

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

Mémoire de Fin de Cycle

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



Thème

*Etude des bactéries productrices
d'exopolysaccharides dans la rhizosphère
du blé dur (*Triticum durum* L.)*

Présenté par :

M^{elle} KRIMAT Nabila

M^{elle} KRIMAT Naima

Membres de jury :

Président : Mr MOUSSI K.

Promotrice : M^{me} FELLA-TEMZI. S

Examinatrices: M^{me} SMAIL L. et

M^{me} IKHNACH F.

Promotion 2011/2012



Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice M^{me} FELLA-TEMZI S., pour avoir accepté de nous encadrer, pour l'aide qu'elle nous a apporté, son entière disponibilité et sa confiance.

Nos vifs remerciements s'adressent aux membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

Mr MOUSSI K., pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté de présider le jury d'examinations.

M^{me} SMAÏL L. et M^{me} IKHNACH F. pour l'honneur qu'ils nous ont accordé en examinant ce modeste travail.

Nos sincères remerciements et reconnaissances s'adresse aussi à Ouazna et Mr MOUSSI K., pour leurs inestimable aide et leurs précieux conseils.

Nous tenons également à remercier toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicaces

Ce modeste travail, achevé avec l'aide de Dieu le tout puissant, est dédié à tous ceux que j'aime.

A la mémoire de mon cousin et mon oncle, Qu'ALLAH vous offre le paradis qu'il désire et vous compte parmi ces biens aimés.

Aux deux êtres qui me sont les plus chers au monde ma mère et mon père à qui je dois le mérite d'en arriver là, auxquels j'exprime ma profonde gratitude.

A mes chers grands-parents.

A ma cher et unique Soeur Ouardia et son époux Kamel.

A mes cher Frères Djamel, Abdenour, Farid et Amirouche.

A mes belles Soeurs Djida, Souhila et Diana.

Aux petits anges Mamou, Nounous, Alilou et Fifa.

A mon aimable binôme Naïma et sa famille.

A toute ma famille.

A mes copines de chambre Souad, Lylia auxquelles je souhaite une belle vie.

A toute la promotion CQA 2011-2012 (Kahina, Sabiha, Wassila, Yamina, Warda et Amirouche).

A tous ceux qui m'aiment et qui m'ont encouragé.

Nabila





Dédicaces

Ce modeste travail, achevé avec l'aide de Dieu le tout puissant, est dédié à tous ceux que j'aime.

*À la mémoire de mon précieux père et ma chère grand mère.
Qu'ALLAH vous offre le paradis qu'il désire et vous compte parmi ces biens aimés.*

À ma très chère maman avec mes prières qu'elle soit toujours en bonne santé et à coté de moi.

À mes frères MOUHAD LOUNAS et TAYEB auxquels je souhaite beaucoup de réussite.

À mes très chères sœurs OURDIA et OUNISSA (et leurs maris), SAHRA et KARIMA.

À mon neveu (GHILAS) et À dada NASSIR,

À toute ma famille.

À mon aimable binôme NABILA et sa famille.

À toutes mes copines de chambre BAHDA, SOUAD auxquelles je souhaite une belle vie.

À tout ce qui m'aime.

À toute la promotion CQA2011-2012. (YAMINA, KAHIA, SABIBA, WASSILA WARDIA et AMIROUCHE)

Naïma



Liste des abréviations

DO : densité optique.

DRB : deleterious rhizobacteria (rhizobactérie délétère).

EPS : Extrat Polymeric Substances, Exopolysaccharide.

GDP : Guanine di phosphate.

GN : gélose nutritif.

LDC : lysine décarboxylase.

LPS : lipopolysaccharides.

ODC : ornithine décarboxylase.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria (rhizobactéries promoteurs de la croissance végétale).

Qsp : ajuster jusqu'à le trait Gaugé.

RM : Rouge de méthyl.

Rmp: rotation par minute.

SPE : Polymériques Extracellulaires.

TSI : Triple Sugar Iron.

Liste des figures

Figure 1. Interactions entre les racines des plantes, les microflores et la rhizosphère.....	3
Figure 2. Structure du dextrane, un homopolymère.....	7
Figure 3. Structure d'un Hétéropolysaccharide : Xanthane.....	8
Figure 4. Biosynthèse de polysaccharide extracellulaire chez <i>Klebsiella aerogenes</i>	11
Figure 5. Photo d'un microagrégat bactérien issu du sol rhizosphérique.....	14
Figure 6. Schéma représentatif de la technique de lyophilisation.....	28
Figure 7. Morphologie de colonies productrices des exopolysaccharides.....	32
Figure 8. Production des exopolysaccharides des différentes souches isolées sur le milieu RCV-saccharose après 48h d'incubation à 30°C.....	37
Figure 9. Croissance cellulaire de différentes souches isolées sur le milieu RCV-saccharose après 48h d'incubation à 30°C.....	38
Figure 10. Résultats de la productivité obtenus sur le milieu RCV-saccharose.....	38

Liste des tableaux

Tableau I : Effet de la nature des substrats carbonés sur la croissance des souches (milieu solide).....	29
Tableau II: Caractères cellulaires des souches bactériennes et leurs croissances dans le milieu liquide.....	31
Tableau III : Caractères culturelles des souches bactériennes.....	33
Tableau IV : Résultats de la caractérisation biochimique des souches bactériennes.....	34

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Revue bibliographique

1 La Rhizosphère	2
1.1 La rhizodéposition	3
1.2 Les interactions entre la rhizosphère, les racines et les micro-organismes.....	4
2 Rhizobactéries	4
2.1 Les rhizobactéries saprophytes	4
2.2 Les rhizobactéries délétères (DRB , deleterious rhizobacteria).....	5
2.3 Les rhizobactéries promoteurs de la croissance végétale (PGPR).....	5
3 Les polysaccharides d'origine microbienne.....	6
4 Les exopolysaccharides.....	6
4.2 Classification des exopolysaccharides	6
4.2.1 Sur le plan composition	6
4.2.2 Sur le plan localisation	9
4.3 Localisation des EPS dans la rhizosphère	9
4.4 Biosynthèse et sécrétion des EPS.....	9
4.5 Rôles et fonctions des EPS pour la souche productrice d'EPS.....	12
4.6 Application des EPS	12
4.6.1 Cosmétique	12
4.6.2 Diagnostic microbiologique	13
4.6.3 Domaine médical	13
4.6.5 Applications agro-alimentaires	14
4.6.6 Domaine de l'environnement	15

5 Les biofilms	15
5.1 La survie des micro-organismes dans le biofilm	15
6. Quelques inconvénients des exopolysaccharides	16

Chapitre II : Matériel et méthodes

1 Isolement des bactéries productrices des exopolysaccharide.....	17
2 Purification des bactéries productrices d'EPS	17
3 Influence de la nature de la source de carbone sur la croissance des bactéries	18
4 Identification des bactéries productrices d'EPS	18
4.1 Etude des caractères morphologiques	18
4.2 Etude des caractères biochimiques	18
4.2.1 Recherche de la catalase.....	18
4.2.2 Recherche d'une nitrate-réductase.....	19
4.2.3 Test LDC (lysine décarboxylase) et ODC (ornithine décarboxylase.....	20
4.2.4 Production d'indole.....	21
4.2.5 Etude du type respiratoire.....	21
4.2.6 Test TSI.....	22
4.2.7 Test VP et RM.....	23
4.2.8 Test de Mannitol mobilité.....	24
5 Extraction des EPS.....	25
5.1 Technique d'extraction.....	25
6 Dosage des EPS par la méthode colorimétrique à l'Anthrone.....	25
7. Mesure de la croissance bactérienne (dosage des protéines).....	26
8. Lyophilisation.....	27
8.1 Technique.....	28

Chapitre III : Résultats et discussions

1 Influence de la nature de source de carbones sur la croissance des souches.....	30
2 Identification des bactéries productrices d'EPS.....	31
2.1 Etude des caractères morphologiques.....	31
2.2 Etude des caractères biochimiques	34

3 Comparaison des niveaux de production des EPS et croissance microbienne.....37

Conclusion.....41

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

La rhizosphère, qui est la partie de sol entourant les racines vivantes, est le siège de l'exsudation racinaire. Les molécules libérées à la surface des racines sont disponibles pour les bactéries et plus particulièrement pour celles qui sont hétérotrophes pour le carbone (Heyraud *et al.*, 2008). C'est ainsi que Lynch et Whipps (1990) ont indiqué que les bactéries sont 5 à 50 fois plus abondantes dans la rhizosphère que dans le reste du sol (Kaci, 2006).

Des études sur les microorganismes telluriques ont permis ces dernières années de développer le concept "d'engrais biologique", basé essentiellement sur des propriétés dites bénéfiques de certains microorganismes. Cependant, les nombreuses recherches dans ce domaine se sont orientées préférentiellement vers la fixation biologique de l'azote atmosphérique qui a occupé une place de choix (Tisdall, 1994).

D'autres bactéries ont la capacité d'adhérer à différentes surfaces en synthétisant des exopolysaccharides (EPS). Ces EPS sont définis comme étant des polymères extracellulaires d'origine biologique participant à la formation d'agrégats microbiens. Ils présentent une grande diversité de structure qui leur confère des propriétés rhéologiques à même de répondre à des besoins exprimés dans de nombreux domaines, en particulier dans l'épuration des eaux usées, l'industrie pharmaceutique ou encore la cosmétologie (Geesey, 1982).

Notre travail constitue une contribution à l'étude des bactéries productrices d'EPS isolées dans la rhizosphère du blé dur et leurs EPS.

Nous nous sommes tout d'abord opérées à la purification de ces populations bactériennes déjà isolées de la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum L.*) dans 3 régions d'Algérie.

Nous avons ensuite procédées à caractériser nos populations purifiées d'un point de vue phénotypique par une série de tests. Enfin on s'est intéressé au dosage de ces exopolysaccharides ainsi que leur lyophilisation.

Chapitre I
Revue bibliographique

1 La Rhizosphère

La rhizosphère est la région du sol autour des racines des plantes. Le terme rhizosphère a été introduit en 1904 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. Par la suite, cette définition a été étendue à toutes les plantes. Enfin, 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. La rhizosphère constitue ainsi un lieu d'échange entre le végétal et le minéral ; c'est un milieu complexe aux multiples interactions (Lynch *et al.*, 1990; Lemenceau et Heulin, 1998).

La rhizosphère comprend :

- a) le **rhizoplan** (surface de la racine) ;
- b) l'**endorhizosphère** (espace intercellulaire entre les tissus de la racine habité par des bactéries qui ne forment pas de structures symbiotiques) ;
- c) l'**exorhizosphère ou sol rhizosphérique** (Gobat *et al.*, 2003).

La composante biologique de la rhizosphère revêt un attrait particulier du fait de sa grande diversité taxonomique et fonctionnelle, et déjà Hiltner notait que cette diversité dans la rhizosphère était différente de celle du sol non rhizosphérique adjacent. Ainsi, la dynamique microbienne de la rhizosphère est fortement influencée par la présence de racines, de ses exsudats et les fonctions exercées par ces effets microbiens ont été modelées par cette niche particulière (Berge, 2011).

