

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et
De la Recherche Scientifique

Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre : 006/ Mag /2010

N° de série : 002/ SN /2010

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister
(Ecole Doctorale)
Option : Biotechnologie végétale

Présenté par

Benahmed Amira

Thème

**Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la
nodulation de la légumineuse *Hedysarum coronarium***

Soutenance le : 14/01/2010

Devant le jury d'examens :

Président : M^r. D. KHELIFI

Professeur .Université de Constantine

Rapporteur : M^r. Y. BENHIZIA

Maître de Conférences. Université de Constantine

Examineurs : M^r. A. BENGUEDOUAR

Professeur .Université de Constantine

M^r. A. HAMIDECHI

Maître de Conférences. Université de Constantine

Année Universitaire : 2008-2009

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Faculté des Sciences de la Nature, Université Mentouri Constantine. Je tiens à remercier **Mr. A. Benguedouar**, pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire, pour sa présence et ses conseils scientifiques judicieux tout au long de la réalisation de mon travail.

Je remercie sincèrement **Mr. Y. Benhizia** d'avoir accepté de consacrer du temps, en tant que rapporteur pour juger et aider à l'amélioration de ce travail, merci de m'avoir enseigné la pratique des sciences et la rigueur de la démarche expérimentale.

Je ne peux surtout pas oublier de remercier **M^{elle}. R. Gharzouli** pour son aide et pour avoir su répondre à mes innombrables questions existentielles.

Je tiens aussi à remercier **M^{elle}. A. Torche** pour son aide et son encouragement.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **Mr.D. Khelifi** pour avoir accepté de présider à ce jury de thèse mais aussi pour m'avoir ouvert son laboratoire avec une grande modestie.

Mes remerciements aux membres du laboratoire d'écologie microbienne : **Mr. N. Bourghoud, Mr. M. A.Haddi** et **Mr. D.E.D.Kadem**.

Je tiens à remercier tous mes compagnons de laboratoire pour avoir su m'écouter, m'encourager et me soutenir tout au long de cette pratique.

Merci à tous ceux qui partagent ma vie et qui m'accompagnent avec tant d'amour et de tendresse, Merci à mon père, à ma mère et à toute la famille. A mon époux, **Abdelmoutalib**, je voudrais rappeler mon amour et ma reconnaissance pour sa compréhension, sa présence affectueuse à mes côtés.

Mes remerciement aux membres de jury : **Mr. A. Benguedouar, Mr.D. Khelifi** et **Mr. Hamidechi** d'avoir sacrifier leur temps pour juger ce travail.

Sommaire

Table des matières

INTRODUCTION.....	13
-------------------	----

CHAPITRE UN : étude bibliographique

I- La fixation biologique de l'azote.....	16
I-1-L'azote	16
I-2-Cycle de l'azote.....	16
I-3-La fixation biologique de l'azote.....	18
 II-Interaction plante- microorganisme	18
II-1- Le macro symbiote : <i>Hedysarum</i>	18
II-2- Le microsymbiote : <i>Rhizobium</i>	20
II-2-1-Caractères morphologiques des rhizobia	21
II-2-2- Caractères biochimiques des rhizobia.....	22
II-2-3- Génome des Rhizobia.....	23
 III- La symbiose <i>Rhizobium</i> – Légumineuse	23
III-1- La symbiose au niveau moléculaire	24
III-2-Les étapes de la nodulation.....	25
III-2-1-La reconnaissance mutuelle	25
III-2-2-L'invasion par le symbiote et la formation du nodule.....	27
III-2-3-Le fonctionnement du nodule.....	28
 IV-Autres facteurs symbiotiques : les polysaccharides.....	30
IV-1-Les polysaccharides de surface.....	30
IV-2-Polysaccharides exocellulaires ou exopolysaccharides (EPS).....	30
IV-2-1-Composition et classification des exopolysaccharides	31
a-Composition osidique :.....	31
b- Classification.....	32
IV-2-2-Rôle symbiotique des exopolysaccharides.....	34
IV-2-3-Facteurs influençant la production des EPS	35
IV-2-3-1-La source de carbone	35
IV-2-3-2-La source d'azote	36
IV-2-3-3-Les sels minéraux et cofacteurs.....	36

CHAPITRE DEUX : Matériels et Méthodes

I-Isolement des souches à partir des nodules.....	38
I-1-Collecte des échantillons	38
I-2- Conservation des nodules	38
I-3- Isolement des bactéries à partir des nodules.....	39
I-3-1-Stérilisation des nodules :.....	39
I-3-2-Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés	39
 II-Purification et conservation des isolats :.....	39
II-1 Examen morphologique et microscopique.....	39
II-2-Vitesse de croissance.....	40
II-3-Purification et conservation des isolats	40
 III- Caractérisation phénotypique des souches	41
III-1-Effet de la source de carbone.....	41
III-2- Effet du stress salin	41
III-3-Détermination du profil protéique par SDS-PAGE.....	41
III-3-1 Principe	41
III-2-2 Protocole	42
 IV-Test de nodulation	43
-Préparation des jarres de Léonard.....	43
-Préparation du mélange : sable- vermiculite.....	43
-Stérilisation des graines.....	44
-Inoculation des jarres.....	45
IV-1-Influence de la source de carbone sur la nodulation	46
IV-2-Influence du stress salin sur la nodulation	46
a-Système des jarres de Léonard.....	46
b-Systèmes des plantules en tubes.....	46
b-1- Préparation et germination des graines	46
b-2- Préparation des plantules en tube et inoculation	46

V- Etude des Exopolysaccharides (EPS) des isolats.....	48
V-1- Détection des exopolysaccharides.....	48
a- Examen visuel	48
b- Les colorations.....	48
b-1-Le Calcofluor.....	48
b-2-Le rouge de ruthénium.....	48
V-2- Production et extraction des EPS	49
V-3- Dosage des exopolysaccharides par la méthode à l' Anthrone	49

CHAPITRE TROIS : Résultats et discussion

I-Caractères cultureux	52
 II-Caractéristiques phénotypiques des isolats.....	54
II-1- Effet de la source de carbone.....	54
II-2- Effet du stress salin	56
II-3-Détermination du profil protéique par SDS page.....	61
 III-Test de nodulation.....	64
III-1- Premier test de nodulation : test témoin.....	64
III-2- Influence de la source de carbone sur la nodulation :.....	66
III-3- Influence du stress salin sur la nodulation :.....	80
 IV- Etude des Exopolysaccharides (EPS) des isolats	82
IV- 1-Detection des exopolysaccharides :.....	82
a-Examen visuel	82
b- Les colorations.....	84
IV- 2-Production et extraction des EPS	85
IV- 3-Dosage des EPS a l' Anthrone :.....	86
 Conclusion générale	93
Références bibliographique.....	98
Annexe	

Résumé

يهتم عملنا بتبيين تأثير مصدر الكربون على إنتاج عديدات السكريات الخارجية عند السلالات البكتيرية المعزولة من العقد الجذرية للنبات ألبقولي *Hedysarum coronarium* وتبيين تأثير التغيرات في البناء الحيوي للـ EPS على تكوين العقد الجذرية .

تم تعريف السلالات مظهريا بالمقارنة مع السلالات الشاهدة بواسطة تحاليل أشرطة البروتينات الكلية تحت ظروف التشويه SDS-PAGE و هذا بعد الاختبارات الفيزيولوجية و التتماوية.

السلالات تم تنميتها في وسط YMA أين المانيتول يتم استبداله بسكريات أخرى تم استخلاص الـ EPS وتقديرها باستعمال طريقة Anthrone .

اختبار العقد الجذرية في ظروف التعقيم المراقبة تم إجراؤها وفق طريقة Vincent 1970 لتوضيح دور الـ EPS على التعايش.

النتائج المحصل عليها تبين أن مصدر الكربون يؤثر على طبيعة و كمية الـ EPS المنتجة من طرف العزلات.

السلالات المعزولة بينت قدرتها على اختراق الأنسجة الجذرية و التحفيز على تكوين العقد الجذرية.

الكلمات الأساسية:

التعايش, *Rhizobium*, *Hedysarum coronarium*, Exopolysaccharides,

Abstract

Our study consists to highlight the effect of carbon source on EPS production by the bacterial strain isolated from the nodule of the legume species *Hedysarum coronarium* and to determine the effect of variation in EPS biosynthesis on the nodulation.

The strains are characterized phenotypically in comparison with the wild strain by an analysis of a profile of total proteins on SDS-PAGE, as well as some physiological and nutritional tests.

The strains are cultivated on YMA that the mannitol is replaced by other sugar; we proceed then in an extraction of EPS and their measure by utilizing Anthrone method. Nodulation test in bacteriological controlled condition is carried out according to the method of Vincent (1970).

The obtained results show that the carbon source affects the nature and quantity the EPS produced by the isolates.

The isolate strains have shown a good capacity of penetration on root and induce nodule formation.

Key words: *Rhizobium*, *Hedysarum coronarium*, Exopolysaccharide, Symbiosis.

Introduction

La symbiose dans le monde végétal permet, le plus souvent, la survie de la plante dans un environnement défavorable qu'il soit sec ou carencé en nutriments. Elle permet ainsi l'implantation de nombreuses espèces dans des milieux hostiles en enrichissant les sols.

Notre travail concerne une association symbiotique particulière: la symbiose fixatrice d'azote. L'azote, le phosphore, le calcium, et plus généralement les minéraux indispensables à la croissance des végétaux sont prélevés dans le sol. Après la récolte, les éléments qui ont servi à la croissance des plantes, doivent être restitués au sol, afin d'en conserver la fertilité. Dans le système d'agriculture intensive que nous connaissons, la restitution se fait sous forme d'engrais d'origine chimique (azote/phosphore/potasse), parfois appliqués en excès. Cette pratique est une source de nuisances pour la santé humaine et l'environnement. Elle pollue les eaux de surface et des nappes phréatiques, par lessivage des engrais, mais engendre aussi une forte consommation d'énergie et une émission de gaz à effet de serre pour la production des engrais azotés. Ces engrais purement minéraux amènent par ailleurs, un déséquilibre croissant de la structure et de la composition des sols (Chataigné, 2007).

Cette symbiose est de type mutualiste (E. Toby Kiers et al., 2004): la plante apporte les nutriments carbonés et un environnement pauvre en oxygène et sans stress hydrique, tandis que la bactérie apporte l'ammoniaque.

Une utilisation de la symbiose fixatrice d'azote peut diminuer l'apport d'engrais azoté chimique nécessaire aux cultures tout en structurant les sols en réalisant des cycles légumineuses/céréales performants ou tout simplement une bactérisation.

Les rhizobia sont capable de s'attacher et de pénétrer dans les racines des légumineuses, provoquer la division des cellules corticales aboutissant à la formation d'un petit organe appelé nodule au sein duquel, elles fixent l'azote atmosphérique.

L'établissement de cette symbiose est basé sur l'interaction moléculaire entre les deux partenaires, en plus des flavonoïdes et les facteurs NOD, les polysaccharides de surface (lipopolysaccharides (LPS), polysaccharides capsulaires (CPS), exopolysaccharides (EPS)) peuvent jouer un rôle important dans la symbiose.

Les polysaccharides extracellulaires (EPS) produits par les rhizobia sont essentiels pour l'établissement d'une fixation symbiotique d'azote avec les légumineuses. (Chataigné, 2007 ; Broughton *et al*, 2000). Les EPS sont considérées comme des molécules de signalisation, jouent un rôle important dans le développement du fil d'infection et du processus d'invasion, étapes clé pour la formation des nodules racinaires (Chuang Yien Lee, 2000).

La compréhension, puis la maîtrise des processus permettant la mise en place d'une telle symbiose, constituent un grand pas vers le développement d'une agriculture moins polluante.

Ce présent travail consiste à mettre en évidence l'influence de la source de carbone sur la production des EPS chez des souches bactériennes isolées à partir des nodules de la légumineuse *Hedysarum coronarium* et de déterminer l'effet des variations dans la biosynthèse des EPS sur le processus nodulaire, ainsi d'étudier l'effet de stress salin sur la synthèse des EPS et la formation des nodules.

Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

- Isolement des bactéries à partir des nodules racinaires de la plante *Hedysarum coronarium* en présence de souches de référence, *Rhizobium sllae*, disponibles au laboratoire d'écologie microbienne du Département de Microbiologie.
- Evaluation de la quantité des EPS produites par les souches bactériennes en présence de différentes sources de carbone, extraction de ces EPS et leur dosage on utilisant la méthode d'Anthrone.
- Etudier l'influence des variations dans la synthèse des EPS sur le processus de nodulation par la réalisation d'un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées.
- L'effet de la pression osmotique sur la quantité des EPS synthétisés et évalués sur un milieu spécifique à différentes concentrations du sel et une solution nutritive à différentes concentrations en NaCl nourrissant les racines de la plante durant le processus de nodulation.

Partie bibliographique

I- La fixation biologique de l'azote

I -1-L'azote

L'azote est un élément-clé de la nutrition des cultures à travers son rôle dans l'élaboration des protéines et de la chlorophylle (Hopkins, 2003). L'azote joue un rôle essentiel dans la synthèse de la matière vivante à partir de la matière minérale. Contrairement aux animaux (organismes hétérotrophes), les végétaux ou certains microorganismes (organismes autotrophes) sont capables d'utiliser l'azote minéral du sol pour former des substances organiques azotées qui seront, à leur tour, utilisées par les animaux (Vincent, 2002).

Dans la nature, l'azote est abondamment présent :

- Sous forme de gaz N_2 dans l'air dont il représente près des 4/5
- Sous forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante.

Dans les sols agricoles, l'azote est présent majoritairement sous forme organique et minoritairement sous forme minérale (ions nitrates NO_3^- et ammonium NH_4^+). Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) (Vincent, 2002).

I- 2-Cycle de l'azote

Les échanges complexes englobent les trois ensembles principaux : constitué par l'atmosphère, le sol (et l'eau qui lui est associée) et l'azote contenu dans la biomasse, et représentent le cycle de l'azote.

Le cycle de l'azote est un cycle biogéochimique qui décrit la succession des modifications subies par les différentes formes de l'azote (di-azote, nitrite-nitrate, ammoniac, azote organique (protéines)).

Il peut être simplifié par quatre types de réactions dans lesquelles les microorganismes jouent un rôle important :

- **Fixation de l'azote** : c'est le processus par lequel les bactéries transforment l'azote atmosphérique en ammoniac par la réduction du diazote.

- **Ammonification** : Les décomposeurs, certaines bactéries du sol et les champignons transforment les composés azotés d'origine animale ou végétale en ammoniac NH_3 .

- **Nitrification** : c'est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-) qui est la forme la plus utilisable par les plantes. La première étape de la formation du nitrate,

est l'oxydation l'ammoniac en nitrite par des bactéries du genre *Nitrozomonas*. Le nitrite est ensuite oxydé en nitrate par des membres du genre *Nitrobacter*.

- **Dénitrification** : c'est le processus de réduction du nitrate NO_3^- en diazote N_2 , qui retourne l'atmosphère, par des bactéries dites dénitrifiantes.

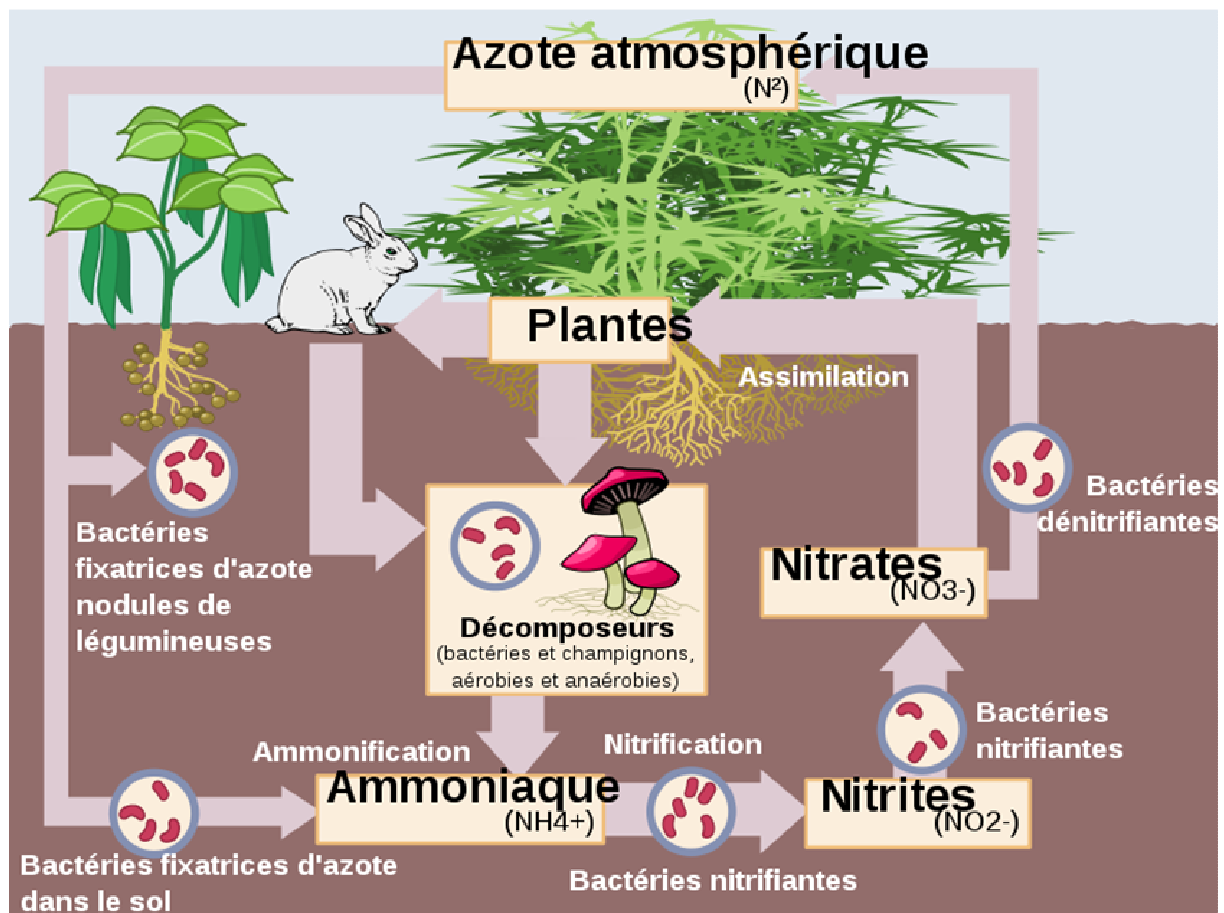


Figure 1 : Cycle de l'azote (B. Peret, 2007)

I- 3-La fixation biologique de l'azote

L'azote peut être fixé par trois voies (Burdass, 2002) :

-Fixation atmosphérique : elle se produit spontanément, et ne fixe qu'une petite quantité.

-Fixation industrielle : processus de Haber-Boch.

-Fixation biologique : les bactéries fixatrices d'azote fixent 60% de l'azote atmosphérique.

La fixation biologique

A l'échelle mondiale, environ 60% des 150 à 190 millions de tonne d'azote fixé par an est réalisé par des organismes vivants, ce processus est connu sous le terme de fixation biologique d'azote (Hopkins, 2003).

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement.

Elle très importante pour fournir l'azote disponible pour les plantes dans les systèmes naturels et dans les régions agricoles où l'engrais synthétique est trop cher ou non disponible (Vincent, 2002).

Il existe des bactéries qui vivent dans le sol et assurent la fixation de l'azote, soit librement, soit en symbiose avec d'autres bactéries. Ce sont principalement:

Des bactéries aérobies : *Azotobacter*, *Azomonas* ;

Des bactéries anaérobies : *Clostridium*,...

D'autres bactéries vivent en symbiose avec des plantes :

Rhizobium avec des légumineuses (Fabacées);

Actinomycètes avec diverses espèces d'angiospermes.

II- Interaction plante-microorganismes

II-1-Le macro-symbiote : *Hedysarum*

Le genre *Hedysarum* sp. est une légumineuse fourragère spontanée répandue dans la région méditerranéenne. Différentes espèces de ce genre sont rencontrées en Afrique du Nord et en Europe de Sud dans des étages bioclimatiques et des conditions édaphoagricoles assez variables (Abdelguerfi-Berrakia et coll., 1988).

Plus de cent espèces composent ce genre de la famille du pois, toutes originaires des régions tempérées de l'hémisphère nord. Ce sont pour la plupart des annuelles, des

bisannuelles et des vivaces, mais quelques unes sont des arbustes caducs à bois tendre. (Geoff et coll., 2005)

Toutes les espèces sont rustiques et demandent une exposition ensoleillée, ainsi qu'un sol bien drainé, sableux, ou caillouteux et calcaire (Geoff et coll., 2005).

Selon Quezel et Santa (1962), le genre *Hedysarum* L. se caractérise par : calice en cloche, à 5 dents égales ou inégales. Pétales à onglet très court, carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité, étamines diadelphes (9-1), à tube fendu en dessus.

- L'espèce *Hedysarum coronarium*

Hedysarum coronarium également appelé Sulla ou sainfoin d'Espagne est une plante pérenne, à enracinement relativement profond, qui peut atteindre 1 à 1,50 m de hauteur.

Cette plante diploïde ($2n = 16$ chromosomes) et allogame, manifeste une période assez prolongée de repos végétatif ; pendant cette période il n'est pas nécessaire d'arroser la plante.

Cette espèce se développe bien sur des sols bien pourvus en magnésium, des teneurs en phosphore et en matières organiques variables. Le pH neutre à basique évolue dans une gamme assez restreinte, entre 7,3 et 8,9 (Quezel et Santa, 1962).

La Sulla a un développement tapissant, elle a donc tendance à s'élargir beaucoup. Ses tiges sont droites, rameuses, hautes d'un pied et demi à deux pieds, munies de feuilles composées de sept à neuf folioles ovales. Ses fleurs sont d'un beau rouge et disposé en grappes simples, courtes, et portées sur des pédoncules plus longs que les feuilles (De Bory de Saint-Vincent ,1829) (photographie 1).



Photographie 1 : *Hedysarum coronarium*

Cette espèce produit des gousses longues, comprimées, nues et hérissées, qui diffèrent de celles des autres espèces par des articulations marquées, comme celles d'une chaîne (De Jacques Eustache de Sève, 1819).

Les populations naturelles de *Hedysarum coronarium* L constituent un patrimoine d'un grand intérêt agronomique, qui peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées. A l'état spontané, cette espèce se localise sur des sols argilo-limoneux bien drainés des zones méridionales de la moitié occidentale du bassin méditerranéen. Les populations spontanées sont caractérisées par une protrandrie marquée et sont exploitées pour la pâture. De plus, la production de graines qui se ressèment naturellement favorise leur utilisation pour la protection des sols (Trifi-Farah, 2001).

H. coronarium est cultivée pour la production de fourrage dans de nombreux pays du bassin méditerranéen (Trifi-Farah, 2001).

II-2- Le microsymbiote : *Rhizobium*

Les rhizobia forment un groupe paraphylétique où l'on trouve aussi bien des α - Proteobactéries appartenant aux genres *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Rhizobium* (= ex. *Rhizobium*) (Wang et Martinez-Romero, 2000 ; F. Zakhia et P. de Lajudie, 2001) et des β -Protéobactéries découvertes récemment appartenant aux entre autres aux genres *Burkholderia* (Moulin et coll., 2001), *Ralstonia* (Chen et coll., 2001) et *Methylobacterium* (Sy et coll., 2001).

