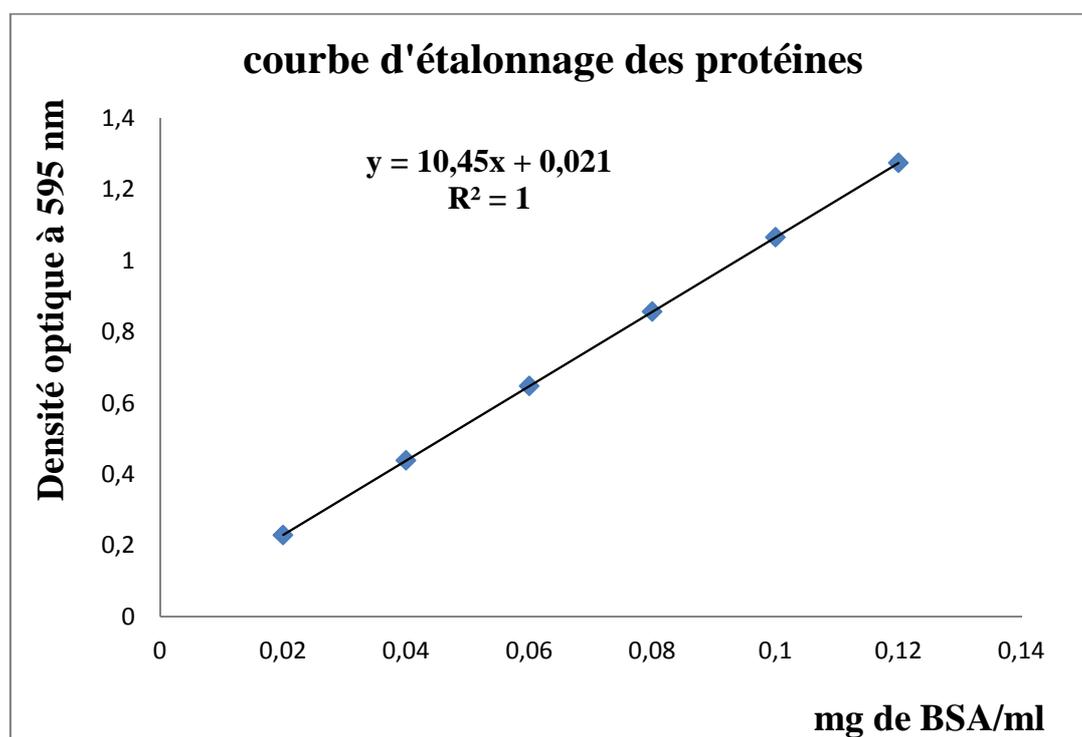
❖ Les courbes d'étalonnage :**Annexe 10 :**

Figure 1: Courbe étalon, absorbance à 595 nm en fonction de la concentration en albumine bovine.

Annexe 11:

