

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

Université de Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 28/DS/2013
N° de série : 02/BA/2013

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT En Sciences

En

Génétique Moléculaire
Présentée par

Razika GHARZOULI

Titre :

Etude Structurale et Génétique des Exopolysaccharides
produits par l'espèce *Rhizobium sllae*

Soutenue le 27 Mai 2013

Membres de Jury :

Présidente : D. SATTA Professeur - Université de Constantine 1

Rapporteur : A. BENGUEDOUAR Professeur - Université de Constantine 1

Examineurs : V. POINSOT Directeur de Recherche – CNRS (Toulouse, France)

N.E. KARAM Professeur – Université Oran Es Senia

Y. KACI Professeur – Université USTHB

Y. BENHIZIA Professeur – Université de Constantine 1

Année Universitaire : 2012-2013

Remerciements...

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au laboratoire d'Ecologie microbienne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Constantine1 (Algérie) et le laboratoire des Interactions Moléculaires de Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP) de l'Université Paul Sabatier III, Toulouse (France).

Je remercie vivement mon directeur de thèse, le Professeur BENGUEDOUAR Amar pour m'avoir proposé ce sujet, pour son aide, pour sa rigueur scientifique, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je voudrais adresser toute ma reconnaissance au Dr POINSOT Véréna. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et permis de réaliser toute la caractérisation structurale des EPS au sein de votre laboratoire. Merci de m'avoir enseigné la pratique de la chimie et de la rigueur dans la démarche expérimentale. J'ai énormément appris de vous et je garderai longtemps le souvenir de votre enseignement et de votre humanisme. Merci d'avoir accepté de juger ce travail et participé à son amendement.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur SATTA Dalila pour avoir accepté de présider ce jury de thèse mais aussi pour sa présence et ses conseils tout au long des années de la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont également au Professeur BENHIZIA Yacine qui m'a énormément aidé et pour ses conseils très utiles. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie sincèrement mes professeurs KARAM Nouredine et le Professeur KACI Yahia d'avoir accepté de consacrer du temps, en tant qu'examineurs pour juger ce travail et aider à son amélioration.

Mes remerciements aux membres du laboratoire d'écologie microbienne : Mr. BOURGHOUD Nadjib, Mr HADDI Mohamed Elaid, CHABBI Rabah, TORCHE Asma, BENAHMED Amira, GACI Mériem, SAOUDI Mouna, GUERGOURI Ibtissem, SEBIHI Fatima Zohra, avec qui j'ai passé de réels bons moments au coin d'une paillasse, d'une hotte ou autour d'une table, je n'oublierai jamais nos passionnées.

J'adresse également à monsieur COUDERC François, à Madame Carpéné Marie-Anne, à messieurs Jean-Christophe Garrigues et Christian Labau, chercheurs au laboratoire des IMRCP pour leur soutien et leur aide précieuse.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Résumé

L'interaction symbiotique entre les bactéries du sol, les rhizobia, et leur plante légumineuse hôte, conduit à la formation des nodules racinaires. Ce processus implique un dialogue moléculaire complexe entre les deux partenaires. Les rhizobia synthétisent différentes classes de polysaccharides : les exopolysaccharides (EPS), les polysaccharides capsulaires riches en Kdo (KPS), les lipopolysaccharides (LPS) et le glycane cyclique. Ces différentes classes de polymères sont importantes pour l'établissement d'une association symbiotique avec les légumineuses.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des EPS produits par l'espèce *Rhizobium sllae*, le microsymbiant spécifique de la plante légumineuse *Hedysarum coronarium* L. (*sulla*) largement distribuée en Algérie. Une nouvelle structure d'EPS riche en fucose est mise en évidence, suite à une caractérisation structurale complète de ces derniers. Ce déoxysucre inhabituelle dans la structure des EPS des rhizobia a montré une activité symbiotique importante par une performance de la capacité de nodulation.

Des souches mutantes de l'espèce *R. sllae* déficientes dans la production d'EPS sont transformées de l'ADN plasmidique extrait des souches sauvages en appliquant une technique de choc thermique. L'utilisation du calcofluor a permis de sélectionner les bactéries transformées et l'incorporation de l'ADN plasmidique est vérifiée grâce à un profil plasmidique sur le gel d'agarose (1%). L'insertion d'ADN plasmidique a restauré la capacité de production des EPS par les souches transformées et par conséquent leur capacité de noduler la plante hôte.

Finalement, l'activité symbiotique des EPS à haute masse moléculaire (HMM) et à faible masse molaire (FMM) est testée avec les souches mutantes. Les résultats obtenus montrent que les EPS à FMM sont symbiotiquement plus actives que les EPS à HMM.

Mots clés : *R. sllae*, *H. coronarium* L. Structure des exopolysaccharides, Symbiose, Transformation bactérienne, Plasmide symbiotique, EPS.

Abstract

Specific and complex interactions between soil bacteria, known as rhizobia, and their leguminous host plants result in the development of root nodules. This process implies a complex dialogue between the partners. Rhizobia synthesize different classes of polysaccharides: exopolysaccharides (EPS), Kdo-rich capsular polysaccharides (KPS), lipopolysaccharides (LPS) and cyclic glucans. These polymers are crucial for establishing a successful symbiosis with legumes. In this work we focused on studying the EPS produced by *Rhizobium sllae* bacteria that nodulate *Hedysarum coronarium* L. largely distributed in Algeria. An unusual fucose rich polysaccharide has been characterized. This desoxysugar showed a significant symbiotic activity on nodulation capacity.

Mutant strains of the *R. sllae* species deficient in EPS production are transformed by plasmid DNA extracted from wild-type strains by a method of thermal shock. Use of calcofluor was used to select transformed bacteria and the incorporation of plasmid DNA was confirmed by carrying a plasmid profil of the agarose gel (1%). The insertion of plasmid DNA restored the ability of EPS production by the transformed strains and consequently their ability to nodulate the plant host.

Finally, the symbiotic activity of High molecular weight (HMW) EPS and low molecular weight (LMW) tested with mutant strains. The results show that the LMW EPS are symbiotically more active than HMW EPS.

Keywords: *Rhizobium sllae*, *H. coronarium* L., Exopolysaccharide (EPS) structure, Symbiosis, Bacterial transformation, Symbiotic plasmid, EPS.

ملخص

لإنتاج المايكوبوليمرات، *Rhizobium* و *Hedysarum coronarium* م، تؤدي إلى إنتاج كميته، هذا المركب هو منتج حيوي شيرت، كميته إنتاج. إنتاج المركبات الأيضية في كندا، إنتاج المركبات: كندا، إنتاج المركبات: كندا، إنتاج المركبات: كندا. هذا المركب هو كميته إنتاج (Polymères) ضروري لإنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات.

ف ك م، أو إنتاج المركبات الأيضية (EPS) لإنتاج المايكوبوليمرات *Rhizobium sulae* إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات *Hedysarum coronarium* L. (Sulla) إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات.

إنتاج المايكوبوليمرات (EPS) في إنتاج المايكوبوليمرات *Fucose* إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات. هذا المركب هو إنتاج المايكوبوليمرات (désoxy-sucre) في إنتاج المايكوبوليمرات *Rhizobium* إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات. إنتاج المايكوبوليمرات.

إنتاج المايكوبوليمرات *Rhizobium sulae* إنتاج المايكوبوليمرات (EPS) إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات. إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات.

إنتاج المايكوبوليمرات (EPS) إنتاج المايكوبوليمرات (HMM) إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات. إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات.

إنتاج المايكوبوليمرات *H. coronarium* L, *R. sulae*، إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات، إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات. إنتاج المايكوبوليمرات في إنتاج المايكوبوليمرات. EPS.

Liste des abréviations

Ac: Acétyl

BCP : Pourpre de Bromocresol

BET: Bromure d'éthidium

COSY: Correlation Observed Spectroscopy

DOC: Acide Désoxycholique

EPS : Exopolysaccharides

ESI⁺ : mode de détection /ionisation positif

ESI⁻ : mode de détection /ionisation négatif

ESI/MS : ionisation électrospray couple à un spectromètre de masse

FMM : Faible masse molaire

Fuc: Fucose

Gal: Galactose

GalA: acide Galacturonique

GC/MS: Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse

Glc: Glucose

GlcA: Acide Glucuronique

GPA : Glucose Peptone Agar

Hex : Hexose

HexA : Acide uronique

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPAEC : Chromatographie Haute Performance Echangeuse d'Anion

HMM : Haute masse molaire

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

Kdo : Acide 2-ceto,3-désoxy-*manno*-octulosonique

Kdx : Acide 2-céto-3-désoxy-ulosonique

KPS : polysaccharides capsulaires

LCOs : lipo-chito-oligosaccharides

LPS : Lipopolysaccharides

Man: Mannose

MS: Spèctre de masse

PAGE : Electrophorèse sur Gel de polyacrylamide

PEG : Polyéthylène glycol

PHB : Polyhydroxybuturate

psi : pound per square inch (unité de mesure de pression, 1psi= 0,069 bar)

Pyr: Pyruvyl

RC : Rouge Congo

Rha: Rhamnose

Rib: Ribose

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

Succ: Succinate

TBE : Tris Borate EDTA

TFA : Acide trifluoroacétique

TEMED: Tétraméthyl-éthyl éthylènediamine

UDP : Uridine diphosphate

UTP : Thymidine diphosphate

YMA:Yest Mannitol Agar

Liste des figures

- Figure 1.** La légumineuse *Hedysarum coronarium* L. (Litardière).....05
- Figure 2.** Invasion des racines des légumineuses par les bactéries du genre *Rhizobium* (Kambara, 2008).....09
- Figure 3.** Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique les facteurs Nod (Deléglise, 2001).....10
- Figure 4.** Structure chimique générique des facteurs Nod et structure chimique du facteur Nod produit par *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (Buchanan et al., 2001).....11
- Figure 5.** Schéma de la surface d'une bactérie de type Gram négatif (Chataigne, 2007)...12
- Figure 6.** Les structures chimiques des unités répétées des exopolysaccharides (EPS) rhizobial en fonction de la souche qui les produits. Abréviations : Glc : glucose, GlcA : acide glucuronique, Gal : galactose, Succ :succinate et Ac : Acetyl. (Skorupska et al., 2006).....14
- Figure 7.** Schéma structurale des LPS de l'espèce *R. etli* CE3 (Frayssé et al., 2003).....16
- Figure 8:** La structure du cyclique β -(1, 6) et β -(1, 3)-glucane chez *B. japonicum* (Spaink, 2000).....17
- Figure 9.** Structure du dextrane, un homopolymère (Bergmaier, 2002).....18
- Figure 10.** Schéma représentant la biosynthèse de l'unité répétitive des EPS I de *S. meliloti*. (Skorupska et al., 2006)..... 23
- Figure 11.** Modèle de la régulation du succinoglycane (EPSI) et le galactoglucane (EPSII) chez l'espèce *S. meliloti* (Skorupska et al., 2006).....29
- Figure 12.** Assemblage de la Jarre de Léonard (Vincent, 1970).....41
- Figure 13.** Aspect morphologique et microscopique des bactéries. **A** : sur YMA - rouge Congo, **B** : sur milieu YMA, **C** : sous microscope après coloration de Gram (GX 100).....46
- Figure 14.** Mise en évidence de la production des EPS par les souches étudiées. **A** : formation d'un filament visqueux, **B** : aspect des colonies sur le milieu YMA-Rouge de Ruthénium, **C** : aspect des colonies sous UV sur le milieu YMA-Calcofluor.....48
- Figure 15.** La cinétique de croissance des souches *R. sulae* A6 et RHF après dessiccation, cultivées en présence de différents sucres.....56
- Figure 16.** Corrélation entre **A** : La production des EPS à HPM des EPS de *R. sulae* avec les différents sources de carbone. **B**: la capacité des souches à reprendre leur multiplication dans un milieu liquide après dessiccation.....59

Figure 17. Chromatogrammes de l'analyse GC/MS obtenus après silylation des standards et après hydrolyse et silylation des EPS-HPM et FPM de la souche <i>R. sultae</i> RHF cultivée en présence du mannitol.....	60
Figure 18. Les chromatogrammes des EPS-FPM de la souche RHF en présence des différents sucres, (a) mannitol, (b) saccharose, (c) glucose, (d) sorbitol.....	62
Figure 19. Les chromatogrammes des EPS-HPM de la souche RHF en présence des différents sucres, (a) mannitol, (b) saccharose, (c) glucose, (d) sorbitol.....	63
Figure 20. Les chromatogrammes des EPS-FMM de la souche A6 en présence des différents sucres, (a) mannitol, (b) saccharose, (c) glucose, (d) sorbitol.....	63
Figure 21. Les chromatogrammes des EPS-HMM de la souche A6 en présence des différents sucres, (a) mannitol, (b) saccharose, (c) glucose, (d) sorbitol.....	64
Figure 22. L'analyse GC/MS EI ⁺ des dérivées TMS hydrolysées : A : des fractions des EPS à FPM de la souche A6 cultivée en présence du glucose, B : des fractions des EPS à FPM de la même souche cultivée en présence du sorbitol. Entre les deux on peut observer une diminution claire du contenu de Fucose et une augmentation du rhamnose.....	65
Figure 23. Spectre de la RMN ¹ H des ESP-FMM de la souche RHF cultivée en présence du mannitol et de la souche A6 cultivée en présence du saccharose.....	71
Figure 24. Carte de corrélation de la RMN : ¹³ C/ ¹ H HSQC des EPS-FMM de la souche <i>R. sultae</i> RHF cultivée en présence du mannitol. Les pics de corrélation attribués correspondent aux attributions présentent dans le tableau XII (Gharzouli et al., 2013).....	71
Figure 25. La carte de corrélation de la RMN : ¹³ C/ ¹ H HMBC des EPS-FPM de la souche <i>R. sultae</i> RHF cultivée en présence du mannitol. Les pics de corrélation attribués correspondent aux attributions présentent dans le tableau XII (Gharzouli et al., 2013).....	72
Figure 26. Spectre en mode ESI-MS négatif obtenus avec le système QqTof Ultima (waters). A : spectre MS des EPS avec introduction directe, B : spectre MS-MS de l'ion m/z 1041,4 [M-H], C : spectre MS-MS des possibles variations structurales : nue, acétylé ou succinylé (Gharzouli et al., 2013).....	74
Figure 27. Structure détaillée de l'unité répétitive des EPS à faible poids moléculaire de l'espèce <i>R. sultae</i> (Gharzouli et al., 2013).....	75
Figure 28. Résultats du test de nodulation avec l'isolat S2 cultivée en présence de différents sucres ; A : Mannitol, B : Saccharose, C : Galactose, D : Lactose.....	77