Les *ex-Rhizobium* sont regroupés dans la famille des *Rhizobiaceae*, mais des analyses phylogénétiques récentes basées sur l'ARN 16S révèlent que cette famille a des origines multiples et constitue aussi un groupe paraphylétique.

Les genres *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* par exemple sont assez éloignés des autres et devraient être placés dans une autre famille (Wang et Martinez- Romero, 2000).

Les genres *Allorhizobium* et *Sinorhizobium* sont très proches du genre *Agrobacterium* qui a été classé en dehors des *Rhizobiaceae* en raison de ses caractéristiques pathogènes. Les gènes qui confèrent aux rhizobia leur capacité symbiotique et ceux qui confèrent à *Agrobacterium* son pouvoir pathogène sont situés majoritairement sur des plasmides. Comme les plasmides peuvent être transmis horizontalement entre bactéries de différentes espèces, la prise en compte des caractères codés par les plasmides n'est pas le meilleur moyen pour établir des divisions phylogénétiques (Svistonoff, 2003).

La classification des rhizobia est en constante modification et une nouvelle classification devrait bientôt être adoptée (Site web- Rhizobium taxonomy, The current taxonomy of rhizobia [Updated 14th September 2009]).

Dans la seconde édition du Bergey's, l'ordre des rhizobiales dans les α - protéobactéries contiendra 10 familles avec une grande variété de phénotypes. La première famille de cet ordre est celle des *Rhizobiaceae*, où figurent les genres Gram négatif aérobies, *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (Prescott et coll., 2007).

Les rhizobiums, ou rhizobia (genre *Rhizobium*), sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Ces bactéries présentent la capacité de former une symbiose avec des plantes de la famille des légumineuses.

En condition limitante en azote combiné, les rhizobia vont induire la formation de nodosités au niveau racinaire ou caulinaire des légumineuses. Ces nodosités vont représenter de véritables organes d'échange métabolique entre les bactéries et les plantes (Svistoonoff, 2003).

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont responsables de la proportion la plus importante de l'azote atmosphérique fixé. « La fixation d'azote par les microorganismes fournit environ 65% de l'azote disponible de la biosphère » (Lodwig et coll., 2003).

Dans les nodules dites effectifs, les rhizobia vont bénéficier d'un micro habitat exceptionnellement favorable, les Fabacées leur procurant un apport en substrats carbonés issus de la photosynthèse (Lodwig et Poole, 2003), et sont protégés dans la structure des nodules (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995). En échange, les rhizobia vont fixer et réduire l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les plantes hôtes (O'Gara et Shanmugam, 1976).

II-2-1-Caractères morphologiques des rhizobia

Les membres du genre *Rhizobium* sont des bâtonnets courts, Gram négatif, d'une largeur de 0.5 à 0.9 μ m et une longueur de 1.2 à 3 μ m, souvent avec une région non colorée due à la présence de polymère de β -hydroxybutyrate (PHB). Les rhizobia ne forment pas d'endospores, mobiles par des flagelles polaires ou péritriches (4 à 6), aérobies, chimioorganotrophes. Ils deviennent pléomorphes dans des conditions adverses (Prescott et coll., 2007).

- **Croissance des rhizobia**

- **Colonies sur Yeast Mannitol Agar (YMA)** : les formes à croissance rapide produisent des colonies blanches de 1 à 5 mm après 3 à 4 jours à 25 - 28 °C, alors que les colonies à croissance lente sont détectables après 5 jours et n'excèdent pas 1 mm (Vincent, 1970)
- **Autres caractéristiques de la croissance** : croissance abondante marquée par un changement de pH sur Peptone –agar après 2 à 3 jours à 30°C et culture positive sur lait tournesolé (Beck, 1993).

II-2-2- Caractères biochimiques des rhizobia

La possibilité des rhizobia de croître sous une pression d'oxygène réduit est fréquemment observée (Allen et Allen, 1950).

Le sodium sélénite est réduit rapidement par les rhizobia à croissance rapide, et longement ou non par les rhizobia à croissance lente (Allen et Allen, 1950).

Certaines espèces montrent une réduction lente du lait tournesolé suivie d'une faible protéolyse avec formation d'une zone de sérum, d'autres ne le réduisent pas (Allen et Allen, 1950).

A l'exception de la souche *Sinorhizobium meliloti* qui exige une température de croissance à environ 35°C le niveau optimum de croissance pour la majorité des rhizobia se situe entre 29 - 31°C.

Tous les rhizobia tolèrent de la même façon l'alcalinité, mais sont affectés différemment par l'acidité. *S.meliloti* est la plus sensible à l'alcalinité ; *R. lupini* et *B. japonicum* sont les plus tolérants ; la réaction optimale pour la respiration est plus alcaline que celle observé pour la croissance.

Le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) est le plus souvent utilisé pour la culture des rhisobia (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

Les rhizobia à croissance lente apparaissent les plus spécifiques et exigeant dans leurs besoins en carbone et azote.

D'un point de vue physiologique, des études menées par Casella et coll. (1984, 1986,1988) ont montré que *R. sullae* (anciennement *R. hedysari*) réussit, comme d'autre espèce de *Rhizobium*, à utiliser les nitrates et nitrites comme accepteurs d'électrons dans de culture en anaérobiose.

II-2-3- Génome des Rhizobia

La structure du génome de *Rhizobium* est très semblable à celle d'*Agrobacterium tumefaciens*, cependant, bien que *Agrobacterium tumefaciens* a un chromosome circulaire, un chromosome linéaire et méga plasmide, *Rhizobium* sp (NRG234) a un chromosome de 3.5Mb de longueur, un méga plasmide de longueur supérieur à 2 Mb et un plasmide de 536.165pb de longueur, qui porte la plus part des gènes impliqués dans la symbiose avec les légumineuses. Le contenu en GC% du génome entier est d'environ 61.2% (Viprey et coll., 2000).

Le séquençage du génome de *R. leguminosarum* bv *viciae* a montré qu'il contient 7.751.309 pb et le contenu en GC% est en moyenne de 60-86%.

III-La symbiose *Rhizobium* – Légumineuse

Certaines bactéries fixent librement l'azote mais la plupart des espèces telles que *Rhizobium* vivent au sein de nodosités spécialisées sur les racines de légumineuses. La formation de ces nodosités exige une collaboration génétique intime entre les bactéries et la plante puisqu'on connaît de nombreuses mutations dans leurs génomes respectifs qui peuvent bloquer le développement d'une nodosité fonctionnelle (Broughton, 2000).

Après inoculation (introduction ou pénétration accidentelle dans l'organisme d'un germe vivant), le centre du nodule est rouge : il contient les bactéroïdes et la leghémoglobine (Broughton, 2000).

Le *Rhizobium* seul dans le sol est incapable de fixer l'azote, car son gène de la nitrogénase, permettant la conversion de l'azote atmosphérique en ammoniac, est réprimé lorsqu'il est à l'état isolé (Svistoonoff, 2003 ; Broughton, 2000).

Le complexe nitrogénase, qui réalise cette transformation fondamentale, est constitué de deux protéines (Broughton, 2000) :

1. une réductase : qui fournit des électrons de haut pouvoir réducteur.
2. une nitrogénase : qui utilise ces électrons pour réduire N_2 en NH_3 .

Le transfert des électrons de la réductase à la nitrogénase est couplé à l'hydrolyse de l'ATP par la réductase (Broughton, 2000).

La nitrogénase est très sensible à l'oxygène moléculaire, dont sa présence réprime le gène de la nitrogénase (Svistoonoff, 2003). L'expression de ce gène est régulée par la concentration d'oxygène libre et le *Rhizobium* ne forme de nitrogénase que sous forme bactéroïde (Broughton, 2000).

La symbiose du *Rhizobium* avec la plante lui permet donc d'effectuer cette fixation de l'azote; les rhizobia profitent également de plusieurs composés rejetés par la plante, comme des acides aminés, des vitamines et des protéines (Lodwig et coll., 2003). Cette symbiose n'est pas essentielle, ni indispensable, dans le sens que les deux organismes (bactérie et plante) peuvent se développer indépendamment l'un sans l'autre.

La plante, sans ce bactéroïde fixant l'azote, est incapable d'effectuer cette fixation. La fixation de l'azote est très importante, car l'azote est utilisé pour un très grand nombre de molécules métaboliques. Bref, le *Rhizobium*, permet à la plante de fixer l'azote, et la plante lui fournit des composés carbonés (Broughton, 2000).

III- 1- La symbiose au niveau moléculaire

Il s'agit principalement de gènes portés par la bactérie et impliqués dans la symbiose et la fixation de l'azote :

- **sym** : gènes nécessaires à la formation de nodosités symbiotiques fonctionnelles fixant l'azote (Broughton, 2000).

- **nod** : gènes nécessaires à l'initiation et aux premières étapes de la formation des nodosités. D'autres gènes sont également impliqués dans la formation de nodosités : les gènes **nol** et **noe** (Broughton, 2000).

Ces gènes de structure **nod** se divisent en deux groupes :

Les gènes *nod* communs : les gènes *nodABC* sont présents chez toutes les espèces d'*Azorhizobium*, *Rhizobium*, et *Bradyrhizobium* étudiés jusqu'à présent. Ces gènes sont nommés gènes *nod* communs parce qu'ils sont structurellement conservés et fonctionnellement interchangeables entre les espèces cités précédemment sans altérer le spectre d'hôte (van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

L'inactivation des gènes *nod* communs supprime la possibilité d'avoir une relation symbiotique dans la plante et mène à un phénotype Nod⁻ (van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

Les gènes *nod* II sont présents chez les espèces *R. leguminosarum* bv *viciae* et bv *trifolii*, *B. japonicum*, *R. etli*, et *A. caulinodans*. Des mutations au niveau de ces gènes résultent d'un retard dans la nodulation chez *R. leguminosarum* et *A. caulinodans*, mais n'ont pas d'effet remarquable chez *B. japonicum* (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

Les gènes *nod* spécifiques (*hsn*): gènes déterminant la spécificité de l'hôte ; ces gènes ont été identifiés comme étant des gènes non structurellement ou fonctionnellement conservés parmi les rhizobia (van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

- ***fix*** : gènes nécessaires aux étapes plus tardives de la construction d'une nodosité capable de fixer l'azote (Broughton, 2000).

- ***nif*** : gènes codant pour les trois sous-unités hautement conservées de la nitrogénase (réduisant l'azote moléculaire en ammoniac), ainsi que pour des protéines auxiliaires nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase (Broughton, 2000).

III-2- Les étapes de la nodulation

L'infection des racines par les rhizobia est un processus à plusieurs étapes qui commence par des événements de pré-infection dans la rhizosphère. Les activités coordonnées d'une légumineuse et d'une bactérie du genre *Rhizobium* dépendent des réactions chimiques entre les deux partenaires symbiotiques (Van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

III-2-1-La reconnaissance mutuelle

Cette reconnaissance est effectuée par l'intermédiaire de signaux chimiques. Divers composés déterminant une chimiotaxie positive sont émis par la racine, parmi lesquels des flavonoïdes, inducteurs des gènes *nod* contrôlant la synthèse des facteurs Nod, responsables de la spécificité de la reconnaissance entre les symbiotes et du déclenchement de l'organogenèse nodulaire. Ce développement nodulaire est programmé par la plante et déclenché par la bactérie (Terefework, 2002).

Le gène *nod D* est transcrit de manière constitutive. Son produit, Nod D, différent d'une souche à l'autre, se lie après liaison avec les flavonoïdes aux sites régulateurs (*nod* boxes) des opérons porteurs des autres gènes *nod* et active leur transcription (Broughton et coll., 2000). Certains de ces gènes sont communs à toutes les souches et interchangeables, d'autres sont

spécifiques de la plante à infecter. Les enzymes produits permettent la synthèse des facteurs Nod (lipo-chitooligo-saccharide diffusibles, LCO). Ces composés sont libérés dans la rhizosphère et perçus en retour par le végétal. Seule une structure très précise de LCO modulée par la présence ou non de certains substituants est reconnue par la plante hôte (Broughton et coll., 2000). Ces facteurs Nod, une fois reconnus, vont avoir une activité « à distance » au niveau de la plante.

Ceux-ci exercent une action hormonale sur la racine et provoquent l'incurvation de l'extrémité des poils absorbants en crochet caractéristique ainsi que la formation de pré-nodules par stimulation de la mitose des cellules corticales (Pingret et coll., 1998). A ce stade, un deuxième message est envoyé aux racines des légumineuses et deux solutions se présentent :

- Soit les racines reconnaissent le message, se modifient (hair-curling) et provoquent une stimulation de la croissance. Ainsi, le nodule va devenir fonctionnel.
- Soit, dans le cas contraire, il ne se passe rien et le pré-nodule reste non fonctionnel.

Le fait que des structures lipochitooligo-saccharidiques spécifiques soient actives à des concentrations picomolaires sur des légumineuses suggère que les facteurs Nod sont perçus par des récepteurs spécifiques à haute affinité (figure 2)

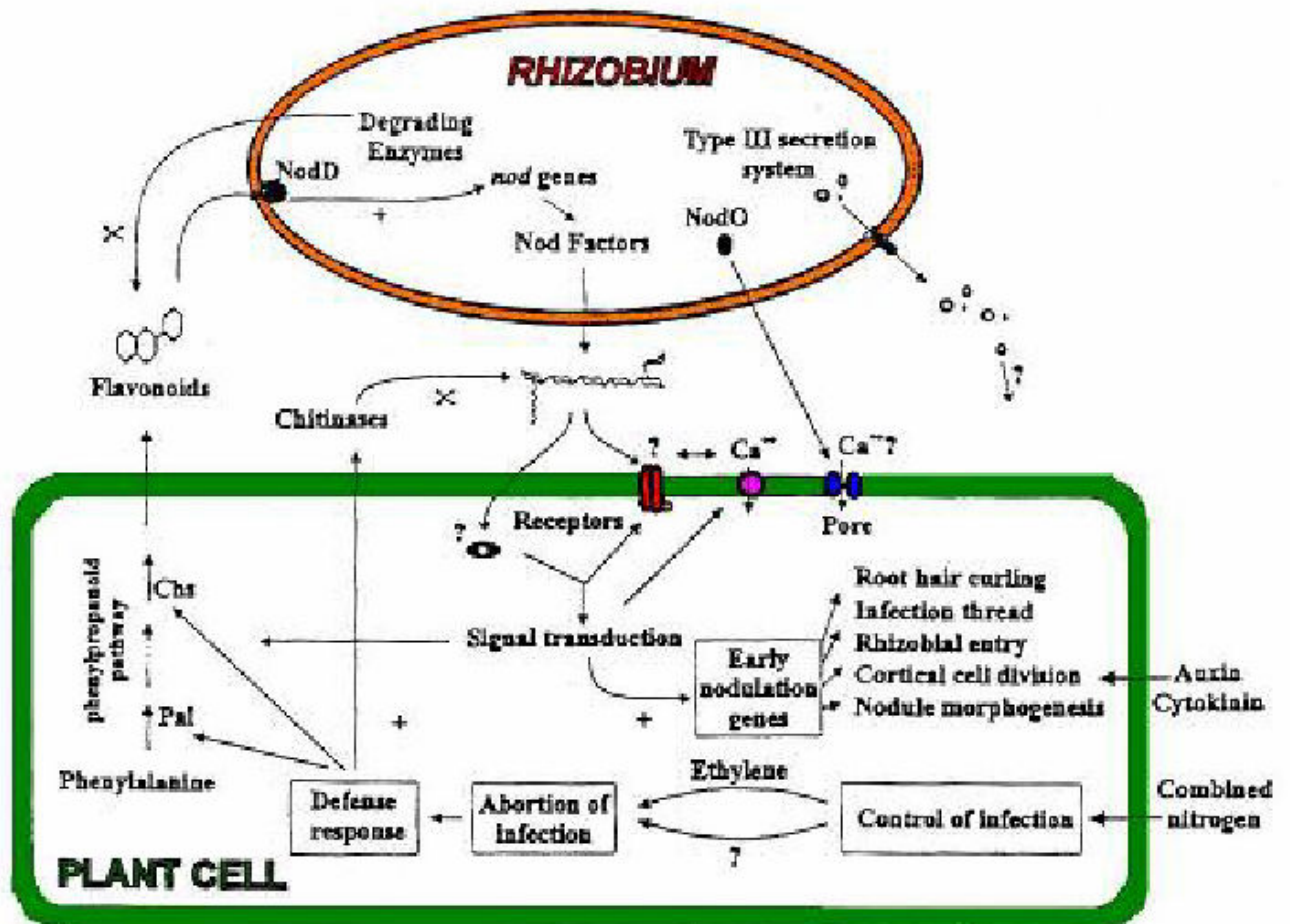


Figure 2: Signal moléculaire entre les deux partenaires (Broughton, 2000).

III-2-2-L'invasion par le symbiote et la formation du nodule

L'adhésion des bactéries à la surface des cellules des poils absorbants implique peut-être des lectines (protéines se liant spécifiquement à des glucides formés par la bactérie et par la plante). Les cellules de *Rhizobium* sont piégées dans une poche formée par la paroi des crochets. La membrane plasmique forme une invagination dans laquelle pénètrent des bactéries (Pelmont, 1995 ; Gage, 2004). Simultanément, la plante sécrète une gaine cellulosique autour des bactéries et forment ainsi un canal infectieux qui se dirige vers un pré-nodule.

Les LPS de *Rhizobium* joueraient un rôle lors de la formation du canal. Celui-ci libère finalement les bactéries dans le cytoplasme des cellules corticales. Celles-ci se divisent alors pour constituer une nodosité vascularisée dans laquelle les bacilles se différencient

irréversiblement en bactéroïdes ou en endosymbiose (Lindstroïm et coll., 2002). Ces derniers, de forme irrégulière, ont un volume supérieur à celui des formes libres. Ils ne se divisent plus et ne synthétisent plus de protéines Nod. En revanche, les bactéroïdes se concentrent dans la production de nitrogénases indispensables à la fixation de l'azote moléculaire.

Chaque bactéroïde est entouré par une membrane pér bactéroïdale formée par la plante. Elle sert de plaque d'échange entre la bactérie et le cytoplasme de la cellule hôte (Pelmont, 1995 ; Corbière, 2002). Cette dernière fabrique également diverses protéines spécifiques des nodules appelées les nodulines (par ex. globine de la leghémoglobine) (Corbière, 2002).

III-2-3-Le fonctionnement du nodule

L'association *Rhizobium*-légumineuse est un exemple de syntrophie. Les acides organiques fournis par la plante sont une source d'électrons permettant au *Rhizobium* d'obtenir son énergie (réduction O_2 en H_2O) et de fixer l'azote (réduction N_2 en NH_3) (Lodwig et Poole, 2003). L'ammoniac produit est cédé à la plante qui le convertit en acides aminés, une partie étant rétrocédée aux bactéroïdes (O'Gara et Shanmugam, 1976).

La leghémoglobine, protéine de coloration rouge et présentant des similitudes avec les hémoglobines animales, permet aux rhizobia de maintenir un taux faible mais constant d'oxygène dans le nodule. Elle permet ainsi d'éviter l'inactivation de la nitrogénase qui est sensible à l'oxygène tout en assurant l'apport d' O_2 indispensable à ces bactéries aérobies (Svistoonoff, 2003 ; Broughton, 2000). Elle est synthétisée par la plante-hôte (globine) et par le bactéroïde (groupe prosthétique hème) lié étroitement à la globine (Broughton, 2000).

La fixation de l'azote est assurée par un complexe enzymatique composée d'une nitrogénase réductase (passage de l'ATP à l'ADP) et d'une nitrogénase vraie (réaction permettant la fixation de l'azote de l'air) (Broughton, 2000).

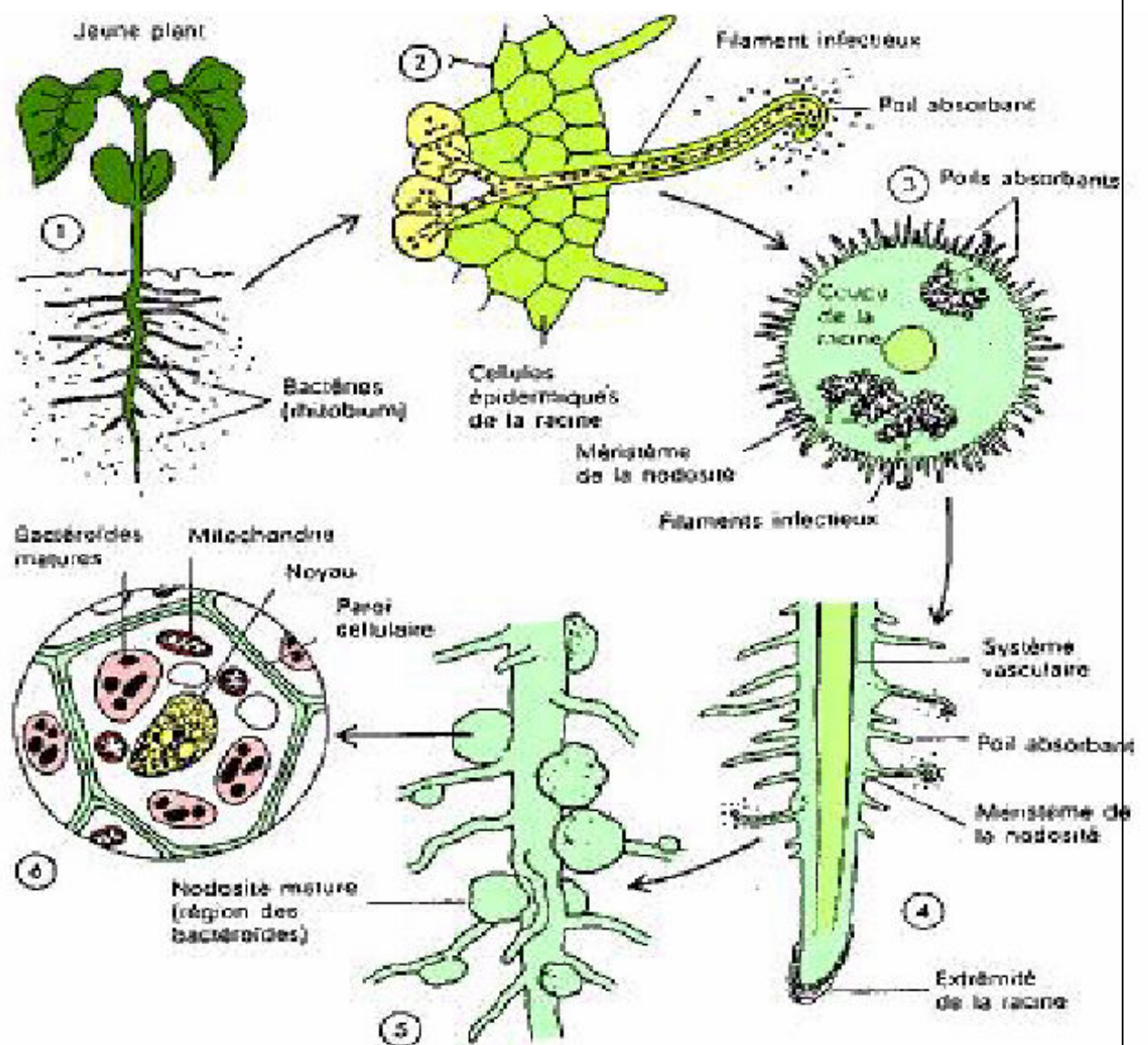


Figure 3: Les étapes de la nodulation (Broughton, 2000).