1.1 La rhizodéposition

La rhizodéposition est la production organique ou inorganique de la racine dans le sol. Elle correspond à 15-40% de la production photosynthétique totale de la plante et apporte un flux important de carbone et d'énergie aux micro-organismes de la rhizosphère (Lynch et Whipps, 1990; Darrah, 1996).

Elle comprend des cellules détachées, du mucilage sécrété (facilite les échanges hydriques), des exsudats solubles (par exemple les sucres, les acides aminés, attractants ou antibiotiques) et des lysats de cellules corticales (Aragno *et al.*, 2003).

1.2 Les interactions entre la rhizosphère, les racines et les micro-organismes

La rhizosphère est un lieu d'intense activité racinaire et microbienne où s'effectuent les échanges entre le sol et la plante (par exemple l'adsorption d'eau et de nutriments minéraux par les racines, ou l'exsudation racinaire des substances organiques).

Les racines des plantes contribuent à la stabilité des agrégats, directement par les racines elles-mêmes et indirectement par la stimulation de l'activité microbienne. Les microorganismes rhizosphériques produisent des exopolysaccharides (EPS) qui constituent l'interface entre les cellules et leur environnement immédiat. Ils contribuent ainsi à la stabilité des microagrégats, régulation de la teneur en eau et notamment dans des conditions de stress hydrique (Fig.1) (Henaio valencia, 2008).

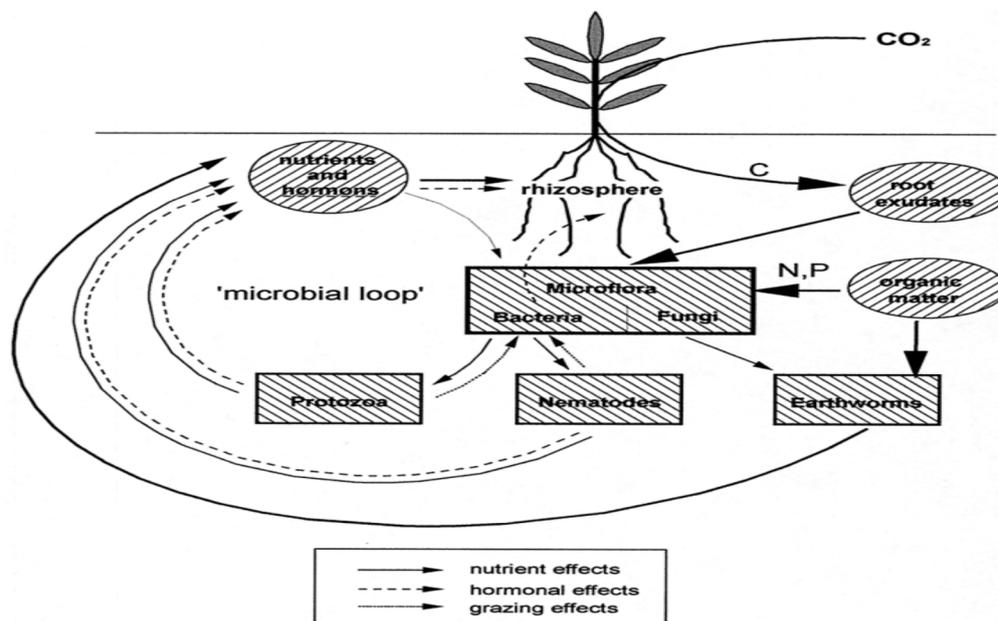


Figure 1. Interactions entre les racines des plantes, les microflores et la rhizosphère (Bonkowski *et al.*, 2000).

2 Rhizobactéries

Les rhizobactéries sont des bactéries dominantes dans la rhizosphère d'un certain nombre de plantes (blé dur, blé tendre, tournesol, colza, *Arabidopsis thaliana*...), mises en culture dans des sols de régions tempérées, semi-désertiques ou désertiques et ont été recherchées de façon systématique.

La très grande majorité des espèces ainsi révélées appartiennent à la famille des Rhizobiacées (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*) (Alami *et al.*, 2000; Kaci *et al.*, 2005; Hebbar *et al.*, 1992).

Elles peuvent être :

- Saprophytes ;
- Délétères (DRB, deleterious rhizobacteria) ;
- Bénéfiques, c'est le cas des rhizobactéries promoteurs de la croissance végétale (PGPR).

2.1 Les rhizobactéries saprophytes

Les rhizobactéries 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. Dès qu'une source d'énergie se trouve près de ces microcolonies, l'état de dormance des cellules microbiennes est levé; si des éléments nutritifs sont présents, les microorganismes se multiplieront rapidement (Chantigny *et al.*, 2005).

2.2 Les rhizobactéries délétères (DRB, deleterious rhizobacteria)

Sont des bactéries qui endommagent les tissus racinaires des plantes ou produisent des métabolites toxiques ce qui empêchent la croissance et le développement des racines. Brian et autres (1951) ont démontré que les métabolites de quelques micro-organismes de sol pouvaient défavorablement affecter le développement des plantes (Suslow *et al.*, 1982; Woltz *et al.*, 1978).

2.3 Les rhizobactéries promoteurs de la croissance végétale (PGPR)

Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes qu'elles colonisent par deux mécanismes :

-Directs : incluent la production des régulateurs de la croissance, la solubilisation des matériaux minéraux, la fixation de l'azote atmosphérique, la solubilisation du phosphate et la production de divers composés à faible poids moléculaire (tels que les phytohormones) et/ou composés antagoniques.

-Indirects : par l'intermédiaire des changements de la structure des sols rhizosphériques (Upadhyay *et al.*, 2011).

3 Les polysaccharides d'origine microbienne

Un polysaccharide est un polymère de résidus monosaccharidiques reliés entre eux par des liens glycosidiques. Ces liens se forment par l'élimination d'une molécule d'eau entre le groupe hémiacétal hydroxyle de l'extrémité de l'un et le groupe hydroxyle primaire ou secondaire du résidu suivant.

Les polysaccharides peuvent être linéaires, avec embranchements ou, dans certains cas, cycliques. Le degré de ramification du polymère a une incidence sur les propriétés physiques telles que la solubilité dans l'eau, la viscosité et les comportements gélifiants des solutions de polysaccharides (Cerning, 1994; Stephen *et al.*, 1995).

Toutes les cellules bactériennes synthétisent des polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Certains se trouvent dans le cytosol et servent de source de carbone et d'énergie, tandis que d'autres, tels les peptidoglycanes et les acides téichoïques, sont les constituants de la paroi. Le troisième type regroupe les polysaccharides élaborés et excrétés par la cellule dans le milieu de culture (EPS) (Dupont, 1998).

4 Les exopolysaccharides

Une grande majorité des micro-organismes vivent et se développent sous forme agrégée. Les biofilms sont une très bonne illustration de type d'organisation.

Ce phénomène naturel que l'on trouve chez les bactéries résulte généralement de leur fixation sur une matrice à l'aide de composés (ou substances) Polymériques Extracellulaires, communément appelées SPE ou EPS (Extrat Polymeric Substances).

Les EPS microbiens sont des polymères biosynthétiques ou biopolymères. Geesey (1982) les définit comme des "substances polymériques extracellulaires d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbien". D'autres auteurs tel que Characklis and 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 des substrats" (Garrido *et al.*, 2002).

4.1 Les propriétés des exopolysaccharides

Les propriétés 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, gélifiant, et solidifiant pour les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques (Ashtaputre *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995).

Ce sont ces caractéristiques particulières qui les différencient des autres molécules organiques. Ces propriétés dépendent étroitement de la structure des EPS qui sont donc la résultante à la fois des propriétés physico-chimiques de leurs oses constitutifs et de celles dues à leur architecture moléculaire (Kaci Y., 2006).

4.2 Classification des exopolysaccharides

4.2.1 Sur le plan composition

Les EPS sont composés principalement de macromolécules formées par polymérisation d'unités similaires ou identiques. Ils peuvent aussi contenir les groupements non polymérisés de faible poids moléculaire qui modifient fortement la structure et les propriétés physico-chimiques des EPS. Par exemple, les polysaccharides

extracellulaires peuvent porter des groupements acétyl, succinyl ou pyruvyl ou des constituants inorganiques tels que les sulfates (Garrido *et al.*, 2002).

Les EPS sont divisés en deux grandes classes :

- Les homopolysaccharides ;
- Les hétéropolysaccharides.

a) Les homopolysaccharides

Ce sont des polymères constitués d'un seul type de sucre (Petit, 2005). Ils peuvent être classés en quatre groupes :

Les α -D glucane, les β -D glucane, les fructane et autres comme les polygalactanes (Bergmaier, 2002).

Les homopolysaccharides sont caractérisés par un poids moléculaire souvent très élevé. Ainsi le poids moléculaire du dextrane varie entre $6,2$ et $7,1 \cdot 10^6$ Da.

Parmi les homopolysaccharides les plus étudiés :

-Les dextrans produits par *Leuconostoc mesenteroides* sont des polyglucanes $\beta(1,4)$ formant un gel en solution (Sutherland, 1972) (Fig .2).

-Les curdlanes sécrété par *Agrobacterium radiobacter* sont des polyglucanes $\beta(1,3)$ formant un gel en solution (Phillips *et al.*, 1983).



Figure 2: Structure du dextrane, un homopolymère (Bergmaier, 2002).

b) Les hétéropolysaccharides

Les hétéropolysaccharides représentent la très grande majorité des polysaccharides bactériens. Ils forment un vaste groupe et sont composés d'unités répétitives de 2 à 10 sucres de complexité variable. Ils peuvent être ramifiés ou linéaires.

Parmi les hétéropolysaccharides les plus étudiés:

- le xanthane sécrété par *Xanthomonas campestris* (Morris, 1995) (Fig.3).
- Le gellane est produit par *Pseudomonas elodea* (O'Neill et al., 1983).