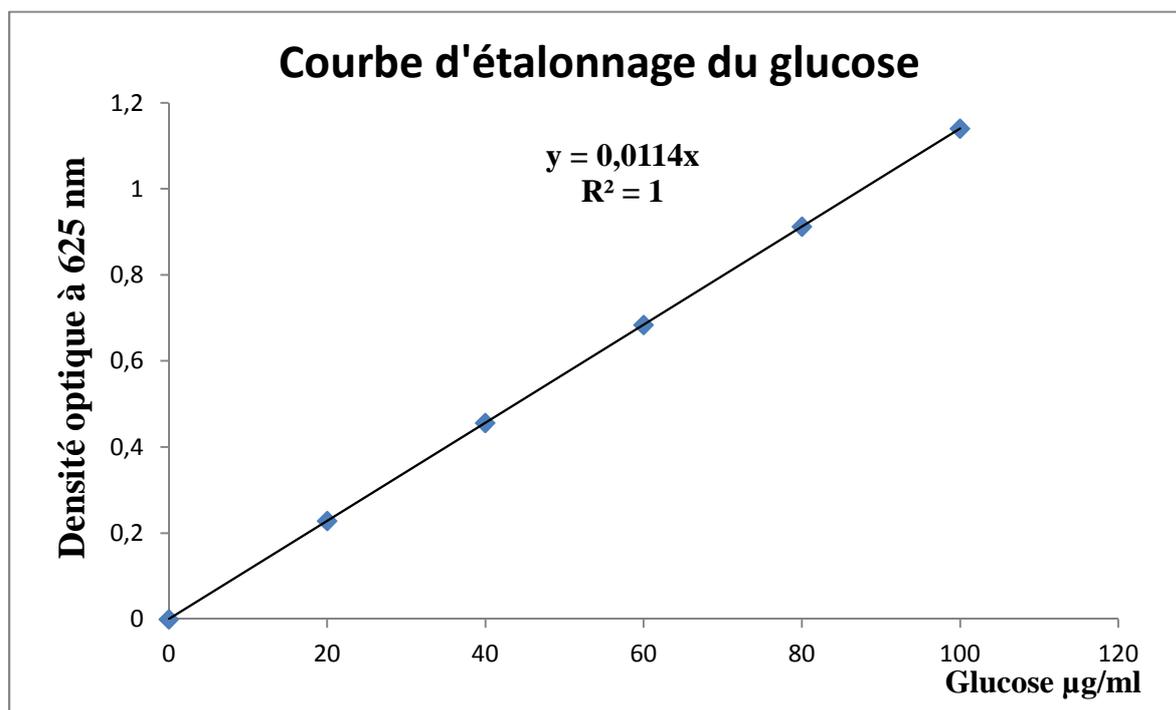


Figure 2: Courbe étalon, absorbance à 625 nm en fonction de la concentration en glucose.

A

- **Anonyme 1:** (https://biosol.estipa.org/liens/rhizo2013/schema_genaral.jpg).
- **Anonyme2:** Springer image.
- **Alami Y., Achouak W., Marol C. et Heulin T. (2000)** – rhizosphere soil aggregation and plant-growth promotion of flower by EPS-producing *Rhizobium sp.* stain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3393-3398.
- **Alvarez J. A. L., Jauregui-Rincon J., Mendoza-Diaz G., Vazquez R. R. et Reyes C. F. (2009)**- Study of Sorption Equilibrium of Biopolymers Alginate and Xanthan with C. I. Disperse Yellow 54. *J. Mex. Chem. Soc.* **53** (2): 59-70.
- **Amellal N. (1996)** – Rôle de bactéries productrices d'exopolysaccharides dans la rhizosphère du blé dur. Thèse de doctorat, Université Nancy, France : 176.
- **Amellal N., Portal J. M., Vogel T. et Berthelin J (2001)** - Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation.* **12**: 49-57.
- **Ashtaputre A. A., Shah A. K. (1995)** - Studies on a viscous, Gel-Expression and Competitiveness in the rhizosphere. *Plant Soil.* **129**: 45-52.

B

- **Bachelier G. et Gavinelli R. (1966)** – Dosage globale des glucides du sol par les méthodes colorimétriques à l'antrone. *Pédol.* **4** : 97-103.
- **Berge O. (2011)**- Ecologie des populations bactériennes associées aux eucaryotes photosynthétiques : de la rhizosphère à la phycosphère. INRA-PACA. Avignon (France), Université Montpellier **2**. HDR : 83.
- **Bergmaier D. (2002)**- Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *LB. Rhamnosus RW-9595M* d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse du grade de philosophiae Doctor. Université Laval Québec.
- **Bethlenfalvay G.J., Cantrell I.C., Mihara K.L. et Shreiner R.P. (1999)** - Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biol. Fertil. Soils.* **28**: 356-363.

- **Bottner P. et Billes G. (1987)** – La rhizosphère: Site d'interaction biologique. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* **24**: 369-388.
- **Brenner E. (1994)** – Adaptation of *E. coli* to high osmolarity environment: osmorégulation of high affinity glycine-betaine transport system *pro U.FEMS Microb-Rev.* **17**: 3-20.

C

- **Carlson R.W. (1982)** - Surface Chemistry. In « *Nitrogen fixation, Vol 2: Rhizobium* », Broughton W.J. Ed., Clarendon Press, Oxford; 199-234.
- **Chaignon V. (2001)** – Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées-cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse de doctorat, Université AIX-MARSEILLE III : 21 p.
- **Chataigné G. (2007)**- Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de doctorat, Université Toulouse, France : 18-19.
- **Chenu C. et Guérif J. (1991)** – Mechanical strength of clay minerals as influenced by an adsorbed polysaccharide. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **55**: 1076-1080.
- **Chenu C. (1993)** – Or sand-polysaccharide associations as models for the interface between microorganisms and soil: water related properties and microstructure. *Geoderma*.**56**: 143-149.
- **Chenu C. (1995)** - Extracellular polysaccharides: An interface between micro-organisms and soil constituents. In “*Environmental impact of soil component interactions.*” Lewis Publishers. Eds. P. M. Hung, J. Berthelin, J. M. Bollaag, W. B. Mc Gimm and A. L. Page. Vol. I: 217-233.
- **Costerton J. W. et Irvin R. T. (1981)** - The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324.
- **Csonka L.N et Epstein W. (1996)**- Osmoregulation, B. P : 1210-1223.