Figure 29. Résultats du test de nodulation avec l'isolat S3 cultivé en présence de différents sucres ; A : Mannitol, B : Saccharose, C : sorbitol.....	77
Figure 30. L'influence de la source de carbone sur la capacité de nodulation des isolats (S1, S2, S3, S4).....	79
Figure 31. Résultats du test de nodulation obtenus avec la souche <i>R. sulae</i> A6 cultivée en présence du ; A : Saccharose, B : Glucose, C : Sorbitol, D : Mannitol.....	80
Figure 32. Résultats du test de nodulation obtenus avec la souche <i>R. sulae</i> RHF cultivée en présence du; A : Glucose B : Saccharose, C : Mannitol, D : Sorbitol.....	81
Figure 33. L'influence de la source de carbone sur la capacité de nodulation de souches de <i>R. sulae</i> A6 et RHF.....	82
Figure 34. La corrélation entre ; A : la capacité de nodulation qui représente l'activité symbiotique des souches de <i>R. sulae</i> en présence de différentes sources de carbone. B : le taux des désoxysucre dans la composition des EPS totaux et les EPS à FMM. C : le taux de production des EPS totaux et les EPS à FMM en fonction des différentes sources de carbone.....	84
Figure 35. Résultats du test de nodulation ; test positif avec les souches sauvages (RHF et A6) et négatif avec les souches mutantes (F2s et A6m).....	86
Figure 36. La co-inoculation des graines par des mutants et des solutions des EPS à faible poids moléculaire a permis de restaurer la capacité de nodulation.....	87
Figure 37. La co-inoculation des graines par des mutants et des solutions des EPS à haut poids moléculaire a permis de restaurer la capacité de nodulation.....	87
Figure 38. Aspect des colonies sous UV sur milieu YMA contenant le Calcofluor. (A) : aspect sec, rugueux et non fluorescent des souches mutantes et <i>E. coli</i> . (B) aspect lisse et fluorescent des souches transformées sélectionnées (T1 : F2s transformée par l'ADN plasmidique de souche RHF, T2 : A6m transformée par l'ADN plasmidique de la souche A6, EcT : <i>E. coli</i> transformé par l'ADN plasmidique de la souche RHF). (C) : aspect lisse et fluorescent de la souche sauvage RHF.....	90
Figure 39. Test de nodulation positif avec les souches sauvage (A), les souches mutantes sont non infectives (B), restauration de l'infectivité avec les souches transformées (C).....	92

Liste des tableaux

Tableau I. Principaux substituants organiques des EPS bactériens (Roger, 2002).....	20
Tableau II. Substituants inorganiques des EPS bactériens (Roger, 2002).....	21
Tableau III. Liste et références des souches utilisées.....	34
Tableau IV. Influence de la source de carbone sur la croissance (DO λ_{600}), le degré de viscosité des colonies (DV) et le rendement de production des EPS (EPS) (mg/g de biomasse bactérienne) avec les isolats obtenus des racines de la plante <i>H. coronarium</i>	49
Tableau V. Effet de la source de carbone sur la production des EPS par les deux espèces <i>R. sullae</i> A6 et <i>R. sullae</i> RHF.....	50
Tableau VI. Effet de la source de carbone sur la production des EPS par les souches de <i>R. sullae</i> (RHI et RH19) et <i>R. leguminosarum</i> bv <i>viciae</i> et <i>trifolii</i>	51
Tableau VII. Résultats du dosage colorimétrique des sucres acides et le dosage à l'Anthrone.....	53
Tableau VIII. Valeurs de la viscosité relative des EPS à HMM et à FMM	55
Tableau IX. Les valeurs de la densité optique (λ_{600}) obtenus après reprise de croissance après dessiccation.....	57
Tableau X. Composition saccharidique des EPS des deux souches <i>R. sullae</i> A6 et RHF déterminés par GC/MS analysés par Hydrolyse et TMS.....	61
Tableau XI. Résultats de la SEC des EPS à faible poids moléculaire	67
Tableau XII. Les données des déplacements chimiques des résidus glycosidiques des EPS produits par l'espèce <i>R. sullae</i> à partir de 2D-RMN dans le D ₂ O à 500 MHz avec l'utilisation d'un cryosonde	69
Tableau XIII. Résultats du test de nodulation avec les souches S1, S2, S3, S4 et S5.....	78
Tableau XIV. Résultats du test de nodulation avec les souches <i>R. sullae</i> A6 et <i>R. sullae</i> RHF.....	79

Table de Matières

Introduction	01
Chapitre I : Etude bibliographique	03
1. Le Cycle d'azote.....	03
2. Interaction symbiotique Légumineuse- <i>Rhizobium</i>	04
2.1. Le partenaire végétal.....	04
2.2. Le partenaire bactérien.....	05
2.3. L'association symbiotique entre la plante <i>H. coronarium</i> et son microsymbiant	06
3. Les étapes de la nodulation.....	07
3.1.Exsudation des flavonoïdes	07
3.2.Sécrétion des facteurs Nod	07
3.3.Formation du fil d'infection et sa progression	08
3.4.Nodule mature.....	08
4. Les signaux symbiotiques	09
4.1. Les exsudats racinaires	10
4.1. Facteurs Nod : structure et rôle symbiotique.....	10
4.3. Rôle symbiotiques des polysaccharides de surface.....	11
4.3.1. Les exopolysaccharides (EPS)	13
4.3.2. Les KPS	14
4.3.3. Les LPS	15
4.3.4. Glucane cyclique	16
5. Composition et classification des exopolysaccharides.....	18
5.1. Composition osidique.....	18
5.2. Substituants.....	19
5.2.1. Substituants organiques	19
5.2.2. Substitunats inorganiques	21
6. Biosynthèse des EPS bactériens spécifiques au genre <i>Rhizobium</i>	22
6.1. Gènes de synthèse des EPS chez les différentes espèces de <i>Rhizobium</i>	22
6.2. La régulation de la synthèse des exopolysaccharides	26
6.2.1. Facteurs influençant la production des EPS.....	26
6.2.2. Les gènes de régulation de la synthèse du succinoglycane.....	27
6.2.3. Les gènes de régulation de la synthèse du galactoglycane.....	28

Chapitre II : Matériel et Méthodes	30
1. Origine des souches utilisées.....	30
2. Purification et conservation des souches	30
3. Détection des exopolysaccharides	31
3.1. Examen visuel	31
3.2. La coloration au rouge de Ruthénium.....	31
3.3. Coloration au Calcofluor	31
4. Influence de la source de carbone sur la croissance des bactéries	32
et la production des EPS	
4.1. Etude de la croissance bactérienne	32
4.2. Effet de la source de carbone sur la production des EPS	32
5. Dosage des exopolysaccharides	33
5.1. Dosage des sucres neutres par la méthode à l'Anthrone	33
5.2. Dosage colorimétrique des sucres acides (Blumenkrantz et <i>al.</i> , 1973)	33
6. Viscosité relative des EPS	34
7. Vitesse de reprise de la croissance après dessiccation	34
8. Identification structurale des EPS de l'espèce <i>R. sulae</i>	35
8.1. Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à un spectre....	35
de masse « GC/MS »	
8.2. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	37
8.3. Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide- Acide Désoxycholique	37
« Desoxycholic acid - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (DOC-PAGE) »	
8.4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	38
8.4.1. EPS - HMM.....	38
8.4.2. EPS - FMM	39
8.5. La spectrométrie de masse (ESI-ToF MS)	40
9. Influence de la source de carbone sur la nodulation	41
10. Restauration de la capacité de nodulation en présence d'EPS :	42
propriété et rôle du plasmide.	
10.1. Etude des propriétés du plasmide par le processus de la transformation .	42
bactérienne	
10.2. Rôle du plasmide symbiotique et des EPS dans la nodulation	45
10.2.1. La capacité des cellules transformées à noduler la.....	45
plante <i>H. coronarium</i> . L	

10.2.2. Rôle des EPS de haute et de faible masse molaire dans la restauration 45	45
de la nodulation	
Chapitre III : Résultats et Discussion	46
1. Caractères morphologiques et microscopiques des souches utilisées.....	46
2. Détection des exopolysaccharides	47
2.1. Examen visuel	47
2.2. Coloration au rouge de Ruthénium.....	47
2.3. Coloration au Calcofluor.....	47
3. Influence de la source de carbone sur la croissance bactérienne.....	49
et la production des EPS	
4. Dosage colorimétrique des EPS	53
5. Viscosité relative des EPS- HMM et EPS-FMM de l'espèce <i>R. sultae</i>	54
6. Vitesse de reprise de la croissance après dessiccation.....	56
7. Identification structurale des EPS de l'espèce <i>R. sultae</i>	60
7.1. L'analyse sur GC/MS des EPS	60
7.2. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	66
7.3. DOC-PAGE	68
7.4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	69
7.4.1 EPS-HMM.....	69
7.4.2 EPS-FMM.....	69
7.5. La spectrométrie de masse (ESI-ToF MS) des EPS de faible masse	73
molaire.	
8. Influence de la source de carbone sur la nodulation.....	77
8.1. Les résultats obtenus avec les isolats (S1, S2, S3, S4).....	77
8.2. Les résultats obtenus avec l'espèce <i>R.sultae</i> A6 et <i>R.sultae</i> RHF	79
9. Activité symbiotique des EPS de faible masse molaire et de haute masse.....	86
molaire de l'espèce <i>R. sultae</i>	
10. Etude des propriétés du plasmide symbiotique de l'espèce <i>R. sultae</i> et son.....	89
rôle dans la nodulation	
10.1. Profil d'DAN plasmidique sur gel d'agrose.....	91
10.2. Capacité de nodulation des souches après transformation	91
Discussion Générale et Conclusion	94
Références bibliographiques	99
Annexes	

Introduction

Introduction

Les légumineuses jouent un rôle important dans le maintien de la productivité en agriculture. Le genre *Hedysarum* est composé d'un grand nombre d'espèces fourragères, largement distribués en Algérie (Abdelguerfi-Berrekia et *al.*, 1988).

L'espèce *Hedysarum coronarium* L. (Litardière), appelée couramment Sulla ou Sainfoin d'Espagne, est la seule espèce cultivée dans le Bassin Méditerranéen pour la production de fourrage (Marghali et *al.*, 2002). Cette plante se caractérise par sa résistance à la sécheresse, la tolérance au sol alcalin et ses bonnes qualités agronomiques, à la fois en termes de rendement (jusqu'à 60 tonnes de fourrage vert /ha/an) et la teneur en protéine (jusqu'à 24% du poids des feuilles) (Struffi et *al.*, 1998).

Les plantes légumineuses sont capables d'entrer en symbiose avec des bactéries appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Ces dernières réduisent l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les plantes (Yates, 1988). L'espèce *Rhizobium sulae* est le partenaire spécifique de la légumineuse fourragère *H. coronarium* L. (sulla) (Benguedouar et *al.*, 1997; Squartini et *al.*, 2002), dont il existe une spécificité entre l'écotype de la plante et la souche correspondante (Casella et *al.*, 1984 ; Struffi et *al.*, 1998).

L'établissement d'une association fixatrice d'azote est important pour la plante, essentiellement lorsque la plante est dans un sol dépourvu des éléments nutritifs nécessaires pour son développement. Ce processus symbiotique a lieu dans les racines des plantes légumineuses à l'intérieur d'organes spécialisés, appelés nodules (Murray, 2011).

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse est basée sur l'interaction moléculaire spécifique entre les deux partenaires (Dénarié et *al.*, 1992; Cooper 2007). En plus des flavonoïdes et les facteurs Nod, les polysaccharides de surface (lipopolysaccharides (LPS), polysaccharides capsulaires (KPS), exopolysaccharides (EPS)) peuvent jouer un rôle important dans la formation du cordon d'infection et le développement des nodules (Frayse et *al.*, 2003). Néanmoins, les fonctions précises de ces complexes polysaccharidiques sont toujours en cours d'investigation.

Une relation entre la capacité de nodulation et la production des EPS par les rhizobia a été rapportée (Karr et *al.*, 2000; Ghosh et *al.*, 2005). Les EPS produits par les rhizobia sont essentiels pour l'établissement de la fixation symbiotique d'azote avec les légumineuses (Chataigné, 2007 ; Broughton et *al.*, 2000). Les EPS sont considérés comme des molécules de signalisation. Mais avant tout, les EPS contribuent à la protection des bactéries vis-à-vis leur environnement.

Les propriétés rhéologiques des EPS et leur localisation périphérique jouent un rôle dans la protection contre le stress environnemental, et permettent le premier contact entre la surface de la bactérie et les racines de la plante légumineuse (D'Haeze et *al.*, 2004).

La production des EPS est essentielle pour les plantes hôtes qui forment des nodules de type indéterminé sur leur racine (Laus et *al.*, 2004). Ce type de nodules est en général cylindrique ou montre une forme ovale avec un méristème apical persistant produisant un gradient dans les zones de développement (Patriarca et *al.*, 2002).

Orgambide et ses collaborateurs (1996) ont étudié les glycoconjugués et les lipides produits par l'espèce *R. sullae* IS123 (enceinement nommé *R. hedysari*). Navarini et *al* (1997) ont mis en évidence l'influence de la source de carbone sur la production des EPS par l'espèce *R. sullae* HCNT. Aucun travail n'est rapporté sur la détermination de la structure complète et l'étude du rôle symbiotique des EPS de l'espèce bactérienne *R. sullae*. Dans cet objectif, nous avons étudié la structure et les propriétés symbiotiques des exopolysaccharides produits par le microsymbiote spécifique de la plante *H. coronarium* L.

Nos objectifs ont consisté en l'étude de *R. sullae*, pour cela nous avons opté pour :

- 1- Etudier bactériologiquement l'espèce sauvage et de différentes variantes.
- 2- Mettre en évidence la production des EPS par différentes méthodes biochimiques.
- 3- Réaliser l'analyse structurale des EPS par des techniques physico-chimiques.
- 4- Déterminer les rôles physiologiques des EPS sous différentes conditions environnementales.
- 5- Appliquer la méthodologie génétique pour étudier les capacités transformantes de différentes souches de *R. sullae*, sauvage et mutantes.

Etude Bibliographique

1. Le Cycle de l'azote

L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes. L'azote permet la synthèse protéique favorisant ainsi l'utilisation des hydrates de carbone, il stimule le développement et l'activité racinaire, en facilitant l'absorption des autres éléments minéraux et la croissance des plantes. Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) (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. Malgré son taux élevé, mais ce type d'azote est non assimilable par les plantes.
- sous forme minérale ou organique dans les sols et la matière vivante.

On appelle fixation de l'azote le processus de transformation d'azote atmosphérique en ammoniac. La fixation biologique de l'azote est le processus biochimique le plus important après l'assimilation du CO_2 (Tortora et *al.*, 2003).

Le cycle de l'azote est une série de processus qui convertit l'azote gazeux en substance organique et restitue à nouveau l'azote dans la nature. C'est un cycle continu qui peut être décomposé en quatre types de réactions où les microorganismes jouent un rôle (Peret, 2007):

- **Fixation de l'azote** : c'est le processus par lequel les bactéries transforment l'azote atmosphérique en ammoniac par la réduction du diazote (N_2).
- **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 d'arrose la plus facilement utilisable par les plantes. La première étape de la formation du nitrate, est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite par des bactéries du genre *Nitrosomonas*. 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.

Les organismes qui peuvent fixer l'azote c'est-à-dire convertit l'azote gazeux stable de l'atmosphère en une forme biologiquement utile, appartiennent à un groupe biologique connu sous le nom de fixateurs d'azote (Davet, 1996). On distingue deux groupes de bactéries qui sont capables de fixer l'azote :

Le premier groupe est très hétérogène. Il regroupe des bactéries aérobies (*Azobacter*), des anaérobies strictes (*Clostridium*) et des anaérobies facultatives (*Klebseilla*). Des bactéries photosynthétiques (*Chromatium*, *Rhodospirillum*) des cyanobactéries, ainsi que des méthanogènes comme les *Methanococcus* et *Methanosarcina* peuvent être trouvées dans ce groupe. Les bactéries libres fixatrices d'azote sont très répandues. Elles colonisent les sédiments marins et d'eau douce, les sols, les surfaces des feuilles et des écorces ainsi que le tube digestif de divers animaux (Hopkins, 2003). L'intensité de la fixation de l'azote par les bactéries libres est très variable selon les lieux et les conditions climatiques. La quantité totale d'azote fixé par les bactéries libres représente environ 50 millions de tonnes chaque année (Davet, 1996).

Le deuxième groupe des organismes fixateurs concerne des symbiotes de plantes ou de champignons. La fixation de l'azote par des bactéries symbiotiques produit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes, soit plus du double de l'apport dû aux bactéries libres (Davet, 1996). Trois situations se présentent : les endosymbioses des rhizobia, de tige des *Frankia* et enfin les symbioses à cyanobactéries. Les deux premiers sont des associations étroites puisqu'elles nécessitent la formation d'un organe végétal sur les racines ou la tige : le nodule, qui héberge la bactérie et au sein duquel ont lieu les échanges symbiotiques (Hopkins, 2003). La plante fournit les conditions anaérobies et les éléments nutritifs à la bactérie qui, en retour, fixe l'azote qui intégrera les protéines végétales (Tortora et al., 2003). Les symbioses avec les cyanobactéries ne conduisent pas à la formation des nodules mais plutôt au détournement des organes existants comme par association de la plante *Azolla* avec la cyanobactérie *Anabaena* (Hopkins, 2003).