IV- Autres facteurs symbiotiques : Les Polysaccharides

Si les facteurs Nod sont le point de départ d'une communication indispensable à la mise en place spécifique de la symbiose fixatrice d'azote, ils ne sont pourtant pas impliqués dans les étapes plus tardives. En effet, lorsque des racines sont mises en présence des seuls facteurs Nod, les organes symbiotiques ne se forment pas ou sont incomplets. Seul le recourbement du poil absorbant est visible (Chataigné, 2007).

Il existe à la surface des bactéries d'autres composés dont le rôle est de succéder aux facteurs Nod : **les polysaccharides de surface** (Chataigné, 2007). Ceci est rapporté par de nombreux articles sur le rôle de ces polysaccharides :

IV-1-Les polysaccharides de surface

La plupart des microorganismes synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme, où ils sont utilisés par la bactérie comme source d'énergie. D'autres sont des composants de la paroi tels que les peptidoglycanes et les acides téichoïques. Enfin, un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule (Dirk Bergmaier, 2002).

Le terme « exopolysaccharide » (EPS) ou « polysaccharide exocellulaire » a été proposé par Sutherland (1972) et Cerning (1994) comme appellation générale pour ce groupe. Les microorganismes peuvent excréter deux types d'EPS. Le polysaccharide peut soit être excrété dans le milieu environnant, soit resté lié à la surface de la cellule sous forme de capsule (Dirk Bergmaier, 2002).

IV-2-Polysaccharides Exocellulaires ou exopolysaccharides (EPS)

Les polysaccharides exocellulaires sont synthétisés à la fois par des bactéries à Gram positif, négatif et des cyanobactéries. Ils se présentent soit sous forme d'une capsule enrobant la cellule soit secrétés dans le milieu environnant. Dans certains cas, les deux formes sont produites par le micro-organisme mais dans la pratique, la distinction entre les deux reste mal expliquée (Roger, 2002).

Ces polymères ont été nommés polysaccharides capsulaires ("capsular polysaccharides" : CPS), microcapsulaires, ou encore "slime" dans la littérature anglo-saxonne. Le terme général de polysaccharide exocellulaire ou exopolysaccharide (EPS) semble le plus approprié pour désigner ces différentes formes de polysaccharides (Roger, 2002).

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides (*exo/exs* ou *pss*) forment un grand groupe de gènes situé sur le megaplasmide symbiotique pSymB. Les protéines synthétisées par ce groupe de gènes sont de quatre types : les enzymes impliquées dans la biosynthèse des précurseurs de sucre, les transférases responsables de l'assemblage de l'unité répétitive, les enzymes responsables des substitutions non-sacharidiques et enfin celles permettant la polymérisation des unités répétitives entre elles et l'export des EPS (Chataigné, 2007).

La biosynthèse des EPS représente un processus multi-étape et dépend d'un complexe protéique localisé à la fois sur les membranes interne et externe. 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 de type ABC (Chataigné, 2007).

IV-2-1-Composition et classification des exopolysaccharides

a-Composition osidique

Les EPS sont composés de résidus glycosidiques, qui peuvent être liés de façon covalente à des substituants organiques ou inorganiques. Les sucres que l'on peut trouver dans les EPS sont extrêmement divers. La plupart de ces résidus sont également présents chez les animaux et les végétaux. Le D-glucose, le D-galactose et le D-mannose sous forme pyranosique, sont présents dans de nombreux EPS. Parmi les 6-déoxy-hexoses, le L-fucose et le L-rhamnose sont les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés. Les EPS de cellules eucaryotes se distinguent par la production, dans certains cas, de pentoses comme le D-ribose ou le D-xylose, qui sont beaucoup moins fréquents dans les polysaccharides dérivés des procaryotes (Sutherland, 1990).

En plus des monosaccharides les plus communs cités ci-dessus, les EPS peuvent contenir un ou plusieurs sucres rares, comme les hexoses de configuration absolue L, les hexosamines N-acétylées telles que la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine, la N-acétylmannosamine ou des amino-sucres comme la fucosamine ou la talosamine.

Une grande diversité dans la structure chimique des EPS peut être trouvée parmi les rhizobia, concernant la composition en sucres, et leur liaison dans la simple sous unité, la taille de l'unité de répétition et le degré de polymérisation (Skorupska et coll., 2006).

Parmi les EPS rhizobiales les plus connus : le succinoglycane (EPS I) qui est produit par plusieurs souches de *Sinorhizobium meliloti*, il se compose d'un galactose et sept résidus du glucose relié par des liaisons glycosidiques β 1,3, β -1,4 et β -1,6 (figure 4). La simple unité de répétition est représentée par le pyruvyl, acétyl, et des motifs du succinyl (Skorupska et coll., 2006).

Certaines souches de *S. meliloti* sont capables de produire un autre type d'EPS appelé galactoglucane (EPS II) qui est composé d'une unité répétitive disaccharidique de type hexose. L'EPS II est synthétisé seulement sous des limitations en phosphore (Skorupska et coll., 2006).

b-Classification

Selon leur composition chimique, les EPS peuvent être subdivisés en deux groupes: les **homopolysaccharides** et les **hétéropolysaccharides**. Tandis que les homopolysaccharides sont constitués d'un seul type de monomère saccharidique, les hétéropolysaccharides peuvent contenir plusieurs types de sucres (Dirk Bergmaier, 2002).

Parmi les homopolysaccharides, on retrouve les α -glucanes généralement composés des résidus de glucose liés en α -1,6 et α -1,3, comme les dextranes produit par *Leuconostoc mesenteroides* et les glucanes produit par *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* (Dirk Bergmaier, 2002).

Le groupe d'EPS le plus large et le plus diversifié est le groupe des hétéropolysaccharides qui se composent de plusieurs types d'oses constitutifs. Les hétéropolysaccharides sont formés d'unités répétitives, variables dans leur taille (de di- à octasaccharides), mais aussi d'autres groupes peuvent être présents, tels des groupements phosphate, amino ou acétyl. La production d'hétéropolysaccharides est très fréquente parmi les microorganismes et on y trouve aussi bien des souches d'un intérêt médical comme *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. ou *Enterobacter* spp. que des bactéries lactiques (Dirk Bergmaier, 2002). Les EPS rhizobiales sont des hétéropolysaccharides spécifiques pour chaque espèce (Skorupska et coll., 2006).

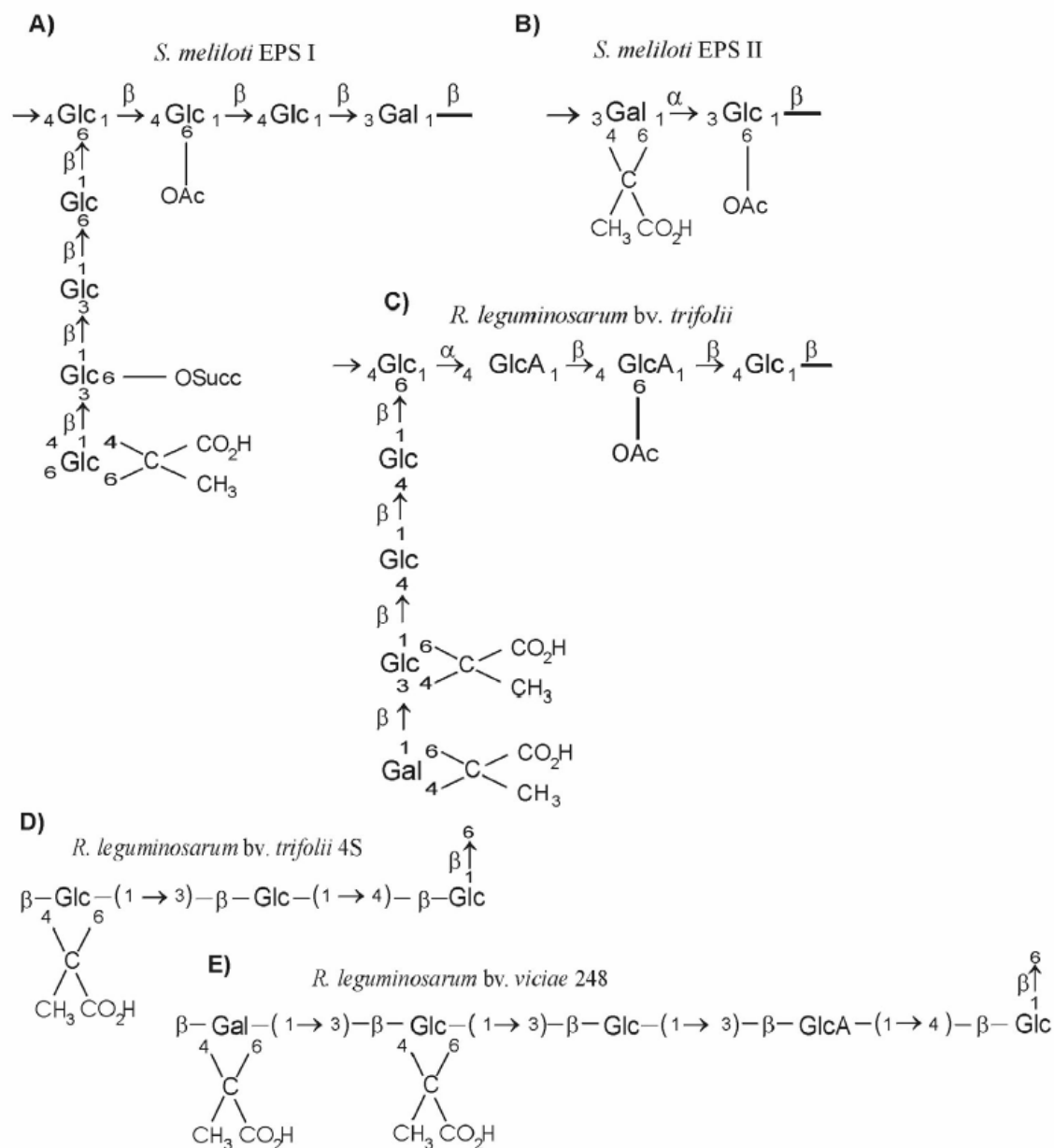


Figure 4: Schéma de la structure de différents exopolysaccharides en fonction de la souche qui les produits (Skorupska et coll., 2006).

IV-2-2-Rôle symbiotique des exopolysaccharides

La symbiose légumineuse-*Rhizobium* est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. La reconnaissance entre les deux symbiotes est rendue possible par des échanges de signaux moléculaires (Chataigné, 2007).

En plus des flavonoïdes, les polysaccharides extracellulaires (EPS) produits par les rhizobia sont essentiels pour l'établissement d'une fixation symbiotique d'azote avec les légumineuses (Chataigné, 2007 ; Gharzouli, 2006 ; Broughton et coll., 2000).

La fonction réelle des EPS dans la symbiose n'est encore élucidée, mais il y a plusieurs données qui indiquent que les EPS fonctionnent comme molécules de signalisation biologique active (Gallego, 2006).

Les EPS sont continuellement sécrétés dans la rhizosphère ou dans le canal d'infection, mais leur production est stoppée une fois le nodule atteint. Dans les conditions de stress hydrique, ces polysaccharides transforment leur environnement en gel afin de maintenir une couronne humide autour de la bactérie (Chataigné, 2007).

L'absence des exopolysaccharides bactériens provoque chez la plante la production excessive de composés phénoliques qui colorent en brun les racines et provoquent une apoptose des cellules infectées, ainsi que la mort des bactéries. De plus, le cordon d'infection ne progresse pas et des aberrations (poches) apparaissent. Ainsi leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote se situe dans l'inhibition des réactions de défense des plantes et dans la progression du cordon d'infection (Chataigné, 2007). Les EPS contribuent à la fixation de l'azote en empêchant les pressions élevées de l'oxygène (Kumari et coll., 2008).

Les légumineuses qui forment des nodules de types indéterminés révèlent des exigences structurales pour les EPS des rhizobia (Gharzouli, 2006 ; Janczarek et coll., 2003)

Le succinoglycane est un déterminant nécessaire pour la formation du cordon infectieux dans les poils racinaires (Gallego, 2006).

Des mutants déficients d'EPS de *R leguminosarum* bv .*trifolii* et *R leguminosarum* bv. *viciae* provoquent la formation des nodules vides ou partiellement infecté et inefficace sur le trèfle et la vesce (Janczarek et coll., 2003).

Une mutation au niveau des gènes *exo* chez *Sinorhizobium meliloti* provoque la formation de petits nodules abortifs et ineffectifs sur la luzerne (Janczarek et coll., 2003).

Parmi les rôles qui ont été proposés pour les EPS rhizobiales, l'identification de spécifique signalisation active pendant la colonisation et l'élongation du fil d'infection, l'organisation du cytosquelette des racines et redirection de la croissance de bout des poils racinaires (Morgante, 2007).

Le rôle des EPS pour la cellule le plus souvent proposé est de nature protectrice vis à vis de son environnement. La capacité de s'enrober dans une couche d'EPS avec une forte teneur en eau la rend plus résistante à la dessiccation et à la déprédation des protozoaires. La nature anionique de la couche d'EPS autour de la cellule peut aider à capturer des minéraux essentiels et des nutriments (Dirk Bergmaier, 2002).

En général, les bactéries productrices d'EPS ne sont pas capables de cataboliser les EPS qu'elles ont produites. Ainsi, les EPS ne semblent pas jouer le rôle d'une source d'énergie quoique dans certains cas, une dégradation du polymère a été observée (Cerning 1994).

IV-2-3-Facteurs influençant la production des EPS

Il est important de se rappeler que la production d'EPS dépend d'abord de la souche étudiée. Ce ne sont pas toutes les souches de bactéries qui produisent des polysaccharides qui sont excrétés dans le milieu, et la production peut varier d'une souche à l'autre dans le même genre bactérien. Enfin, même si la majorité des bactéries peuvent produire des EPS dans n'importe quel milieu, la production peut être optimisée sous certaines conditions dans certains milieux définis (Dupont, 1998).

La structure, la composition et la viscosité des exopolysaccharides bactériens dépendent de plusieurs facteurs tel que la composition du milieu de culture, la source de carbone et d'azote, les sels minéraux, le type de la souche et les conditions de fermentation (pH, température, la concentration d'oxygène et l'agitation) (Duta et coll., 2006).

IV-2-3-1-La source de carbone

La source de carbone a une influence majeure sur la biosynthèse des EPS par les bactéries lactiques. En plus du type de sucre (glucose, galactose, lactose, mannose, fructose etc.) et du rapport entre eux, la concentration des sucres peut avoir un effet stimulant sur la production (Cerning et coll., 1994; Dirk Bergmaier, 2002).

La production d'EPS par *Rhizobium* sp. est augmentée en présence des 13 sucres testés avec un maximum de production dans un milieu contenant 1% du glucose (Datta et coll., 1999).

IV-2-3-2-La source d'azote

La majorité des bactéries productrices d'EPS utilise un sucre comme source d'énergie et de carbone, et un sel d'ammonium ou des acides aminés comme source d'azote (Sutherland, 1982).

Pour certaines bactéries Gram-négatif comme des souches de *Xanthomonas*, *Pseudomonas* et *Rhizobium*, une limitation de l'azote résulte en une production accrue d'EPS (Sutherland, 1990).

Différentes sources d'azote tel que nitrate, acide glutamique, casamino acid et L-asparagine augmente la production d'EPS, mais elle est inhibée par la glycine, nitrite et les sels d'ammonium (Datta et coll., 1999).

IV-2-3-3-Les sels minéraux et cofacteurs

Les minéraux ont aussi une forte influence sur la production d'EPS. Des ions comme le Mg^{2+} , K^{+} , Fe^{3+} et Ca^{2+} qui agissent comme cofacteurs essentiels à la synthèse des polysaccharides (Sutherland, 1982).

Selon De et Basu (1996), le maximum d'EPS produit est obtenu en présence de 3% de mannitol, 3 mg/L de biotine et 0.3% KNO_3 .

Une production importante est obtenue lorsque le milieu est additionné de 1% du glucose, 10 g/ml $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, pyridoxal phosphate (2 g/ml), et 0.1% d'acide glutamique (Datta et coll., 1999).

Partie matériels et méthodes

I- Isolement des bactéries à partir des nodules

I -1-Collecte des échantillons

La plante *Hedysarum coronarium* se développe dans une grande partie du Constantinois (Quezel et Santa, 1962 ; Abdelguerfi-Berrakia et al, 1988 ; Benguedouar, 2000). Les sites choisis sont ceux de Chaab Ersas et du plateau de Ain El Bey (Constantine). La collecte des échantillons est effectuée aux mois de Février et Mars selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994). On creuse environ 15cm autour de la plante et 20cm de profondeur pour extraire la plante et son appareil racinaire. On débarrasse soigneusement le sol lié au niveau des racines pour ne pas endommager les nodules; enfin on place le tout dans un sac en plastique.

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

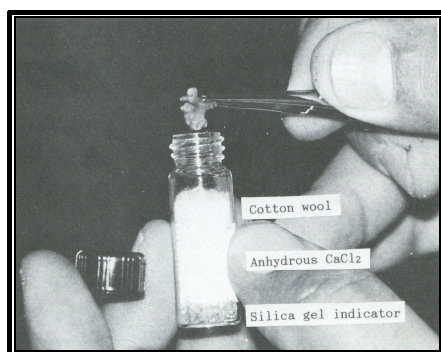
1-2-Conservation des nodules

La méthode de conservation utilisée est celle décrite par Vincent (1970) qui repose sur la dessiccation des nodules dans des flacons adéquats contenant du Chlorure de calcium anhydre (CaCl_2) (photographie 2). Par cette méthode les nodules peuvent être conservés de 6 à 12 mois.

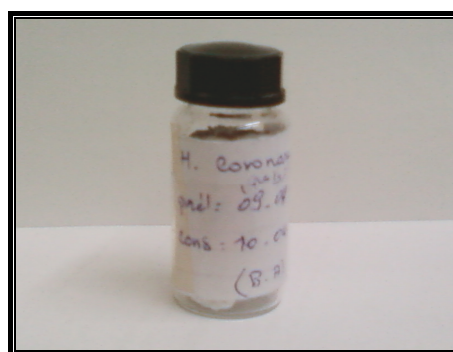
Chaque flacon sera identifié par une étiquette portant les informations suivantes :

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

Pour un usage immédiat, les nodules frais sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à 48h.



(a)



(b)

Photographie 2: Conservation des nodules sous CaCl_2 (a : Photo D.P. Beck, 1993)

I-3-Isolement des bactéries à partir des nodules

Les nodules conservés par dessiccation sont réhydratés pendant 24 heures au réfrigérateur dans l'eau distillée, puis une heure à la température ambiante (Vincent 1970).

I-3-1- Stérilisation des nodules

La stérilisation s'effectue sous la hotte à flux laminaire (Kottermann) selon les étapes suivantes :

- Les nodules sont immergés dans l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes.
- transférés rapidement dans le chlorure de mercure acidifié 0.1% (1g Hg Cl₂ + 5 ml HCl + 1l d'eau distillée) pendant 3 minutes.
- rincés abondamment à l'eau distillée stérile (10 fois), puis laissés pendant 1 heure dans l'eau distillée après le dernier rinçage.

I-3-2- Isolement des bactéries selon la méthode des nodules écrasés

Dans une boîte de Pétri stérile sont déposées 2 à 3 gouttes d'eau distillée stérile. Dans chacune d'elles est déposé un nodule stérile. Avant d'écraser le nodule selon la technique préconisée, on effectue un ensemencement du nodule entier sur les milieux YMA + rouge Congo et GPA + Pourpre de bromocrésol (Annexes 1). C'est une étape nécessaire pour vérifier la bonne stérilisation du nodule. Ensuite on procède à son écrasement de manière aseptique dans une goutte d'eau distillée stérile. Enfin on ensemence sur les boîtes des milieux précédents selon la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970). Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C pendant 24h à 72h.

II- Purification et conservation des isolats

II- 1 Examen morphologique et microscopique

Les colonies recherchées sur les deux milieux doivent correspondre à une description selon Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) : forme, aspect et couleur des colonies sur

- milieu YMA au rouge congo,
- milieu GPA au pourpre de bromo crésol.

Les colonies qui ont absorbé peu ou pas du rouge Congo sur le milieu YMA + RC et n'ayant pas acidifié le milieu GPA+BCP sont retenues. Elles subiront une observation microscopique (coloration de Gram) avant de leur purification.

II- 2- Vitesse de croissance

Les colonies suspectées et retenues sont ensemencées sur milieu YMA + Bleu de bromothymol, milieu permettant de distinguer les bactéries à croissance rapide (genre *Rhizobium*) et bactéries à croissance lente (genre *Bradyrhizobium*) (Jordan, 1984 ; Vincent, 1970).

II- 3- Purification et conservation des isolats

Dans des conditions aseptiques les colonies à purifier sont ensemencées dans 9ml du milieu YMB (Annexe 1) puis placée dans un bain-marie agitateur (Haier-water Bath Shaker-) pendant 24h à 48h. A partir d'une culture sur bouillon, on ensemence un milieu YMA au rouge Congo selon la méthode des stries. Incuber les boîtes à 28°C jusqu'à l'apparition des colonies pures.

Pour conserver les isolats, nous avons utilisé deux méthodes différentes :

- sur le milieu YMA additionné de 3g/l de CaCO₃ en tube incliné (Vincent, 1970)
- sur milieu YMA additionné de glycérol à 20%

Tableau 1 – Isolats et souche de référence utilisés

	Souches	Plante- hôte	Origine géographique	Source
A6	<i>Rhizobium sulae</i>	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar-Constantine, A. Squartini et coll., (2002)
S1	Notre étude	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
S2	Notre étude	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
S3	Notre étude	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
S4	Notre étude	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
S5	Notre étude	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	Cette étude

III- Caractérisation phénotypique des isolats

III-1-Effet de la source de carbone

Les souches sont cultivées sur milieu YMB et YMA où le Mannitol est remplacé par l'un des sucres suivants

D-Arabinose, D-Fructose, D-Galactose, D-Saccharose, D-Glucose D-Xylose, Lactose, Les tubes sont inoculés et incubés dans le bain marie agitateur à 28°C pendant 24 heures.

L'utilisation des sucres comme source de carbone est étudiée par l'estimation de la croissance en mesurant de la densité optique à une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm. (Shimadzu – spectrophotometer UV/120-02) et estimée aussi sur milieu solide YMA dont le Mannitol est remplacé par chacun des sucres sus-cités.

III-2-Effet du stress salin

Dans des tubes contenant le milieu YMB avec différentes concentrations de NaCl (Annexes 1), on prépare des précultures. On incube les tubes à 28°C dans le bain-marie agitateur pendant 24h. 0,1ml des précultures en phase exponentielle de croissance sont utilisés pour inoculer un flacon contenant 50 ml de milieu YMB à différentes concentrations de NaCl. Incubation à 28°C pendant 24h au bain-marie agitateur.

Les différentes concentrations de NaCl sont : 0g/l (0mM), 0.2g/l (3.41mM), 0.6g/l (10mM), 3g/l (50mM), 5.85g/l (100mM), 11.7g/l (200mM), 17.55g/l (300mM), 100g/l (1710 mM).

La croissance est suivie par mesure de la DO à une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm chaque 2 heures puis après 24 h.

La croissance est aussi suivie sur milieu solide YMA avec les mêmes concentrations en NaCl comme pour les hydrates de carbone.

III-3-Détermination du profil protéique par SDS-PAGE

III-3-1- Principe

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel sous l'effet d'un champ électrique. La vitesse de migration dépend de la charge, la taille et la dimension des molécules.