D

- **Dexter A.R. (1988)** - Advances in characterization of soil structure. *Soil and Tillage Research.* **11**: 199-238.

- **Dirk B. (2002)**- Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *lb. rhamnosus rw-9595* d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec: 149p.
- **Dupont I. (1998)** – Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices des exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Département des sciences des aliments et de nutrition. Laval (Canada), université Laval. Maître en sciences 129.

F

- **Fuchs J. (1999)**- Fertilité des sols: les produits biologiques. Institut de recherches et de consultations en agronomie et écologie appliquée : 24p.
- **Foley I. et Gilbert P. (1996)** - Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling*, 10:331-346.

G

- **Garrido F., Michel C. et Morin D. (2002)** - les exopolymères bactériens. Synthèse bibliographique. BRGM/PR- 51673-FR : 9p.
- **Geesey G.G. (1982)** - Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *Amer Soc Micobiol News* **48**: 9-14.
- **Geesey G. G et Jang L. (1991)** – Interactions between metal ions and capsular polymers. In: *Metal ions and Bacteria*, Beveridge, T. J. and Doyle, R. J. Eds. John Wiley and Sons, New York: 325p
- **Gobat J.M., Argano M. et Mttthey W. (2003)** – Le Sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne Coll. 2^{ème} édition revue et augmentée. ISBN 2-88074-501-2 : pp 76-79.
- **Guezennec J. et Ifremer (2004)**- les bactéries des sources hydrothermales profondes à l'origine de nouvelles molécules bioactive. *Vertig O-la revue électronique en sciences de l'environnement. Volume 5 Numéro 3.*

H

- **Henao valencia L. (2008)**- Etude des bases moléculaires de l'agrégation des sols par des exopolysaccharides bactériens. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant Grenoble, Université Joseph Fourier, France. **196** : 23-62.
- **Herbst B., Kneip S. et Bremer E. POSEX(1994)**-Vectorsof osmoticaly controlled and finily turned gene expression in *Esherichia coli* gene **151**:136-142.
- **Heyraud A., Bresin A., Rinaud M., Santaella C., Baynast R. et Heulin T. (2008)**- Production industrielle d'un polysaccharide bactérien luttant contre le stress hydrique. Editions techniques de l'Ingénieur.
- **Huang P. M., Bertheling J., Bollag J. M, McGill W. B., Page A. L. (1995)**- Environmental Impact of soil Component Interaction. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press Inc.

J

- **Jonas R., Farah L.F. (1998)** - Production and application of microbial cellulose. Polymer Degradation and Stability, **59(1-3)**: 101-106.
- **Jordan D. C. (1984)** – Family III: Rhizobiacées dans “Begeys manual of systematic bacteriology”, 9th Ed, vol.1, Krieg N. R. et HoltJ. C. (Ed), Williams and Wilkins Baltimore: 234-244.

K

- **Kaci Y., Heyaud A., Barakat M. et Heulin T. (2005)** – Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Research in Microbiology*. **156** : 522-531.
- **Kaci Y. (2006)**- les bactéries productrices de polysaccharides dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum*) : effet sur l'agrégation du sol. Thèse de doctorat, ISN-USTHB : 4-201.
- **Kahn M. L., Mortimer M. et Zhang W. (1995)** - Carbone métabolism in the *Rhizobiumlegumsymbiosis*. *Genet. Cell. Biol.* **13**:525-532.
- **Kuzyakov Y. et Denin V. (1998)** - CO₂ efflux by rapid decomposition of low molecular organic substance in soils. *Sciences of Soils*. **3**: 27-38.

\mathcal{L}

- **Lemenceau P. et Heulin T. (1998)** - La rhizosphère. In «*Sol : interface fragile.* » Paris, Intra : 93-106.
- **Lowendorf H. S. (1980)** - Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil. *Adv. Microbiol. Ecol.* **4**: 87-124.