2. Interaction symbiotique Légumineuse-Rhizobium

2.1. Le partenaire végétal

Les légumineuses ou Fabacées constituent une superfamille comprenant plus de 18000 espèces réparties dans trois sous famille : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papillioideae* (Peret, 2007). Dans les 3 sous familles le pourcentage des espèces nodulantes est largement différent, 97% d'espèces de la sous-famille des *Papillioideae* sont nodulées, 90% dans *Mimosoideae* et seulement 23% des espèces de *Caesalpinioideae* (Werner, 1992).

Hedysarum spp est une légumineuse fourragère spontanée assez répandue dans la région méditerranéenne. Différentes espèces de ce genre sont rencontrées en Afrique du Nord

et en Europe du Sud dans des étages bioclimatiques et des conditions édapho-agricoles assez variables (Abdelguerfi-Berrekia et *al.*, 1988).

Le genre *Hedysarum* renferme des espèces annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames. Il est représenté en Afrique du Nord par des espèces faisant partie du groupe méditerranéen en présentant un nombre chromosomique de base $n = 8$ (Quezel et Santa, 1962 ; Pottier-Alapetite, 1979).

La plante *Hedysarum coronarium*. L (Fig.1) est également appelée Sulla ou Sainfoin d'Espagne. C'est une plante, herbacée, annuelle, ou pérenne, droite ou rampante pouvant atteindre de 0,3 à 1,5 m. La floraison commence au début de l'été. Les fleurs sont réunies en racème jusqu'à 35 fleurs ; s'étendant du rose au violet mais étant généralement cramoisies. Les tiges sont épaisses, boisées, simples ou ramifiées et généralement creuses (Quezel et Santa, 1962). Cette plante joue un rôle dans l'amélioration et la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique, dans l'apiculture (les fleurs du Sulla sont pollinisées principalement par les abeilles), ainsi que dans la protection des sols contre l'érosion (Douglas, 1984 ; Hannachi-Salhi et *al.*, 2004).



Figure 1. La légumineuse *Hedysarum coronarium* L. (Litardière)

2.2. Le partenaire bactérien

Les rhizobia sont des bactéries du sol, Gram négatives, aéro-anaérobie facultatives, présentant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 μm de largeur et de 1,2 à 3 μm de longueur et non sporulant (Jordan, 1984). Elles se caractérisent par leur mobilité grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches (Werner, 1992).

Le *Rhizobium* possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobie; alors que dans les conditions d'anaérobie, les espèces de *Rhizobium* peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons (Werner, 1992).

En culture, une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30° C et un pH 6,0 à pH 7,0 (Somasegaran et Hoben ,1994). Les températures extrêmes sont de 4° C et 42,5° C. Les souches de *Rhizobium* peuvent se développer à pH compris entre 4,5 et 9,5 (Jordan, 1984).

Les rhizobia ont besoin d'un milieu de culture qui renferme une source de carbone, d'azote et des sels minéraux (Somasegaran et Hoben ,1994). En comparaison avec d'autres bactéries de sol, les genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* ont une grande exigence pour le Ca^{2+} , Fe^{2+} et Co^{2+} . Leurs besoins en vitamines sont très variables, le genre *Bradyrhizobium* est généralement stimulé par la biotine, alors que le *Rhizobium* a besoin conjointement de thiamine et de pantothénate (Werner, 1992).

2.3. L'association symbiotique entre la plante *H. coronarium* et son microsymbiote

La bactérie fixatrice d'azote, nodulant la plante Sulla a été isolée et nommée *Rhizobium sullae* (Squartini et al., 2002). La souche a été caractérisée, comme bactérie à croissance rapide et hautement spécifique de l'espèce *Hedysarum coronarium* elle est incapable de noduler *Trifolium repens*, *T. subterraneum*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Glycine max*, *Vigna unguiculata* et *Cicer arietinum*. (Casella et al., 1984 ; Struffi et al., 1998).

Dans l'association *Hedysarum coronarium-Rhizobium sullae*, il existe une spécificité nette entre l'écotype de la plante et la souche de *Rhizobium*. Il a été observé que le microsymbiote de la plante Sulla peut noduler la plante *Hedysarum fluxuosum*, mais il est alors incapable de fixer l'azote atmosphérique. Alors que la bactérie isolée des nodules de *H. fluxuosum* ne peut pas noduler *H. coronarium* L (Casella et al., 1984).

Les bactéries du genre *Rhizobium* 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).

3. Les étapes de la nodulation

L'organogénèse des nodules débute par l'infection bactérienne et se termine par la formation d'un nodule. Elle est bien connue aujourd'hui. Les étapes de la mise en place de la symbiose peuvent être énumérées dans l'ordre chronologique suivant (Fig.2):

3.1. Exsudation des flavonoïdes (Fig.2 A)

Pendant cette étape aucune spécificité n'intervient (Bélanger, 1998), les rhizobia sont attirés vers les poils racinaires par un large groupe de substances, principalement les flavonoïdes exsudés par les racines (Patriarca et *al.*, 2004). Par la suite, les bactéries s'attachent aux poils racinaires, interviennent dans ce mécanisme les lectines de la plante, des fibres de cellulose et une adhésine bactérienne, la ricadhésine (Bélanger, 1998). Le chimiotactisme peut jouer un rôle dans l'efficacité de l'interaction sous des conditions environnementales et microbiologiques complexes (Patriarca et *al.*, 2004).

3.2. Sécrétion des facteurs Nod (Fig. 2 A)

Certains flavonoïdes spécifiques induisent l'expression des gènes *nod* de la bactérie qui se traduit par la sécrétion des facteurs Nod (Patriarca et *al.*, 2004). Les facteurs Nod sont des molécules de signalisation de nature lipochito-oligosaccharides (Gage et Morgolin, 2000). Tous les facteurs Nod des espèces du genre *Rhizobium* ont la même structure chimique de base, mais ces facteurs diffèrent d'une espèce à l'autre par leurs chaînes latérales substituant la chaîne principale d'oligosaccharide et ainsi que par la longueur et le degré de saturation de la chaîne lipidique (Patriarca et *al.*, 2004).

Les facteurs Nod induisent une alcalinisation de la surface racinaire et une dépolarisation de la membrane des poils absorbants, ainsi qu'une oscillation de la concentration du calcium (Bélanger, 1998, Teillet, 2008). Les facteurs Nod provoquent également la déformation des poils absorbants en fin de croissance apicale. Sous l'action de ces composés les cellules du cortex se mettent en mitose à distance pour former le primordium nodulaire dans le méristème (Gage et Morgolin, 2000). Enfin les facteurs Nod induisent aussi l'expression des nodulines précoces au niveau des cellules de l'épiderme du cortex du péricycle de la racine (Teillet, 2008).

3.3. Formation du cordon d'infection et sa progression (Fig.2 B, C)

Une fois fixées à l'apex de la racine en croissance, les bactéries vont induire par l'intermédiaire des facteurs Nod, la courbure des poils absorbant « crosse de berger » (Bélanger, 1998 ; Teillet, 2008). Cette déformation, typique de l'infection par *Rhizobium*, correspond à un retournement à 360° du poil absorbant autour d'une micro-colonie bactérienne. A la suite de cette déformation, les bactéries pénètrent dans le poil absorbant via une structure tubulaire appelé cordon d'infection, qui amène la bactérie au nodule primaire (Teillet, 2008). A l'intérieur du cordon d'infection, les bactéries apparaissent alignées en une ou deux colonnes plus ou moins parallèles à l'axe du cordon (Teillet, 2008). La matrice du cordon est constitué à la fois des composés végétaux tels que des glycoprotéines et des extensines ainsi que des composés bactériens tels que les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides de surface (Gage et Morgolin, 2000).

3.4. Maturation du nodule (Fig.2 D, E)

Lorsque le cordon d'infection atteint la base des cellules épidermiques, il fusionne avec leur paroi et les bactéries se propagent dans l'espace intercellulaire. En même temps, la paroi de la cellule corticale sous-jacente s'invagine, permettant au cordon d'infection de continuer sa progression (Gage et Morgolin, 2000). Les cellules du cortex interne se dédifférencient et leur cycle cellulaire est réactivé, ce qui donne la formation d'un primordium nodulaire (Teillet, 2008). Le nodule se prolonge et le raccordement vasculaire avec la stèle de la racine est mis en place. Les bactéries qui sont acheminées dans les cellules du nodule se différencient en bactéroïdes fixant l'azote. Le nodule et le bactéroïde forment le symbiosome (Lindström et al., 2002). Une membrane pér bactéroïdale entoure les bactéroïdes, protégeant la plante contre l'ammoniac produit et la pathogénicité potentielle de la bactérie, tout en maintenant un gradient d'azote, d'oxygène et de nutriments nécessaires à la fixation d'azote (Bélanger, 1998).

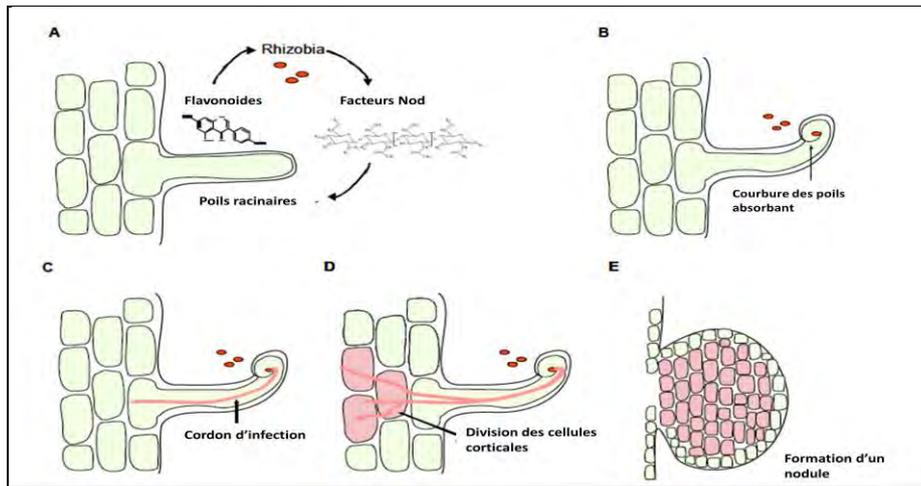


Figure 2. Invasion des racines des légumineuses par les bactéries du genre *Rhizobium* (Kambara, 2008)

A: les rhizobia colonisent naturellement la rhizosphère, métabolisent les compositions organiques secrétés par les cellules racinaires. Les flavonoides libérés par les légumineuses, attirent les bactéries et favorisent leur attachement aux poils racinaires. **B:** la concentration élevée des flavonoides déclenche la synthèse des facteurs Nod par les rhizobia, ce qui induit une courbure des poils absorbant et la pénétration des bactéries au centre de la poche de l'infection. **C:** le développement du cordon d'infection dans les poils absorbant vers les cellules corticales de la racine. **D:** le cordon d'infection se ramifie près du primordium nodulaire formé par les cellules corticales en division. Les rhizobia sont libérés du fil d'infection pour former des symbiosomes dans des cellules de nodule « montré en rose ». **E :** de nombreux événements de dégagement et de division des cellules corticales mènent au développement d'un nouveau organe racinaire, le nodule.

4. Les signaux symbiotiques

Le terme « dialogue moléculaire » a été utilisé par Dénarie et al (1993) pour décrire l'échange des signaux chimiques plante-bactérie qui conduit à l'infection racinaire et la formation des nodules racinaires des légumineuses par des bactéries fixatrices d'azote collectivement connues sous le nom des rhizobia (Fig.3) (Cooper, 2007).

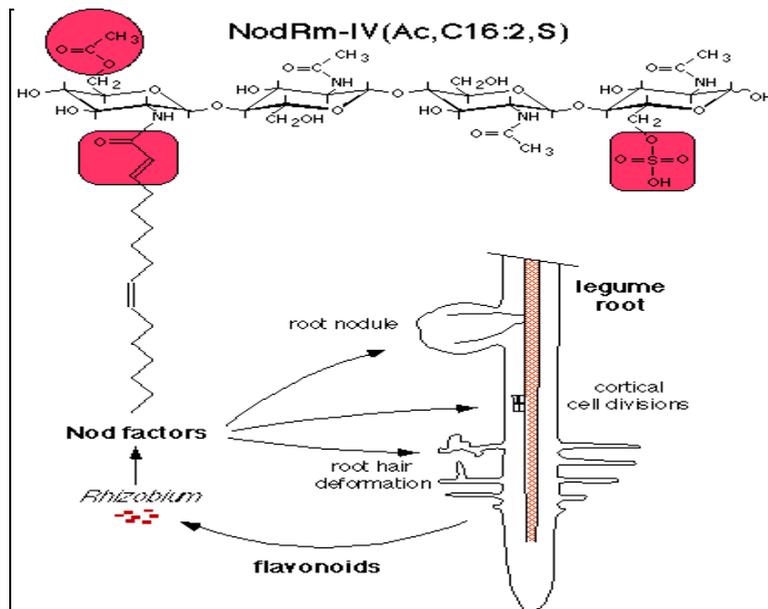


Figure 3. Dialogue moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques implique les facteurs Nod. (Deléglise, 2001)

4.1. Les exsudats racinaires

Les interactions entre les légumineuses et les rhizobias débutent dans la rhizosphère suite à la libération de molécules carbonées (sucres, acides organiques, hormones, vitamines et substances phénoliques) par exsudation, sécrétion, ou autolyse des vieilles cellules de la racine (Fig. 3). Ces substances attirent vers la plante des microorganismes symbiotiques et pathogènes. D'autres composés trouvés dans les exsudats racinaires exercent des pressions sélectives sur la communauté microbienne, les (iso) flavonoides, stachydrines et acides aldoniques sont les plus importants de point de vue symbiotique (Ara Begum *et al.*, 2001 ; Barbour *et al.*, 1991).

Les flavoïdes sont des métabolites secondaires des plantes qui sont synthétisés par la voie centrale des phénylpropanoïdes et la voie acétate-malonate (Cooper, 2007). Ils constituent les premiers signaux de l'hôte (Gage, 2004). Une légumineuse peut sécréter une variété de sous classes dont : les chalcones, flavones, flavanones, isoflavones et coumestanes. Ces substances sont fréquemment actives à de faibles concentrations (micromolaires ou même nanomolaires) (Cooper, 2007).

4.2. Les facteurs Nod : structure et rôle symbiotique

Les facteurs Nod sont des lipo-chito-oligosaccharides (LCOs) produits par les différents gènes *nod*, *nol* et *noe*. Les LCOs sont formés par 3 à 5 résidus N-Acetyl-glucosamines liés en configuration β , 1-4. Un acide gras est lié à l'azote du sucre terminal non réducteur. Aux deux extrémités se trouvent des substituants divers (fucose, sulfate, acétyl, carbonyle)

(Fig.4) (Spaink, 2000 ; Cooper, 2007). La longueur et la saturation de la chaîne de l'acide gras ainsi que les différents substituants greffés sur le squelette du LCOs jouent un rôle crucial dans la spécificité entre la bactérie et la plante. Ces substituants permettent l'entrée du *Rhizobium* (Perret et al., 2000 ; Bélanger, 1998).