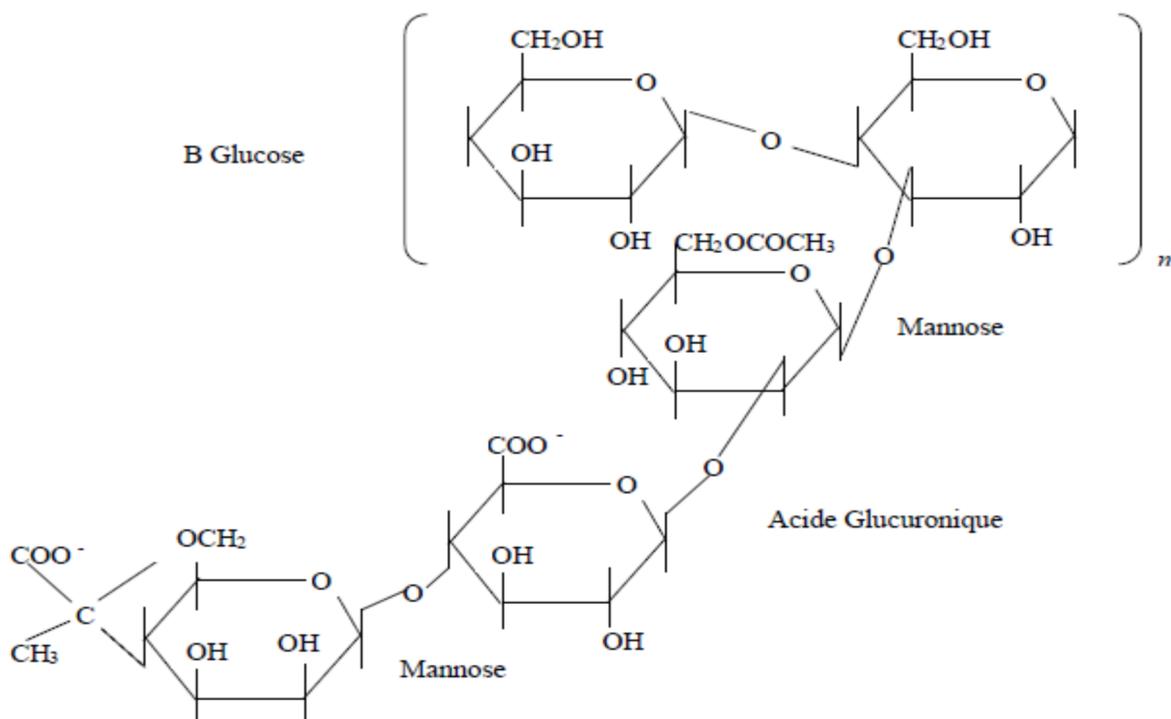


Figure 3. Structure d'un Hétéropolysaccharide : Xanthane (Steinbüchel et Rhee, 2005).

4.2.2 Sur le plan localisation

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 microorganismes (Henao valencia, 2008; Skorupska *et al.*, 2006).

4.3 Localisation des EPS dans la rhizosphère

Les observations d'*A. thaliana* inoculées par YAS 34, montre que l'EPS est bien produit dans la rhizosphère, mais que la synthèse de l'EPS n'est pas essentielle pour produire des biofilms sur les racines ce qui n'était pas attendu. La production d'EPS est localisée sur des parties spécifiques des racines en particulier dans la partie basale, alors que c'est dans la partie subapicale qu'on les trouve habituellement (exsudation maximale).

Des déterminants de cette production sont à rechercher peut être dans la nature des exsudats. Cette production d'EPS est indispensable pour la survie de la bactérie dans la partie basale (Santaella *et al.*, 2008).

4.4 Biosynthèse et sécrétion des EPS

La biosynthèse des polysaccharides dépend de l'activité d'un complexe de protéine localisé dans les membranes internes et externes. L'efficacité de la translocation de polysaccharide s'est avérée due à l'association physique des protéines localisées dans les deux membranes (Marczak *et al.*, 2008).

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.

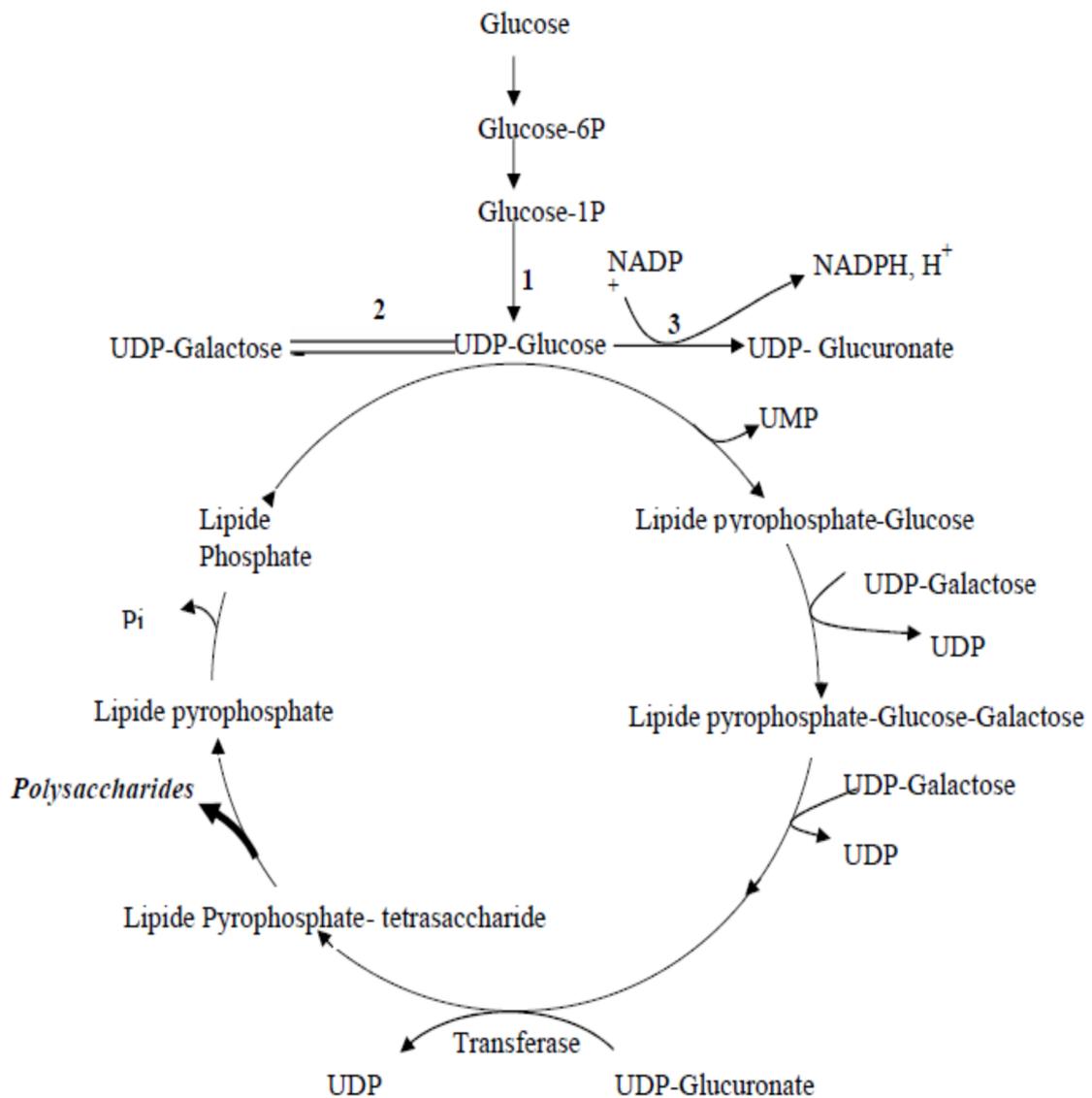
Par exemple les dextrans, composés exclusivement de glucoses, la biosynthèse fait intervenir une seule enzyme, la dextrane sucrase qui est une D glycosyl- transférase et qui va transférer le D-glucose du saccharose (substrat spécifique de la synthèse) sur un accepteur.

En ce qui concerne les **hétéropolysaccharides**, les voies de biosynthèse sont plus complexes. La première étape se situe dans le cytoplasme grâce à différentes glycosyl-transférases très spécifiques qui vont permettre la formation d'une séquence répétitive. Les séquences (ou motifs) vont être ensuite exportées, polymérisées et libérées dans le milieu (Jolly *et al.*, 2002).

Pour bien comprendre ce type de mécanisme, nous avons choisi l'exemple de la biosynthèse d'hétéropolysaccharidique chez *Klebsiella aerogenes* (Sutherland et Norval, 1970). Les monosaccharides sont activés par des précurseurs tels que UDP et GDP et additionnés un à un sur le lipide phosphate pour former la sous unité oligosaccharadique avec transformation du lipide phosphate en lipide pyrophosphate.

Le lipide pyrophosphate subit une déphosphorylation et devient lipide phosphate libre, prêt à entamer la synthèse d'une autre sous unité oligosaccharidique.

Ce processus se poursuit pour obtenir à la fin un polysaccharide constitué d'une succession régulière d'unités oligosaccharidiques. Le lipide impliqué est un isoprénoïde de phosphate semblable à un transporteur lipidique (De Vuyst *et al.*, 2001) et qui intervient dans la biosynthèse du peptidoglycane et des L.P.S (Fig.4).



- 1 : UDP Glucose Pyrophosphorylase
- 2 : UDP Glucose épimérase
- 3 : UDP Glucose deshydrogénase

Figure 4 : Biosynthèse de polysaccharide extracellulaire chez *Klebsiella aerogenes* (Sutherland et Norval, 1970).

4.5 Rôles et fonctions des EPS pour la souche productrice

La production d'EPS demande beaucoup d'énergie et il paraît donc improbable qu'une bactérie utilise autant d'énergie et de substrat sans en tirer un avantage. Sous des conditions naturelles, et donc fortement concurrentielles, les EPS semblent donner aux bactéries un avantage compétitif et leur permettre de survivre (Petit, 2005).

Dans la nature, les exopolysaccharides remplissent plusieurs fonctions, celles d'une barrière physique favorisant la lutte contre la phagocytose ou encore contre la dessiccation, une réponse à un stress environnemental, ou encore une fonction essentielle dans les processus d'interactions et reconnaissances cellulaires. Mais surtout, et parmi les mieux décrites, il y a celle d'assurer la fixation irréversible des micro-organismes sur les surfaces exposées en milieu naturel et de favoriser, en concentrant et piégeant la matière organique et les oligo-éléments nécessaires à la croissance de ces bactéries, la formation d'un voile biologique (ou biofilm) (Guezennec *et al.*, 2004; Quérellou *et al.*, 2010).

4.6 Application des EPS

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) :

4.6.1 Cosmétique

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

4.6.2 Diagnostic microbiologique

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

4.6.3 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 possède 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).

4.6.4 Applications agronomiques

Lorsque les micro-organismes du sol redeviennent actifs, ils sécrètent un mucilage riche en glucides et en protéines dont la fonction première est d'assurer une protection contre la dessiccation. Ce mucilage est collant et a tendance à s'agglutiner aux particules de sol adjacentes, constituant ainsi de petites entités autour des cellules microbiennes ayant une stabilité et une cohésion supérieure à celle du milieu environnant ; c'est ce qu'on appelle un agrégat (Tisdall *et al.*, 1982) (Fig.5).

D'autres part, la nature anionique de la majorité des EPS, leur confère une capacité de rétention d'eau (Sutherland, 1988; Whitfield, 1988).