\mathcal{M}

- **Marin M., Frédéric René F. (2000)** – Lyophilisation. Techniques de l'ingénieur. **F3240** : 9.
- **Marvillet C. (2001)** - Application industrielles du froid-Généralités. Techniques de l'Ingénieur. **Be9755**:15.
- **Miller K.J, Reinhold Y.N et Kennedy E.P (1986)** - Osmotic adaptation by Gram negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharid. *Sciences* **231**:48-51.
- **Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R.-M., & Remaud-Simeon M. (2001)**. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **11(9)**: 675–685.
- **Moosavi-Nasab M., Layegh B., Aminlari L., et Hashemi M. (2010)** - Microbial Production of Levan using Date Syrup and Investigation of Its Properties. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* **68**:1238-1244.

\mathcal{N}

- **Noureddine N.E (1997)** – Production de polysaccharides extracellulaires chez quelques souches de *Rhizobium meliloti*: propriétés biochimiques et rhéologiques et effet de la salinité. Thèse de magister. ISN-USTHB. 140.

\mathcal{P}

- **Petit A-C. (2005)** - Modifications d'un exopolysaccharide biosynthétisé par une bactérie issue des écosystèmes Hydrothermaux profonds. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) : 5P.

- **Piccolo A., Spaccini R., Haberhauer G. et Gerzabek M. H. (1999)** - Increased sequestration of organic carbon in soil by hydrophobic protection. *Naturwissenschaften*. **86**: 496-499.

Q

- **Quérellou J. et Guézennec J. (2010)**- Biotechnologie des extremophiles. Editions Techniques de l'Ingénieur.

R

- **Reubert T. L ; Reed G.W. et Glazebrook J. (1991)** – Analysis of the roles of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharids in nodulation. “In advances in molecular genetics of plant-microbe interaction” Hennecke H. et Verma D.P.S (Eds.); Kluwer Academic, Dordrecht: 182-188.
- **Roberson E.B. et Fireston M.K. (1992)**–Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in soil *Pseudomonas sp.* *Appl. Environ. Microbiol.***58**: 1284-1291.
- **Roger O. (2002)** – Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure /fonction. Thèse de doctorat, université paris.19p.
- **Rosalam, S., & England, R. (2006)** - Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, **39(2)**: 197–207. Structure xanthèse

S

- **Sanin S.L., Sanin F.D. et Bryers J.D. (2003)** - Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process biochemistry*. **38**: 909-914.
- **Shreiner R. P., Mihara K.L., McDanil H. et Bethlenfalvay G.J. (1997)** - Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant Soil*. **188**: 199-209.
- **Smith S. et Read D. (1997)** - *Mycorrhizal symbiosis*, Academic Press ed. San Diego and London. ISBN 0-12652840-3.

- **Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Krol J (2006)** - Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fac.* **7**: 1-19.
- **Suslow T.V., Schroth M.N. (1982)** - Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology* **72**: 111-115.
- **Surtherland I.W. (1972)** – Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.***23**:161-172.
- **Surtherland I.W. (1977)** - Bacterial exopolysaccharides their nature and production. In “Surface carbohydrate of the prokaryotic cell”. Ed. Acad. Press. New York. Pp : 27-96.

T

- **Tarchitzky J., Hatcher P. G. et Chen Y. (2000)** - Properties and distribution of humic substances and inorganic structure-stabilizing components in particle-size fractions of cultivated Mediterranean soils. *Soil Science*. **165**:328-342.
- **Tavernier, P., I. Besson, J.C. Portrais, J. Courtois, B. Courtois, et J.N. Brbotin. (1997)** - Exopolysaccharide and Poly- β -Hydroxybutyrate Coproduction in Two *Rhizobium meliloti* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:21-26.

V

- **Vandamme E. J., De Baets S., & Steinbuchel E. (2002)** - Biopolymers. Polysaccharides I Polysaccharides from prokaryotes Wiley-VCH.
- **Vincent J. M. – (1981)** – Genes *Rhizobium* “the prokaryote”. Vol. 1. Shelegel. H. G et Balows. A (Ed.). Berlin. : 818-843.

W

- **Whitfield C. (1988)**. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* **34**: 415-420.
- **Wipps J.M. (2001)** – Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**: 478-511.

- **Woltz S.S. (1978)** – Non-parasitic plant pathogens. Annual review of phytopathology **16**: 403-430.

Y

- **Yancey P.H (1994)** - Compatible and contracting solutes dans “cellular and molecular physiology of cell”. Strange K.(Ed) CRS press, Boca Raton, USA:81-103.