Cette méthode de séparation, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (ou PAGE pour Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) classique, est une méthode dénaturante en raison de l'adent dénatrant, SDS ou Sodium Dodécyl Sulfate) (Coyne et cool, 2002).

Dans ce gel dénaturant, le SDS, qui se lie aux protéines, est un détergent anionique qui dénature les protéines et confère une charge négative au polypeptide proportionnellement à sa longueur. Les complexes SDS-protéines qui se forment sont chargés négativement et toutes les protéines possèdent la même densité de charge. Cela signifie que dans des conditions de séparation dénaturante de SDS-PAGE le poids moléculaire apparent (et non réel) des protéines sera le seul facteur de leur séparation. Donc la migration est déterminée par le poids moléculaire et non pas par la charge intrinsèque du polypeptide (Coyne et cool, 2002).

La séparation des protéines d'une souche bactérienne par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) donne un profil ou électrophorégramme caractéristique de la souche et reproductible si les conditions sont standardisées (Ndiaye et coll., 2002).

III-3-2 -Protocole

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Laemmli (1970). La quantité d'une anse de platine remplie de bactéries, estensemencée sur un milieu de TY et incubée à 28°C pendant 24h. Une aliquote de 200 µl de chaque culture bactérienne, en phase exponentielle de croissance, est centrifugée à 7000 tours/min pendant 15 min.

La lyse des cellules s'effectue après traitement du culot bactérien obtenu par l'addition de 100 µl de tampon de lyse (Annexes 2) et agitation pendant 20mn ensuite mis dans l'étuve à 60°C pendant 20 mn pour interrompre les ponts di-sulfures.

Un dépôt de 35 µl de chaque échantillon est mis dans un puit. L'électrophorèse est réalisée sur un gel de polyacrylamide de 12 % (Annexes 2).

Après migration et démoulage, le gel est mis dans une solution de coloration contenant le bleu de Comassie et l'acide trichloracétique (60%) pendant une nuit sous une faible agitation. Enfin le gel est décoloré dans l'eau distillée sous faible agitation jusqu'à l'apparition des bandes polypeptidiques. Le gel est photographié à l'aide d'un appareil photo numérique.

IV- Test de nodulation

Le critère reconnu le plus fiable établissant l'appartenance d'un isolat au groupe des BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuses), est sa capacité à noduler sa plante hôte. Ainsi les isolats obtenus ont été testés pour leur capacité à noduler leur plante hôte d'origine.

-Préparation des jarres de Léonard

Les jarres sont préparées à partir des bouteilles en plastique d'eau minérale. Les bouteilles sont coupées horizontalement en deux parties. Laver et désinfecter les parties sous la hotte à flux laminaire par un détergent courant hypochlorite de sodium ensuite, sont exposées aux radiations ultraviolettes (UV) pendant 15 minutes. Les bouchons ont été percés au milieu à l'aide d'une pince passée au bec benzène. Les deux parties de la bouteille sont reliées par un cordon de compresse stérile. Les bouchons et les cordons sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

La partie supérieure contient le mélange sable –vermiculite alors que la partie inférieure contient la solution nutritive de Farhaeus (Annexe 1). Le cordon de compresse lié aux deux parties permet d'humidifier le mélange par la solution nutritive (photographie 3).



Photographie 3: Assemblage de Jarre de Léonard (Vincent, 1970)

-Préparation du mélange : sable- vermiculite

Le sable de rivière et la vermiculite sont lavés séparément avec de l'eau de robinet jusqu'à ce que l'eau devienne claire, puis sont séchés à l'étuve (photographie 4). Après séchage la vermiculite moulue dans un mixer et mélangé avec le sable à une proportion de 2/3. Le mélange vermiculite-sable est humidifié avec la solution nutritive de Fahraeus et

stérilisé à l'autoclave(Heizung) à 120 °C pendant 20 minutes dans des bécjers recouverts par du papier aluminium.



Photographie 4: Lavage et séchage de la vermiculite

-Stérilisation des graines :

Des graines (ou semences) de la plante *H. coronarium* (sulla), sont stérilisés, dans un premier temps 5 à 10 secondes dans l'éthanol 95 %, puis immédiatement transférées dans une solution d'acide sulfurique concentré (95%) pendant 3 minutes. Les graines sont ensuite rincées 10 fois avec de l'eau distillée stérile. Au dernier rinçage, elles sont laissées à gonfler pendant une heure.

Les graines stériles sont mises en germination sur des boîtes de TYA (tryptone yeast agar) (Annexe 1) enveloppées avec du papier aluminium et incubées à température ambiante pendant 4 à 5 jours (Planche 1).



a: gousses d' *H. coronarium*



b : graines d' *H. coronarium*



Planche 1 : germination des graines sur milieu TYA (Beringer, 1974).

-Inoculation des jarres

Après germination, dans chaque jarre sont plantées trois graines à une profondeur de 2 cm dans le mélange sable –vermiculite, puis sont inoculées avec 2 ml de la suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance (DO~1) à partir d'une culture sur YMB à 28 °C.

Enfin les jarres sont couvertes du papier aluminium pour éviter une éventuelle contamination et évaporation de la solution nutritive puis sont placées dans une chambre de croissance à température ambiante, où il est possible de moduler les conditions de luminosité, pendant 2 à 3 mois.

L'addition de la solution nutritive est réalisée régulièrement dans des conditions stériles à chaque fois que le niveau diminue (Photographie 5).



Photographie 5: L'ensemble des jarres dans une chambre de culture.

IV-1-Influence de la source de carbone sur la nodulation

Afin d'évaluer l'effet de la source de carbone sur le processus nodulaire, les jarres sont inoculées avec 2ml de la suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO \sim 1$) à partir d'une culture sur YMB à 28 °C, dont le mannitol est remplacé à chaque fois par l'un des sucres suivants : D-Arabinose, D-Fructose, D Galactose, D-Saccharose, D-Glucose, D-Xylose, Lactose, Maltose, Raffinose, Sorbitol.

IV-2-Influence du stress salin sur la nodulation

Pour étudier l'influence du stress salin sur la nodulation, on a réalisé le test de nodulation en utilisant deux systèmes différents :

a- Système des jarres de Léonard

Le test de nodulation est ordinaire, toutefois la solution nutritive est modifiée par la concentration croissante en NaCl (de 0g/l à 100g/l)

b- Systèmes des plantules en tubes

b-1-Préparation et germination des graines

La stérilisation et la germination des graines s'effectuent de la même manière que dans le test ordinaire.

b-2-Préparation des plantules en tube et inoculation

Après germination des graines, les jeunes plantules sont transférées dans des tubes à essai contenant chacun 10 ml de milieu Fahraeus solidifié, à raison d'une plantule par tubes (Photographie 6).

Pour évaluer l'effet du stress salin sur la nodulation et le processus symbiotique, nous utilisons le milieu Fahraeus solidifié à différentes concentrations en NaCl comme précédemment (jarre).

Pour chaque isolat, 3 essais avec plantules correspondantes sont réalisés, dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Après 5 à 6 jours, dans les conditions ambiantes de température et de luminosité du laboratoire, les plantules en tubes sont inoculées par les souches à tester.

Les tubes sont inoculés par 1 ml de la souche à tester. Pour chaque isolat bactérien, nous procédons à l'inoculation de 3 tubes avec un tube témoin non inoculé. Les tubes sont maintenus dans les conditions ambiantes du laboratoire, durant toute la période du test de nodulation. Après 4 semaines, les plantes inoculées sont régulièrement contrôlées pour détecter la formation des nodules au niveau de leurs systèmes racinaires.



Photographie 6: Dispositif utilisé dans le test de nodulation

V- L'étude des Exopolysaccharides (EPS) des isolats

V-1-Détection des exopolysaccharides

Il existe plusieurs façons de détecter la présence de polysaccharides. Les polysaccharides peuvent être détectés qualitativement par un examen visuel ou par coloration. Le dosage des EPS permet de les détecter quantitativement (Dupont, 1998).

a- Examen visuel

La façon la plus simple de détecter la production d'EPS chez une souche consiste à examiner une colonie sur un milieu gélosé. La colonie d'une souche productrice aura une apparence brillante et en touchant la colonie avec un cure-dents ou avec une anse, il y aura formation de longs filaments visqueux (Dupont, 1998).

b- Les colorations

Il est possible de sélectionner des souches bactériennes productrices d'EPS, en ajoutant des colorants dans le milieu de culture :

b-1- Le Calcofluor

Pour la détection des souches productrices d'EPS, les souches bactériennes sont cultivées sur des boîtes contenant le milieu YMA additionné de 0.02% de Calcofluor.

Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 24 heures.

Le Calcofluor est un colorant de la cellulose et les structures capsulaires. Il est fluorescent sous la lumière ultraviolette (UV). Les colonies non productrices d'EPS ne seront pas fluorescentes (Jordan, 1984 ; Struffi et coll., 1998).

b-2- Le rouge de ruthénium

Les souches bactériennes sont cultivées sur des boîtes contenant le milieu YMA additionné de (0.05%) de rouge de ruthénium. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 24 heures.

Le rouge de ruthénium est un colorant cationique qui donne une coloration rose foncé au milieu de culture. Ce colorant se fixe sur le peptidoglycane de la paroi bactérienne, ce qui entraîne une coloration de la colonie d'une souche non productrice. Ce colorant ne présente pas d'affinité pour les polysaccharides excrétés, ces derniers masquent alors la coloration et les souches productrices d'EPS apparaissent blanches sur fond rose (Gancel et coll., 1988).

V-2- Production et extraction des EPS (Kaci, 2005)

La production des EPS est déterminée sur milieu solide YMA dont le Mannitol est remplacé par une gamme de sucre (D-Arabinose, D-Fructose, D Galactose, D-Saccharose, D-Glucose, D-Xylose, Lactose, Maltose, Sorbitol) pour estimer l'influence de la source de carbone sur la production des EPS.

Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

Après incubation et à l'aide d'une spatule stérile, on prélève toutes les colonies muqueuses pour les mettre dans des tubes de centrifugation (photographie 7). Auparavant on rajoute une solution de KCl stérile 0,85% (Kaci, 2005). Les cellules bactériennes sont séparées de leurs EPS par centrifugation (Biofuge 22R Heraeus) 12800 tours/mn pendant 30min à 4°C.

Le surnageant contenant les EPS est filtré à travers des membranes filtrantes 0.45µm de Φ pour éliminer les cellules et les grandes fractions cellulaires.

Les fractions des EPS de grand poids moléculaire sont précipitées par 3 volumes d'éthanol 95%, fractionnés en petits morceaux puis conservés au congélateur.



Photographie 7: raclage des cellules bactériennes

V-3- Dosage des exopolysaccharides par la méthode à l'Anthrone

La teneur en polysaccharides est déterminée par la méthode à l'anthrone (Dreywood, 1946). Ce dosage permet de mesurer les sucres totaux réducteurs qui possèdent des fonctions carbonyles ($C = O$). Le dosage à l'Anthrone est une méthode colorimétrique basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide (H_2SO_4 pur) et à chaud.

Les dérivés furfuraliques obtenus (5-hydroxyméthyl-furfural pour les hexoses) se condensent avec l'anthrone pour donner des produits colorés (bleu-vert pour les hexoses, rouge avec les pentoses).

-Préparation du Réactif d'Anthrone

Pour 100ml :

H ₂ O	28ml
H ₂ SO ₄ concentré (1,84)	72ml
Anthrone	0.05g
Thiourée	1g

Refroidir et stocker le mélange dans le réfrigérateur pour une période n'excédant pas deux semaines.

-Mode opératoire

0,9 mL d'échantillon (EPS bactérien) est mis en contact avec 4.5 mL de réactif Anthrone en tube. Le mélange est agité au vortex et mis au bain marie 100°C pendant 15 mn. Les tubes sont ensuite refroidis dans un bain eau-glace et l'absorbance est lue à 620 nm.

Une courbe d'étalonnage est établie en utilisant du D-glucose et D-galactose (Sigma) avec des concentrations comprises entre 0.02 à 0.1g/l.

Résultats et Discussion

Caractères cultureux

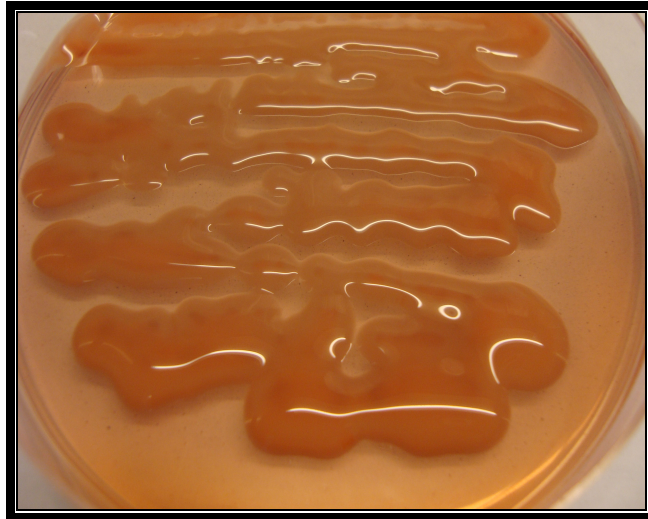
Les isolats, symbolisés par S1, S2, S3, S4, et S5 présentent une croissance sur le milieu YMA détectable après 48h, avec une production abondante des exopolysaccharides et de Poly β hydroxybutyrate (PHB).

Les colonies sur ce milieu apparaissent sous forme circulaire, convexe, de couleur blanchâtre ou crème et montrent une texture homogène translucide avec un aspect brillant (photographie 8).



Photographie 8: Aspect des colonies de la souche S5 sur le milieu YMA

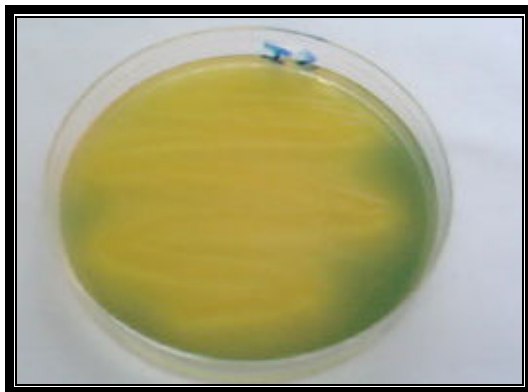
Les isolats et la souche de référence A6 présentent une faible absorption du rouge Congo (photographie 9) sur milieu YMA et n'acidifient pas le milieu GPA additionné de pourpre de bromocrésol après 24h. Ces caractères, propres aux bactéries nodulant les légumineuses, en particulier le genre appartenant à la famille des Rhizobiacées (Vincent, 1970; Somasegaran et Hoben., 1994).



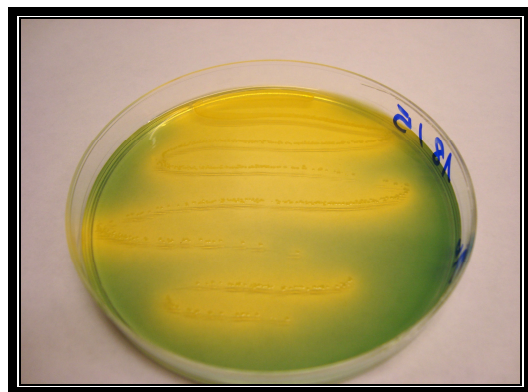
Photographie 9 : Aspect des colonies de la souche S2 sur YMA+rouge Congo

Le critère de vitesse de croissance fait ressortir que les isolats et la souche A6 acidifient le milieu YMA additionné de Bleu de bromothymol après 24h.

Selon Vincent (1970) ; Beck et coll., (1993) les rhizobia à croissance rapide provoquent une réaction acide rapide sur le milieu YMA au bleu de bromothymol avec un virage de la couleur du milieu du vert vers le jaune.



(a)



(b)

Planche 2: acidification du milieu YMA+BTB après 24h d'incubation avec la souche S1(a) et avec la souche A6(b)

L'examen microscopique des cellules bactériennes révèle des bâtonnets courts à Gram négatif (figure 5).

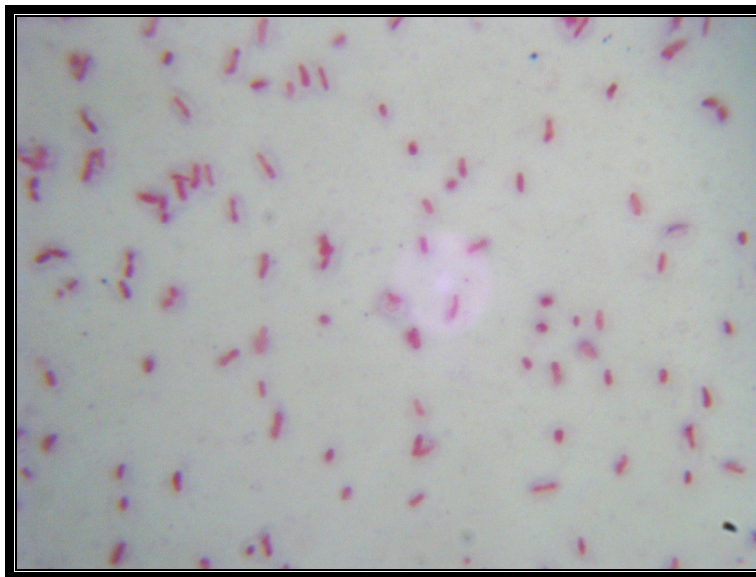


Figure 5: coloration de Gram de la souche S2

II- Caractéristiques phénotypiques des isolats

II-1- Effet de la source de carbone

La D.O. λ_{600} est mesurée après 24 heures d'incubation à 28°C. Les valeurs de la densité optique obtenues (annexe 3) montrent que les isolats peuvent assimiler une large gamme de sucres comme source de carbone avec une préférence pour le sorbitol, le saccharose, le maltose et le glucose.

Le mannitol présente une bonne source de carbone pour toutes les souches par contre l'arabinose et la xylose sont faiblement utilisés par les isolats. Les résultats de l'effet de la source de carbone sur la croissance des souches bactériennes sont résumés dans le tableau 2

Tableau 2: effet des différents sucres sur les souches testées

Souches Sucres	S1	S2	S3	S4	S5	A6
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	±	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	+
Arabinose	±	-	-	-	-	+
fructose	±	-	-	-	+	+

+ Croissance positive, - croissance négative ; ± croissance faible.

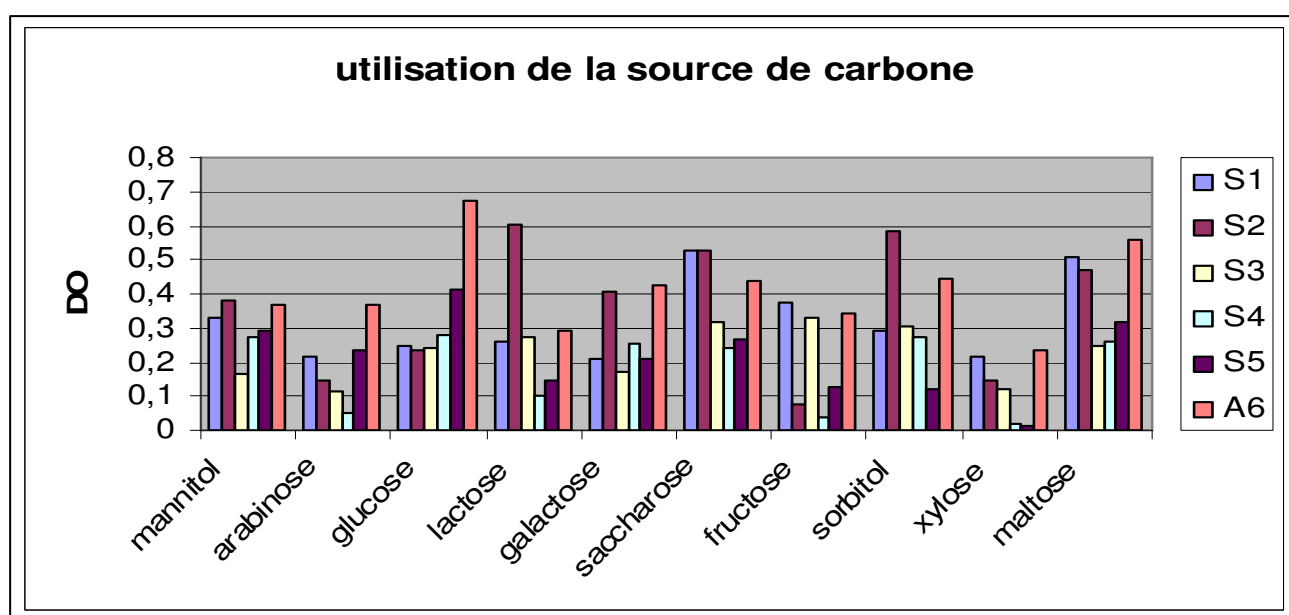


Figure 6 : utilisation de la source de carbone par toutes les souches testées.

Kumari et coll., (2008) montrent que parmi les 20 carbohydrates testés, les monosaccharides (glucose, galactose, arabinose, fructose, raffinose et xylose) donnent une bonne croissance, suivie par le mannitol, les disaccharides (lactose, maltose, saccharose) et les polysaccharides (cellulose).

Les rhizobia à croissance rapide utilisent une large gamme de carbohydrates comme source de carbone par rapport aux rhizobia à croissance lente (Graham et Parker, 1964).

Les rhizobia à croissance rapide ont la capacité de produire l'enzyme NADP-6 phosphogluconate déshydrogénase qui leur permet d'utiliser une large gamme de sucre (Martinez -Romero et coll., 1991) par contre les rhizobia à croissance lente, n'ayant pas de NADP-6 phosphogluconate déshydrogénase, n'assimileraient que quelques substrats carbonés (Jordan, 1984).

Les polysaccharides sont généralement considérés comme une source de carbone pauvre pour la croissance des rhizobia ; cependant, selon Kumari et coll., (2008) toutes les souches présentent une bonne croissance en présence de cellulose.

Cigdem et coll., (2006) montrent que les rhizobia isolés à partir des nodules de *Phaseolus vulgaris* sont capable de croître en présence du glucose, galactose, mannitol, sucrose, succinate, rhamnose et mannose.

Wei et coll., (2002) montrent que les rhizobia isolés à partir de *Indigofera amblyantha*, *Indigofera carlesii* et *Indigofera potaninii* utilisent une large gamme de carbohydrates tel que le galactose, lactose, sucrose, mannose, xylose, et le citrate.

II-2- Effet du stress salin

Les résultats obtenus, représentés par les planches (3, 4 et 5) montrent que jusqu'à une concentration de 300 mM de NaCl, la croissance des souches n'est pas affectée. Au-delà de cette valeur (1710 mM de NaCl), aucune croissance n'est observée pour la majorité des souches.

L'effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des souches est résumé dans le tableau 3.

Des résultats rapportées par Merabet et coll., (2006) montrent que les rhizobia isolés de *Medicago ciliaris* et *M. polymorpha* tolèrent une salinité allant jusqu'à 800mM de NaCl in vitro.