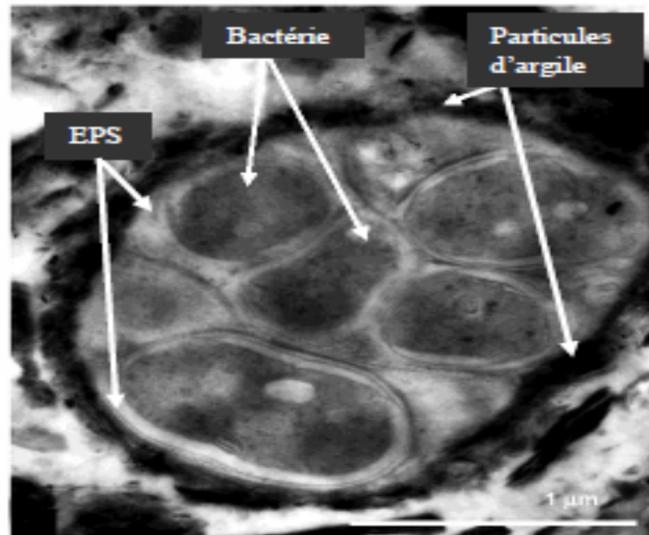


Figure 5. Photo d'un microagrégat bactérien issu du sol rhizosphérique (Blanchart *et al.*, 2000).

4.6.5 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 États-Unis et en Europe. Le gel est caractérisé par une bonne saveur et est stable sur une vaste gamme de valeurs de pH.

-le **xanthane** peut être utilisé dans une vaste gamme d'aliments, car il est compatible avec la plupart 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 épaissement 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).

4.6.6 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, 2001). 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 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).

5 Les biofilms

L'attachement sur une surface est " une stratégie de survie " qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement ; les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de biofilm.

Le biofilm se définit comme une population bactérienne adhéree à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharide (Filloux *et al.*, 2003). Ces composés déterminent en partie les propriétés physico-chimiques et biologiques des biofilms. Ils forment un micro-environnement très particulier qui peut constituer un véritable milieu sélectif pour les micro-organismes (Wingender *et al.*, 1999).

5.1 La survie des micro-organismes dans le biofilm

Au sein du biofilm, les micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfuies du biofilm, et, d'autre part, d'évacuer les déchets. Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'exopolysaccharide et être utilisé par

les bactéries. Un gradient de nutriments et d'oxygène est observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où l'on a un micro-environnement anaérobie. Cette observation confirme l'idée selon laquelle l'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de sa structure (Filloux *et al.*, 2003).

6. Quelques inconvénients des exopolysaccharides

D'une part, la présence des EPS n'est pas souhaitée dans certains procédés de fabrication et dans certains produits. Ils occasionnent des pertes économiques considérables causées par l'obstruction des conduites d'écoulement des fluides, des filtres ou des échangeurs de chaleur. Tel que le dextrane. De plus, la production d'EPS par certaines souches dans les vins, les bières et les produits carnés emballés sous vide est non souhaitée car elle représente une altération du produit rendant celui-ci impropre à la consommation (Bergmaier, 2002).

D'autre part, la production de glucane par *Streptococcus mutans* permet à la souche de coller aux dents et participer à la formation de la plaque dentaire (Gerbaux, 1994).

Chapitre II

Matériel et méthodes

1 Isolement des bactéries productrices d'exopolysaccharides

Les bactéries productrices d'EPS sont isolées à partir du sol rhizosphérique et des racines du blé dur de variété Waha (de *Triticum durum L.*) cultivé dans trois sols différents (Boudjelil (Bejaïa), Sebkha(Oran), Tindouf).

Les échantillons de sol ont été séchés à l'air libre, tamisés, et mis dans des pots contenant 400 g de chaque sol et cultivé avec du blé dur pendant 4 semaines.

A partir des racines : les racines du blé dur sont broyées après élimination du sol adhérent puis sont mis en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

A partir du sol adhérent : 1g du sol adhérent à la racine est mis en suspension dans 9ml d'eau physiologique.

Des ensemencements sont réalisés en surface, en étalant 0,1ml de ces solutions dans des boîtes de pétries contenant le milieu RCV-saccharose. Ce milieu est utilisé pour l'isolement et la sélection des souches bactériennes productrice d'EPS, il est très riche en saccharose (20g/l) de manière à stimuler la production des EPS.

Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant cinq jours, les colonies bactériennes dites productrices d'EPS sont reconnaissables par leurs aspect gommeux et visqueux.

2 Purification des bactéries productrices d'EPS

La purification de ces bactéries s'opère par plusieurs repiquages : d'abord on prélève les colonies à partir du milieu gélose nutritif (GN) pour les repiquer deux fois de suite sur le milieu RCV-saccharose. 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. La conservation se fait sur milieu RCV-saccharose à 4°C en tubes à essais inclinés.

3 Influence de la nature de la source de carbone sur les souches productrices d'EPS

Afin d'évaluer l'influence de trois substrats carbonés: glucose, saccharose et mannitol sur la croissance des souches productrices d'EPS, on ensemence les cultures bactériennes dans des milieux solides RCV-glucose, RCV-saccharose, RCV-mannitol. Puis les incubées à 30°C pendant cinq jours.

4 Identification des bactéries productrices d'EPS**4.1 Etude des caractères morphologiques**

Les isolats sélectionnés, ont été examinés à partir des cultures de 5 jours, obtenus sur milieu RCV-saccharose à 37°C.

a) Caractères cellulaires

Cette étude est basée sur des observations microscopiques (x100) permettant de différencier le type de Gram (annexe), la forme, la mobilité ainsi que la disposition des cellules.

b) Caractères coloniales

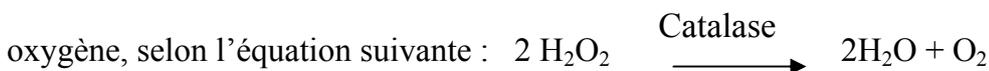
Les critères descriptifs pour les colonies sont les suivants : la forme, la couleur, l'aspect de la surface, le diamètre, l'opacité et l'élasticité.

4.2 Etude des caractères biochimiques

Les tests biochimiques sont réalisés à partir des colonies isolées d'un milieu de général (culture fraîche de 18 heures).

4.2.1 Recherche de la catalase**a) Principe**

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène, selon l'équation suivante :



b) Technique

Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes, puis prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

c) Lecture

La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène.

4.2.2 Recherche d'une nitrate-réductase**a) Principe**

La recherche d'une nitrate-réductase se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Toutefois, comme certaines bactéries réduisent les nitrates au-delà du stade nitrites, toute réaction apparaissant négative (absence de coloration rose ou rouge) doit être contrôlée pour constater la présence ou la disparition des nitrates contenus à l'origine dans le milieu.

Dans ce but, on ajoute au milieu de la poudre de zinc. Le zinc est un agent réducteur capable de réduire en quelques minutes les nitrates en nitrites.

Si la réaction est véritablement négative, les nitrates toujours présents dans le milieu sont réduits en nitrites sous l'action du zinc et une coloration rose ou rouge apparaît.

Si la réaction est faussement négative, les nitrates ont été réduits par les bactéries en azote gazeux. Le milieu ne contient plus de nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la teinte du milieu n'est pas modifiée.

b) Technique

Cultiver les bactéries dans un bouillon nitraté, puis les incuber à 37°C jusqu'à l'obtention d'une culture abondante. Ajouter ensuite une ou deux gouttes d'acide parasulfanilique en milieu acétique (réactif NIT I) puis une à deux gouttes d'alpha-naphtylamine en milieu acétique (réactif NIT II).

c) Lecture

-Apparition en quelques secondes d'une coloration rose ou rouge : réaction positive, la bactérie réduit les nitrates en nitrites

- Absence de coloration : ajouter de la poudre de zinc :

- Apparition en cinq minutes d'une coloration rose ou rouge : réaction négative.
- Absence de coloration : réaction positive (bactérie réduisant les nitrites jusqu'au stade azote gazeux).

4.2.3 Test LDC (Lysine décarboxylase) et ODC (Ornithine décarboxylase)**a) Principe**

Ces enzymes, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés.

La décarboxylation de la lysine produit de la cadavérine, la L-ornithine est décarboxylée en putrescine. Les milieux utilisés ne contiennent qu'un seul acide aminé (lysine ou ornithine) et du glucose.

La recherche de ces enzymes n'est effectuée que pour des bactéries à métabolisme fermentatif. Dans un premier temps, les bactéries fermentent le glucose et les milieux s'acidifient. Dans un second temps, la production éventuelle d'une décarboxylase conduit à la formation de composés alcalins et à l'alcalinisation du milieu.

Technique

Ensemencer chacun des deux tubes avec une suspension bactérienne, et réaliser une anaérobiose en recouvrant la surface du milieu d'huile de paraffine et incuber à 37°C.

b) Lecture

-Apparition d'une coloration jaune (acidification du milieu) : réaction négative.

-Apparition d'une coloration violette (milieu alcalin): réaction positive.

4.2.4 Production d'indole**a) Principe**

Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du réactif de Kovacs pour donner un composé coloré en rouge.

b) Technique

Après une culture de 24 heures à 37°C sur le milieu eau-péptonée, ajouter une goutte du réactif de Kovacs au milieu.

c) Lecture

Réaction positive: apparition d'un anneau rouge en surface.

Réaction négative : milieu incolore ou présentant une légère coloration jaune.

4.2.5 Etude du type respiratoire**a) Principe**

Les milieux utilisés contiennent du glucose (métabolisme énergétique), mais ils sont dépourvus de nitrates. On utilise des géloses profondes telle que la gélose VF (viande foie), coulées dans des tubes longs et étroits (180 mm x 9 mm).

b) Technique

Plonger l'effilure d'une pipette pasteur dans une suspension de la bactérie à étudier, transporter l'inoculum dans le fond du tube maintenu en surfusion, puis remonter la pipette en décrivant des tours de spires très serrés en prenant soin de ne pas aérer le milieu. Incuber à 37 °C durant 18 à 24 heures.

c) Lecture

Après incubation, on peut reconnaître quatre types respiratoires :

- Bactérie aérobie: croissance uniquement dans la zone superficielle de la gélose.
- Bactérie anaérobie :croissance uniquement dans la zone profonde de la gélose.

- Bactérie aéro-anaérobie: croissance sur toute la hauteur de la gélose.
- Bactérie micro-aérophile : croissance dans un cylindre de gélose d'environ 0,5 cm de hauteur et situé à environ 1 à 2 cm de la surface.

4.2.6 Test TSI

a) Principe

Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH).

- Les bactéries qui fermentent le lactose ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube.
- Les microorganismes ne fermentant aucun des trois sucres ne modifient pas la couleur du milieu.

La production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

b) Technique

Ensemencer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées.

Incuber à 37°C pendant 24 heures (capsules desserrées) de manière à favoriser les échanges gazeux.

c) Lecture

La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

Fermentation de glucose :

- culot rouge : glucose non fermenté.
- culot jaune : glucose fermenté.

Fermentation du lactose et/ou du saccharose :

- pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés.
- pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s).

Production de gaz :

- apparition de gaz dans le culot.