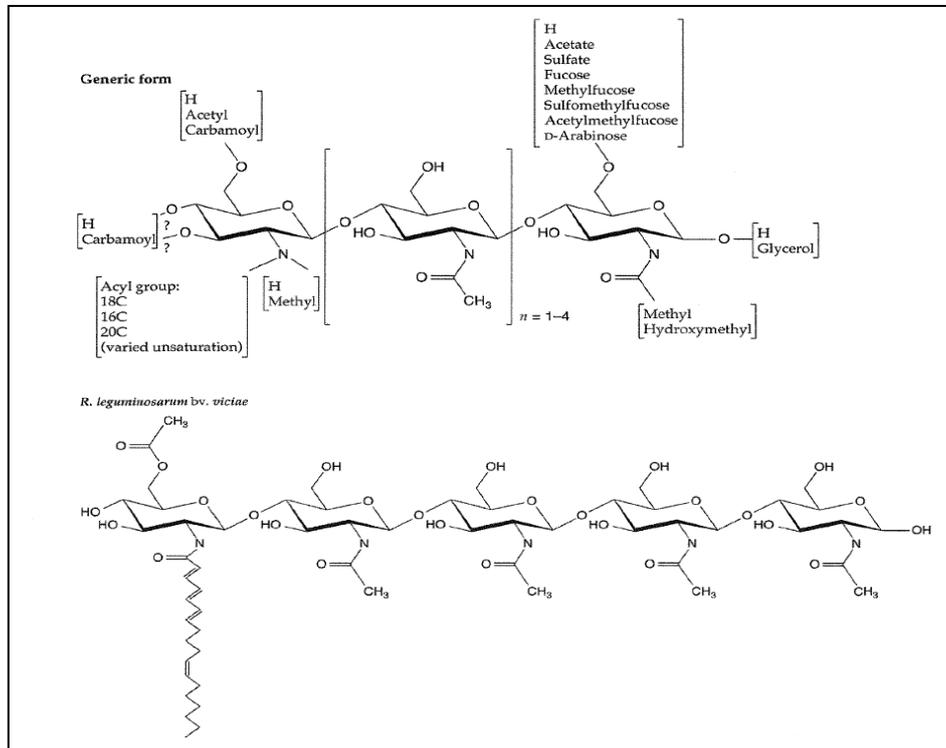


Figure 4. Structure chimique générale des facteurs Nod et structure chimique du facteur Nod produit par *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (Buchanan et al., 2001)

Les facteurs Nod constituent un signal essentiel dans le développement symbiotique ; en absence des facteurs Nod, les rhizobia ne peuvent infecter les racines des légumineuses. Ils sont actifs à des concentrations de 10^{-12} M (Cooper, 2007). Il est important que les facteurs Nod conservent leur intégrité structurale, puisque chaque partie de leur structure assure une fonction cruciale dans le développement nodulaire.

4.3. Les polysaccharides de surface : rôle symbiotique

Les rhizobia synthétisent différentes classes de polysaccharides : les exopolysaccharides (EPS), les polysaccharides capsulaires (CPS), les lipopolysaccharides (LPS) et les glucane cycliques. Certains d'entre eux sont sécrétés dans le milieu environnant, d'autres sont exposés à la surface ou présents dans l'espace périplasmique (Fig.5).

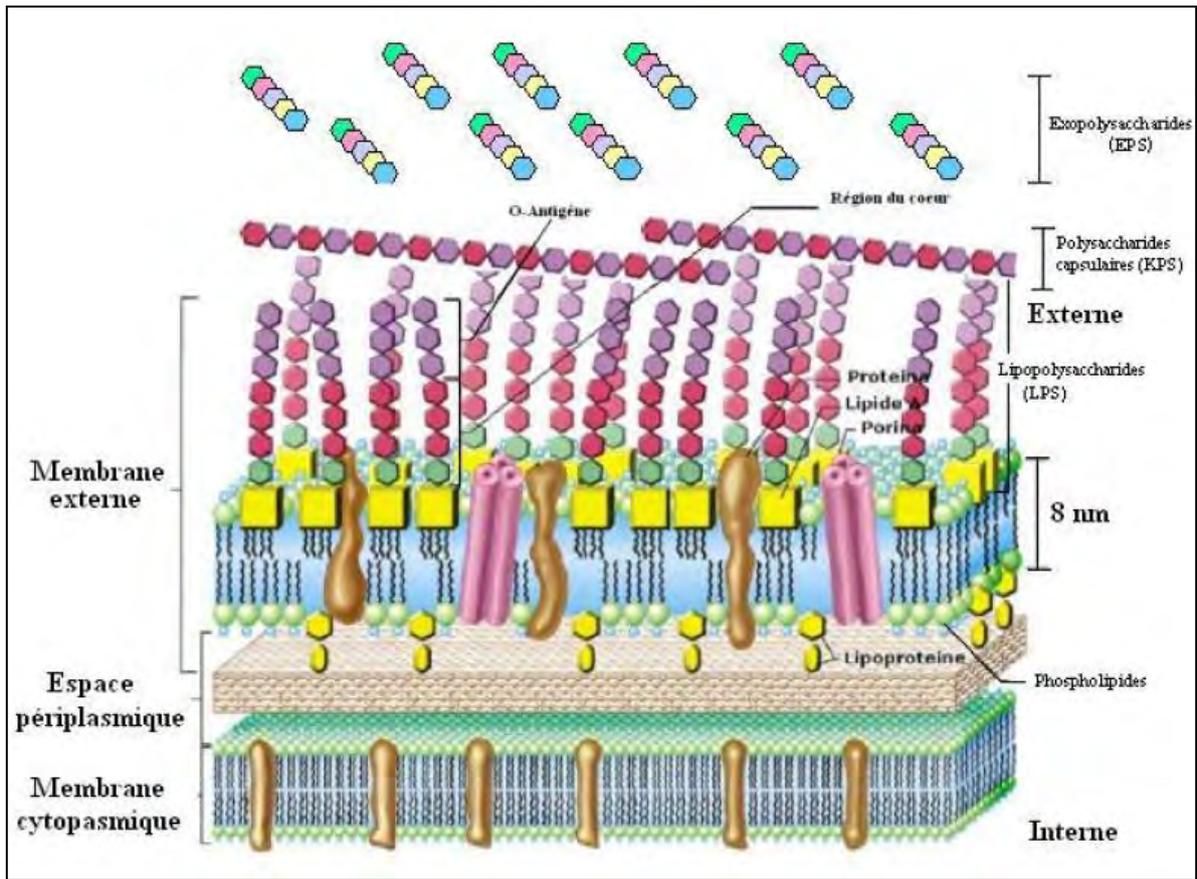


Figure 5. Schéma de la surface d'une bactérie de type Gram négatif (Chataigné, 2007)

Les EPS sont des produits extracellulaires abondants, sécrétés dans le milieu externe et sont accumulés à la surface cellulaire. A l'état libre, les EPS agissent comme une barrière physique contre les agents extérieurs et ils sont également impliqués dans l'attachement aux surfaces.

Les CPS sont une classe de polysaccharides qui demeure attachée à la surface bactérienne. Cette classe joue un rôle dans la protection contre la dessiccation et elle confère la résistance aux bactériophages (Frayssé et *al.*, 2003). Lorsque les CPS sont riches en acide 2- désoxy-3- keto-octulosonique on les note KPS.

Les LPS sont des polysaccharides ancrés dans la membrane bactérienne externe. Les LPS sont impliqués dans la stabilisation des membranes. Ils agissent également en tant que barrière contre les composés antibactériens tels que les peptides cationiques. Les glucanes cycliques sont des molécules cycliques formées de glucose qui peut être ou non substitué par des groupes anioniques. Ils sont accumulés principalement dans l'espace périplasmique et ils sont trouvés chez des bactéries du groupe α -proteobactéria. Les glucane cyclique jouent un

rôle dans la protection contre les conditions hypo-osmotique (Skorupska et *al.*, 2006). Le rôle symbiotique de ces polysaccharides reste mal connu.

4.3.1. Les exopolysaccharides (EPS)

Les exopolysaccharides rhizobiens sont des hétéropolymères spécifiques de l'espèce. Formés d'unités répétitives, ils se composent en général d'hexoses tel que : glucose, galactose, mannose, rhamnose, acide glucuronique et acide galacturonique qui peuvent être substitués par des pyruvates, succinates ou des acétates (Fig.5) (Skorupska et *al.*, 2006 ; Spaink, 2000).

Deux types d'EPS sont décrits chez *S. meliloti* ; les succinoglycanes (EPS I) et les galactoglycanes (EPS II).

Les succinoglycanes sont parmi les EPS les mieux connus. Produits par plusieurs souches de l'espèce *S. meliloti*. Ils sont constitués d'un octasaccharide comme unité répétitive, constitué d'un galactose et de sept résidus de glucose. Chaque unité répétitive est substituée par au moins un groupement acétyl, pyruvyl et succinate (Fig.6 A).

Le galactoglucane (EPS II) est un polydisaccharide composé d'un glucose acétylé et un galactose pyruvylé (Fig.6A) (Skorupska et *al.*, 2006). L'EPS II est surtout synthétisé sous des conditions de carence en phosphate ou lorsqu'une mutation touche l'un des gènes régulateurs *mucR* ou *expR* (Skorupska et *al.*, 2006).

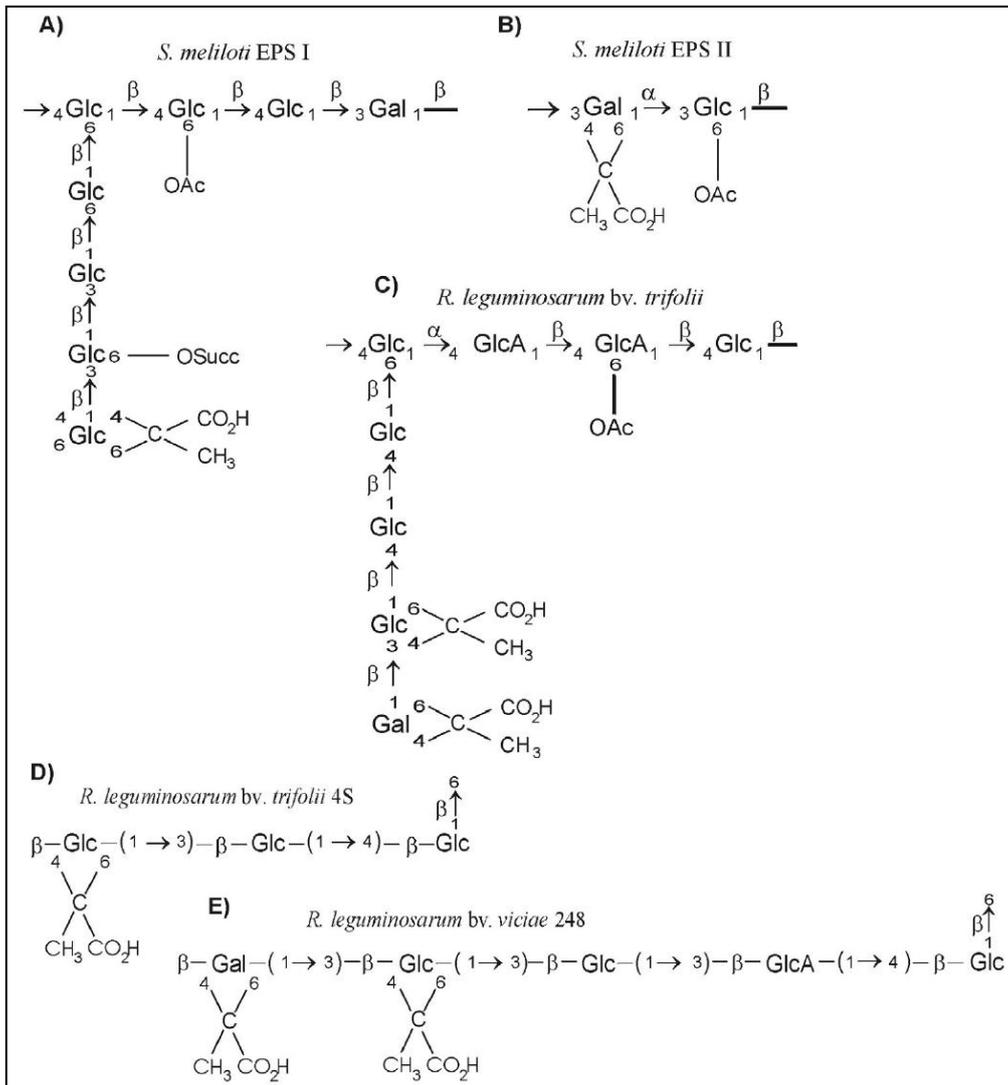


Figure 6. Les structures chimiques des unités répétitives des exopolysaccharides (EPS) rhizobial en fonction de la souche qui les produit. Abréviations : Glc : glucose, GlcA : acide glucuronique, Gal : galactose, Succ :succinate et Ac : Acetate. (Spaink, 2000)

Les fonctions attribuées aux EPS sont en particulier la reconnaissance spécifique de l'hôte, l'organisation du cytosquelette des poils racinaires, influence sur la prolongation du cordon d'infection et la redirection de la croissance apical des poils racinaire (Pellock *et al.*, 2000, Morgante *et al.*, 2007). D'autres auteurs ont suggéré un rôle de modulateur négatif de la réponse de défense de la plante (Janczarek et Skorupska, 2003, Morgante *et al.*, 2007).

4.3.2. Les KPS

Contrairement aux EPS qui possèdent une structure généralement commune entre les souches de la même espèce, les KPS possèdent une structure spécifique à la souche. Les KPS sont formés de l'acide 2-céto-3-désoxy-ulosonique, notés Kdx (Lepek et D'Antuono, 2005).

Leur structure est analogue à celle de l'antigène KR5 de *E. coli*, d'où les initiales KPS qui leur ont été attribuées (Frayse et *al.*, 2003).

La nature et la taille des KPS sont variables dans l'espèce *S. meliloti* d'une souche à l'autre. La souche Rm 41 synthétise deux types du KPS, les KPS à faible poids moléculaire et les KPS à haut poids moléculaire.

Leur rôle dans la symbiose fixatrice d'azote est à ce jour inconnu. Peu d'études ont été réalisées pour comprendre leurs mode d'action (Skorupska et *al.*, 2006). Ils pourraient avoir un simple rôle passif de protection lors des changements brusques d'environnement (passage du sol à la plante) et faces aux défenses de la plante (antibiotiques de nature peptidique) et au choc alcalin (Frayse et *al.*, 2003)

4.3.3. Les LPS

Les LPS sont formés de trois régions différentes, le lipide A ; impliqué dans l'ancrage de la molécule dans la membrane ; le cœur, région polysaccharidique attachée au lipide A par 2 Kdo et à l'antigène O par un autre ; l'antigène O ; par des résidus de désoxy ou didésoxyoses (Fig. 7) (Lepek et D'Antuono, 2005).

Deux types de LPS sont distingués (Frayse et *al.*, 2003) :

- r-LPS « rough LPS » : sont formés de deux domaines seulement, le lipide A et le cœur. Ceux-ci donnent au contour des colonies bactériennes un aspect irrégulier rugueux.
- s-LPS « smooth LPS » : contiennent les trois domaines (lipide A, coeur et antigène-O). contrairement aux r-LPS, les s-LPS permettent d'observer des colonies bactériennes à contours réguliers lisses.

Plusieurs travaux de recherche ont été porté dans l'objectif de déterminer le rôle des LPS produits par différentes espèces bactériennes dans l'établissement d'une relation symbiotique avec leur plante hôte. Les résultats obtenus montrent que les LPS sont surtout impliqués dans l'adhésion des bactéries aux poils racinaires, et dans leur pénétration dans les cellules végétales ainsi dans la stimulation de la formation du cordon d'infection. Les LPS joueraient aussi un rôle dans l'inhibition des réactions de défense de la plante dans les étapes les plus tardives de l'infection, lorsque les EPS ne sont plus synthétisés, en empêchant la mise en place du choc oxydant. Les LPS interviennent aussi dans la différenciation en bactéroïdes (Frayse et *al.*, 2003 ; Lepek et D'Antuono, 2005).