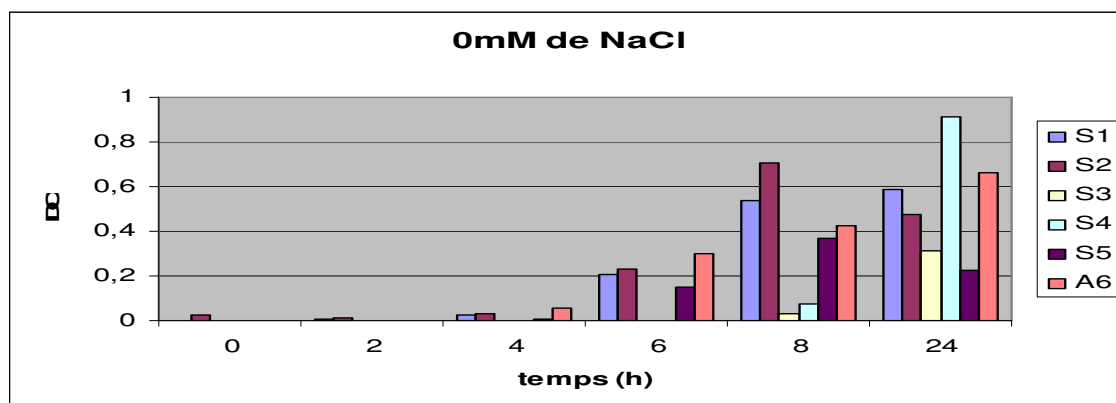
Selon Wei et coll., (2003) les espèces de *Rhizobium loessence* isolées du trèfle et d'astragale n'ont pas pu croître dans un milieu de culture avec 5% de NaCl.

La tolérance aux fortes concentrations de NaCl semble être un caractère adaptatif, comme il a été établi avec des souches de *Sinorhizobium meliloti*, qui après un long séjour dans un milieu à forte concentration de NaCl, sont devenues tolérantes à 3.5% de NaCl. (Steiborn et Rhoughley, 1975).

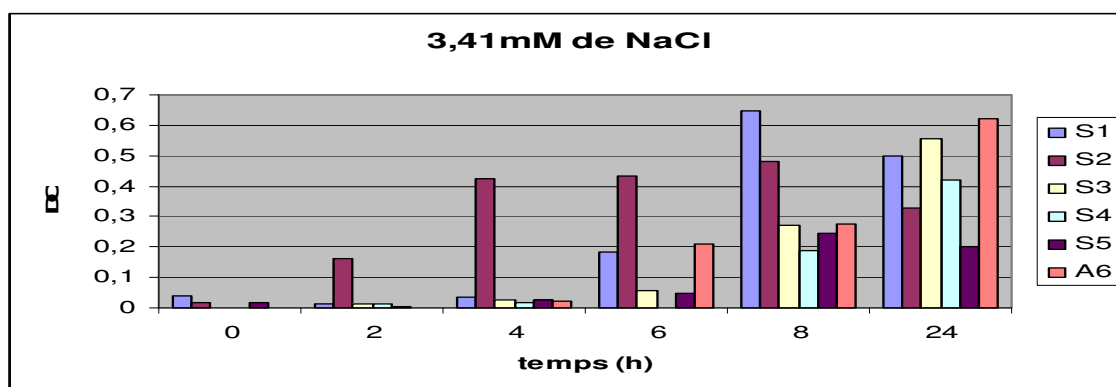
Tableau 3 : effet du stress salin.

Souches testées NaCl	S1	S2	S3	S4	S5	A6
0 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+
3.41 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+
10 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+
50 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+
100 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+
200 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+
300 mM de NaCl	+	+	+	+	+	+
1710 mM de NaCl	-	-	-	-	-	-

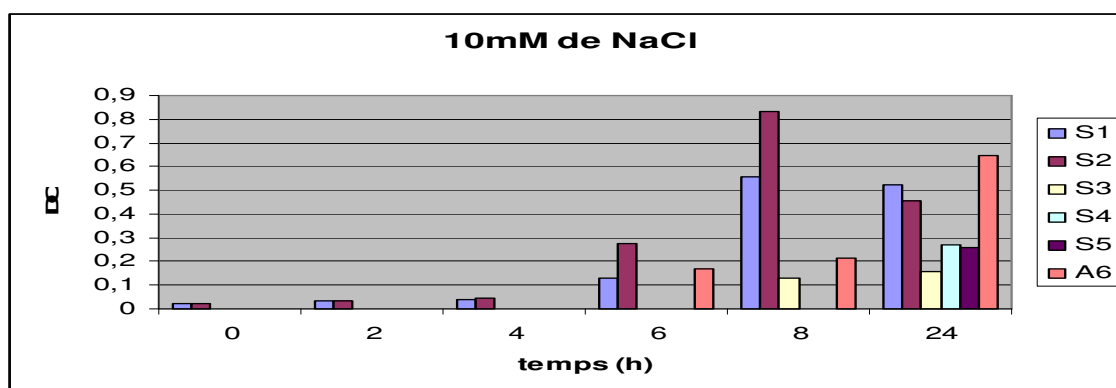
+: Croissance positive, **-** : croissance nulle.



(a)

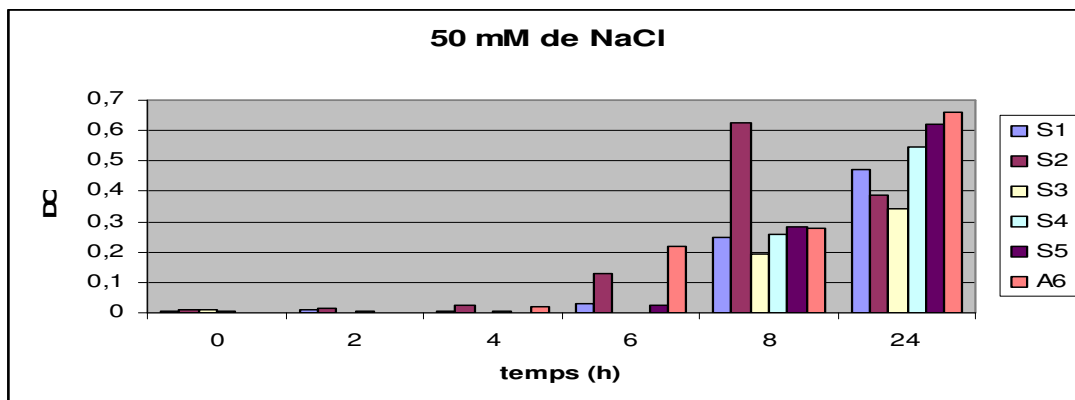


(b)

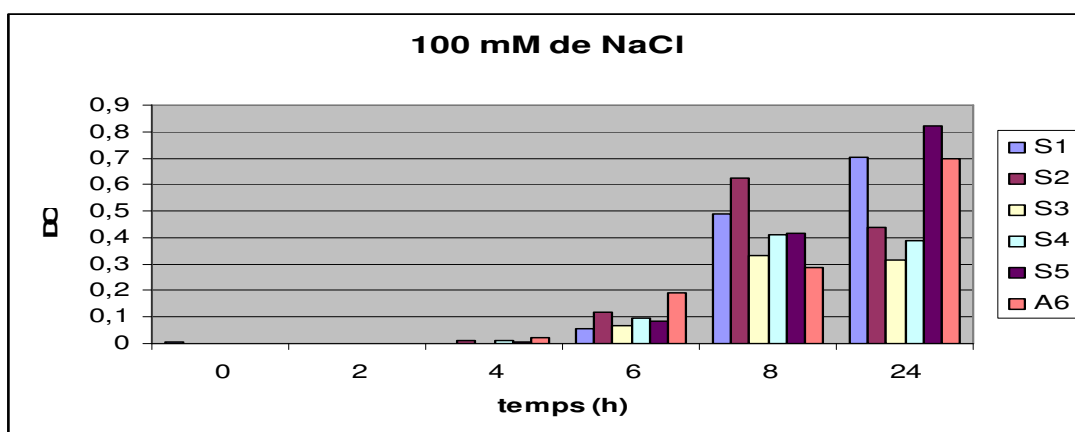


(c)

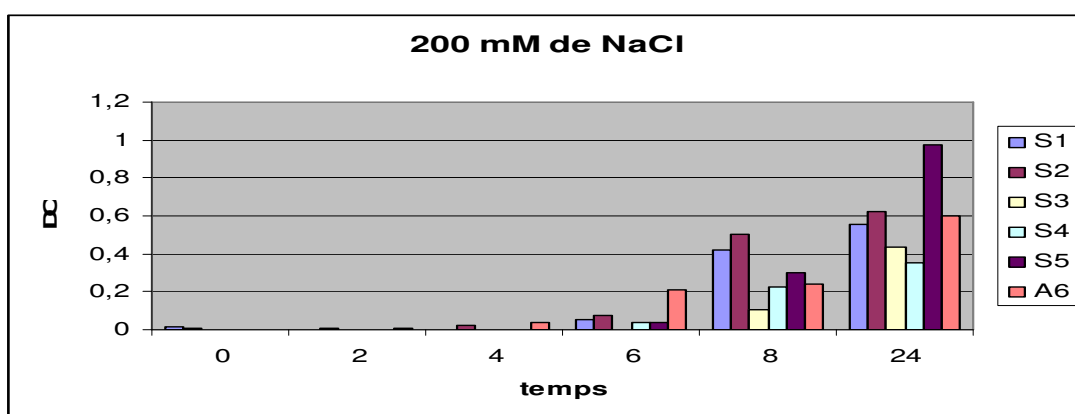
Planche 3 : suivie de la croissance en présence de 0 mM de NaCl(a), 3.41 mM (b) et 10mM de NaCl (c)



(d)

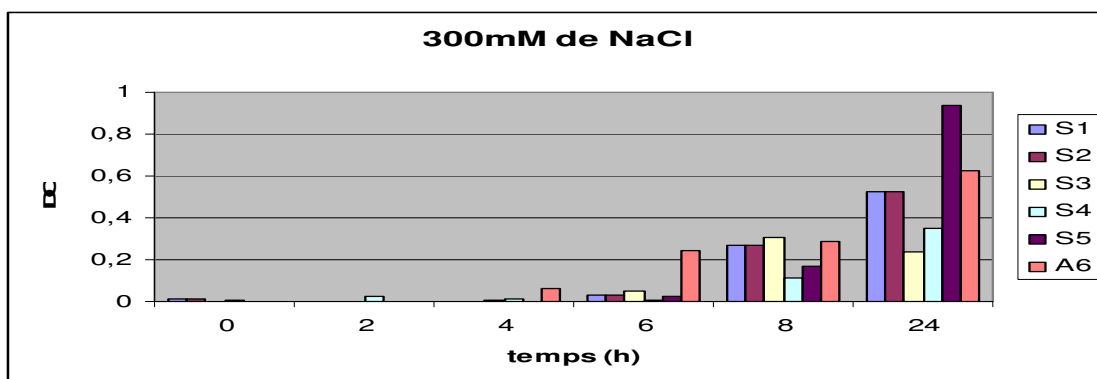


(e)

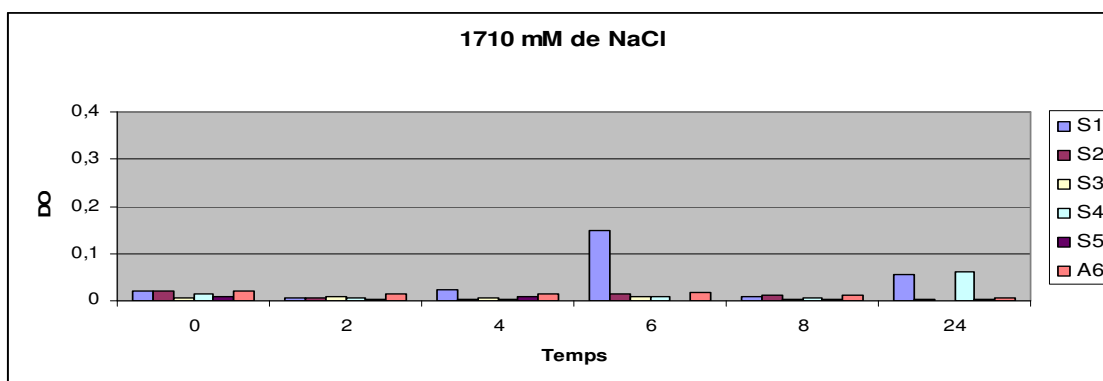


(f)

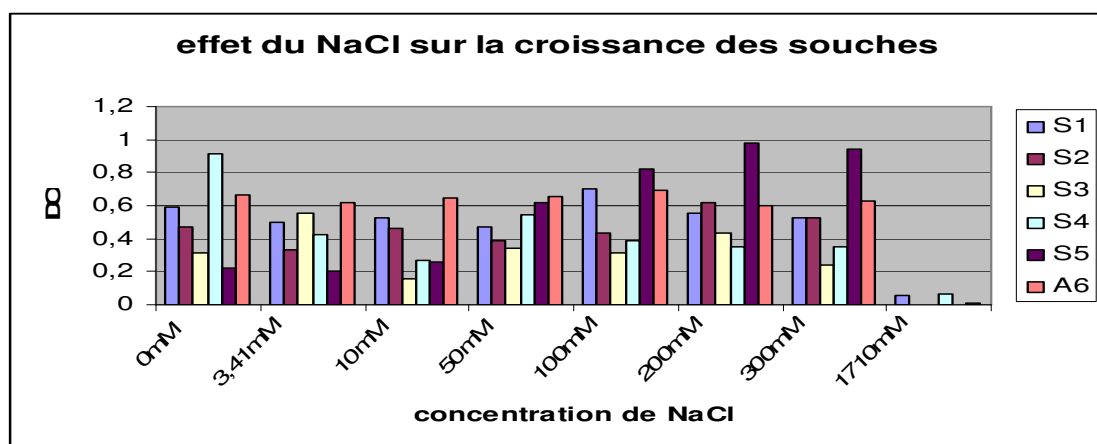
Planche 4 : suivie de la croissance en présence de 50 mM de NaCl (d), 100 mM (e) et 200 mM de NaCl (f).



(g)



(h)



(i)

Planche 5 : suivie de la croissance en présence de 300 mM de NaCl (g), 1710 mM (h).

(i) : effet du NaCl

II-3- Détermination du profil protéique par SDS page

L'analyse numérique des profils électrophorétiques obtenus pour chaque souche, consiste à calculer le rapport frontal R_f de chaque bande polypeptidique selon la formule suivante (Coyne et coll., 2002) :

R_f = distance parcourue par la bande polypeptidique / la distance parcourue par le marqueur.

Après avoir dénombré les différentes bandes de chaque profil et calculé les rapports frontaux correspondants, on a pu établir le diagramme type suivant :

Tableau 4: diagramme type des bandes polypeptidiques.

bande	Rf	S1	S2	S3	S4	S5	A6
1	0.045	0	0	0	0	1	0
2	0.08	0	0	1	0	1	0
3	0.12	0	0	0	0	1	0
4	0.2114	0	0	1	0	1	1
5	0.2171	0	0	0	0	0	1
6	0.2571	0	0	0	0	1	1
7	0.2685	0	0	0	0	0	1
8	0.28	0	0	0	0	1	1
9	0.3142	0	0	1	0	1	1
10	0.3257	0	0	0	0	0	1
11	0.3485	0	0	0	0	1	1
12	0.3657	0	0	0	0	1	1
13	0.3771	0	0	1	0	0	1
14	0.3942	0	0	1	0	1	1
15	0.4171	0	0	1	0	0	0
16	0.4342	0	0	1	1	1	1
17	0.4457	0	0	0	0	0	1
18	0.4687	0	0	1	1	1	0
19	0.4742	0	0	0	0	0	1
20	0.5085	0	0	1	1	1	0
21	0.5371	0	0	1	1	1	1
22	0.5714	0	0	0	0	1	1
23	0.5828	0	0	0	0	0	1
24	0.6000	0	0	1	1	1	0
25	0.6171	0	0	1	1	0	1
26	0.6285	0	0	0	0	1	1
27	0.6628	0	0	1	1	1	1
28	0.6800	0	0	0	0	0	1
29	0.7028	0	0	1	1	0	1
30	0.7200	0	0	0	0	1	1
31	0.7371	0	0	1	1	0	0
32	0.7485	0	0	0	0	0	1
33	0.7657	0	0	1	1	0	1
34	0.7771	0	0	0	0	1	0
35	0.7942	1	0	1	1	0	0

36	0.8000	0	0	0	0	1	1
37	0.8228	0	0	1	1	0	0
38	0.8342	1	0	0	0	1	1
39	0.8742	0	0	0	0	0	1
40	0.8857	0	0	1	1	1	0
41	0.9028	0	0	0	0	1	1
42	0.9257	0	0	1	1	1	1
43	0.9428	0	0	1	1	1	1
44	0.9714	0	0	0	0	1	1

0 : absence de bande ; **1** : présence de bande

Afin de déterminer le degré de ressemblance entre les différentes souches testées, on a calculé le coefficient de similitude selon la méthode de Jana et coll., (1992).

Formule du coefficient de similitude :

Coefficient de similitude = (nombre de bandes communes entre les 2 souches /nombre total de bande) ×100

Tableau : coefficient de similitude entre les différentes souches testées

Souches testées	S1	S2	S3	S4	S5	A6
S1						
S2	95.45%					
S3	47.72%	52.27%				
S4	61.36%	65.90%	86.38%			
S5	40.90%	38.63%	50%	45.45%		
A6	31.81%	27.27%	34.09%	27.27%	52.27%	

Les résultats obtenus montrent que les isolats présentent un degré de similitude faible avec la souche de référence A6.

Les profils protéiques révèlent une différence importante entre la majorité des isolats, sauf entre la souche S1et S2ou le coefficient de similitude atteint les **95.45%**.

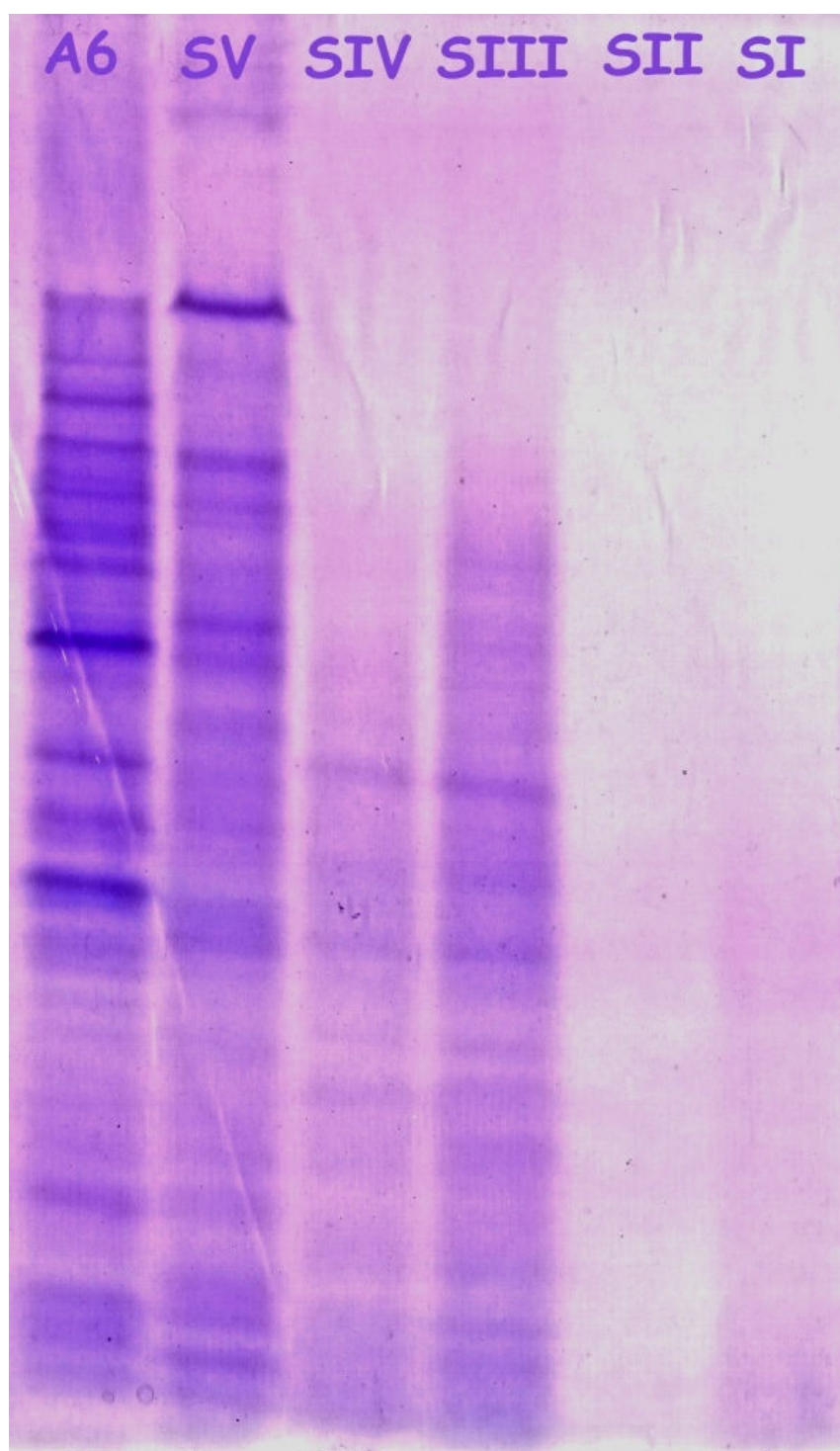


Figure 7 : profils protéique des différentes souches

Souches isolées: SI, SII, SIII, SIV, SV

Souches de references: A6

III-Test de nodulation

L'aptitude des bactéries à infecter les racines de la plante-hôte et à induire des nodules s'appelle 'l'infectivité', alors que le terme 'efficacité' ou 'effectivité' désigne l'aptitude des plantes nodulées à fixer au maximum l'azote. (Bech et coll., 1993)

Dans notre étude, nous avons réalisé le test de nodulation en utilisant le système des jarres de Leonard pour évaluer l'influence de la source de carbone sur la capacité de nos isolats à former des nodules sur les racines de la légumineuse *H. coronarium* sous des conditions bactériologiques contrôlées, ainsi que l'effet du stress salin sur le processus de nodulation

En rassemblant toutes les conditions requises, notamment l'absence de tout contaminant au niveau des graines, des milieux de croissance et solution nutritive, on a pu aboutir aux résultats suivants :

III- 1- Premier test de nodulation : test témoin

Ce premier test est un essai pour évaluer la capacité de nos isolats d'infecter les racines de la légumineuse et de former des nodules avec la plante d'origine à partir de laquelle ont été isolées en présence d'une source de carbone témoin: le mannitol.

Après une période de culture de deux à trois mois dans une chambre de culture sous des conditions contrôlées, les plantes sont prélevées pour évaluer la formation des nodules. La partie aérienne est bien développée avec des feuilles bien formées vertes (planche 6).

On observe la formation d'un nombre important de nodules en présence de tous les isolats, sauf en présence de la souche S1 et S4 où il n'y a ni formation de nodules ni de palettes. La taille des nodules obtenus est importante.

En présence de la souche S3 et S5, on observe la formation de quelques nodules rouges de petite taille se situant dans la partie supérieure des racines. La couleur rouge des nodules est peut-être due à la présence d'un pigment, la Leghémoglobine ; l'apparition de ce pigment dans le nodule coïncide avec le démarrage de fixation d'azote et sa dégradation correspond à l'arrêt de la fixation. En plus le réisolement des souches bactériennes à partir des nodules fait apparaître des colonies sur milieu YMA.