Formation d'H₂S :

- formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

4.2.7 Test VP et RM

a) Principe

Le glucose utilisé par les bactéries, est dégradé en acide pyruvique qui est un intermédiaire clef du métabolisme des glucides. Selon les bactéries, l'acide pyruvique peut être complètement oxydé ou être le point de départ de diverses voies fermentaires.

Test RM : La fermentation acide mixte conduit à la production des acides qui provoquent une acidification importante d'un milieu glucosé.

Test VP : permet de caractériser l'acétoïne. En présence d'oxygène et d'une base forte (soude 4M ou potasse 4M), l'acétoïne est oxydée en diacétyl qui forme un complexe coloré en rose en réagissant avec une fonction amine d'un groupement guanidyle des protéines. La réaction est plus sensible et plus rapide en présence d'alpha-naphtol.

b) Technique

Ensemencer un milieu de Clark et Lubs et incuber à 37°C pendant 24 heures.

Prélever 2 fois 1 ml du milieu et les transvaser dans deux tubes à essai

* test RM :

- ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle,
- la lecture est immédiate.

* test VP :

- ajouter 10 gouttes de soude concentrée ou de potasse(VPI) et le même volume d'alpha naphtol(VPII).

- incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation.
- attendre quelques min à 1 heure.

c) Lecture

* test VP :

- Anneau rouge en surface : test positif.
- Anneau jaune en surface : test négatif.

* test RM :

- Milieu rouge : test positif.
- Milieu jaune : test négatif.

4.2.8 Test de Mannitol mobilité**a) Principe**

Le mannitol est un produit de réduction du mannose. La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes.

Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle: étude de mobilité

Technique

Ensemencer par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit et incuber 24 heures à température optimale.

c) Lecture

La mobilité :

- Culture dans tout le milieu : souche mobile.
- Culture le long de la piqûre: souche immobile.

Utilisation du mannitol :

- Milieu devenu jaune : test positif.
- Milieu rouge : test négatif.

5 Extraction des EPS

La première étape de purification des EPS est souvent une centrifugation, afin de séparer les cellules du milieu. Cependant, la viscosité élevée empêche souvent une sédimentation des cellules et rend la séparation plus difficile ; alors l'addition d'un solvant organique au surnageant résulte en une précipitation de toutes les macromolécules, incluant les EPS de la solution.

5.1 Technique d'extraction

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

Le surnageant est ensuite récupéré et les EPS sont précipités à l'éthanol pur et froid, dans un rapport volumique : 1 volume de surnageant / 3 volumes d'éthanol. 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 rmp pendant 20 minutes (kaci, 2006).

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

6 Dosage des EPS par la méthode colorimétrique à l'Anthrone

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

La teneur des surnageants de cultures en sucres totaux est déterminée par comparaison avec une droite de corrélation DO à 625nm=f (glucose) (annexe).

Les résultats obtenus avec cette méthode de dosage sont exprimés en (μg d'EPS/ml) (Bachelier *et al.*, 1966).

7 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 20 min.

a) Principe

La technique de dosage de protéines retenues 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 Coomassie G-250 postes à partir de 465 nm (forme cationique rouge) à 595 nm (forme anionique bleue) lors de la liaison aux protéines. Les interactions hydrophobes et ioniques stabilisent la forme anionique du colorant, entraînant un changement de couleur visible.

b) Mode opératoire

- Des aliquotes de cultures de 10 ml sont centrifugées à 7000 g /20 min 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 min.

c) Dosage des protéines

- A 0,2 ml d'échantillon pur ou dilué, ajouter 2 ml de réactif au bleu de Coomassie G250,
- Agiter par vortex
- Laisser reposer 3 min
- Lire l'absorbance à 595nm

La teneur des culots cellulaires en protéines est déterminée par comparaison avec une droite de corrélation DO à 595 nm= f (albumines bovines).

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

8 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.

Sublimer 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).

8.1 Technique

Des cultures bactériennes sont produites dans des Erlen Meyer de 500 ml, contenant 250 ml de milieu RCV-saccharose. Ces flacons bouchés au coton cardé sontensemencés avec une culture bactérienne. L'incubation est réalisée sous agitation à 30°C. Après 7 jours, les cultures sont centrifugées à 6000 rpm à 4°C pendant 20 min.

Le surnageant contenant la fraction EPS a été filtré sous vide respectivement sur des membranes de 8µm, 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 3 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 boites de pétri en verre pendant une nuit puis la lyophilisation (figure 6).

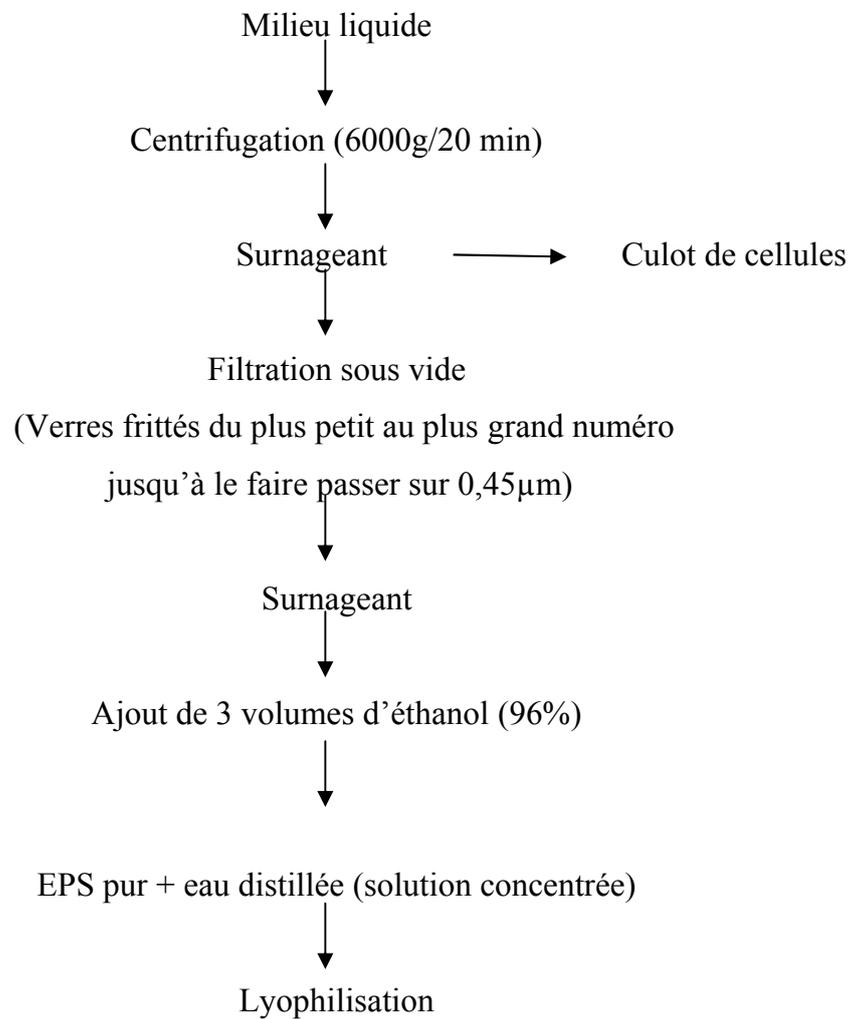


Figure 6. Schéma représentatif de la technique de Lyophilisation.

Chapitre III

Résultats et discussions

1 Influence de la nature de source de carbones sur les souches productrices d'EPS

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

L'effet le plus remarquable étant obtenu en présence de saccharose à une concentration de 20g/l, tandis que dans le milieu RCV-glucose, aucune souche productrice d'EPS n'est aperçue. Dans le milieu RCV-mannitol, la souche RO5 présente la même croissance que dans le saccharose, alors que celle de RB'-2 est faible (Tableau I).

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

Souches	Milieu RCV-saccharose	Milieu RCV-mannitol	Milieu RCV-glucose
SS'-30	+	-	-
RB'-2	+	+	-
RO8	+	-	-
RO5	++	++	-
RT13	+	-	-

+ : Croissance des souches productrices d'EPS.

- : Pas croissance des souches productrices d'EPS.

++ : Même croissance.

❖ Discussion

En général, nos résultats sont en accord avec la littérature ; la nature du substrat carboné a un effet sur la croissance des souches productrices d'EPS 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).

2 Identification des bactéries productrices d'EPS

2.1 Etude des caractères morphologiques

a) Caractères cellulaires (Tableau II)

La caractérisation a porté sur (5) souches bactériennes productrices d'exopolysaccharides, sélectionnées parmi les 20 isolats sur la base de deux critères, essentiels, la production d'exopolysaccharides ainsi que l'élasticité de leur EPS nommées :

RO5, RO8, RT13, SS'-3O et RB'-2 (annexe).

Pour les critères cellulaires, les examens microscopiques révèle que les souches sont tous mobiles et Gram⁻ à l'exception de la souche RO8 qui est Gram positif.

Les souches bactériennes présentent des formes cellulaires différentes, dont RO5 et RT13 sont des petits bacilles, SS'-3O est de long bacille tandis que RO8 et RB'-2 sont respectivement diplococcobacille et court bâtonnet.

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 leurs croissances dans le milieu liquide.

Caractères Souches	Caractères cellulaires			Croissance dans le milieu liquide
	Forme	Gram	Mobilité	
RO5	Petit bacille	–	+	Dépôt
RO8	Diplococcobacille	+	+	Trouble
SS'-3O	Long bacille	–	++	Dépôt
RT13	Petit bacille	–	+	Dépôt
RB'-2	Bâtonnet (court)	–	+	Dépôt

++ : Très mobile.

b) Caractères coloniales

Nous relevons du tableau III que les colonies des différentes souches sur le milieu RCV-saccharose sont toutes arrondies, convexes, régulières, brillantes, gommeuses.

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'-3O et RB'-2 sont opaques avec une couleur beige.

Pour le critère d'élasticité, les colonies formées par les souches RO5, RO8 et RT13 et RB'-2 sont toutes visqueuses sauf la souche SS'-3O qui présente une très bonne élasticité (figure 7).



(a)



(b)



(c)

(a) : Morphologie de colonies de la souche RT₁₃.

(b) : Morphologie de colonies de la souche SS'-30.

(c) : Morphologie de colonies de la souche RO₅.

Figure 7. Morphologie de colonies productrices des exopolysaccharides.

Tableau III : Caractères culturels des souches bactériennes.

Caractères Souches	Caractères culturels						
	Forme	Aspect	Élévation	Brillance	Opacité	Elasticité (EPS)	Couleur
RO5	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Translucide	-	Transparente
RO8	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Translucide	-	Transparente
SS'-30	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Opaque	+++	Beige
RT13	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Translucide	-	Transparente
RB'-2	Arrondie à bord régulier	Lisse	Convexe	+	Opaque	-	Beige

2.2 Etude des caractères biochimiques (Tableau IV)

➤ Types respiratoire et métabolique :

Toutes les souches étudiées sont des aéroanaérobies, elles ne fermentent pas le glucose et ne produisent pas de gaz et H₂S à l'exception de la souche SS'-30 qui fermente le glucose, le lactose et/ou le saccharose et produit du gaz. Tandis que les souches RO5 et RT13 ne fermentent pas les trois sucres. Le type fermentaire de la souche SS'-30 est VP⁺ RM⁻, alors que les autres sont VP⁻ RM⁻.