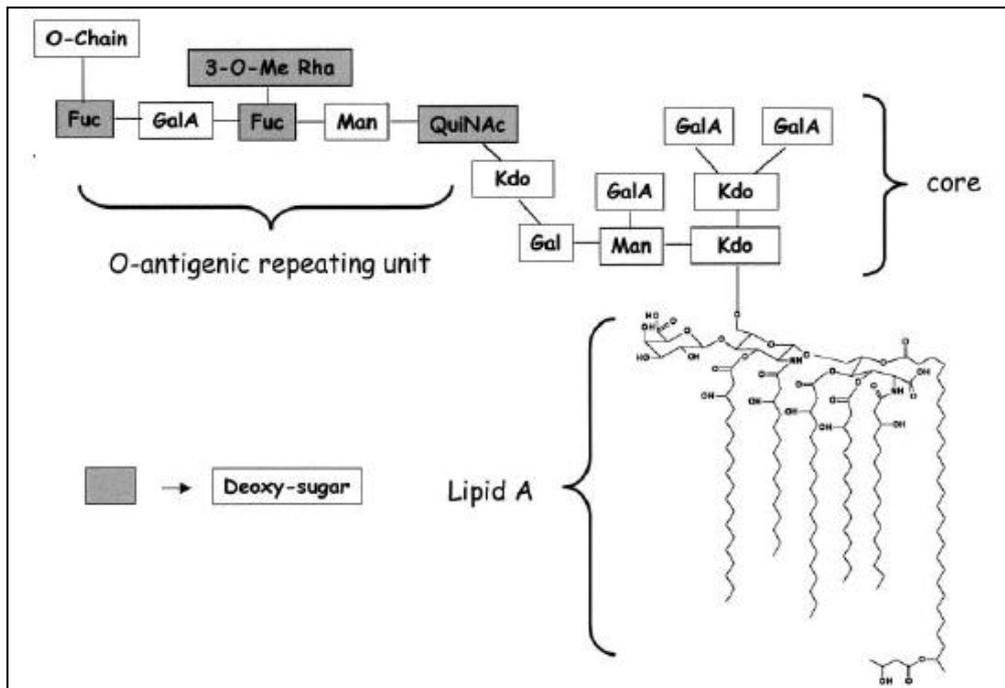


Figure 7. Schéma structural des LPS de l'espèce *R. etli* CE3 (Frayssé et al., 2003)

4.3.4. Les glucanes cycliques

Le premier isolement du glucane cyclique à partir de *S. meliloti* a mis en évidence que le glucane cyclique est constitué d'un homopolymère de 20 résidus de glucose lié par des liaisons osidique β -(1,2). Dans le genre de *Rhizobium* et *Sinorhizobium*, ces molécules sont liées uniquement par des liaisons β -(1,2) glycosidique avec un degré de polymérisation allant de 17 à 25 (*R. leguminosarum*). Les espèces du genre *Bradyrhizobium* produisent des glucanes cycliques contenant deux types de liaison glycosidique β -(1,3) et β -(1,6). Ces molécules contiennent 10 à 13 résidus de glucose et semblent porter des ramifications dans leur structure (Fig.8) (Spaink, 2000).

La biosynthèse de β -(1,2) glucanes cycliques chez le genre *Sinorhizobium* et le genre *Rhizobium* dépend de la protéine NdvB. La protéine NdvB est une très grande protéine (319 kDa chez *Sinorhizobium*), capable de former un intermédiaire covalent avec la chaîne principale du glucane en cours de synthèse (Spaink, 2000).

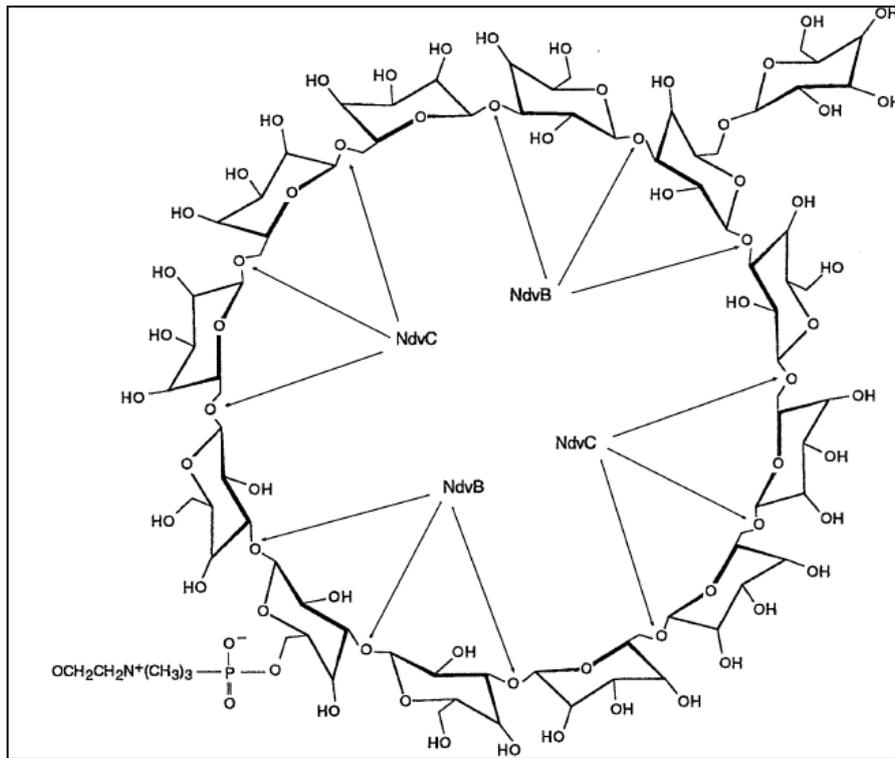


Figure 8. La structure du cyclique β -(1, 6) et β -(1, 3)-glucane chez *B. japonicum* (Spaink, 2000).

Les glucanes cycliques jouent un rôle symbiotique important dans l'attachement aux racines et à l'adaptation au choc hypo-osmotique. Gore et Miller (1993) ont rapporté la présence d'une quantité plus élevée du glucane cyclique dans le bactéroïde. Ce qui est nécessaire pour une adaptation rapide aux variations osmotiques dans un environnement allant de la rhizosphère au cordon d'infection et au symbiosome (Frayse et *al.*, 2003).

5. Composition et classification des exopolysaccharides

5.1. Composition osidique

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 (Bergmaier, 2002).

- **Homopolysaccharides**

Un grand nombre d'EPS microbiens, dont certains possèdent une importance industrielle, sont des homopolysaccharides. Quoique la chaîne du polymère se compose d'un seul type de monomère, les propriétés des homopolysaccharides peuvent varier énormément selon leur structure. Bien que seul le D-glucose compose sa chaîne, le curdlane, la cellulose et le dextrane, par exemple, démontrent des comportements très différents quant-à leurs capacités épaississantes (formation du gel et solubilité).

Les homopolysaccharides ont des poids moléculaires très élevés. Ainsi, la masse moléculaire du dextrane produit par *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F varie entre 6.2 et $7.1 \cdot 10^6$ Da, et celles des levanes et fructanes, produits par *S. mutans* vont jusqu'à $21.6 \cdot 10^6$ Da et $12.4 \cdot 10^6$ Da, respectivement (Cerning et al., 1990). La Figure 9 montre comme exemple la structure du dextrane.

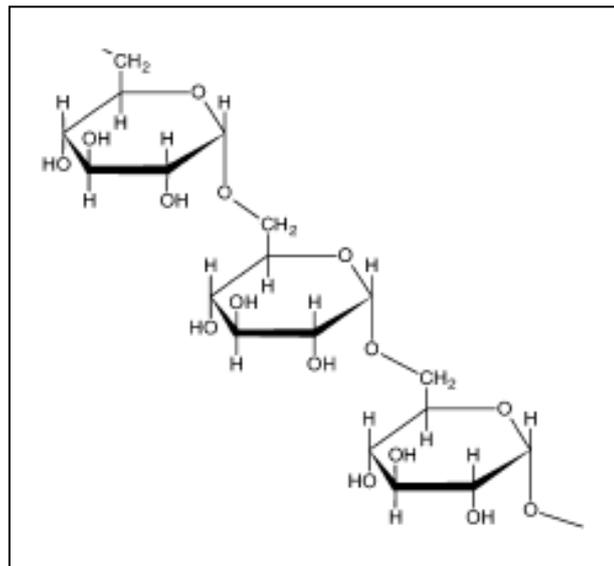


Figure 9. Structure du dextrane, un homopolymère (Bergmaier, 2002).

- **Hétéropolysaccharides**

Les hétéropolysaccharides microbiens sont composés principalement d'unités répétitives, variables dans leur taille, allant du di- à l'octasaccharide. En général, ils ont des poids moléculaires élevés de $5 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^6$ Da (Ruas-Madiedo et *al.*, 2002).

Les sucres communs généralement trouvés dans la structure des EPS rhizobiens sont le glucose, galactose, mannose, rhamnose, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique. Ces résidus peuvent être substitué par le pyruvate, l'acétate, le succinate et l'hydroxybuturate (Spaink, 2000 ; Lepek et D'Antuono, 2005).

Les hétéropolysaccharides peuvent être ramifiés ou linéaires. Il existe donc une très grande variété de structures possibles. Cette classe de polymères représente une source de molécules dont les propriétés physico-chimiques sont très diverses (Roger, 2002).

L'une des caractéristiques majeures des bactéries du genre *Rhizobium* est la production des quantités importantes des EPS hétéropolysaccharidique. Ces derniers montrent des variations de structure chimique (Wilbert et *al.*, 1998).

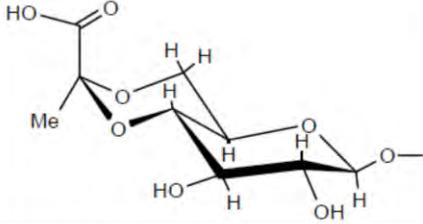
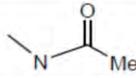
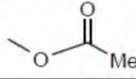
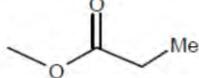
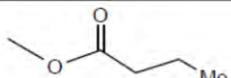
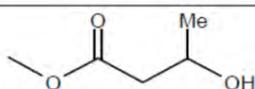
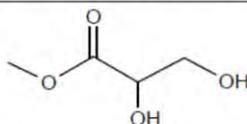
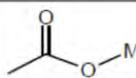
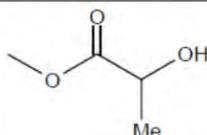
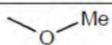
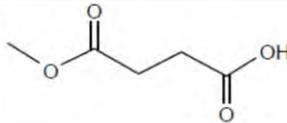
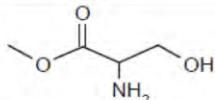
5.2. Les substituants

5.2.1. Les substituants organiques

Les EPS microbiens peuvent contenir divers substituants liés par des liaisons éther, ester, amide ou acétate (Tableau I) au squelette glycosidique. Ces substituants sont très fréquemment rencontrés dans les unités répétitives des EPS bactériens alors qu'ils sont beaucoup plus rares dans les polysaccharides d'eucaryotes. Ces groupements sont en grande partie responsables des propriétés physico-chimiques des polymères qui les portent (Roger, 2002).

La présence de tels substituants peut améliorer la capacité symbiotique des EPS pour l'établissement d'une fixation d'azote atmosphérique chez les légumineuses qui développent des nodules de type indéterminé (Fraysse et *al.*, 2003).

Tableau I. Principaux substituants organiques des EPS bactériens (Roger, 2002)

	Substituant	structure	liaison	Bactérie productrice
Acides organiques	Pyruvyl		acétal	Très commun
	N-Acétyl		amide	<i>Vibrio diabolicus</i>
	O-Acétyl		ester	Très commun
	Succinyl		ester	<i>Rhizobium spp.</i>
	Propionyl		ester	<i>Escherichia coli</i>
	Hydroxybutanoyl		ester	<i>Rhizobium trifolii</i>
	Glycéryl		ester	<i>Pseudomonas elodea</i>
	Métyl		ester	
	O-Lactyl		ester	
	O-Métyl		éther	
Acides aminés	Acide Glutamyl		ester	<i>Klebsiella aerogenes K82</i>
	Séryl		ester	<i>Escherichia coli</i>

5.2.2. Les substituants inorganiques

Les phosphates sont beaucoup plus répandus et représentent un constituant fréquemment rencontré dans les EPS bactériens (tableau II). Beaucoup d'EPS phosphorylés ressemblent à l'acide téichoïque présent dans la paroi des bactéries à Gram positif. En réalité, beaucoup de souches produisent à la fois des polymères phosphorylés constitutifs des membranes et des EPS phosphorylés.

Tableau II. Substituants inorganiques des EPS bactériens (Roger, 2002)

Acides inorganiques	Phosphates		ester	<i>commun</i>
	Phosphates		diester	<i>Lactococcus lactis</i>
	Sulfates		ester	<i>Cyanobactéries, Alteromonas infernus</i>

6. Biosynthèse des EPS bactériens spécifique au genre *Rhizobium*

La biosynthèse des EPS chez les rhizobia est un processus très complexe régulé à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel et influencé par la variable des conditions environnementales et nutritionnelles. La biosynthèse des EPS est un processus multi-étapes nécessitant l'activité de plusieurs enzymes (Janczarek et Skorupska, 2011).

Les gènes codant pour la biosynthèse des ESP (*exo/exs* ou *pss*) forment de larges groupes distribués entre le génome et les mégaplasmides. 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 des résidus non saccharidiques et enfin la classe des enzymes de la polymérisation des unités répétitives entre elles et l'export des EPS. Tout ces complexes protéiques sont localisés à la fois sur les membranes interne et externe (Skorupska et al., 2006).

Skorupska et ses collaborateurs (2006) ont détaillé la biosynthèse des EPS de type I « le succinoglycane » chez l'espèce *S. meliloti*. Les auteurs ont rapporté que la synthèse débute par la formation d'un nucléotide de sucre, le gène *exoC* code pour une phosphoglucomutase qui transforme le glucose- 6-phosphate en glucose-1-phosphate qui est le précurseur de l'UDP glucose. Une UDP-glucose-4-épimérase est nécessaire pour convertir UDP-glucose en UDP-galactose, cette enzyme est le produit du gène *exoB*. Les mutants *exoB* ou *exoC* non seulement ne produisent pas d'EPS, mais sont incapables aussi de produire d'autres polysaccharides tels que les LPS ou les glycanes cycliques.

L'assemblage de l'unité répétitive des EPS est initié par ExoY qui est une galactosyltransférase. Les mutants *exoY* ne produisent plus le succinoglycane et ils sont symbiotiquement inefficaces à initier la formation du cordon d'infection. *exoF* est le gène codant pour la protéine qui assure la construction d'une liaison entre le galactose et l'undecaprenyl diphosphate.

ExoA, ExoL, ExoM, ExoO, ExoU et ExoW sont les glycosyltransférases qui vont ajouter séquentiellement les sucres de l'unité répétitive tandis que les protéines ExoZ, ExoH, et ExoV vont introduire les motifs non-saccharidiques (Fig. 10). Les protéines ExoP, ExoQ, ExoT et ExsA sont responsables de la polymérisation et de l'acheminement vers le milieu externe des EPS entiers.