Tableau 5 : résultats du 1^{er} test de nodulation pour la plante *H. coronarium*

Plante	Souche inoculée	Sucre sutilisés	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied	Nb total des nodules
<i>H.coronari um</i>	S1	Mannitol	04-11-08	04-11-08	(-)	(-)
	S2	Mannitol	04-11-08	04-11-08	3P (2n, 3pa- 2n, 4pa-3n, 2pa)	7 nodules, 9 palettes
	S3	Mannitol	04-11-08	04-11-08	3p (2n, 2pa- 5n, 2pa-2n)	9 nodules, 4 palettes Rmq : sur p ₂ : 3n de couleur rouge et de petite taille
	S4	Mannitol	04-11-08	04-11-08	3p (0-0-0)	(-) avec une partie racinaires bien développée
	S5	Mannitol	04-11-08	04-11-08	3p (9n-1n- 4n)	14 nodules. Sur p ₁ 2n rouges dans la partie supérieur des racines.

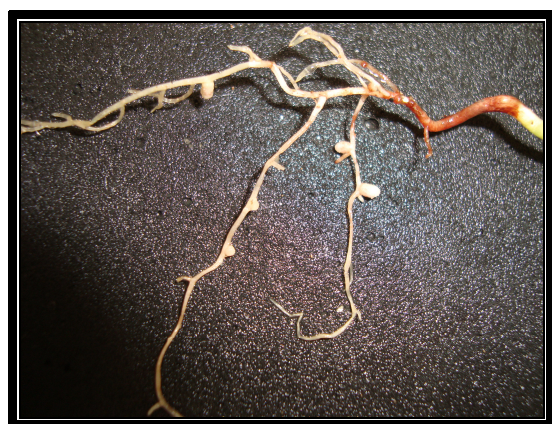
Chiffre + p : nombre de pieds ; **chiffre + n** : nombre de nodules ; **chiffre + pa** : nombre de palettes ; (-) : absence de nodules et de palettes.



(a)



(b)



(c)



(d)

Planche 6: résultats du test de nodulation avec la souche S2(a), avec la souche S5 (b, c) et la partie aérienne (d).

III-2- Influence de la source de carbone sur la nodulation

Dans ce test nous avons modifié la source de carbone du milieu de culture des souches bactériennes ; l'objectif étant l'influence des différents sucres sur le processus de nodulation.

Les résultats diffèrent selon la source de carbone et la souche inoculée. La taille et le nombre des nodules obtenus sont variables selon la souche inoculée et le sucre utilisé.

La souche S1

Tableau 6: test de nodulation avec la plante *H. coronarium* inoculée par la souche S1

Chiffre + p : nombre de pieds ; **chiffre + n** : nombre de nodules ; **chiffre + pa** : nombre de palettes ; **(-)** : absence de nodules et de palettes.

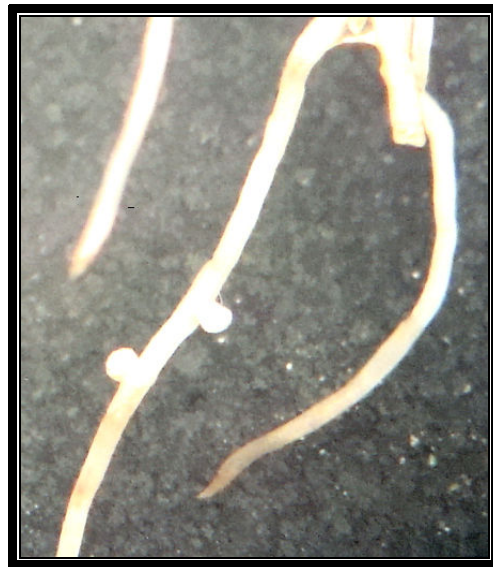
plante	Souche inoculée	Sucre utilisé	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied	Nb total des nodules
<i>H.coronarium</i>	S1	Saccharose	18-01-09	18-04-09	3P (1n, 6pa)	1n
		mannitol	18-01-09	18-04-09	3P (1pa-1pa-2pa)	0n
		raffinose	18-01-09	18-04-09	3P (4pa-4pa-0)	0n
		glucose	18-01-09	18-04-09	2P (1pa-2pa)	0n
		fructose	18-01-09	18-04-09	2 P (1n-1n)	2n
		galactose	18-01-09	18-04-09	5P (1n, 2pa-2pa-4pa-3pa-1pa)	1n
		sorbitol	18-01-09	18-04-09	(-)	0n
		lactose	01-02-09	18-04-09	4P (1n, 7pa-4pa-5pa-1n, 4pa)	2n
		arabinose	01-02-09	18-04-09	5P (3n, 2pa-1n, 11pa-4pa-2n, 3pa-5pa)	6n
		xylose	01-02-09	18-04-09	5P (2n roses, 6pa-1n rouge-1pa-0-2pa)	3n

On observe la formation des nodules de taille minuscule en présence de la majorité des sucres à l'exception du mannitol, du raffinose, du glucose, et du sorbitol, où il n'y a pas de formation de nodules.

En plus de la formation des nodules, on remarque l'apparition de structures racinaires appelées palettes. En présence de la xylose, il y a la formation de nodules rouges.



(a) : xylose



(b) : arabinose

Planche 7: nodules obtenus avec la souche S1

La souche S2

Avec la souche S2 il y a formation des nodules ainsi que des palettes en présence de tous les sucres.

Le nombre des nodules obtenus en présence du lactose et du fructose est important par rapport aux autres sucres. La majorité des nodules formés sont de grande taille et de couleur rouge. En présence du sorbitol le nombre de nodules est réduit.

Tableau 7: résultat du test de nodulation pour la plante *H. coronarium* inoculée par la souche S2.

plante	Souche inoculée	Sucre utilisé	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied	Nb total des nodules
<i>H. coronarium</i>	S2	Saccharose	18-01-09	18-04-09	4P (2n grands, 1pa-1n grand, 1pa-0-0)	3 grands nodules
		mannitol	18-01-09	18-04-09	2P (3n 2grands rouges et 1petit, 1pa-0)	3 n
		raffinose	01-02-09	18-04-09	4P (1n grand -1n grand 1pa-1n grand, 2pa-0)	3 grands nodules
		glucose	01-02-09	18-04-09	6p (1n, 2pa-1n, 3pa-1n, 4pa-1n RP.PS ,16pa-1n RP.PI, 13PA-1n RSPI .7p)	6 n (5grands et rouges et 1 moyen blanc)
		fructose	01-02-09	18-04-09	6p (1n, 20pa-2n, 3pa-1n, 7pa-1n, 15pa-2n, 16pa-2n, 5pa)	9n (3grands nodules+6petits)
		galactose	18-01-09	22-04-09	3P (2n RP.PS, 3pa-3n RS.PI, 12pa-3pa)	5 n (4grands +1 petit)
		sorbitol	18-01-09	22-04-09	1P (1n RPPS ,10pa)	1 n
		lactose	01-02-09	22-04-09	6p (2n '1RPPS et 1 RSPI', 10pa-2n RSPI,	9n (1n rouge)

					2pa-1 n RPPS ,6pa- 1n RPPS ,7pa- 2n RPPS, 14pa-1n RPPS , 13pa)	
		arabinose	01-02-09	22-04-09	6p (1n RPPS ,10pa- 1n RSPS-2n RSPS ,10pa- 1n RPPS, 6pa-5pa-2pa)	5n (2 grands rouges+3 moyens)
		xylose	01-02-09	22-04-09	5p (2n RPPS, RSPI, 9pa -1n RSPI ,5pa-0- 0-1nRPPS, 2pa)	4n (2grands +2 petits)

Chiffre + p : nombre de pieds ; **chiffre + n** : nombre de nodules ; **chiffre + pa** : nombre de palettes ; (-) : absence de nodules et de palettes.



a: fructose



b: arabinose



c: galactose



d: lactose

Planche 8: résultat du test de nodulation pour la souche S2

La souche S 3

L'inoculation de la plante *H. coronarium* par la souche S3 a donnée un nombre important de nodules en présence de la majorité des sucres testés, par rapport aux autres souches.

En présence du xylose, raffinose, saccharose et lactose ; on remarque la formation d'un nombre important de nodules avec un maximum de 21 nodules avec du saccharose. Par contre, lorsque le sorbitol et le fructose sont utilisés comme source de carbone dans le milieu, le nombre de nodules formés est réduit.

Il est à noter que les nodules obtenus en présence du saccharose et du xylose atteignent respectivement les 3mm et 4mm de longueur.

Tableau 8: résultat du test de nodulation pour la plante *H. coronarium* inoculée par la souche S3

Plante	Souche inoculée	Sucre utilisé	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied	Nb total des nodules
<i>H. coronarium</i>	S3	glucose	22-02-09	17-05-09	5p : P₁ : 1n rouge+2n roses RS.PS ,5 pa P₂ : 1n grand RP.PS, 1pa P₃ : 2n RPPS; 6pa. P₄ : 1n RSPI. P₅ : 3pa	7n (2 grands nodules rouges) +15 palettes
		xylose	22-02-09	17-05-09	6p : P₁ : 2n (1 grand RPPS, 1 petit RSPI) ; 10pa. P₂ : 3n (2 RPPS ; 1RSPI) ;	12 nodules dont quelques uns atteignent les 4 mm de longueur +60

					13pa. P₃ ; 1 grand n RPPS ; 15pa. P ₄ :2n rouges RSPS ; 5pa P ₅ :4n RSPS ; 11pa P ₆ :6pa	palettes
		galactose	22-02-09	17-05-09	4p : P ₁ :2n RSPS ; 10pa P ₂ :3n (2RPPS ; 1RSPI) ; 6pa P ₃ : 1n RPPS ; 5pa P ₄ :6pa	6 grands nodules+1 27palettes
		maltose	22-02-09	18-05-09	2p : P ₁ : 1n RPPI ; 5pa P ₂ : 2n RSPI ; 3pa	3 nodules +8 palettes
		arabinose	22-02-09	18-05-09	5p : P ₁ :4n (1 RPPS ; 3RSPI) ; 6pa P ₂ : 1n RPPS ; 3p P ₃ :10pa P ₄ :3pa P ₅ :5pa	5 nodules +27 palettes

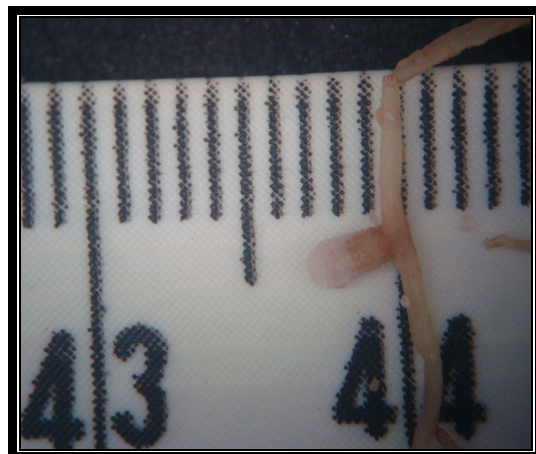
		Raffinose	22-02-09	18-05-09	6p : P ₁ :1nRPP I ; 3pa P ₂ :3n (1 RPPI ; 1RSPS ; 1RSPI) ; 8pa P ₃ :4n (1RPPS) ; 4pa P ₄ :1n RSPS ; 6pa P ₅ :1n RSPS ; 1pa P ₆ :2pa	10 nodules +24 palettes
		Fructose	22-02-09	18-05-09	3p : 0n ; 8pa	0 nodules+8 palettes. partie aérienne bien développé e
		Sorbitol	22-02-09	18-05-09	2p : 1n RPPI ; 2pa	1nodule +2palettes partie aérienne bien développé e
		Saccharose	22-02-09	19-05-09	6p : P ₁ : 1nRSPS ; 9pa P ₂ :8n (4n rouges RPPS ; 4 roses RSPS) ,10pa P ₃ :1n RSPS ; 3pa P ₄ :2n (1grand	21 nodules dont leur taille allant jusqu'à 3mm+49 palettes

					RSPS ; 1petit RSPI ; 5pa P ₅ : 8n (2grands nodules RSPS+6n RSPI) ; 17pa P ₆ : 1n RPRS ; 5pa	
		Lactose	22-02-09	19-05-09	6p : P1 :4n RSPS ; 6pa P2 :2n RSPI ; 4pa P3 : 1n RSPS, 9pa P4 : 2n RPPI ; 3pa P5et P6 : 0n, 0pa	9 nodules +22 palettes

Chiffre + p : nombre de pieds ; **chiffre + n** : nombre de nodules ; **chiffre + pa** : nombre de palettes ; (-) : absence de nodules et de palettes.



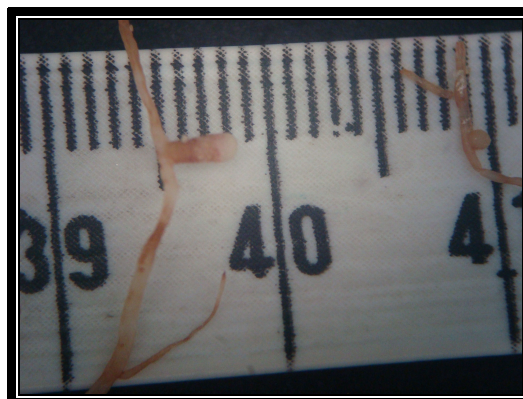
a: en présence du saccharose



b, c: Taille des nodules avec du saccharose



d



e

d, e: nodules obtenus en présence de la xylose

Planche 9: résultat du test de nodulation pour la souche S3

Les souches S4 et S5

Echec du test de nodulation avec ces deux isolats, on remarque que les parties aérienne et racinaire ne sont pas bien développées.

On suggère que l'échec de ce test est dû à la période pendant laquelle a été lancé le test, puisque durant cette période on a rencontré un problème concernant la germination des graines à cause de la haute température enregistrée au mois de juin.

Certaines souches dont les caractères externes suggérant leur appartenance aux rhizobia, pourraient avoir perdu leur caractère de nodulation à cause, soit de leur culture prolongée et répétée sur les milieux de cultures, soit de l'exposition aux stress (température, dessiccation....) ou au passage sur leurs plantes hôtes (Provorov, 1998).

La souche A6

Avec la souche A6 la formation des nodules est observée qu'en présence du galactose, mannitol, saccharose et maltose ; avec un maximum en présence du galactose.

Avec cette souche on remarque la formation d'un nombre important de palettes.

Tableau 9: résultat du test de nodulation pour la plante *H. coronarium* inoculée par la souche A6

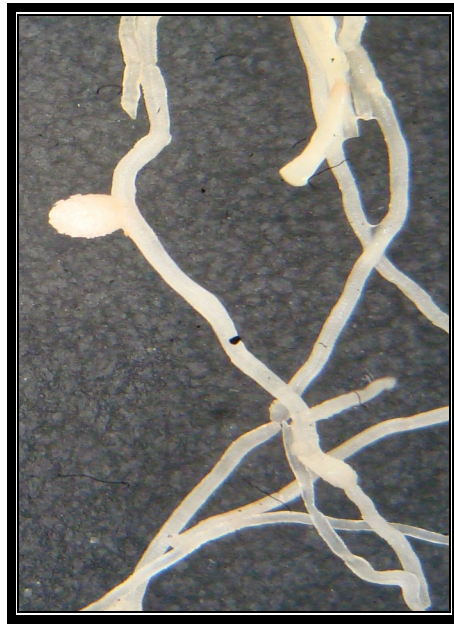
plante	Souche inoculée	Sucre utilisé	Date d'inoculation	Date de prélèvement	Résultats nb nodules/pied	Nb total des nodules
<i>H. coronarium</i>	A6	Saccharose	11-02-09	29-04-09	6P : 1n rouge RSPS ; 50pa	1 nodule+50 palettes
		mannitol	11-02-09	29-04-09	6P : 1n RSPI ; 36pa	3 nodules+36 palettes
		maltose	11-02-09	29-04-09	3p : P1 : 2n RSPS ; 3pa. P2 : 1n rouge RSPS ; 6pa. p3 : 1n ; 11pa.	4 nodules+20 palettes
		glucose	11-02-09	29-04-09	5p : 0n ; 53pa	0 nodules +53 palettes
		fructose	11-02-09	29-04-09	5p : 0n ; 60pa	0 nodules +60 palettes.

		galactose	11-02-09	29-04-09	5P : P1 : 1n RSPI ; 1pa P2 : 2n RSPS ; 2pa P3 : 1n rose RSPS P4 : 4n roses RSPS ; 6pa P5 : 2n RSPS ; 5pa	10 nodules+ 14palettes
		sorbitol	11-02-09	29-04-09	5p :0n ; 60pa	0 nodules +60 palettes
		lactose	11-02-09	29-04-09	6p :0 n ; 52pa	0 nodules +52 palettes
		arabinose	11-02-09	29-04-09	3p :0n ; 23pa	0 nodules +23 palettes
		xylose	11-02-09	29-04-09	5p 0n ; 35pa	0 nodules +35palettes

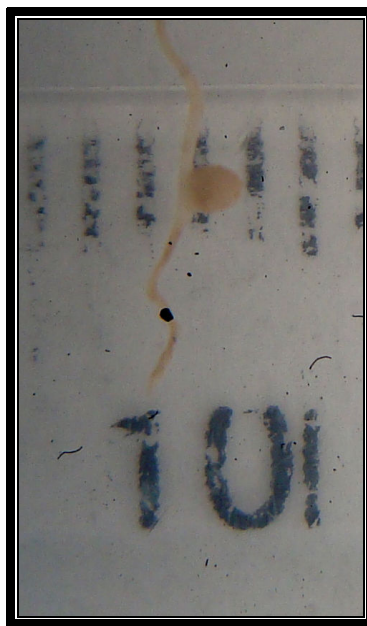
Chiffre + p : nombre de pieds ; **chiffre + n** : nombre de nodules ; **chiffre + pa** : nombre de palettes ; (-) : absence de nodules et de palettes.



a: en présence du galactose



b: avec du maltose



c: taille de nodule

Planche 10: résultat du test de nodulation pour la souche A6

Il ressort de la comparaison des résultats obtenus du test de nodulation que le degré d'infectivité varie non seulement en fonction de la souche inoculée, mais aussi en fonction de la source de carbone utilisée.

La souche S3 forme le plus grand nombre de nodules ; en présence du sorbitol le nombre de nodules formés est faible.

Les exopolysaccharides produits par *Rhizobium leguminosarum* jouent un rôle important dans l'interaction symbiotique avec les légumineuses qui forment des nodules de type indéterminés (Janczarek et coll., 2003). Ces légumineuses révèlent des exigences structurales pour les EPS des rhizobia (Janczarek et coll., 2003 ; Gharzouli, 2006).

Plusieurs observations sur *R. leguminosarum* bv *viciae* et *R. leguminosarum* bv *trifolii* montrent que les mutants au niveau des gènes *exo* sont affectés dans leur capacité de provoquer le fil d'infection ou dans le développement des bactéroïdes (Janczarek et coll., 2003).

Sinorhizobium meliloti peut produire deux types d'EPS : succinoglycane et galactoglucane ; l'invasion bactérienne et la formation des nodules fonctionnels fixatrices d'azote exigent ces EPS (Serrato et coll., 2008).

Les mutants du *Rhizobium* sp, déficients dans la synthèse des EPS, induit la formation des nodules vides et inefficaces avec un nombre réduit des bactéries intracellulaires. (Gharzouli, 2006).

Certaines mutations au niveau de la région *exoYFQ* (région promotrice des gènes codant pour le EPS1) peuvent affecter la production d'EPS1 ainsi la capacité de former des nodules efficaces (Gharzouli, 2006).

III- 3- Influence du stress salin sur la nodulation

Dans ce test, deux systèmes sont utilisés: les jarres de Leonard (test de nodulation usuel) et le test de nodulation en tubes.

- Test usuel

Pour étudier l'effet du stress salin sur le processus nodulaire, on a utilisé le même dispositif avec une solution nutritive additionnée de différentes concentrations en NaCl.

Aux concentrations de 100, 200, 300, et 1710mM de NaCl les plantules meurent après une semaine du lancement du test.

En présence des autres concentrations de NaCl, la partie aérienne commence à se développer faiblement et après une période d'un mois et demi toutes les plantules sont mortes.

En effet la mort des plantules après une semaine peut être due aux fortes concentrations de NaCl alors que pour les autres plantules, c'est un échec du test à cause de la température élevée (mois de juin) durant la période du déroulement du test.

- Test en tubes

Après une période d'un mois, on remarque qu'en présence des concentrations de 0 et 3.14mM de NaCl, la partie aérienne est bien développée avec des feuilles bien formées vertes ainsi que la partie racinaire (photographie 10).

Avec 10 et 50mM de NaCl, et avec certaines souches les plantules présentent un bon développement de la partie aérienne et racinaire, alors qu'en présence des autres souches telles que S4 et S5 les plantules présentent un faible développement.

En présence des concentrations 100, 200, 300, et 1710mM de NaCl, les plantules meurent. On note l'absence de nodules sur les racines des plantes.

Le stress salin réduit la nodulation des légumineuses par l'inhibition des premiers événements symbiotiques. Par exemple, la réduction de la nodulation chez le soja sous des conditions salines a été attribuée à la diminution dans la colonisation rhizobiale et le rétrécissement des poils racinaires (Bouhmouch et coll., 2005).

Dans le cas de *Vicia faba*, il a été montré que la colonisation des bactéries et le curling des poils racinaires ont été réduits en présence de 100mM de NaCl, alors que la proportion des poils racinaires contenant des fils d'infection a été réduit à 30% (Bouhmouch et coll., 2005).

L'association de *Sinorhizobium* avec *Medicago sativa* a montré une différence de réponse à la salinité (aussi bien au niveau du nombre de nodules que du poids en matière sèche des parties aériennes) qui n'est pas corrélée avec la tolérance des souches in vitro (Jebara et coll., 2000).



Photographie 10 : plantules obtenues après un mois de culture

IV-Etude des Exopolysaccharides (EPS) des isolats

IV-1-Détection des exopolysaccharides

La détection des EPS qualitativement est réalisée soit par un examen visuel soit en ajoutant des colorants dans le milieu de culture.

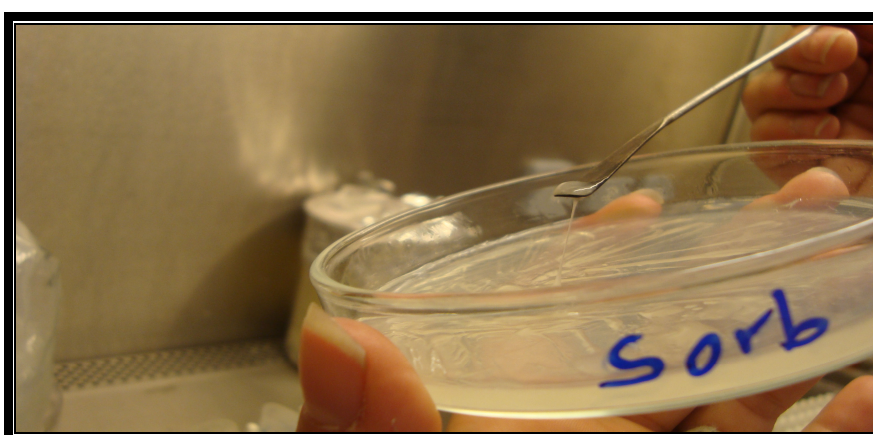
a-Examen visuel

On peut détecter la production des EPS chez une souche par un simple examen visuel. Cet examen consiste à toucher la colonie avec un cure-dent ou une öse de platine. Si la souche est productrice des EPS, il y aura formation de long filament visqueux (Dupont, 1998).

En réalisant ce test et en touchant la colonie avec l'anse, on observe la formation de petits et fins filaments visqueux avec la majorité des souches testées ; ce qui indique que tout nos isolats sont producteurs des EPS (planche 11).



a : souche S5 avec du sorbitol



b : souche S4 avec du sorbitol



c : souche S5 avec du sorbitol



d : souche S3 avec du lactose

Planche 11: Production des EPS par les souches

b- Les Colorations

b-1-Le Calcofluor

Pour montrer visuellement la production des EPS, les souches sont cultivées sur un milieu contenant le calcofluor (Jordan, 1984 ; Struffi et coll., 1998).