Quand au teste indole, le résultat révèle que les souches n'hydrolysent pas le tryptophane pour donner une molécule d'indole. Et pour le métabolisme du mannitol, toutes les souches sont mannitol⁻ à l'exception des souches SS'-30 et RO8.

➤ Présence des enzymes :

-La souche SS'-30 possède une nitrate réductase, lysine décarboxylase et ornithine décarboxylase.

-La souche RB'-2 présente une LDC, alors que la souche RO5 présente une nitrate réductase.

-Les souches, RO8, RT13 possèdent une catalase, nitrate réductase et LDC pour cette dernière.

Tableau IV : Résultats de la caractérisation biochimique des souches bactériennes.

Souches		SS'-3o	TR13	RB'-2	RO8	RO5
Tests						
Pente	Lact et/ou sacch	croi	abs	croi	croi	abs
Culot	Glu	croi	abs	abs	abs	abs
	Gaz	+	-	-	-	-
	H ₂ S	-	-	-	-	-
Nitrate réductase		+	+	-	+	+
VP		+	-	-	-	-
RM		-	-	-	-	-
Indole		-	-	-	-	-
LDC		+	+	+	-	-
ODC		+	-	-	-	-
Catalase		-	+	?	+	-
Mannitol		+	-	-	-	-
Mobilité		-	-	-	-	-
VF		aéroanaérobie	aéroanaérobie	aéroanaérobie	aéroanaérobie	aéroanaérobie

+ : test positif.

Abs : absence de croissance.

- : test négatif.

Coi : la croissance

❖ Discussion

D'après les résultats obtenus sur les critères morphologiques et biochimiques des isolats, on révèle une différence phénotypique entre les souches bactériennes, cela est due au types du sol et la nature des exsudats racinaires, qui constituent une source de carbone pour les populations.

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. Selon Roberson et Firestone (1992), cet aspect muqueux, lié à la production d'EPS, répond à un besoin de protection de la part des bactéries.

L'analyse des caractères cellulaires des cinq souches montre que la plupart des souches sont Gram- et mobile. C'est ainsi que Stengel *et al.* (1998), ont montré que les groupes bactériens les plus favorisés dans la rhizosphère sont mobiles donc aptes à répondre au chimiotactisme exercé par les exsudats racinaires, de sorte que les bactéries de la rhizosphère utilisent ces exsudats comme signaux qui guident leurs mouvements vers la surface racinaire (Bauer et Caetano-Anolles, 1990).

La taille des colonies semble plutôt dépendre d'EPS produit par les bactéries. Ces EPS sont reconnaissables par leurs aspects visqueux, sont secrétés dans le milieu sous forme d'une gangue muqueuse (Reubet *et al.*, 1991).

Les genres bactériens les plus souvent isolés de la rhizosphère sont des bactéries à Gram- (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, Entérobactéries, *Sinorhizobium meliloti*, *rhizobium*, *agrobacterium*, *rhodopseudomonas*, *klebsiella pneumoiae*, *nitrobacter*...) et Gram+ (*Bacillus*, *Arthrobacter*), caractérisées par une vitesse de croissance rapide, les bactéries à Gram négatif bénéficient d'un avantage compétitif par rapport aux autres bactéries qui réagissent plus lentement à la source d'énergie disponible (Amellal, 1996).

Ainsi Kaci (2006), a montré que les souches Gram-, isolées de différentes régions d'Algérie présentent des activités métaboliques plus diversifiées que celles des bactéries Gram +. Elles touchent aussi bien l'utilisation de glucides, d'acides organiques ou d'acides aminés comme seule source de carbone. Ce qui laisse entrevoir des capacités d'adaptation importantes.

Au regard des résultats enregistrés, et la comparaison aux critères d'identifications des souches qui se trouvent dans la rhizosphère du blé dur, on constate que :

- ✓ La souche SS'-30 peut appartenir à la famille d'Enterobactériaceae (*Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei* et *Serratia*)
- ✓ La souche RO8 peut appartenir à la famille Micrococcaceae, *Micrococcus*, (*Micrococcus roseus* et *Micrococcus agilis*).
- ✓ Pour les souches RO5, RT13 et RB'-2 peuvent appartenir aux *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Agrobacterium*.

3 Comparaison des niveaux de production des EPS et croissance microbienne

La quantité d'EPS produite peut varier considérablement d'une souche bactérienne à l'autre, alors la souche RO₈ s'avère la plus productrice avec une valeur 0,449 µg/ml que les souches RO₅, RT₁₃ et RB'₂ où leurs valeurs respectivement sont : 0,211 µg EPS/ml, 0,204 µg EPS/ml, 0,201 µg EPS/ml, tandis que la souche SS'₃₀ présente la production la moins importante avec une valeur de 0,177 µg EPS/ml (Fig. 6).

Les résultats de dosage de protéines (Fig. 7), montre que la biomasse protéique la plus importante est observée pour la souche SS'₃₀ dont sa valeur est 0,068 mg de protéine/ml ; suivie des souches RT₁₃ et RO₈ avec des valeurs respectives de 0,04 et 0,032 mg de protéine/ml. Alors que les souches RB'₂ et RO₅ présentent une croissance la plus faible (0,007 et 0,004 mg de protéine/ml respectivement).

Pour avoir une meilleure appréciation de la production d'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 productions brutes, elle consiste à rapporter les niveaux de production des exopolysaccharides à l'unité protéique. D'après les résultats obtenus (Fig. 8), on peut classer nos souches en trois types :

Souches très productives : RO₅ et RB'₂ qui ayant les taux de productivité 51,02 et 27,45 µg d'EPS/mg de protéine successivement.

Souches moyennes productives : RO₈ et RT₁₃ qui ayant les taux de productivité 13,68 et 5,04 µg d'EPS/mg de protéine successivement.

Souches peu productives : c'est le cas de la souche SS'₃₀ avec un taux de productivité 2,58 µg d'EPS/mg de protéine.

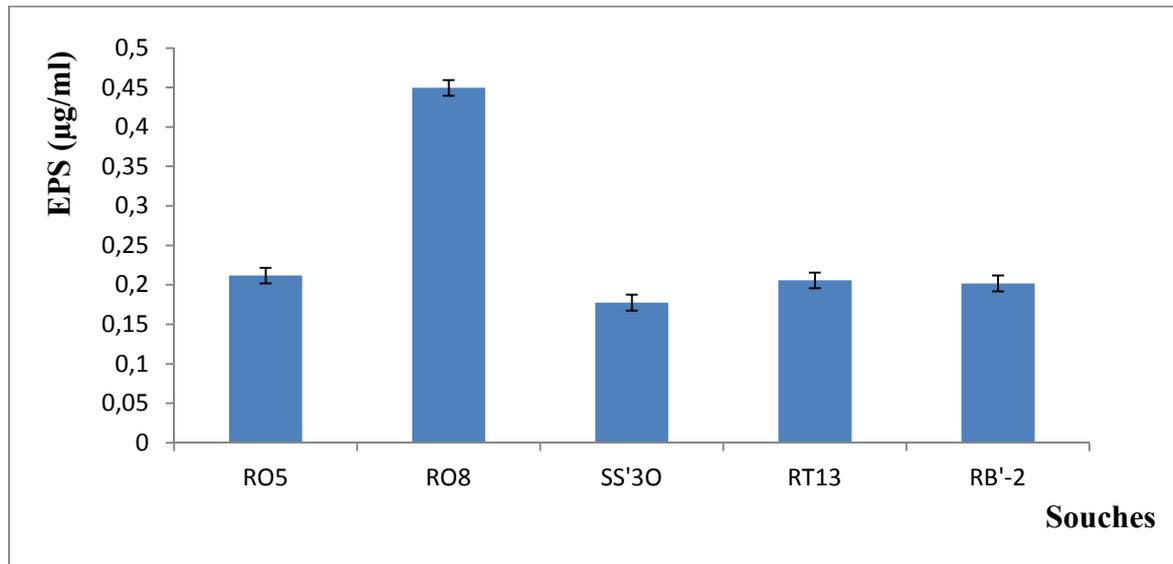


Figure 8. Production des exopolysaccharides des différentes souches isolées sur le milieu RCV-saccharose après 48h d'incubation à 30 °C.

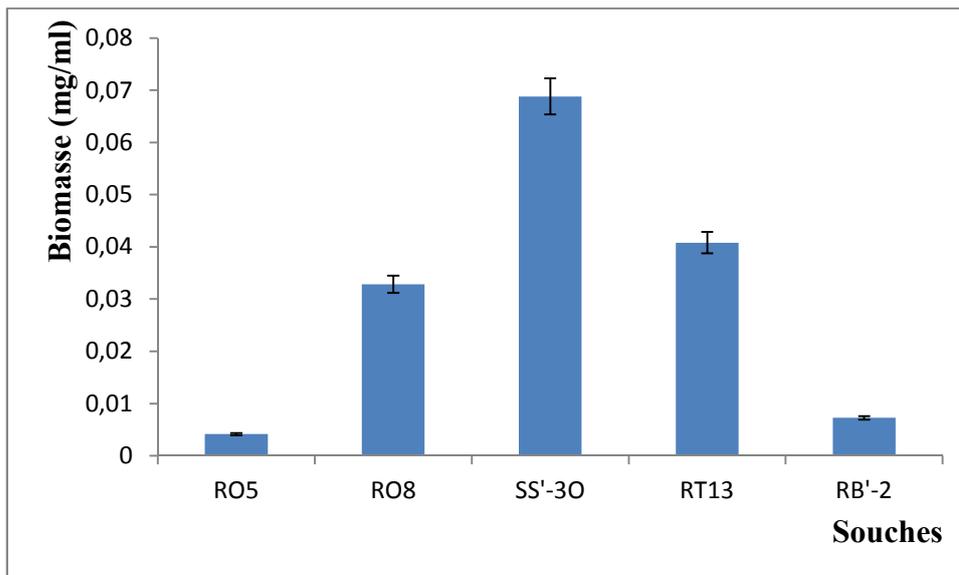


Figure 9. Croissance cellulaire de différentes souches isolées sur le milieu RCV-saccharose après 48h d'incubation à 30 °C.