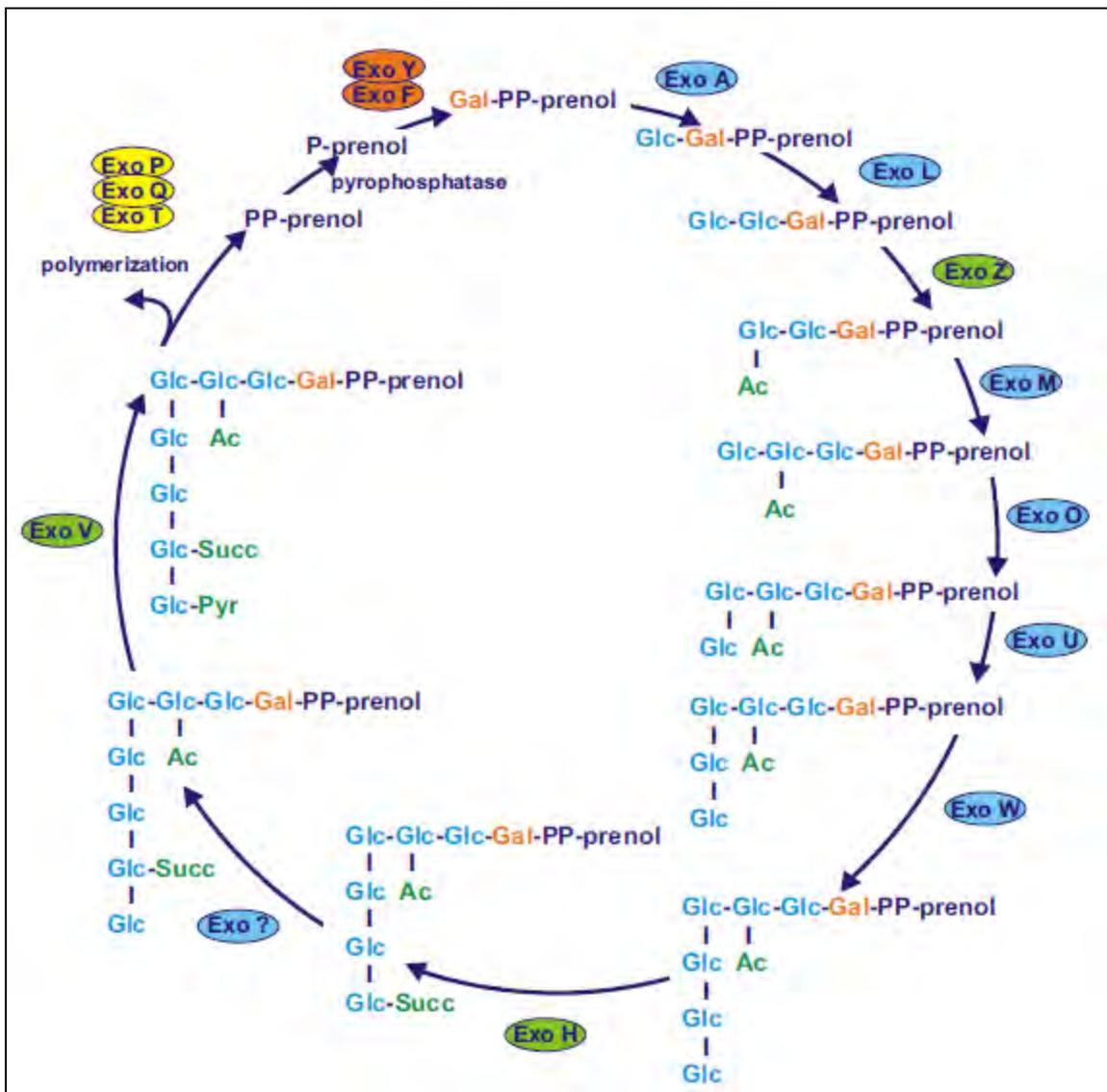


Figure 10. Schéma représentant la biosynthèse de l'unité répétitive des EPS I de *S. meliloti*. En orange et en bleu sont indiquées les protéines impliquées dans le transfert du précurseur (galactose) sur le transporteur lipidique (undecaprenol-diphosphate : PP-prenol), en vert sont indiquées les protéines impliquées dans les modifications non-saccharidiques, en jaunes les protéines permettant la polymérisation et l'export des EPS. Abréviations utilisées : Glc, glucose; Gal, galactose; Ac, acetate; Pyr, pyruvate; Succ, succinate (Skorupska et al., 2006).

Le second polysaccharide produit par l'espèce *S. meliloti*, dirigé par le produit des gènes *exp* est le galactoglucane « EPS II ». Le groupe de gènes *exp* a une taille de 23kb, localisé sur le mégaplasmide pSym B et séparé des groupes de gènes *exo/exs* par 200 kb environ (Skorupska et al., 2006).

La biosynthèse des précurseurs nucléotidiques, les diphosphosucres est sous la dépendance de l'activité des protéines suivantes : ExpA7, ExpA8, ExpA9 et ExpA10 qui sont impliquées dans la formation de dTDP-rhamnose. Le TDP-glucose est la forme intermédiaire qui sert de donneur du glucose dans la synthèse des EPS II (contrairement à la synthèse des

EPS I où l'UDP-glucose est le donneur du glucose). Il existe un autre groupe de gènes nécessaire pour l'exportation des EPSII et la régulation de l'expression des gènes *exp* (Skorupska et al., 2006).

6.1. Gènes de synthèse des EPS chez les différentes espèces de *Rhizobium*

Plusieurs articles portant sur l'expression des gènes de la biosynthèse des EPS ont été réalisés au cours des ces dernières années, nous citons quelques uns : Spaink, 2000, Skorupska et al., 2006, Glenn et al., 2007, Kutkowska et al., 2007, Janczarek et al., 2010, Janczarek, 2011. A partir de ces articles nous avons réalisé la synthèse des principaux gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS par les différentes espèces de *Rhizobium*.

- **Gènes *exoC*** : chez *S. meliloti*, ce gène code pour une phosphoglucomutase qui transforme le glucose- 6-phosphate en glucose-1-phosphate.
- **Gène *exoB*** : chez la même espèce code pour une UDP-glucose-épimérase qui convertit l'UDP-glucose en UDP galactose. Une mutation au niveau des gènes *exoC* et *exoB* cause non seulement un manque dans la production d'EPS I mais affecte aussi la synthèse des autres polysaccharides comme les EPS II, LPS et β -glucane. Chez l'espèce *Rhizobium leguminosarum*, le gène *exoB* code pour une protéine qui montre 80% d'identité avec l'UDP-glucose 4-épimérase de l'espèce *S. meliloti*. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de l'UDP-galactose qui est le donneur du résidu galactose pour les différents hétéropolysaccharides des rhizobia.
- **Gène *exoN*** : donne une protéine d'activité UDP-glucose pyrophosphorylase. Une mutation au niveau de ce gène provoque une diminution dans la synthèse des EPS I.
- **Gène *exoY*** : code une galactosyltransférase, enzyme nécessaire pour initier l'assemblage de l'unité répétitive
- **Gènes *exoA*, *exoL*, *exoM*, *exoO*, *exoU*, *exoW*** : codent pour des protéines qui forment un complexe glucosyltransférase impliqué dans l'addition subséquente du résidu glucose. Une mutation au niveau de ces gènes conduit à une répression complète de la production du succinoglycane.
- **Gène *exoH*** : chez *S. meliloti*, ce gène code pour une protéine transmembranaire qui a une activité succinyltransférase. Les mutants *exoH* produisent des fractions d'EPS I de haut poids moléculaire symbiotiquement non fonctionnelle, car elles ne portent pas des groupements succinyl.

- **Gène *exoZ*** : il code pour une transférase impliqué dans l'addition du résidu acétyl. Les mutants *exoZ* qui produisent des succinoglycane sans groupement acétyl, forment des nodules capables de fixer l'azote, mais ils montrent une efficacité réduite dans l'initiation et l'élongation du cordon d'infection.
- **Gène *exoV*** : les mutants *exoV* sont déficients dans la synthèse des EPS I, ils accumulent des unités sans pyruvyl. Ceci indique que ces additions sont cruciales pour la polymérisation et la sécrétion du succinoglycane.
- **Gènes *exoPQT*** : la polymérisation de l'unité répétitive du succinoglycane et la sécrétion du polymère dépendent du produit des gènes *exoPQT*. ExoP est une protéine d'autophosphorylation à activité tyrosine kinase, elle a un rôle crucial dans la biosynthèse des EPS. Elle catalyse la formation d'un dimère de l'unité octa-saccharidique des EPS I et a un rôle structural dans la formation du complexe avec la protéine ExoQ et ExoT qui sont nécessaires pour la sécrétion du succinoglycane. La protéine ExoQ est indispensable pour la formation des EPS de haut poids moléculaire tandis que la protéine ExoT est nécessaire pour la production des EPS de faible poids moléculaire.
- **Gène *exsA*** : il code pour une protéine ExoA, nécessaire pour le transport des EPS de haut poids moléculaire.
- **Gène *pssA*** : ce gène est trouvé chez l'espèce *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *viciae* et *R. etli*, code pour une enzyme le glycosyl-IP-transférase, nécessaire pour transférer l'UDP-glucose à un support lipidique attaché à la membrane plasmidique. Une mutation au niveau de ce gène conduit à un phénotype non-mucoïde des colonies et la formation des nodules non fixateurs d'azote chez le pois, la vesce et le trèfle.
- **Gènes *pssD* et *pssE*** : codent pour une β -1,4-glycosyl transférase qui catalyse l'addition du résidu de l'acide glucuronique. Les deux gènes ont été identifiés chez les deux biovars de *Rhizobium leguminosarum*. Les mutants *pssD* montrent un aspect non mucoides des colonies et forment des nodules inefficaces.
- **Gène *pssC*** : l'addition du deuxième résidu de l'acide glucuronique à la structure des EPS de *R. leguminosarum* nécessite l'activité d'un glucuronosyl- β -1,4-glycosyltransférase, codé par le gène *pssC*. Les mutants *pssC* synthétisent des faibles quantités d'ESP forment des nodules inefficaces sur les racines de la plante trèfle et la vesce.

- **Gènes *pssF*, *G*, *H*, *I*, *J*, *S* et *pssR* et *M*** : ces gènes sont mal connus. Toutefois, les gènes *pssF*, *G*, *H*, *I*, *J*, *S* codent probablement pour des glycosyltransférases. *pssR* et *M* codent pour des enzymes de modification et l'addition des résidus non saccharidiques.
- **Gènes *pssT*, *pssN*, *pssP*** : codent pour des protéines qui forment un système de sécrétion impliqué dans l'assemblage et l'exportation des EPS dans l'espèce *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1.

6.2. La régulation de la synthèse des exopolysaccharides

6.2.1. Facteurs influençant la production des EPS

La production des EPS est une fonction de la souche étudiée, elle 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). Des modifications dans la structure et la quantité des EPS ont été décrites souvent comme réponse aux différentes conditions de vie environnementales et physiologiques (Lloret et al., 1998).

- **La source de carbone**

La source de carbone a une influence majeure sur la biosynthèse des EPS par les bactéries. En plus du type de sucres (glucose, galactose...) et du rapport entre eux, la concentration des sucres peut avoir un effet stimulant sur la production des EPS. (Cerning et al., 1994, 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 Basu, 1999).

- **La source d'azote**

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

Sous des conditions de carence en azote, deux protéines SyrM et NtrC agissent comme des régulateurs positifs de la production des EPS I chez *S. meliloti*. La production de SyrM augmente l'expression de certains gènes *exo* impliqués dans la synthèse de ce polymère par une stimulation positive du gène *syrA* (Janczarek et Skorupska, 2011).

- **La concentration du phosphate**

La biosynthèse des EPS I est stimulée par un stress hyper-osmotique, à des concentrations très élevées en phosphate (>150mM). Par contre la carence en phosphate stimule la production des EPS II, ce qui indique que la concentration en phosphate est un signal qui affecte le type d'EPS produit par *S. meliloti*. Les faibles concentrations en phosphate stimulent l'expression des gènes *exp* impliqués dans la synthèse des EPS II par une action phosphate- dépendante sur les protéines régulatrices WggR et PHO (Janczarek et Skorupska, 2011).

- **Les sels minéraux et les cofacteurs**

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

Fischer et ses collaborateurs (2003) ont rapporté qu'en présence d'un stress salin (300 mM du NaCl) une modification dans la structure des polysaccharides bactériens se produisait, conduisant à une altération dans la phase d'attachement des bactéries lors de la formation des nodules.

6.2.2. Les gènes de régulation de la synthèse du succinoglycane (selon Skorupska et al., 2006) (Fig.11)

La synthèse des EPS est soumise à une régulation très fine en fonction des conditions environnementales et climatiques. Cette régulation est sous le contrôle de nombreux gènes (uniques ou formant des complexes) qui agissent à différents niveaux de cette biosynthèse. Certains de ces gènes sont chromosomiques d'autres sont portés par le mégaplasmide, ainsi :

- **Gènes *exoR* et *exoS*** : tout les deux sont des gènes de régulation chromosomique qui régulent négativement la synthèse du succinoglycane. ExoS est une histidine kinase, agit conjointement avec un autre régulateur de réponse ChvI.

La synthèse des EPSI est fortement favorisée lors d'une carence en ammoniac via le système régulateur codé par les gènes *exoR* et *exoS*. La protéine ExoR semble impliquée directement dans la réponse à l'azote, puisque l'EPS I synthétisé par les mutant *exoR* ne dépend pas de la présence de l'ammoniac dans le milieu.

- **Gènes *exsB*** : ce gène régule négativement la biosynthèse des EPSI, il est localisé sur le mégaplasmide pSymB dans la région *exo* de 24kb. Les mutants *exsB* produisent des quantités d'EPS I trois fois plus grande que leurs souches sauvages. Un nombre de copie important du gène *exsB* conduit à une diminution de 20% du taux d'EPS produit par rapport

au type sauvage. Ceci n'est pas dû à la régulation transcriptionnel des gènes *exo* par la protéine ExoB, puisque il n'y a aucune influence de la mutation *exoB* sur l'expression des gènes *exo-lacZ* et *exs-lacZ*.

- **Gène *exoX*** : ce gène est localisé sur le pSymb et régule négativement la biosynthèse des EPSI. ExoX est une petite protéine attachée à la membrane interne des bactéries. Cette protéine caractérise les espèces suivantes : *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium* sp. NGR234 et *R. meliloti*. Lors d'une mutation *exoX* une augmentation d'un facteur de trois est observée dans la production des EPSI. Lorsque le nombre de copie du gène *exoX* est plus important que le nombre de copies du gène *exoY*, une inhibition de la synthèse des EPSI est observée.

- **Gène *syrM*** : chez *S. meliloti* ce gène code pour une protéine régulatrice qui régule à la fois la synthèse des facteurs Nod et la production des EPSI. Cette protéine est impliquée dans la régulation du rapport relatif entre la quantité des EPS I de haut poids et de faible poids produite. La production de SyrM est négativement régulée par la protéine SyrB et positivement régulée par Nod3, cette dernière est sous la régulation des flavonoïdes et la carence en azote. Ce qui suggère la possibilité de l'existence d'une co-régulation entre la production des facteurs Nod et la production des EPS.

6.2.3. Les gènes de régulation de la synthèse du galactoglycane (selon Skorupska et al., 2006) (Fig.11)

Dans les conditions de croissance standard, les cellules de l'espèce *S. meliloti* 2011 produisent des quantités importantes des EPSI et généralement il n'y a pas une production d'EPSII. Sous des conditions de carence en phosphate, les souches sauvages produisent un exopolysaccharide, EPSII. La production des EPSII est observé aussi lors des mutations sur les gènes *exsR* ou *mucR*.

- **Gènes *expR* et *mucR*** : les deux gènes régulent négativement la biosynthèse du galactoglucane. Les mutants *expR* synthétisent des EPS II sous forme de haut et bas poids moléculaire symbiotiquement actif, alors que les mutants *mucR* et les souches sauvages en manque de phosphate produisent seulement des EPSII de haut poids moléculaire symbiotiquement moins actif. La synthèse des EPSII symbiotiquement actif est régulée par le système Sin du quorum-sensing en présence de la protéine ExpR.