Le calcofluor wite est un colorant fluorescent chargé négativement, utile pour détecter des mutants déficients dans la production des EPS (Gharzouli, 2006).

En soumettant les souches au Calcofluor, les colonies des souches productrices d'EPS apparaissent fluorescentes sous ultraviolet, tandis que les colonies qui ne secrètent pas d'EPS ne sont pas fluorescentes (Jordan, 1984 ; Struffi et coll., 1998).

En prenant ce critère et après exposition des souches aux rayons ultraviolets, toutes les souches testées apparaissent fluorescentes (photographie 11).



Photographie 11: aspect de la souche S2 sur YMA contenant du calcofluor et sous UV

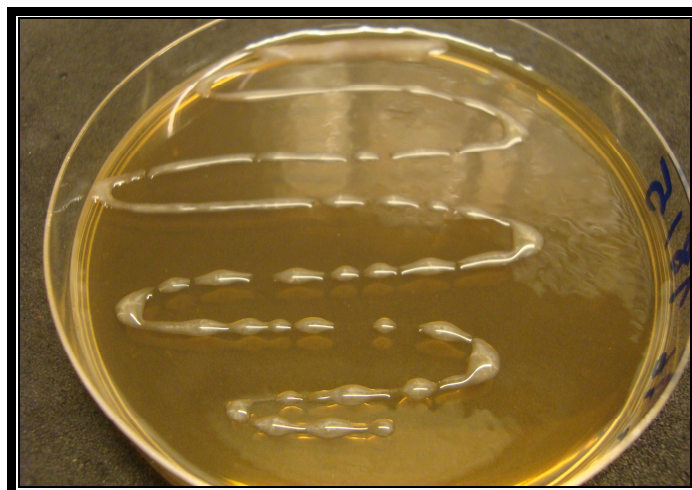
b-2- Le rouge de ruthénium

Un deuxième colorant utilisé pour repérer les souches productrices d'EPS est le rouge de ruthénium. Ce colorant cationique a une affinité pour les polysaccharides anioniques et neutres, et donne une coloration rose foncée au milieu de culture (Dupont, 1998).

En soumettant les souches sur un milieu contenant du rouge de ruthénium, les colonies productrices d'EPS apparaissent blanches sur fond rose par le masquage de la couleur due aux polysaccharides produits (Gancel et coll., 1988).

On se basant sur ce critère et en présence du rouge de ruthénium, toutes les souches examinées présentent une coloration blanche (photographie 12).

De cette façon Bouzar et coll., (1996) ont sélectionné des clones d'une souche de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* produisant différents niveaux de polysaccharides extracellulaires.



Photographie 12 : aspect de la souche S3 sur YMA contenant du rouge de ruthénium

IV- 2- Production et extraction des EPS

L'effet de la source de carbone sur la production des EPS est résumé dans le tableau 10. La quantité des EPS produite varie en fonction de la source de carbone utilisée et la souche testée.

Lorsque le mannitol et le saccharose sont utilisés comme source de carbone toutes les souches montrent une bonne production d'EPS. Par contre en présence du xylose la production des EPS par les souches est nulle.

Parmi les souches testées, la souche S4 est la souche la plus productrice avec un maximum de 3333.33 mg d'EPS/g de cellules en présence du lactose.

Les résultats obtenus pour la majorité des souches sont en accord avec celles établies par Singh et Sharma (1991) qui montrent que les souches de *Rhizobium* qui produisent un maximum d'EPS en présence du saccharose, et une faible quantité avec du glucose.

Lorsque le mannitol est utilisé comme source de carbone dans le milieu YMB, les souches de *Rhizobium* isolées à partir de *Indigofera* ont données un maximum d'EPS, suivi des monosaccharides (Kumari, 2008).

De et Basu (1996) ont remarqué que la production d'EPS est maximale lorsque le milieu est additionné par 3% de mannitol.

Tableau 10: Effet de la source de carbone sur la production des EPS (mg/g)

Source de carbone	Souches testées					
	S1	S2	S3	S4	S5	A6
Mannitol	91.50	397.55	52.95	1068.06	18.181	245.90
Saccharose	611.11	347.15	433.07	792.8	220.58	93.45
Glucose	833.33	0	30	0	1.25	2921.05
Galactose	86.00	224.83	0	132.65	208.33	0
Fructose	18.45	0	0	0	0	0
Maltose	111.11	0	379.32	117.64	100	1888.88
Lactose	0	0	285.71	3333.33	0	0
Arabinose	0	0	0	0	0	41.66
Sorbitol	0	28.614	112.87	875	16.60	0
Xylose	0	0	0	0	0	0



(a)



(b)

Photographie 13: "Méduse " d'EPS obtenue avec la souche A6 en présence du glucose (a) et la souche S5 en présence du mannitol (b).

IV- 3- Dosage des EPS à l'Anthrone

Pour déterminer la teneur en glucides des EPS extraites, une méthode colorimétrique de dosage par l'Anthrone est utilisée.

L'Anthrone, selon Morris (1948), réagit avec tous les holosides, diholosides et polysaccharides, notamment l'amidon et les diverses dextrines.

Dissoute en milieu sulfurique concentré, l'Anthrone, sans les sucres, apparaît de couleur jaune clair et donne, avec les solutions glucidiques, une coloration bleue. Une certaine fluorescence pourrait apparaître avec les diosanes et une couleur rouge se développe en présence des protéines (Morris, 1948).

Les EPS extraits réagissent avec le réactif d'Anthrone et donnent plusieurs couleurs selon la souche utilisée et le sucre testé (Planche 11).

Le dosage des EPS obtenus avec les souches S1 et S3 donne une couleur verte (avec l'ensemble des monosaccharides), et une couleur rouge avec les disaccharides utilisés (saccharose et maltose).

La réaction des EPS obtenus des souches S2, S4, S5, et A6 avec le réactif révèle une coloration allant du rouge au marron.

La coloration des produits obtenus dépend du type de sucre constitutif des EPS. Selon Morris (1948) et Dreywood (1946) la couleur verte est due à la présence des Hexoses alors que la couleur rouge se développe avec des pentoses (Dreywood, 1946) ou éventuellement des protéines (Morris, 1948).

Les propriétés des EPS peuvent différer considérablement d'une souche à l'autre. En effet les conditions de croissance, comme la composition du milieu de culture, la température, le pH, la pression d'oxygène et la vitesse de l'agitation peuvent influencer quantitativement et qualitativement les EPS produits (Bergmaier, 2002).



a : la souche S1



b : la souche S2



c : la souche S3



d : la souche S4



e : la souche S5



f : la souche A6

Planche 11: résultats du dosage à l'Anthrone

Afin de connaître la concentration en sucres, une courbe étalon est réalisée en utilisant du glucose, et du galactose entre 0.02 et 0.1g/l.

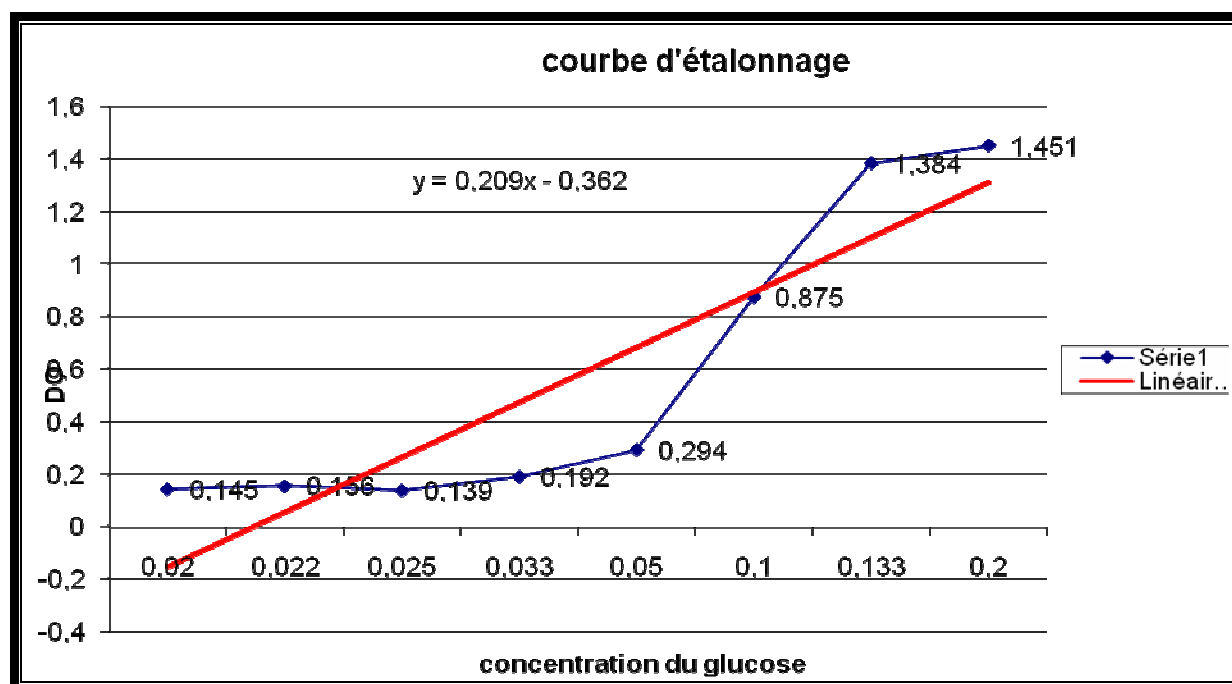


Figure 8: courbe d'étalonnage pour le glucose

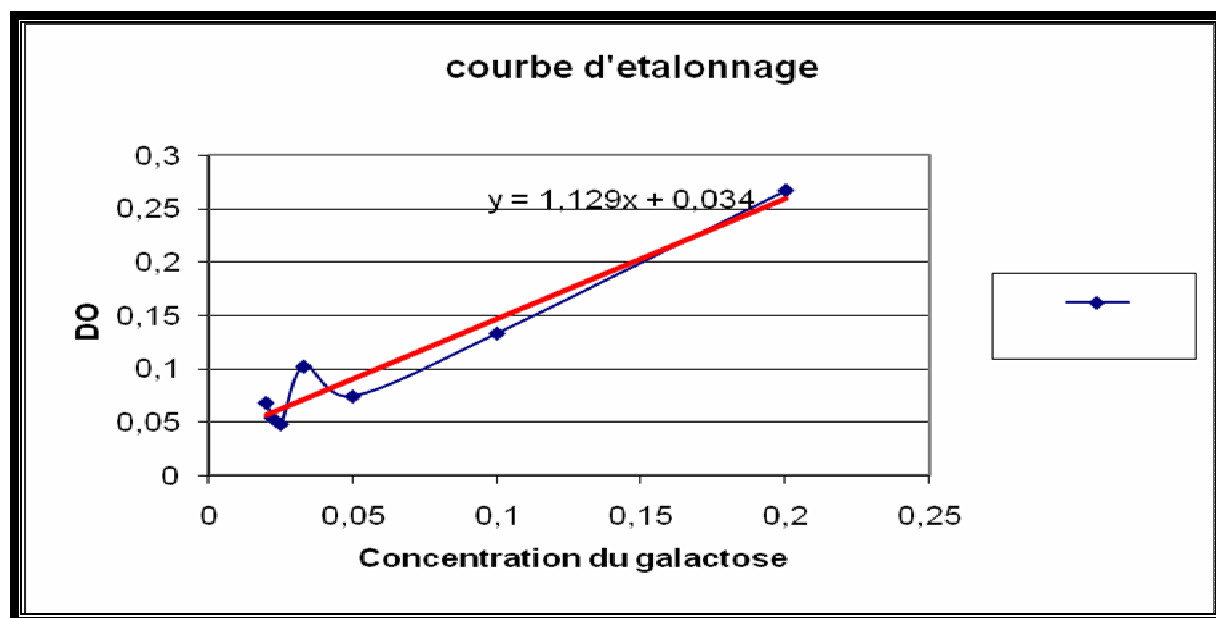


Figure 9: courbe d'étalonnage pour le galactose

A partir des courbes d'étalonnages et les droites de régressions correspondantes, on a pu déterminer la concentration du glucose et du galactose qui se trouve dans chacun des EPS extraites (Tableau 11).

Tableau 11: composition en glucides des différents EPS extraites

	Concentration en galactose	Concentration en glucose	[gal] / [glu]
EPS (S1, Fructose)	0,00	17.90	0
EPS (S1, Mannitol)	2.15	30.55	0.07
EPS (S1, saccharose)	2.33	31.56	0.073
EPS (S1, glucose)	0.44	21.34	0.02
EPS (S1, galactose)	0.37	20.95	0.017
EPS (S1, maltose)	0.24	20.29	0.011
EPS (S2, Galactose)	0.26	20.38	0.012
EPS (S2, mannitol)	1.78	28.55	0.062
EPS (S2, sorbitol)	0.77	23.10	0.033
EPS (S2, saccharose)	-0.01	18.85	0
EPS (S3, Sorbitol)	1.50	27.07	0.055
EPS (S3, glucose)	1.04	24.58	0.042
EPS (S3, saccharose)	1.32	26.06	0.05
EPS (S3, lactose)	0.13	19.67	0.006
EPS (S3, maltose)	0.69	22.67	0.03
EPS (S3, mannitol)	0.72	22.87	0.031
EPS (S4, sorbitol)	2.05	30.03	0.068
EPS (S4, galactose)	3.32	36.86	0.09
EPS (S4, glucose)	3.30	36.76	0.089
EPS (S4, mannitol)	0.25	20.33	0.012

EPS (S4, maltose)	1.47	26.92	0.054
EPS (S4, saccharose)	1.70	28.12	0.06
EPS (S5, mannitol)	3.57	38.24	0.093
EPS (S5, maltose)	1.63	27.78	0.058
EPS (S5, sorbitol)	2.32	31.51	0.073
EPS (S5, galactose)	1.84	28.88	0.063
EPS (S5, lactose)	0.77	23.10	0.033
EPS (S5, saccharose)	4.39	42.64	0.102
EPS (A6, maltose)	2.68	33.42	0.08
EPS (A6, mannitol)	2.23	30.98	0.072
EPS (A6, glucose)	3.99	40.49	0.098
EPS (A6, arabinose)	1.24	25.68	0.048
EPS (A6, saccharose)	1.23	25.59	0.048

Il ressort des résultats obtenus que les EPS extraits sont majoritairement constitués de glucose par rapport au galactose.

Conclusion

L'objectif de cette étude n'était pas de caractériser et d'identifier les souches isolées mais plutôt de mettre en évidence l'influence de la source de carbone sur la production des EPS chez des souches bactériennes isolées à partir des nodules de la plante *Hedysarum coronarium* et déterminer l'effet des variations dans la biosynthèse des EPS sur le processus de nodulation, enfin étudier l'effet de stress salin sur la synthèse des EPS et la formation des nodules.

L'aspect morphologique des isolats sur les différents milieux de cultures montre qu'ils ont une croissance rapide avec une production abondante de poly β -hydroxybutyrates (PHB). La croissance sur milieu YMA- rouge Congo montre que les souches absorbent peu du rouge Congo. Les souches n'acidifient pas le pH sur le milieu GPA. L'examen microscopique par coloration de Gram révèle des bâtonnets Gram négatif.

En fonction de la vitesse de croissance sur le milieu YMA additionné de bleu de Bromothymol, les isolats peuvent être séparés en deux groupes : *Rhizobium* (Bactéries à croissance rapide) et *Bradyrhizobium* (bactéries à croissance lente) (Vincent, 1970), or nos souches ont acidifié le milieu après seulement 24h d'incubation.

Nos souches sont capables d'utiliser une grande variété de sucres comme source de carbone avec une préférence pour le sorbitol, le saccharose, le maltose et le glucose. Elles présentent une tolérance au stress salin jusqu'à une concentration de 300mM de NaCl, mais haut delà de cette concentration la croissance est complètement inhibée.

La SDS-PAGE est une méthode utilisée depuis plusieurs années dans la taxonomie des rhizobiums, est très sensible et donne surtout des informations sur l'analogie des souches qui se trouvent dans les mêmes genres, espèces ou sous espèces (Ndiaye et coll., 2002). L'analyse des profils protéiques des souches révèle qu'il existe un polymorphisme important entre les isolats et la souche de référence, *Rhizobium sulae*.

Dans l'objectif d'étudier l'influence de la source de carbone ainsi que l'effet du stress salin sur le processus symbiotique, un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées est réalisé. Les souches isolées ont montré une bonne capacité de pénétration dans les tissus racinaires pour induire la formation des nodules, avec une certaine sensibilité des isolats aux fortes concentrations de NaCl.

La concentration de NaCl dans le milieu affecte aussi le nombre et la taille des nodules formés.

La majorité des souches ont montré leur infectivité par la formation des nodules sur les racines de la plante hôte. Il ressort de la comparaison des résultats obtenus du test de nodulation que le degré d'infectivité varie non seulement en fonction de la souche inoculée, mais aussi en fonction de la source de carbone utilisée.

La détection de la production des EPS chez une souche consiste à examiner une colonie sur un milieu gélosé (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970). Une souche productrice d'EPS forme des colonies brillantes et visqueuses (Dupont, 1998) et en touchant la colonie avec l'anse, on observe la formation de petits et fins filaments visqueux avec la majorité des souches testées. Ce qui indique que nos espèces bactériennes sont productrices des EPS.

Le Calcofluor est un colorant fluorescent utilisé pour détecter visuellement la production des EPS. Les colonies des souches productrices d'EPS apparaissent fluorescentes sous ultraviolet, aussi bien les isolats que la souche témoin.

Le deuxième colorant utilisé pour la mise en évidence des souches productrices d'EPS est le rouge de ruthénium, colorant cationique ayant une affinité pour les EPS anioniques et neutres ; il développe des interactions ioniques avec les groupements organiques ou inorganiques du milieu environnant. Les colonies productrices d'EPS apparaissent blanches sur un fond rose par le masquage de la couleur due aux EPS produits. En se basant sur ce critère et en présence du rouge de ruthénium, toutes les souches examinées présentent une coloration blanche.

La production des EPS est déterminée sur milieu YMA en remplaçant le mannitol par un autre sucre (saccharose, glucose, maltose, galactose, fructose, lactose, arabinose, sorbitol, xylose) ; l'intérêt étant de voir l'influence de la source de carbone sur la production des EPS.

L'extraction des EPS montre que la quantité produite varie en fonction de la source de carbone utilisée et de la souche testée. Une production abondante des EPS est enregistrée en présence du mannitol, saccharose, glucose et maltose, avec la majorité des souches examinées. Par contre les autres sucres utilisés (ne stimulent pas significativement la production des EPS).

Les isolats où on a enregistré une bonne production d'EPS, ont montré une infectivité efficace par la formation d'un nombre important de nodules avec une taille importante.

Les extraits d'EPS obtenus sont remis en suspension dans de l'eau distillée stérile et dosé selon la méthode de dosage des sucres totaux à l'Anthrone.

L'utilisation des courbes d'étalonnage (glucose, galactose) montre que la quantité de glucose constituant les EPS obtenus est significativement plus importante que celle du galactose. Le résultat du dosage à l'anthrone a montré que la composition osidiques des EPS extraits varie en fonction des souches testées et en fonction de la source de carbone. Les EPS extraits sont constitués d'une concentration importante du glucose par rapport à celle du galactose.

Le dosage des sucres totaux par la méthode d'Anthrone est très fréquemment utilisé. Cette méthode a l'avantage d'être très sensible et détecte de façon fiable des sucres dans une solution avec de faibles concentrations, mais elle n'est pas spécifique aux EPS, d'où l'importance d'une bonne purification de ces polysaccharides. Un autre inconvénient de la méthode provient de la réponse colorimétrique du sucre analysé. Cependant, la composition exacte de l'EPS en monomères saccharidiques n'est pas toujours connue. C'est pourquoi le glucose est souvent utilisé comme sucre étalon.

L'identification des monomères peut être réalisée par des méthodes enzymatiques, spectrophotométriques, par chromatographie liquide haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (GLC) ou avec la spectrométrie de masse. Récemment, la technique de la résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis de faire des progrès considérables dans l'élucidation de la structure des EPS.

L'association des plantes légumineuses et les bactéries du sol du genre *Rhizobium* est un processus complexe implique un échange coordonné des signaux. Les mutants déficients d'EPS de diverses espèces de *Rhizobium* s'étendent de la formation de pseudonodules à une nodulation efficace (Kaufusi, et coll., 2004).

Des études montrent que le succinoglycane est nécessaire pour l'initiation et l'élongation du fils d'infection durant le processus d'invasion. Cependant un excès du

succinoglycane gène la capacité des rhizobia de coloniser la courbure du fil des poils racinaires (Chuang – Yien Lee, 2000).

Références

Références bibliographiques :

Abdelguerfi-Berrakia, R ; Abdelguerfi, A; Bounaga, N ; Guittonneau, G.G., (1988) - Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. I- Etude auto écologique. Ann. Inst. Nat.Agro. El-Harrach.12: 191-219.

Allen, O.N; Allen, E.K., (1950) - Biochemical and symbiotic properties of Rhizobia.Bacterial.Rev.14: 273-330.

Beck,D.P; Materon, L.A; Afondi, F., (1993) - Pratical Rhizobium –Legume Technology Manuala Technical Manual N°19.ICARDRA Box 5466,Aleppo,Syria.

Beringer, J. E., (1974) –R-Factor transfer in rhizobium legume. J. Gen. Microbiol. , 84: 188-198.

Bouhmouch,I; Mouhsine, B.S; Brhada,F; Aurag, J.,(2005)-Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *phaseolus vulgaris* under salt stress. Journal of Plant Physiology 162:1103-1113.

Bouzar, Fm; Cerning, J. and Desmazeaud, M., (1996) –Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbnreckii ssp. bulgancus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. Journal of Daity Science 79, 205-211.

Broughton, W.J., (2000)-Interaction entre plantes et microorganismes. Cours de BMC.

Broughton, W; Jabbouri, S. & Perret, X., (2000) - Keys to Symbiotic Harmony. Journal of Bacteriology **182**, 5641-5652.

Burdass, D., (2002)- Rhizobium, Root Nodules & Nitrogen Fixation. Society for General Microbiology.16 :1-4.

Casella, S; J.P. Shapleigh; F. Lupi and W.J. Payne., (1988) –Nitrite reduction in bacteroids of Rhizobium “hedysari” strain HCNT 1.Arch. Microbiol. 149:384-388.

Casella, S; J.P. Shapleigh and W.J. Payne., (1986) - Nitrite reduction in *Rhizobium* “hedysari” strain HCNT 1. Arch. Microbiol. 146; 233-238.

Casella, S; R.R Gault; K.C Reynolds; J.R. Dyson and J. Brockwell., (1984) –Nodulation studies on legumes exotic to Australia: *Hedysarum coronarium*. FEMS Microbiol. Lett. 22: 37-45.

Cerning, J., (1994) - Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. Pages 309-329 dans I.H. Roissart, Luquet, F.M., ed. Bactéries Lactiques, Grenoble, France.

Chen, W. M ; S. Laevens ; T. M. Lee ; T. Coenye ; P. De Vos ; M. Mergeay ; P. Vandamme., (2001)- *Ralstonia taiwanensis* sp. nov; Isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. P. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1729-35.

Chtaigné, G., (2007) -Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de doctorat de l’université de Toulouse.