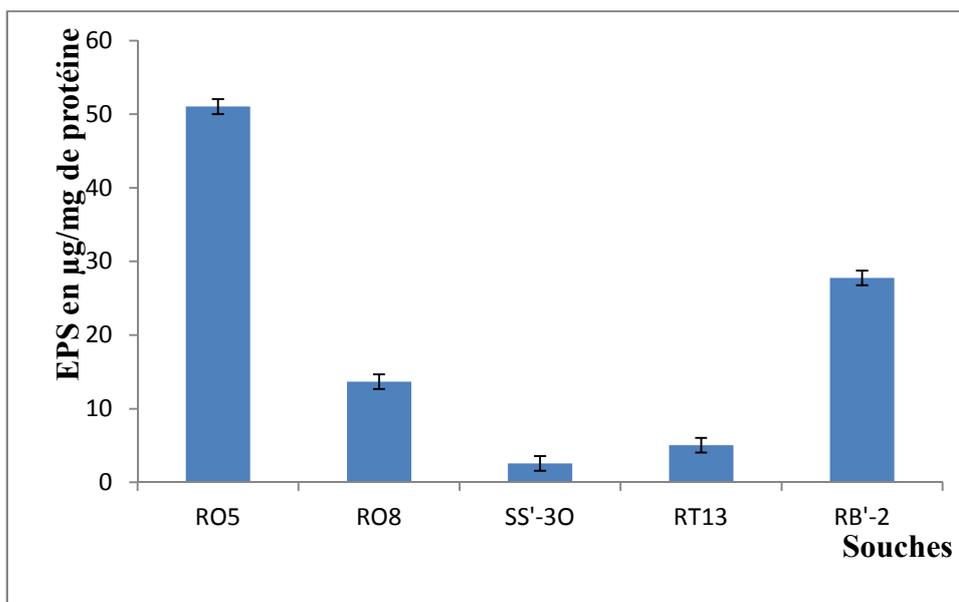


Figure 10. Résultats de la productivité obtenus sur le milieu RCV-saccharose.

❖ Discussion :

Une forte concentration en saccharose (20g/l) et une faible teneur en azote dans le milieu, permet d'augmenter la pression osmotique du milieu de culture. En réponse à ces conditions environnementales stressantes, les bactéries se protègent en produisant des quantités d'EPS plus importantes qui servent de zone tampon contre les changements extérieurs de potentiel hydrique.

Par ailleurs, le stress osmotique ne constitue pas la seule contrainte engendrée par une forte concentration en glucides (saccharose 20g/l), la gélose à 15g/l permet de diminuer d'avantage l'activité de l'eau et donc son accessibilité par les bactéries, augmentant le déficit hydrique (Kaci, 2006).

Toutes les observations liées aux contraintes que subissent les bactéries productrices d'EPS ont mené Cerning (1994) à proposer l'hypothèse selon laquelle, un stress environnementale stimulerait la synthèse d'un "gel" protecteur (EPS).

La biosynthèse des EPS peut varier en fonction des conditions environnantes et de la phase de croissance de la bactérie étudiée (Huang *et al.*, 1995), ainsi que la vitesse de croissance et le potentiel de synthèse d'EPS (rendement des cellules qu'elle renferme).

La productivité chez les cinq souches testées, varient entre 2,58 et 51,02µg d'EPS / mg de protéines, ces variations de la productivité indiquent que le potentiel de synthèse des cellules en EPS varie d'une souche à une autre, selon Sutherland, (1985) cela peut être à l'origine de la variabilité génétique des souches.

Conclusion

Conclusion

Au sein de l'ensemble des populations bactériennes présentées dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum L.*), cultivé dans trois sols différents (Boudjelil, Sebkha, Tindouf), les bactéries productrices des EPS sont dominantes. Ces dernières présentent des différences métaboliques importantes, ce qui confirme la diversité de ces populations.

Les résultats obtenus sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques de ces souches bactériennes, illustrent qu'elles se présentent sous forme bacilles ou cocci, muqueuses, visqueuses, de Gram⁻ ou Gram⁺, aéroanaérobie, mobile. Alors on constate que nos souches peuvent appartenir aux: Entérobactéries, Agrobactérium, Pseudomonas, Xanthomonas, Micrococcaceae (*Micrococcus roseus*, *Micrococcus agilis*, *Arthrobacter*), rhizobactérium.

La croissance des cinq souches bactériennes dans le milieu RCV-saccharose (20g/l) est traduite par une production importante des exopolysaccharides. Ceci est plus remarquable pour les souches RO₅, RB'₂ et RO₈ qui atteignent respectivement 51,02 et 27,45 et 13,68 µg d'EPS/mg de protéine.

On constate que les souches très productives sont RO₅ et RB'₂. Alors ces dernières peuvent être utilisées pour l'inoculation d'un sol rhizosphérique, ceci induit une modification significative des propriétés physiques du sol des régions arides et semi-arides.

Pour les perspectives, il serait intéressant de compléter ce travail par des testes d'identifications fiables, rapides et modernes (Mini-Galeri, tests moléculaire..), ainsi des études approfondies pour la caractérisation structurale de ces polymères par différentes méthodes (HPLC, RMN,...) et aussi pour le champ d'application.

Annexes

Les Réactifs

Réactif sulfurique à l'anthrone (méthode par préconisée par Bachelier et Gavinelli (1966).

- 1 g d'anthrone
- 500 ml d'acide sulfurique à 95 %

Réactif de bleu de Coomassie :

- 10 mg de bleu de Coomassie G250
- 10 ml d'acide phosphorique à 85%
- 90 ml d'eau distillée

Les milieux de culture :

Gélose viande-foie (VF)

- Peptone pepsique de viande et de foie: 30 g/L
- Glucose: 2 g/L
- Agar: 6 g/L

Ce milieu sera utilisé pour l'étude du type respiratoire (Cf. *infra*).

Composition du milieu RCV-saccharose :

Solution I : (solution élément) :

- ZnSO₄ (7H₂O): 0.43 g.
- MnSO₄ (H₂O): 1.30 g.
- NaMO₄ (2H₂O): 0.75 g.
- H₃BO₃: 2.80 g.
- Cu SO₄ (7H₂O): 0.026 g.
- Co SO₄ (7H₂O): 0.07 g.
- H₂O Qsp: 1000 ml

Cette solution “ élément “ d'une 2^{ème} solution appelée ‘ supersalt’

Solution II (solution super salt):

CaCl₂ (2H₂O): 2 g.

MgSO₄ (7H₂O): 2 g.

FeSO₄ (7H₂O): 2 g.

EDTA: 0.4 g.

Solution I: 20 ml.

H₂O Qsp: 1000 ml.

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

KH₂PO₄: 40 g.

K₂HPO₄: 60 g.

H₂O 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 min.

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

Milieu GN

Extrait de viande: 1g

Extrait de levure: 2g

Peptone: 5g

Chlorure de sodium: 5g

Agar: 15 g

Le pH du milieu est ajusté à 7,4.

TSI

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone : 14,0 g
- Extrait autolytique de levure: 3,0 g
- Extrait de viande: 3,0 g
- Glucose: 1,0 g
- Lactose: 10,0 g
- Saccharose: 10,0 g
- Chlorure de sodium: 5,0 g
- Thiosulfate de sodium: 0,3 g
- Citrate ferrique ammoniacal: 0,3 g
- Rouge de phénol: 24,0 mg
- Agar agar bactériologique: 13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.

Mannitol mobilité

Pectone trypsique de viande: 20g

Mannitol: 2g

KNO₃ : 1g

Rouge de phénol 1% : 4g

Coloration du gram

• À 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 à l'alcool à 95°.
- 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 x100 à immersion).

- **À 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°.

 **Tableau 1:** La source des souches étudiées.

Souches	Sources
SS' ₃₀	Sol de Sebkha
RT ₁₃	Racine cultivée dans le sol de Tindouf
RO ₅	Racine cultivée dans le sol d'Oran
RO ₈	Racine cultivée dans le sol d'Oran
RB' ₂	Racine cultivée dans le sol de Boudjelil

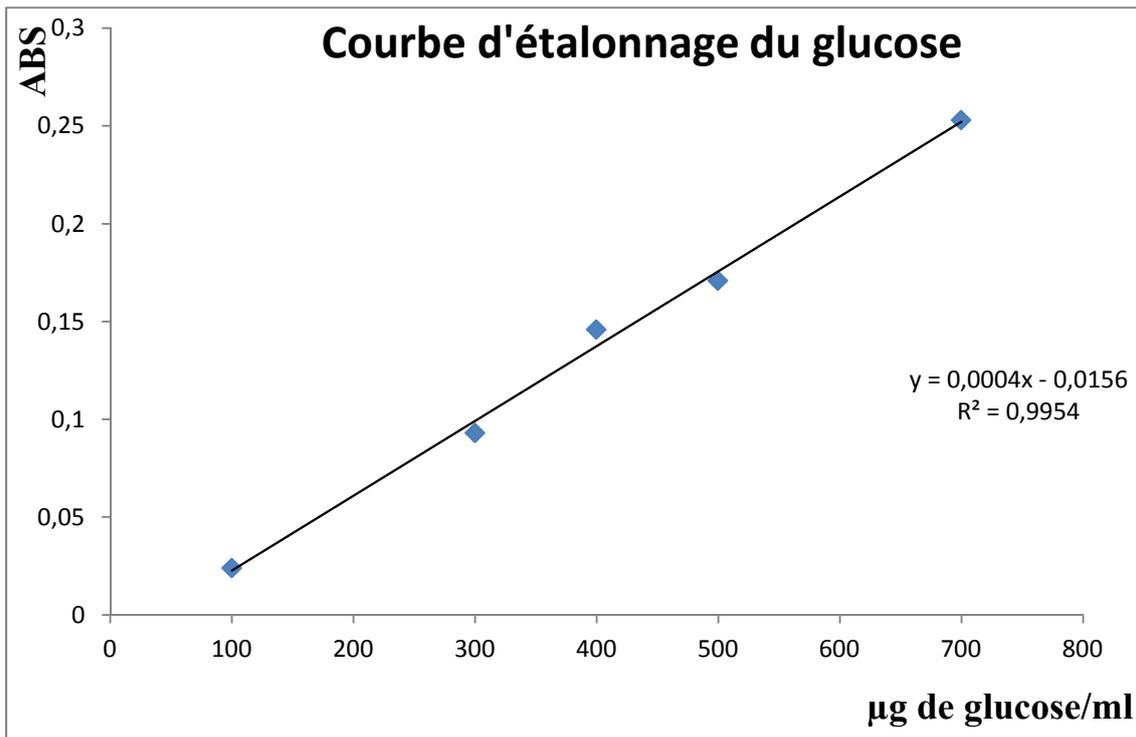


Figure 1. Courbe étalon, absorbance à 625 nm en fonction de la concentration en glucose.