La protéine MucR est le régulateur clé relative dans la production des EPSI et EPSII chez *S. meliloti*. Cette protéine est très similaire à la protéine Ros produit par l'espèce *R. leguminosarum* spp et *R. etli* et qui assure une régulation négative et positive de la biosynthèse des EPS, probablement par une liaison directe sur une séquence d'ADN conservée appelé Ros box.

- **Gène *expG*** : ce gène est localisé sur le plasmide pSymB et régule positivement la synthèse des EPSII. ExpG et MucR sont les seules protéines qui assurent une régulation positive des EPSII chez *S. meliloti*. ExpG appartient à la famille des protéines MarCR qui sont des activateurs transcriptionnels qui se fixent sur la double hélice via un motif de la région promotrice des gènes *exp* qui code la synthèse du galactoglucane. Des copies supplémentaires du gène *expG* et sous des conditions de carence en phosphate, stimulent une transcription très importante de tous les gènes *exp*.

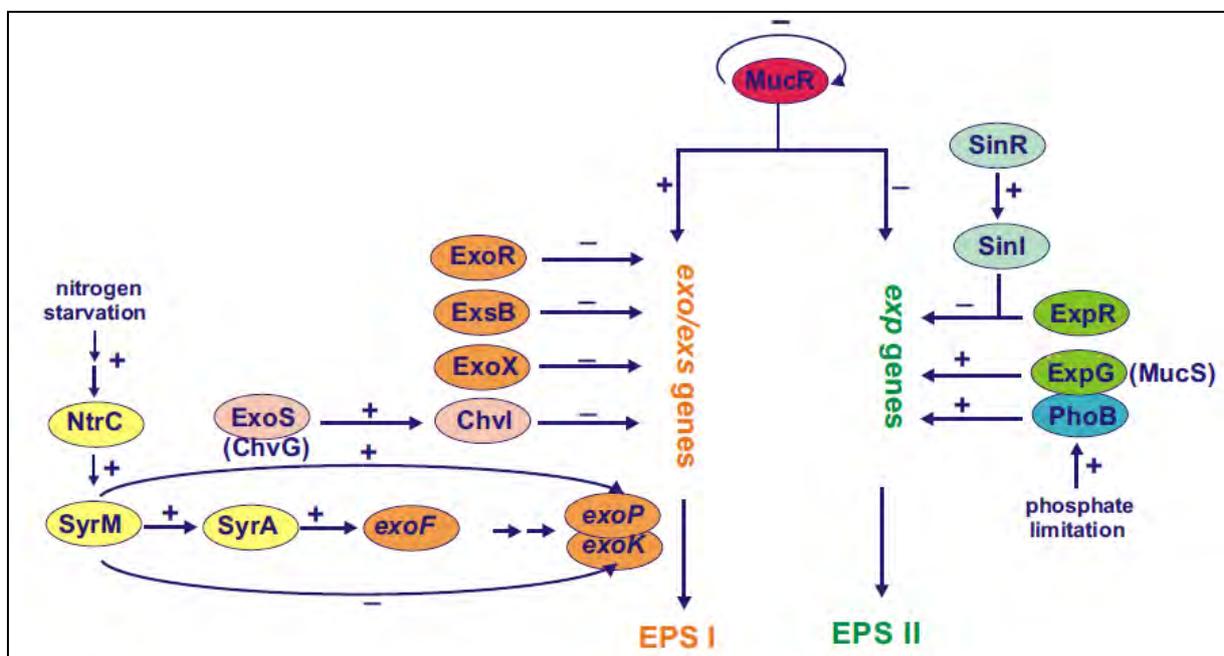


Figure 11. Modèle de la régulation du succinoglycane (EPSI) et le galactoglucane (EPSII) chez l'espèce *S. meliloti* (Skorupska et al., 2006).

Matériel
et
Méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Ecologie microbienne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mentouri, Constantine (Algérie) et le laboratoire des Interactions Moléculaires de Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP) de l'Université Paul Sabatier III, Toulouse (France).

1. Origine des souches utilisées

Les souches utilisées sont isolées à partir des nodosités racinaires de la Légumineuse fourragère *Hedysarum coronarium* L, conservées au laboratoire d'écologie microbienne. L'ensemble des souches étudiées et leur origine sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau III. Liste et références des souches utilisées (Struffi et *al.*, 1998)

Souches	Origine Géographique	Source
<i>R. sullae</i> IS123	Cadix, Espagne	Ollero- Seville
<i>R. sullae</i> RHF	Pise, Italie	Casella- Pise
<i>R. sullae</i> RH19	Sicile, Italie	Casella- Pise
<i>R. sullae</i> A6	Constantine, Algérie	Benguedouar-U.M.Cne
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 1003		Rothamstead Collection
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 843		Rolfé, Camberra
Isolat S1	Constantine, Algérie	Benahmed (2010)
Isolat S2	Constantine, Algérie	Benahmed (2010)
Isolat S3	Constantine, Algérie	Benahmed (2010)
Isolat S4	Constantine, Algérie	Benahmed (2010)
Isolat S5	Constantine, Algérie	Benahmed (2010)

L'ensemble de nos souches ont été utilisé dans le cadre du mémoire de magister (Gharzouli, 2006). Les isolats S1 à S5 ont été également isolés et étudiées dans un travail de Magister de Benahmed (2010).

2. Purification et conservation des souches

La purification de toutes les souches est vérifiée sur milieu YMA au rouge Congo (YMA-RC) et le milieu GPA au pourpre de bromocresol (GPA-BCP) (Annexe 1) (Vincent, 1970). La description des souches est effectuée selon les critères de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) : forme, aspect et couleur des colonies sur les deux milieux. Les bactéries sont soumises à une observation microscopique après coloration de Gram.

Les souches sont stockées sur le milieu YMA additionné de 3g/l du CaCO₃, utilisé comme agent neutralisant l'acidité de milieu de culture (Beck et *al.*, 1993), après autoclavage, le milieu est réparti en tubes à vis inclinés. Après repiquage sous forme de stries régulières et après incubation à 28°C pendant 48 heures, les tubes sont conservés à 4°C.

3. Détection des exopolysaccharides (EPS)

Il existe plusieurs manières de détecter la présence de polysaccharides. Les polysaccharides peuvent être détectés qualitativement par un examen visuel ou par coloration et/ou quantitativement par dosage colorimétrique (Dupont, 1998).

3.1. Examen visuel

Il repose sur l'examen des colonies en milieu gélosé (YMA) (Vincent, 1970). La colonie d'une souche productrice aura une apparence brillante, lorsqu'elles sont prélevés avec une anse de platine, il se forme un long filament visqueux (Dupont, 1998).

3.2. La coloration au rouge de Ruthénium

Le rouge de ruthénium est un colorant cationique qui donne une coloration rose foncé au milieu de culture. Les colonies productrices apparaissent blanches sur un fond rose par le masquage de la couleur dû aux EPS produits. Les colonies non productrices apparaissent rosâtres (Gancel et *al.*, 1988).

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 30°C pendant 24heures.

3.3. Coloration au Calcofluor

Le Calcofluor est un colorant de la cellulose et des structures capsulaires. Il est fluorescent sous la lumière ultraviolette (UV). Les colonies non productrices d'EPS ne sont pas fluorescentes (Clare et King, 2001).

Pour détecter la production des EPS, les souches bactériennes sont cultivées sur des boîtes contenant le milieu YMA additionné de 0.02% de Calcofluor et incubées à 30°C pendant 24heures.

4. Influence de la source de carbone sur la croissance des bactéries et la production des EPS

4.1. Etude de la croissance bactérienne

Les souches sont cultivées sur milieu YMB et YMA (Vincent, 1970) où le Mannitol est remplacé par l'un des mono ou di-saccharides suivants : D-Arabinose, D-Fructose, D Galactose, D-Saccharose, D-Glucose, D-Xylose, Lactose, Maltose, Sorbitol. Les tubes inoculés sont incubés dans le bain-marie agitateur à 28°C pendant 24 heures. Le taux de croissance est estimé en mesurant la densité optique à une longueur d'onde 600 nm sur spectrophotomètre (Shimadzu – spectrophotometer UV/120-02). Le degré de croissance et de viscosité des colonies est évalué sur le milieu solide YMA modifié.

4. 2. Effet de la source de carbone sur la production des EPS

La production des EPS est déterminée sur milieu solide YMA dans lequel le Mannitol est remplacé par une gamme de sucre (D-Arabinose, D-Fructose, D Galactose, D-Saccharose, D-Glucose, D-Xylose, Lactose, Maltose, Sorbitol) (la quantité de chaque sucre est de 10g/ 1l de milieu de culture). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 2 jours à 5 jours.

Les colonies muqueuses sont prélevées et mises dans des tubes de centrifugation stériles. La quantité de cellules bactériennes raclées est pesée et mise en suspension dans une solution de KCl stérile 0,85% (Kaci et *al.*, 2005). Les cellules bactériennes sont séparées de leurs EPS par centrifugation (Biofuge 22R Heraeus) à 12800 tours/mn pendant 30min à 4°C. Après filtration du surnageant à travers des filtres de 0,45µm de diamètre, les EPS à haute masse molaire (HMM) sont précipités par addition de 3 volumes d'éthanol froid à 95% puis sont récupérés après une centrifugation à 3000tours/min pendant 15 min à 4°C. Au surnagent récupéré on ajoute encore 7 volumes d'éthanol à 95% froid afin de récupérer les EPS à faible masse molaire (FMM) ; ces derniers sont obtenus sous forme d'un culot blanc après une centrifugation à 3000 tours/min pendant 15 min à 4°C.

Les EPS de haute masse et de faible masse molaire sont lyophilisées, pesés et conservés à 4°C.

Le rendement de la quantité d'EPS produite par les souches bactériennes est déterminé par le calcul d'un rapport du poids d'EPS obtenu / poids des cellules raclées.

5. Dosage des exopolysaccharides

5.1. Dosage des sucres neutres par la méthode à l'Anthrone

Principe

La teneur en polysaccharides est déterminée par réaction sur l'anthrone (Dreywood, 1946). C'est une méthode colorimétrique basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide (H_2SO_4 pur) et à chaud, ce qui permet de mesurer les sucres totaux réducteurs. Ainsi 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_2O : 28ml, H_2SO_4 (95%): 72ml, Anthrone: 0.05g, Thiourée : 1g

Refroidir et stocker le mélange à 4°C pour une période n'excédant pas deux semaines.

Mode opératoire

0,9 ml d'échantillon (EPS bactérien) à une concentration finale de 25µg/200µl d'eau est mis en contact avec 4.5 ml de réactif d'Anthrone en tube. Le mélange est agité et chauffé au bain-marie à 100°C pendant 15 mn. Les tubes sont ensuite refroidis dans un bain eau-glace et l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 620nm.

L'estimation de la teneur en sucres neutres constituant les EPS, est obtenue par une courbe d'étalonnage en utilisant du D-glucose et D- galactose à des concentrations comprises entre 0 et 50µg/200µl.

5.2. Dosage colorimétrique des sucres acides (Blumenkrantz et *al.*, 1973)

Principe

Les acides uroniques réagissent avec le *méta*-hydroxydiphenyl ; le produit développe une coloration rose dont l'absorbance est lue à 520 nm. La coloration est améliorée en présence de borate de sodium. L'hydrolyse des polymères est effectuée par un traitement à chaud par l'acide sulfurique (98%).

Dosage – courbe d'étalonnage

- 1- Prendre 200µl d'acide glucuronique ou d'acide galacturonique à des concentrations comprises entre 0 et 50µg/200µl.
- 2- Ajouter 1,2 ml d'acide sulfurique concentré contenant 0,0125M du tétraborate de Na.
- 3- Chauffer au bain sec à 80°C pendant 20 min.

- 4- Refroidir dans l'eau froide.
- 5- Ajouter 20µl de NaOH (0,5%) additionné 0,15% du *m*-Hydroxydiphényl (phényl-phénol). Mélanger
- 6- Mesurer l'absorbance à 520 nm.

Les courbes d'étalonnage sont établies à partir des valeurs de DO enregistrées.

Le dosage des EPS extraits est réalisé selon le même protocole et la quantité des sucres acides dans les 200µl d'EPS dosés est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage établie.

6. Viscosité relative des EPS

Les solutions d'EPS de FMM et HMM sont préparées à une concentration finale de 0,1g/l et incubées à 25°C sous une faible agitation (20rpm) (Kaci et *al.*, 2005). Les solutions sont analysées avec un viscosimètre (Scott GERÄTE AVS 310) à 25°C doté d'une colonne de type 5520/II (2mm de diamètre et 4cm de longueur), le temps d'écoulement est déterminé à l'aide des cellules de détection. La viscosité est calculée en appliquant l'équation suivante (Bertrand, 2008):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t\rho}{t_0\rho_0}$$

η_{rel} : la viscosité relative

η : la viscosité de la solution

η_0 : la viscosité du solvant (eau)

ρ : masse volumique de la solution d'EPS

ρ_0 : masse volumique de l'eau à 25°C

t : temps d'écoulement des EPS (seconde)

t_0 : temps d'écoulement de l'eau (seconde)

NB : Pour des solutions suffisamment diluées, la viscosité relative est donnée directement par: $\eta_{rel}=t/t_0$ où t = temps d'écoulement d'un volume donné de solution au travers d'un capillaire et t_0 = durée d'écoulement d'un même volume de solvant pur (Gorlier et Germain, 1998).

7. Vitesse de reprise de la croissance après dessiccation

Après une croissance sur un milieu gélosé YMA contenant les différents sucres (Mannitol, saccharose, glucose, sorbitol), une quantité de 0,1 g de colonies muqueuses est raclée et déposée sur la surface d'un filtre stérile puis les bactéries sont laissées à sécher aseptiquement sous la hotte à flux laminaire. Le temps nécessaire pour le séchage varie d'un

couple souche/sucre à l'autre. La partie du filtre contenant les bactéries sèches est ensemencée dans 150ml du bouillon YMB (ou un bouillon contenant l'un des sucres à la place du mannitol). La culture est incubée à 28°C et le taux de croissance des bactéries est estimé par la mesure de la densité optique à 600 nm à différent temps d'incubation ($t=0$ à $t=74$ heures).

La viabilité des souches après dessiccation est estimée après ensemencement sur YMB. Une dilution au dixième est préparée à partir de chaque flacon, un aliquote de 20 μ l de chaque suspension est étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu YMA (ou l'un des autres sucres). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 20h. Après incubation un dénombrement des colonies obtenues est effectué.

8. Identification structurale des EPS de l'espèce *R. sulae*

Cette partie a été réalisée au niveau du laboratoire des IMRCP à l'Université Paul Sabtier Toulouse, France, sous la direction du docteur Véréna Poinot. Du fait du coût des opérations, il été nécessaire de limiter le nombre d'échantillon des EPS à identifier. Pour cela deux espèces uniquement ont été choisi, il s'agit de l'espèce *R. sulae* A6 (isolée à partir d'un site de Constantine (Algérie) et l'espèce *R. sulae* RHF (isolée à partir d'un site de la Toscane, Italie), cultivées en présence des sucres suivants: le mannitol, saccharose, glucose et sorbitol.

Notre choix a porté sur ces deux souches en relation avec le site de la plante-hôte et des essais de production d'EPS (la production d'EPS par ces deux souches est plus importante que le reste des souches de la même espèce).

8.1. Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à un spectre de masse « GC/MS »

Dans le but de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse ; les monosaccharides libérés sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

Pour cela, huit standards monosaccharidiques sont utilisés : Glucose, Galactose, Mannose, Rhamnose, Xylose, Fucose, Acide Glucuronique et l'acide Galacturonique.

Mode opératoire :

1- Préparation des standards :

- Préparer des solutions mères de 2mg/ml pour chaque monosaccharide séparément.
- Prélever 50 μ l de chaque solution dans un pilulier propre.
- Sécher sous flux d'azote.

- Ajouter 200µl d'isopropanol et évaporer (2 fois).