Chuang-Yien Lee, J., (2000) –Expression Studies on the exo Y Promoter Region in *Rhizobium meliloti*. BUG journal vol.3.

Cigdem, K; Merith, K; Engin, K., (2006) - Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from bean. Turk. J. Boil. 30: 127-132.

Corbière. H. L.F., (2002) – The importance of sucrose synthase for AM symbiosis in maize, in pea and in *Medicago*. Thèse de doctorat.

Coyne, V. E; James, M. D; Reid, S. J; Rybicki, E. P., (2002) - SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Molecular Biology Techniques Manual. Third Edition. University of Cape Town.

Datta, C ; Basu, P. S., (1999) -Production of extracellular polysaccharides by a *Rhizobium* species from the root nodules of *Melilotus alba*. Acta Biotechnologica. Volume 19 Issue 4, Pages 331 – 339.

De Bory de Saint-Vincent (Jean Baptiste Geneviève Marcellin) ; Audouin, J. V.A., (1829) - Dictionnaire classique d'histoire naturelle. Edition. Rey et Gravier, Tome xv, Page 63.

De Jacques Eustache de Sève., (1819) - Nouveau dictionnaire d'histoire naturelle, appliquée aux arts, à l'agriculture, à l'économie rurale et domestique, à la médecine, etc. Edition Deterville. Page 43.

de Lajudie, P; Zakhia,F., (2001) – Taxonomy of rhizobia. EDP Sciences. Agronomie 21:569-576.

De, P. S et Basu, P. S., (1996) - Extracellular polysaccharide production by a *Rhizobium sp.* from root nodules of *Derris scandens*. Folia Microbiologica. Vol. 41 .N .4: 368-372.

Dirk Bergmaier., (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 de Philosophie Doctor (Ph.D.). De l'Université Laval.

Dreywood, R., (1946) - Qualitative test for carbohydrate material. Ind. Eng. Chemistry. 18: 499.

Dupont, I., (1998) - Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Thèse de doctorat. Université Laval.

Duta, F. P; de França, F. P; Lopes, Léa Maria de Almeida., (2006) - Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium sp.* using the response surface method. Electronic Journal of Biotechnology Vol. 9 No. 4: 0717-3458

Gage, D. J., (2004) –Infection and invation of roots by symbiotic nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of Temperate legumes.Microbiology and Moloecular Biology. Reviews, Vol. 68, no.2.American Society for Mirobioogy. (280-300).

Gallego, M., (2006) - les α protéobactéries : mécanismes communs d'interaction avec la cellule hôte. Master de recherche, Université PAUL SABASTIER. ToulouseIII.

Gancel, Fey Novel, G ; Carcano, D ; Loones, A ; Ramos, P., (1988) - Procédé de sélection de clones bactériens producteurs d'exopolysaccharides et clones producteurs obtenus. Brevet No: R 2 632 968 - Al. France 88 08009.

Geoff, B et coll., (2005) – Botanica. Encyclopedie de botanique et d'horticulture. Edition place des victoires. P.432.

Gharzouli, R., (2006) – Influence d'agents mutagènes, les rayons Uilta-violet, sur la nodulation et les caractères phénotipiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. . Mémoire de Magister en génétique moléculaire. Université Mentouri Constantine.

Graham, P.H. and Parker, C.A., (1964) - Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. Plant Soil. 20: 383- 396.

Hopkins, W.G., (2003) -Physiologie végétale. Université des Sciences et Technolie de Lille. Edition de boeck.

Jana, S.C; P.K. Chakrabartty; A.K. Mshra., ((1992) – Taxonomic relationship of some members of enterobacteriaceae based on their protein profiles.J basic microbial.32:29-33.

Janczarek, M; Skorupska, A., (2003) - Exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* is related to various metabolic pathways Research in Microbiology 154 (2003) 433–442.

Jebara, M; Aouani, M.E; Mhamdi, R; Ghrir,R; Mars, M.,(2000)- Effect of salt on *Sinorhizobium* sp. Isolates from Tunisia either in vitro or in association with *Medicago* sp. Cahiers d'études et de recherches francophones/ Agricultures. Vol 9.N 2:99-102.

Jordan, D.C., (1984) - Rhizobiaceae. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore.p:234-245.

Kaci, Y ; Heyraud, A ; Barakat, M ; 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. *Research in Microbiology* 156, 522-531. ELSEVIER.

Kaufusi, P.H; L.S. Forsberg; P. Tittabutr (2004) –Regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium* sp.strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, *rpoH2* *Microbiology* 150,3473-3482.DOI10.1099/mic.027092-0.

Kumari, B. S; Ram, R. M; Mallaiah, K. V., (2008) - Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from Indigofera . *African Journal of Microbiology Research* Vol 3(1) pp.010-014.

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

Lindstroim K; Z. Terrefework; L. Suominen; G. Lortet., (2002) –Signaling and development of *Rhyzobium* –legume symbiosis. *Biology and environnement: Royal I rish Academy* vol. 102B, NO.1, 61-64.

Lodwig, E. M and Poole, P. S., (2003) - Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Critical reviews in plant sciences*, 22(1): 37–38.

Lodwig,E.M ; A. H. F. Hosie; A. Bourdes, K. Findlay; D. Allaway;R. Kurunakaran; J. A. Downie and P.S. Poole., (2003) –Amino-acid cycling derives nitrogen fixation in the legume –*Rhizobium* symbiosis.*Nature*,Vol.422-Nature publishing group.(422-426).

Martinez- Romero, E;Segovia, L; Martins-Mercante,F; Franco,A.A; Graham, P and Pardon M.A., (1991) -*Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L.beans and *Leucaena* sp. trees. *Int.J.Syst.Bacteriol.*42. 417-428.

Merabet, C; Bekki, A;Benrabah, N; Baba-Ahmed Bey, M; Bouchentouf, I; Ameziane, H; rezki, M.A; Domergue, O; Cleyet-marel, J.C; Avarre, J.C; Bèna, G; Bailly, X; and de

Lajudie, P., (2006) - distribution of *medicago* species and their microsymbionts in a saline region of Algeria. *Arid Land Research and Management*.20, 1-13.

Morgante. C; Castro. S; Fabra. A., (2007) - Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. *Soil Biology & Biochemistry* 39 .1222–1225.

Morris, D. L., (1948) - Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent. *Science*, 107:254-255.

Moulin, L ; A. Munive ; B. Dreyfus et C. Boivin-Masson., (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-50.

Ndiaye, A.A; S.N. Sylla; M. Gueye ; P. Delajudie ; I.Ndoye., (2002) - Utilisation de la technique d'électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrilamide –SDS (SDS-PAGE) pour l'étude de la diversité des rhizobiums d'*Acacia tortilis* (forsk). Hayne subsp. *Raddiana* (savi) brenan. *African journal of science and technology*.61.1.pp.33-43.

O'Gara, F. and Shanmugam, K. T., (1976). Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia. Export of fixed N₂ as NH₄⁺. *Biochimica et Biophysica Acta*, 437(2): 313–321.

Pelmont, J., (1995) -Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Vol 2.P.541-572.office des publications Universitaires.

Peret, B., (2007) -Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*.these de doctorat.université Montpellier II.

Pingret, J. L; E.P. Journet; D.G. Barker., (1998) - Rhizobium Nod Factor Signaling:Evidence for a G Protein-Mediated Transduction Mechanism. *Plant Cell*,Vol. 10, 659-672.

Prescott, L. M ; Harley, J. P ; Klein, D. A ; Claire-Michèle ; Bacq-Calberg ; Dusart, J., (2007) –Microbiologie, chapitre .22.les bactéries. Les protéobactérie, .Edition. De Boeck université.p.492.

Provorov, N.A., (1998) – Review article. Coevolution of rhizobia with legumes. Facts and hypotheses. *Symbiosis*.24, 337-368.

Quezel, P et Santa, S., (1962) - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.Tome I.P. 462-541.CNRS.

Roger, O., (2002)- Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Thèse de doctorat de l'université PARIS 13.

Serrato, Rodrigo V; Guilherme L. Sasaki; Philip A.J. Gorin; Leonardo M. Cruz; Fa'bio O. Pedrosa; Biswa Choudhury; Russell W. Carlson; Marcello Iacomini., (2008) - Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica* .*Carbohydrate Polymers* 73:564–572.

Singh, A; Sharma, P.B., (1991) - Biochemical characteristics and salt tolerance by *Rhizobium* species isolated from legume crops. *Indian J. Microbiol.* 11: 33- 42.

Skorupska, A; Janczarek, M; Marczak, M; Mazur,M; Król, J., (2006) - Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories* 5:7 .1475-2859.

Somasegaran P., Hoben H.J., (1994) - Handbook for Rhizobia.Springer verlage New York. Inc p.450

Squartini, A; Struffi, P; Doring, H; Selenska-Pobell, S; Tola, E; Giacomini, A; Vendramin, E; Velazquez, E; Mateos, P.F.Martinez-Molina, E; Dazzo,F.B; Casella,S; Nuti,M.P., (2002) – *Rhizobium sullae* sp.nov. (Formerly”*Rhizobium hedysari*”), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1267-1276.

Steiborn, S; and Roughley, R.J., (1975) - Toxicity of sodium chloride ions to *Rhizobium* *ssp.* In broth and peat cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 39, 133-138.

Struffi,P; Corich, V; A. Giacomini; A. Benguedouar; A. Squartini; S. Casella and M.P.Nuti1., (1998) - Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. Journal of Applied Microbiology, 84(1): 81-89.

Sutherland I.W., (1982) - Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. In Dirk Bergmaier, 2002- production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *LB. Rhamnosus RW -9595M* d'un milieu à base de perméat de lactosérum.

Sutherland, I.W., (1972) - Bacterial exopolysaccharides. Adv. Microb. Physiol., 8, 143-213.

Sutherland, I.W., (1990) - In: Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge studies in biotechnology Cambridge University Press.

Sutherland, I.W., (1990) - In: Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge studies in biotechnology Cambridge University Press.

Svistoonoff, S., (2003) - Implication d'une subtilase dans les étapes précoces des symbioses actinorhiziennes. Thèse de doctorat de l'université Montpellier II

Sy, A ; E. Giraud ; P. Jourand ; N. Garcia ; A. Willems ; P. de Lajudie, Y. Prin ; M. Neyra ; M. Gillis ; C. Boivin-Masson et B. Dreyfus., (2001) - Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbioses with legumes. J. Bacteriol. 183, 214-220.

Terefework, Z (2002) –Diversity and phylogeny of *Rhizobium galegae*, and reflections on molecular evolution of rhizobium –legume symbiosis.ACADEMIC DISSERTATION IN MICROBIOLOGY.University of Helsinki. ISSN 1239-9469

Toby Kiers, E ; Rousseau, R.A ; West, S.A and Ford Denison, R., (2003) - "Host sanctions and the legume rhizobium mutualism. Nature. 425 : 78.

Trifi-Farah, N ; Marghali, S ; Ghariani, S ; Marrakchi, M., (2001) - *Hedysarum coronarium* : Caractérisation moléculaire, Distribution et conservation en milieux méditerranéens Faculté des Sciences de Tunis, 2092 El Manar Tunis, Tunisie.

Van Rhijn, P. and Vanderleyden, J., (1995) - The Rhizobium–plant symbiosis. Microbiological Reviews, 59(1): 124–142.

Vincent, J.M., (1970) -A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook N°15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

Viprey, V; A. Rosenthal; W .J,Broughton and X. Perret., (2000) -Genetic snapshots of the Rhizobium species NRG234 genome.Genome biology.Vol.1,no.6.Genomebiology.(Research 0014.1-0014.17)

Wang, E. T. et E. Martinez-Romero, E. 2000. Phylogeny of root and stem nodule bacteria associated with legumes.

Wei, G.H; Chen, W.X; Wang, E.T; Tan, Z.X; Zhu, M.E., (2002) - Rhizobium indigoferae sp. nov. and Sinorhizobium kummerowiae sp. nov., respectively isolated from Indigofera spp. and Kummerowia stipulacea. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 2231- 2239.

Wei, G.H; Tan, Z.Y; Zhu, M.E; Wang, E.T; Han, S.Z; Chen, W.X., (2003) - Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera Astragalus and Lespedezagrown in the Loess Plateau of China and description of rhizobium loessense sp.nov. International Journal of Systematic Bacteriology.53:1575-1583.

(Site web- Rhizobium taxonomy, The current taxonomy of rhizobia [Updated 14th September 2009).

Annexe

ANNEXE 1

Les milieux de culture

Milieu: Yeast Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970)

Mannitol	10.0g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillée	1000ml
PH	6.8
Autoclavage	120° Pendant 20minutes

Milieu : Yeast Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970)

YMB	1000ml
Agar	15g
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20minutes

Milieu: YMA+rouge Congo

YMB	1000ml
Solution stock de rouge Congo	10ml
Agar	15g
PH	6.8
Autoclavage	120° Pendant 20minutes

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

Milieu : YMA+bleu de bromothymol

YMB	1000ml
Solution stock de bleu de bromothymol	5ml
Agar	15g

PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20minutes

Après ajustement de pH on ajoute 5ml de bleu de bromothymol (0.5g BTB dans 100ml d'éthanol), puis on ajoute l'agar.

Milieu Glucose Peptone Agar (GPA) + pourpre de bromocrésol (BCP) (Vincent, 1970)

Glucose	10g
Peptone	5g
Solution stock de bromocrésol	10ml
Eau distillée	1000ml
Agar	15g
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

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

Solution nutritive (Fahraeus ,1957)

CaCl ₂	0.10g
MgSO ₂ 7 H ₂ O	0.12g
KH ₂ PO ₄	0.10g
Na ₂ HPO ₄ .2 H ₂ O	0.15g
Citrate ferrique	0.005g
*solution stock des oligoéléments	1.0ml

*solution stock des oligoéléments :(g/l)

H ₃ BO ₄	2.86g
MnSO ₄ .4H ₂ O	2.03g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.14g
PH	6.8
Autoclavage	120°C pendant 20minutes

Milieu Tryptone –Yeast (TY) (Beringer, 1974)

Tryptone	5.0g
Extrait de levure	3.0g
CaCl ₂ H ₂ O	0.87g
L'eau distillée	1000ml
PH	6.8-7.2
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Pour le milieu TYagar, on ajoute 18g d'agar avant l'autoclavage.

ANNEXE 2

Electrophorèse des protéines totales (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Préparation du tampon d'échantillon (tampon de lyse)

Tris	25mM
Glycérol	192 mM
SDS	2.5%
B-mercaptoéthanol	2.5% (v/v)
Bleu de Brromophénol	5mg
Eau distillée	200ml

Préparation des solutions stock

- Solution d'acrylamide
 - Acrylamide 30% 60g
 - Bis acrylamide 0.8% 1.6g
 - Eau distillée QSP 200ml
- **Tampon du gel de séparation (resolving gel buffer) : Tris-HCL 3M pH 8.8**
 - Tris 3M 72.7g
 - SDS 0.8% 1.6g
 - Mercaptoéthanol(MCE) 0.8ml
 - Eau distillée QSP 200mlAjuster à pH 8.8 avec HCL
- **Tampon du gel de concentration (stacking gel buffer) : Tris-HCL 0.5M pH 6.8**
 - Tris 0.5M 12.1g
 - SDS 0.4% 0.8G
 - MCE 0.2% 300µl
 - Eau distillée QSP 200mlAjuster à pH 6.8 avec HCL

Préparation des gels

- **Préparation du gel de séparation à 12 %**

Solution d'acrylamide	10.4ml
Tampon de séparation	3.14ml
Temed	12.5 µl
Eau distillée	QSP 25ml
- **Préparation du gel de concentration à 7.5 %**

Solution d'acrylamide	5ml
-----------------------	-----

Tampon de concentration	5ml
Temed	20µl
Eau distillée	QSP 20ml

Juste avant de couler chaque gel ajouter du persulfate (ammniumperoxodisulfate) 15%

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

Gel de séparation 140 µl

Gel de concentration 200 µl

- **Préparation du tampon de migration (running buffer)**

▪ Tris 0.025M	1.06g
▪ Glycine 0.192 M	5.04g
▪ SDS 0.1%	0.35g
▪ MCE 0.05%	175µl
▪ Eau distillée	QSP 350ml

- **Préparation des plaques de gel**

Monter les plaques en verre (éviter d'avoir des fuites), la solution du gel de séparation est coulée entre les plaques en verre en laissant une hauteur de 4cm pour le deuxième gel.

A l'aide d'une micropipette niveler le gel avec solution d'alcool (le butanol), laisser polymériser 20 à 30min .retirer l'alcool, rincer délicatement à l'eau distillée, jeter l'eau, sécher avec du papier filtre sans toucher la surface du gel, ensuite couler le gel de concentration (laissant 3-4 mm d'hauteur environ du bord supérieur).

Placer rapidement le peigne, laisser polymérisé, retirer le peigne très lentement vers le haut, à chaque étape éviter la formation des bulles d'air.

- **Migration électrophorétique**

Remplir les puits par la solution du tampon de migration. Un volume de 35 µl de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque puit. Après le dépôt, la migration des polypeptides a été assurée par une différence de potentiel de départ e 127V (80mA), jusqu'à ce que le voltage arrive à 287V.

L'électrophorèse est conduite jusqu'à ce que le bleu de bromophenol arrive à 3-4 mm de l'extrémité anodique du gel

- **Révélation des bandes protéiques**

- ❖ La solution de la coloration :
25ml de la solution mère (bleu de comassie et le méthanol)

40ml de TCA 60% (l'acide tricholacétique)

QSP 400ml

Agiter la solution.

Après démoulage, mettre le gel dans 200ml de solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation. La décoloration est réalisée dans l'eau distillée.

ANNEXE 3

Résultats de la mesure de densité optique pour le test effet du stress salin

La souche S1								
NaCl (mM) Temps(h)	0	3,41	10	50	100	200	300	1710
0	0	0,04	0,02	0,006	0,006	0,013	0,01	0,02
2	0,005	0,014	0,032	0,012	0	0	0	0,006
4	0,027	0,036	0,041	0,005	0	0	0	0,023
6	0,204	0,185	0,13	0,028	0,055	0,053	0,029	0,15
8	0,536	0,646	0,555	0,25	0,49	0,417	0,266	0,01
24	0,588	0,498	0,522	0,473	0,702	0,555	0,522	0,056
La souche S2								
NaCl (mM) Temps(h)	0	3,41	10	50	100	200	300	1710
0	0,024	0,017	0,021	0,01	0	0,006	0,01	0,021
2	0,014	0,16	0,034	0,017	0,001	0,004	0	0,007
4	0,029	0,425	0,045	0,023	0,014	0,02	0	0,004
6	0,23	0,431	0,276	0,127	0,119	0,076	0,029	0,015
8	0,709	0,48	0,832	0,628	0,622	0,505	0,266	0,013
24	0,475	0,33	0,458	0,385	0,438	0,619	0,522	0,003

La souche S3								
NaCl (mM) Temps (h)	0	3,41	10	50	100	200	300	1710
0	0	0,001	0	0,01	0	0	0	0
2	0	0,013	0	0	0	0	0	0
4	0	0,025	0	0	0,001	0	0,005	0
6	0	0,056	0	0	0,07	0,003	0,051	0
8	0,029	0,27	0,128	0,193	0,33	0,108	0,305	0
24	0,31	0,557	0,159	0,341	0,317	0,434	0,236	0,001
La souche S4								
NaCl (mM) Temps (h)	0	3,41	10	50	100	200	300	1710
0	0	0	0	0,005	0	0	0,006	0
2	0	0,012	0	0,007	0,001	0	0,025	0,007
4	0	0,016	0	0,005	0,013	0	0,015	0,002
6	0	0	0	0	0,098	0,039	0,007	0
8	0,075	0,186	0	0,256	0,409	0,224	0,113	0
24	0,91	0,421	0,269	0,547	0,389	0,35	0,351	0,062

La souche S5								
NaCl (mM) Temps (h)	0	3,41	10	50	100	200	300	1710
0	0	0,019	0	0	0	0	0	0
2	0	0,004	0	0	0	0	0	0
4	0,005	0,026	0	0	0,004	0	0	0,008
6	0,153	0,05	0	0,027	0,083	0,039	0,027	0
8	0,367	0,245	0	0,282	0,415	0,297	0,167	0,003
24	0,223	0,203	0,257	0,621	0,821	0,974	0,94	0,003
La souche A ₆								
NaCl (mM) Temps (h)	0	3,41	10	50	100	200	300	1710
0	0	0	0	0	0	0	0	0,021
2	0	0	0	0	0	0,005	0,002	0,016
4	0,054	0,022	0	0,018	0,025	0,038	0,06	0,015
6	0,297	0,208	0,171	0,216	0,19	0,21	0,246	0,018
8	0,428	0,276	0,215	0,276	0,286	0,242	0,285	0,012
24	0,663	0,62	0,648	0,658	0,696	0,601	0,624	0,005

Résultats de la mesure de densité optique pour le test effet de la source de carbone :

Souches Sucres	S1	S2	S3	S4	S5	A6
mannitol	0,327	0,382	0,166	0,27	0,291	0,37
arabinose	0,217	0,146	0,116	0,05	0,238	0,37
glucose	0,246	0,237	0,239	0,28	0,414	0,673
lactose	0,262	0,605	0,275	0,1	0,148	0,289
galactose	0,208	0,407	0,169	0,254	0,211	0,423
saccharose	0,53	0,524	0,316	0,24	0,267	0,436
fructose	0,376	0,076	0,33	0,037	0,126	0,341
sorbitol	0,291	0,583	0,304	0,271	0,118	0,445
xylose	0,213	0,147	0,122	0,016	0,011	0,233
maltose	0,511	0,468	0,246	0,26	0,32	0,557

NOM :	BENAHMED Date de soutenance:14/01/2010
PRENOM :	Amira
Titre :	Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse <i>Hedysarum coronarium</i>
Nature de Diplôme :	Magister en Biotechnologie végétale
Résumé :	Notre travail consiste à mettre en évidence l'influence de la source de carbone sur la production des EPS chez des souches bactériennes isolées à partir des nodules de la légumineuse <i>Hedysarum coronarium</i> et de déterminer l'effet des variations dans la biosynthèse des EPS sur la nodulation. Les souches sont caractérisées phénotypiquement en comparaison avec la souche de référence par une analyse d'un profil des protéines totales sur SDS-PAGE ainsi que quelques tests physiologiques et nutritionnels. Les souches sont cultivées sur YMA où le mannitol est remplacé par d'autres sucres, on procède ensuite à une extraction des EPS et leur dosage en utilisant la méthode d'Anthrone. Un test de nodulation dans des conditions bactériologiquement contrôlées est réalisé selon la méthode de Vincent 1970 ; pour mettre en évidence le rôle des EPS dans le processus symbiotique. Les résultats obtenus montrent que la source de carbone affecte la nature et la quantité des EPS produits par les isolats. Les souches isolées ont montrés une bonne capacité de pénétration dans les tissus racinaires et induire la formation des nodules.
Mots clés :	<i>Rhizobium</i> , <i>Hedysarum coronarium</i> , Exopolysaccharides, Symbiose
Laboratoire de recherche	Laboratoire d'écologie microbienne, faculté des Sciences de la Nature, université Mentouri Constantine
Directeur de recherche	M ^r . Y.BENHIZIA : Maître de Conférences. Université de Constantine
Membre de jury :	Président : M^r. D. KHELIFI : Professeur .Université de Constantine Examineurs : M^r. A. BENGUEDOUAR : Professeur .Université de Constantine M^r. HAMIDECHI : Maître de Conférences. Université de Constantine