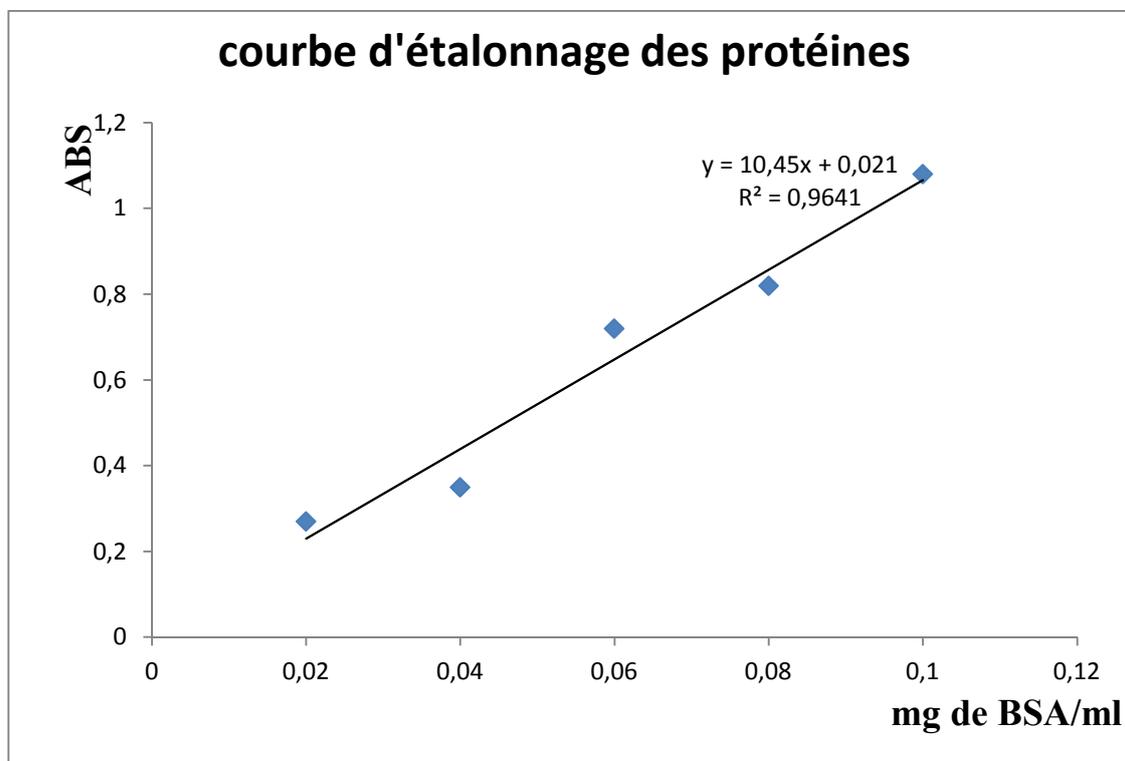


Figure 2. Courbe étalon, absorbance à 595 nm en fonction de la concentration en Albumine bovine.

*Références
bibliographiques*

- **Alami Y., Achouak W., Marol C. et Heulin T. (2000)** - Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflower by an EPS-producing *Rhizobium* sp. isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3393–3398.
- **Amellal N. (1996)**- Rôle de bactéries productrices d'exopolysaccharides dans la rhizosphère du blé dur. Thèse de doctorat, Université Nancy, France :176.
- **Argano M. Gobat J.M., et Matthey W. (2003)** - Le Sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne Coll. Gérer l'environnement no 14, 569. 2ème édition.
- **Ashtaputre A.A., Shah A.K. (1995)**- Studies on a viscous, Gel-Forming Exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 1159-1162.
- **Bachelier G., et Gavinelli R. (1966)**- Dosage globale des glucides du sol par les méthodes colorimétriques à l'antrone. *Pédol.* **4**:97-103.
- **Bauer W.D et Caetanoanollis G. (1990)**- Chemotaxis, induced Gene-Expression and Competitiveness in the rhizosphere. *Plant Soil.* **129**: 45-52.
- **Berge O. (2011)** - Écologie 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.
- **Blanchart E., Achouak W., Albrecht A., Barakat M., Bellier G., Cabidoche Y.M., Hartmann C., Heulin T., Larré-Larrouy C., Laurent J-Y. et al. (2000)**- Déterminants biologiques de l'agrégation dans les Vertisols des Petites Antilles : conséquences sur l'érodibilité. *Etude et Gestion des Sols*, 7(4):309-328.
- **Bradford M. M. (1976)** - A rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of proteins utilising, the principal of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- **Bonkowski M., Cheng W., Griffiths B.S., Alpeh J., Scheu S. (2000)** - Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology* 36 (3-4) : 135–147.
- **Cerning, J. (1994)**- Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*. H De Roissart et F.M. Luquet. Eds, Loriga-Uriage. Vol.1.309-329.
- **Chantigny M., Angers D. (2005)** - Activité microbiologique et qualité des sols : quoi de neuf sous nos pieds?. Colloque en agroenvironnement "Des outils s'intervention à notre échelle", CRAAQ. Drummondville: 10.

- **Darrah P.R. (1996)** - Rhizodeposition under ambient and elevated CO₂ levels. *Plant Soil*. **187**: 265-275.

- **De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F et Degeest B. (2001)** - Recent development in biosynthesis and applications of hétéropolysaccharides from lactic bacteria. *Int. Dairy. J.* **11**:687-707.

- **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.

- **Filloux A., Vallet I. (2003)**- Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine science*. **19** :77-83.

- **Foley I., Gilbert P. (1996)** - Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling*, 10: 331-346.

- **Garrido F., Michel C. et Morin D. (2002)**- Les exopolymères bactériens synthèse bibliographique. Document public.

- **Gerbaux.M. (1994)**- Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques *Dans* : Bactéries lactiques. H De Roissart et F.M. Luquet. Eds, Loriga-Uriage. vol.2.586.

- **Guezennec J., Ifremer (2004)** - Les bactéries des sources hydrothermales profondes a l'origine de nouvelles molécules bioactives?. VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement. *Volume 5 Numéro 3*.
- **Hebbar K.P., Gueniot B., Heyraud A., Colin-morel P., Heulin T., Balandreau J., Rinaudo M. (1992)**- Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**: 248-253.
- **Henaos 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, 196.
- **Heyraud A., Bresin A., Rinaudo M., Santaella C., Baynast R. et Heulin T. (2008)** - Production industrielle d'un polysaccharide bactérien luttant contre le stress hydrique. Éditions 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.
- **Jolly L., Vincent S.J.F., Duboc P., Neeser J.R. (2002)**- Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 367-374.
- **Jonas R., Farah L.F. (1998)**- Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, **59**(1-3) : 101-106.

- **Kaci.Y., Heyraud A., Barakat M. et Heulin T. (2005)-** Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure . Res Microbiol. **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 : 201.
- **Lemanceau P. et Heulin T. (1998)-** La rhizosphère « sol : interface fragile» Paris, Inra : 93-105
- **Lynch J.M. (1990) -** The rhizosphere. New York: John Wiley & Sons.
- **Lynch J.M. et Whipps.J.M. (1990)-** Substrate flow in the rhizosphere. Plant Soil.**129**: 1-10.
- **Marczak M., Mazur A., Gruszecki W.I., Skorupska A. (2008)-** PssO, a unique extracellular protein important for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. Science direct. Biochimie **90** (11-12) :1781-1790.
- **Marin M., Frédéric René F. (2000)-** Lyophilisation. Techniques de l'Ingénieur. f3240.9
- **Marvillet C. (2001)-** Applications industrielles du froid –Généralités. Techniques de l'Ingénieur. be9755. 15.

- **Morris V.J. (1995)**- Food polysaccharides and their applications, Stephen A.M. (ed.), Marcel Dekker, New York.
- **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.
- **O'Neill M.A., Selvendran R.R. and Morris V.J. (1983)**- Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, **124**, 123–133.
- **Petit A-C. (2005)** -Modifications d'un exopolysaccharide biosynthétisé par une bactérie issue des écosystèmes Hydrothermaux profonds. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR). Thèse de doctorat: 214.
- **Phillips K., Railton, Lawford H. G. (1983)**- Curdlan: its properties and production in batch and continuous fermentations. *Progress in Industrial Microbiology*, **18**, 201-229.
- **Quérellou J. et Guézennec J. (2010)** - Biotechnologie des extrémophiles. Éditions Techniques de l'Ingénieur.
- **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 plante-microbe interaction" Hennecke H. et Verma D.P.S. (Eds.); Kluwer Academic, Dodrecht. P182-188.

- **Santaella C., Schue M., Berge O., Heulin T. & Achouak W. (2008)**- The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. *Environ. Microbiol.* **10** (8) 2150-63.
- **Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., et Król J. (2006)**- Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fac.* **7**:1-19.
- **Steinbüchel A et Rhee S.K. (2005)**- Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry- Properties, Production, and Patents. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH et Co, Weinheim. ISBN: 3- 527-31345-1. 783.
- **Stephen A.M., Churms S.C. (1995)**- Polysaccharides and Their Applications. Dekker, Inc. 1-18
- **Suslow T.V., Schroth M.N. (1982)**- Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology* **72**: 111-115.
- **Sutherland I.W. et Norval M. (1970)**- The synthesis of exopolysaccharides by *Klebsiella aerogenes* membrane preparation of exopolysaccharide the involvement of lipide intermédiales. *Biochem.j.* **120**:567-570.
- **Sutherland I.W. (1972)**- Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, **8**, 143-213.

- **Sutherland I.W. (1985)**- Biosynthesis and composition of gram negative bacterial extracellular and wall polysaccharide. *Ann. Rev. Microbiol.* **39** : 243-270.
- **Sutherland I.W. (1988)**- Bacterial surface polysaccharides structure and function. *Int. Rev. Cytol.* **113** : 187-231.
- **Tisdall J.M., Oades J.M. (1982)**- Organic matter and water stable aggregates in soils. *Journal of soil science* **33** : 141- 163.
- **Tisdall J.M. (1994)** - Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil* **159**: 115-121
- **Upadhyay S. K., Singh J. S., Singh D. P. (2011)** - Exopolysaccharide-Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Salinity Condition. *Pedosphere* **21**(2): 214–222.
- **Whitfield C. (1988)**- Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J. Microbiol.* **34** : 415-420.
- **Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (1999)**- What are bacterial extracellular polymeric substances ?. Edition *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer-Verlag, Berlin, 19.
- **Woltz S.S. (1978)**- Non-parasitic plant pathogens. *Annual review of phytopathology* **16**: 403-430.

Résumé

Les bactéries productrices d'EPS sont isolées à partir du sol rhizosphérique et des racines du blé dur de variété Waha (de *Triticum durum L.*), cultivé dans trois sols différents (Boudjelil, Sebkha , Tindouf) Sont ensemencées sur le milieu RCV-saccharose (20g/l).

Identification de ces souches est réalisée par l'étude des caractères morphologiques (couleur, élasticité, Gram, forme, mobilité...) et biochimiques. Les résultats obtenus révèlent que les souches peuvent appartenir aux: Entérobactéries, Pseudomonas, Rhizobium...

La quantité des exopolysaccharides produite par les cinq souches varie entre 51,02 à 2,58 µg d'EPS/mg de protéine. La souche la plus productive est celle nommée RO5.

Mots clés : Rhizosphère, exopolysaccharides, bactérie productrice d'EPS.

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, Sebkha, 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, mobility...). The results obtained reveal that the stocks can belong to: Enterobacterias, Pseudomonas, Rhizobium...

The quantity of the exopolysaccharides produced by the five stocks varies between 51,02 to 2,58 µg of protein EPS/mg. The most productive stock is that named RO5.

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