Z

- **Zevenhuizen L.P.T.M. (1995)** - Succinoglucan and galactoglucan. *Beijerinck centennial. La Haye. Pays-Bas.Ant. van Leeuwenhoek.* **24**: 121-128.

Résumé

Les bactéries productrices d'EPS sont isolées à partir du sol rhizosphérique et des racines du blé dur de variété Waha (*Triticum durum L.*), cultivées dans trois sols différents (Boudjelil, Sebkhia et Tindouf) et ensemencées sur le milieu RCV-saccharose (20g/l). L'identification de ces souches est réalisée par l'étude des caractères morphologiques (couleur, élasticité, Gram, forme,...). La quantité des exopolysaccharides produite par les trois souches varie entre 2991,77 à 13483,43 µg d'EPS/mg de protéine. La souche la plus productive est celle nommée SS-3. Quant aux facteurs du milieu de culture testés (substrat carbonés, pH et Na Cl) les résultats révèlent un effet direct sur la croissance et la production des EPS chez ces bactéries.

Mots clés : Rhizosphère, bactéries productrices des EPS, exopolysaccharides.

Abstract

The producing bacteria of EPS are isolated starting from the ground rhizospheric and of the roots of durum wheat of Waha variety (of *Triticum durum L.*), cultivated in three different grounds (Boudjelil, Sebkhia, Tindouf) are sown on the medium RCV-saccharose (20g/l). Identification of these stocks is carried out by the study of the biochemical and morphological characters (color, elasticity, Gram, form...). The quantity of the exopolysaccharides produced by the five stocks varies between 2991.77 to 13483.43 µg of EPS/mg of protein. The most productive stock is that named SS-3. The factors of the culture medium tested (carbonaceous substrates, Na Cl, pH) have a direct effect on the growth and the production of the EPS at this bacteria.

Key words: Rhizosphere, producing bacterium of EPS, exopolysaccharides.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents pour leurs soutient et sacrifices, qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance tout au long de mes études, qu'ils trouvent ici tous mes profonds remerciements, et que Dieu vous bénisse pour moi.

Mon adorable sœur : Ourida et son époux Hakim ainsi qu'à leurs enfants Lamia, Amel et Zine dîne.

Mes sœurs que j'adore : Sabrina, Kafia et Kamila.

Mon oncle Hakim et sa femme ainsi que tous mes cousins et mes cousines.

Toute ma famille.

Mes très chères amies : Nassima et Kahina.

Mon aimable binôme Katia et sa famille.

Toute la promotion CQA 2012-2013.

Toutes les personnes qui me sont chères...

Saloua

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à:

*Mes très chers parents adorés qui ont su se montrer patients et généreux, qui n'ont jamais cessé de ménager leurs efforts pour que j'atteigne ce niveau et qui ont donné un sens à mon existence en m'offrant une éducation digne de confiance, qu'ils trouvent en ce travail la preuve de tout mon amour et ma tendresse.
Que dieu les garde toujours en bonne santé.*

Mes chers frères : Karim, Rafik et Nassim.

Ma chère sœur Fahima et son époux Madjid ainsi qu'à ses enfants Yasmine, Anya et Yacine.

Ma chère sœur Rachida.

Ma belle sœur Farida.

Ma chère cousine Wissam.

Toute ma famille.

Mes chères amies : Meriem et Lamia.

Mon aimable binôme Saloua et sa famille.

Toute la promotion CQA 2012-2013.

Katia

Introduction

Etude bibliographique

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion

*Références
bibliographiques*

Annexes

Remerciement

S

Avant tous, nous tenons à remercier celui qui nous a protégé, soutenu et surtout aidé jusqu'à pouvoir « mener la graine au fruit ». Pour son aide et soutien providentiels, nous pouvons dire : « Dieu Merci ».

Nos sincères remerciements s'adressent à notre promotrice M^{me} FELLA-TEMZI S. pour avoir accepté de nous encadrer, pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité, ces conseils, sa gentillesse, sa confiance et ces compétences scientifiques qui nous ont permis d'élargir nos connaissances. Qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude et notre respect.

Nous remercions ainsi M^{me} BELKACEM OUAZNA, pour son aide.

Nos remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

Mr Boukhalefa F. pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté de présider le jury d'examinations.

M^{elle} Brahmí F. et M^{me} Smaíl L. pour l'honneur qu'elles nous ont accordé en examinant ce modeste travail.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes qui ont contribué de pré ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Merci.