Silylation

- Ajouter 20µl de pyridine.
- Ajouter 100µl de mélange de silylation TMCS-HMDS (trimethylchlorosilane et 1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane).
- Chauffer 70°C pendant 30 minutes.
- Evaporer à sec sous flux d'azote.
- Pour avoir une concentration finale de 0,1 mg/ml, ajouter 1ml d'hexane
- Injecter 0,1 µl directement dans la colonne.

NB : Avant la silylation, on procède à la méthylation des acides glucuronique et galacturonique par du diazométhane dans l'éther (300µl) avec séchage à sec sous flux d'azote.

2- Préparation des échantillons (selon Rojas-Escudero et al., 2004):

- A partir des solutions mères de 1mg/ml de chaque échantillon d'EPS, prélever 100µl dans un pilulier propre.
- Sécher à sec sous flux d'azote.
- Ajouter 200µl d'isopropanol et évaporer (2fois).
- Hydrolyse par l'acide Trifluoroacétique (TFA): les exopolysaccharides sont hydrolysés par l'ajout de 30µl du TFA (2M) et 170 µl de H₂O. Chauffer 2 heures à 110°C.
- Evaporer à sec sous jet d'azote (à 40°C).
- Ajouter 200µl d'isopropanol et évaporer (2 fois).

Dérivation par silylation

- Ajouter 300 µl de diazométhane dissout dans l'éther « pour méthyler les sucres acides ».
- Sécher à sec sous jet d'azote.
- Ajouter 20µl de la pyridine.
- Ajouter 100µl de mixture de silylation TMCS-HMDS
- Chauffer 70°C pendant 30 minutes.
- Evaporer à sec sous flux d'azote.
- Ajouter 100µl d'hexane pour avoir une concentration finale de 1 mg/ml.
- Injecter 0,1 µl directement dans la colonne.

3- L'analyse du GC/MS

L'analyse est réalisée sur un système de GC6890N couplé à un détecteur de masse quadripolaire (HP 5973 : 25m x 0,25mm x 0,25µm de film.).

L'injection est réalisée en mode colonne, le gaz vecteur est l'Hélium, à un débit maximum de 1 ml/min et une pression constante de 8,8 psi. Avec le programme de montée en température du four suivant : une température de 70°C est maintenue pendant 3min, puis montée en gradient linéaire de 5°C/min jusqu'à 140°C, puis de 3°C/min jusqu'à 240°C et finalement un gradient de 10°C/min jusqu'à une température de 300°C maintenue pendant 10 minutes. Le balayage de masse allant de 50 à 650 uma m/z. Le volume injecté est de 0,1µl.

8.2. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Dans le but de déterminer la masse molaire des EPS à FMM, une chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est réalisée. Une série de polyéthylène glycols (PEG) et de dextrans de différente masse molaire est utilisée afin d'estimer la masse molaire des EPS.

Les MM des PEG utilisés comme étalons sont les suivant (dans un ordre décroissant) : 960000, 634000, 529500, 276300, 219300, 124700, 78450, 43450, 29600, 20300, 8500, 1500, 1000 (unité de masse Daltons). Les masses moléculaires des dextrane sont : 40000, 20000 et 2000 (unité de masse Daltons).

Les étalons utilisés et les EPS sont solubilisés dans l'eau milli-Q à une concentration finale de 5mg/ml et sont filtrés sous vide à travers des filtres de 0,22µm.

Les EPS de faible masse molaire sont fractionnés sur colonne de type TSK Gel G2000 SW-XL (7, 8 mm de diamètre et 30 cm d'hauteur), cette colonne peut séparer des molécules de 5000 à 150000 daltons. La détection est réalisée par un détecteur par diffusion de la lumière évaporative (ELS : Waters 2420. ELD Detector). L'éluant utilisé est l'acétate d'ammonium (20mM) et le débit est fixé à 0,8ml/min. Le volume d'injection est de 20µL et le temps d'analyse est de 30 min. La détection est faite à une pression de 20psi et une température de 100°C.

8.3. Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide- Acide Désoxycholique « Desoxycholic acid - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (DOC-PAGE) »

Le DOC étant un dénaturant anionique, c'est par leur différence de taille que les polysaccharides vont se séparer sur un gel PAGE soumis à un courant électrique. Plusieurs solutions doivent être préparées qui serviront à fabriquer les gels mais aussi les tampons de chargement et de migration (Annexe1).

L'analyse DOC-PAGE est effectuée sur un gel de séparation préparé à 15% d'acrylamide : bis-acrylamide et un gel de concentration à 4% d'acrylamide : bis-acrylamide. La solution de 30% d'acrylamide : bis-acrylamide provenant de Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). Pour la migration, un générateur de Pharmacia Biotec (Freiburg, Allemagne) a été utilisé à 20mA, pendant 90 min. Des marqueurs de poids moléculaire fourni par Fermentas (Villebon-sur-Yvette, France) sont utilisés pour estimer la gamme de taille des EPS.

Les échantillons sont dissous dans le tampon de chargement à 0.1 mg/mL (Annexe 1) des polysaccharides purifiés. 5 μ L de ces solutions sont déposés dans les puits du gel. La migration est alors lancée (Annexe 1).

La coloration utilisée est une combinaison de bleu d'alcian et de nitrate d'argent : le gel est coloré durant la nuit avec 200 mL d'une solution à 0.005% de bleu d'alcian. Il est ensuite lavé avec 100 mL d'eau ultrapure à 30% éthanol durant 10 min puis 100 mL d'eau ultrapure pendant 5 min. Le gel est ensuite traité avec 200 mL d'une solution de périodate de sodium (0,03%) durant 5 min. Le gel est lavé avec 100 mL d'eau ultrapure durant 5min, le bain est changé, et un lavage de 5 min est réalisé. Le gel est alors coloré au nitrate d'argent grâce à un bain de 30 min dans 200 mL de la solution contenant le nitrate d'argent. La cuve est placée à l'obscurité. Deux bains de lavage successifs sont réalisés avec 100 mL d'eau ultrapure. Une révélation de la coloration est faite par le citrate de sodium et le formaldéhyde (bain dans 100 mL) jusqu'à apparition des bandes. La coloration est stoppée par ajout d'une solution de fixation 100 mL (mélange eau-éthanol-acide acétique) (Annexe 1).

8. 4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

8.4.1. EPS-HMM

Avant de procéder à une RMN pour les EPS de haute masse molaire (HMM) une digestion et une dialyse sont nécessaires.

Préparation des échantillons

Digestion par la protéinase K :

But : éliminer les protéines de l'extrait saccharidique.

A une solution d'ESP de 1 à 5mg dans 500 μ l d'eau milli-Q, ajouter 250 μ l du mélange de la solution A (6mg de MgSO₄ dans 1ml du Tris). Traiter la suspension avec 133 μ l de la protéinase K (PK) à 3,5g/l.

Chauffer à 36°C pendant 4 heures.

Dialyse suite à la digestion par la PK

But : retirer les acides aminés et petits peptides des EPS.

Reprendre les mélanges réactionnels dans 5ml d'eau. Les placer dans des tubes de dialyse préalablement préparés. Faire 3 bains de dialyse de 500ml d'eau milli-Q pendant 8 heures.

Après le 3ème bain, récupérer le mélange réactionnel dans des ballons et sécher les mélanges dans un évaporateur rotatif (Büchi Rata vapor R-200).

Après séchage, un volume de 50 à 100 μ l de chaque échantillon est mis dans un tube de RMN. Sécher encore à sec sous flux d'azote, puis les tubes sont placés dans un dessiccateur sous vide en présence de MgSO₄ (comme un agent desséchant) pendant 48 heures.

Après séchage total, ajouter 600 μ l d'eau « deutérée » (deutérium-oxide : D₂O) à 100% afin de solubiliser les EPS.

Passer les échantillons à la RMN proton ¹H : les spectres sont enregistrés sur un spectromètre (Brücker AMX500), Les enregistrements ont été réalisés à 298 K. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm. La recherche des substituants organiques (acétates, pyruvates et succinates) est déterminée par la valeur des déplacements chimiques des protons aliphatiques (CH₃ et CH₂) présents entre 1.3 et 2.8 ppm, à une fréquence de 500,13MHz.

8.4.2. EPS_FMM

Les EPS lyophilisés sont dissout dans le D₂O (100%) sur 2 heures à une température de 40°C. Après solubilisation les solutions d'EPS sont centrifugés pendant 10 minutes, les surnagent sont récupérés et filtrés à travers un filtre de 0,20 μ m dans des tube à RMN propres et sec. Les tubes sont placés dans le congélateur et après 24heures le contenu des tubes est lyophilisé. Après une première lyophilisation, les EPS sont remis en suspension dans le D₂O, congelés et re-lyophilisés. Enfin les tubes sont placés dans le dessiccateur pendant 2 jours.

Deux échantillons sont utilisés, les EPS extraits à partir de la souche *R. sultae* A6 cultivée en présence du saccharose et les EPS extraits à partir de la souche *R. sultae* RHF cultivée en présence du mannitol.

Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre (Brücker AMX500) (Wissenbourg, France) équipé d'une sonde 5mm CPTCI 1H-31P/13C Z-GRDZ449. Les enregistrements ont été réalisés à 303 K. La fréquence du carbone est de 125,75 MHz (^{13}C) et celle du proton est de 500,13 MHz (^1H). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et le nombre de balayages accumulés est de 512.

Les analyses à haut champ en mode homonucléaire COSY (Correlation Observed Spectroscopy) permettent d'attribuer les déplacements chimiques des protons de chaque résidu. L'attribution des déplacements chimiques des carbones est réalisée grâce aux spectres obtenus à haut champ en mode hétéronucléaire HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), 32 scans ont été accumulés. L'analyse en mode hétéronucléaire HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permet de déterminer l'enchaînement des résidus de l'unité répétitive.

8.5. La spectrométrie de masse (ESI-ToF MS)

L'analyse en mode électrospray consiste à appliquer une différence de potentiel entre l'extrémité d'un capillaire traversé par l'échantillon et une électrode afin de créer un fort champ électrique. Celui-ci provoque la formation de microgouttelettes hautement chargées à la sortie du capillaire. Les spectres de masse dans le cas des oligosaccharides ont été réalisés en mode négatif.

Les EPS de faibles masses molaires utilisées proviennent de la souche *R. sultae* RHF cultivée en présence du mannitol. Les fractions des EPS ont été analysées dans le mode négatif sur un système QqTOF (Ultima, Waters) : canne 3kV, cône 50V, une lentille de Rf 25V et une collision 25V. Les échantillons sont dissous à une concentration de 2mg/ml dans un mélange eau-méthanol : 1 :1 avec l'ammoniac à 0,1%. L'injection est réalisée avec un débit de 7 $\mu\text{l}/\text{min}$.

9. Influence de la source de carbone sur la nodulation

Ce test consiste à mettre le macrosymbiote et le microsymbiote en contact direct dans un système appelé jarre de Léonard (Fig. 12) et sous des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent, 1970). Plusieurs préparations sont nécessaires afin de réaliser ce test :

- 7- **Préparation des jarres** : Les jarres ont été réalisées avec des modifications pour les adapter à nos conditions. Après stérilisation (par l'éthanol et exposition aux UV), la jarre est montée selon le modèle proposé par Vincent (1970) « jarre de Léonard ». La partie supérieure de la jarre est remplie par le mélange vermiculite-sable (2/3) stérile et la partie inférieure contient la solution de Fahraeus (1957) stérile afin d'irriguer la plante (Annexe1). Les 2 parties sont reliées par un cordon de compresse stérile.

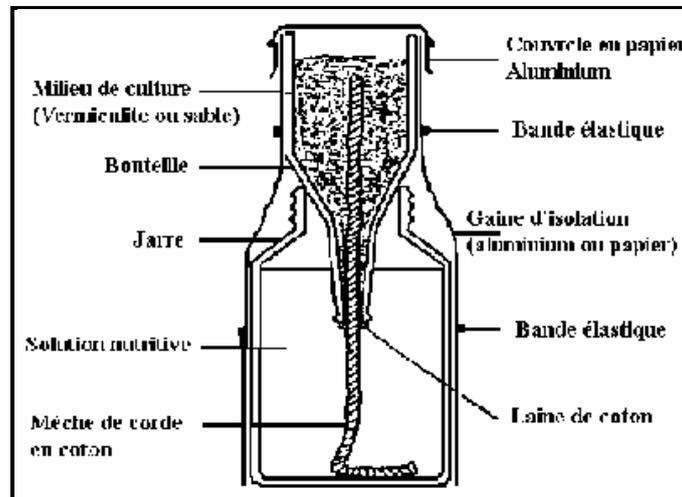


Figure 12. Assemblage de la Jarre de Léonard (Vincent, 1970).

- 8- **Stérilisation des graines** : les graines sont stérilisées selon le protocole proposé par Vincent (1970) et Beck et *al* (1993), puis mises à germer sur milieu TYA (Beringer, 1974) (Annexe1). Les boîtes sont enveloppées dans du papier aluminium et incubées à température ambiante pendant 4 à 5 jours.
- 9- **Inoculation des jarres** : les graines ayant donné des radicelles de 2 à 3cm sont replantées dans les jarres, et inoculées immédiatement par une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO \sim 1$). Les jarres sont couvertes du papier aluminium pendant les premières 24h d'inoculation, placées ensuite dans une chambre de culture à température ambiante pendant 2 à 3 mois.

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~1) à partir d'une culture sur YMB à 28 °C, dont le mannitol est remplacé successivement par l'un des mono-disaccharides suivants : D- Galactose, D-Saccharose, D-Glucose, Maltose, Lactose, Sorbitol, pour les isolats, et pour les souches *R. sultae* A6 et RHF, 4 sucres : le mannitol, le saccharose, le glucose et sorbitol sont testés.

10. Restauration de la capacité de nodulation en présence d'EPS : propriété et rôle du plasmide

Afin d'étudier les propriétés symbiotique du plasmide porté par les souches de l'espèce *R. sultae*, nous avons procédé à une extraction de ce plasmide et d'essayer de l'incorporer à l'intérieur des souches mutantes déficientes dans la production des EPS de la même espèce.

10.1. Etude des propriétés du plasmide par le processus de la transformation bactérienne

Extraction de l'ADN plasmidique (Birnboim, 1993)

- Ensemencer les souches de *Rhizobium sultae* A6 et RHF dans un tube contenant 2ml du milieu TY. Incuber les tubes à 28°C de 24h à 28h sous forte agitation.
- Centrifuger un volume de 1,5 ml de chaque culture pendant 2min à 9000 rpm à température ambiante.
- Mettre le culot récupéré dans la glace.
- Mettre en suspension du culot dans 100µl de tampon (5mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris, pH=8). Agiter sous vortex.
- Ajouter 200µl de la solution 0,2N NaOH, 1% SDS fraîchement préparée.
- Mélanger délicatement en renversant doucement le tube, 2 à 3 fois.
- Laisser les tubes 3min avant d'ajouter 150µl de la solution 3M acétate de sodium, pH 4,8.
- Mélanger délicatement en inversant doucement le tube 2 à 3 fois (un précipité blanc d'ADN/ protéine/ SDS doit être formé).
- Placer les tubes sur la glace pendant 20 min.
- Centrifuger 10min à 9000 rpm à température ambiante.
- Transférer délicatement le surnagent (400µl) dans un tube propre.

- Ajouter 1ml d'éthanol 95%, agiter.
- Centrifuger 10min à 9000 rpm à température ambiante.
- Eliminer le surnagent rapidement en retournant le tube (un culot est généralement visible à cette étape).
- Laver le culot avec 500µl d'éthanol 70%.
- Centrifuger 10min à 9000 rpm à température ambiante.
- Eliminer le surnageant rapidement en retournant le tube.
- Sécher le culot à l'air libre pendant 15 min.
- Ajouter 100µl de TE (Tris-EDTA).

- Transformation bactérienne par choc thermique

L'une des conditions obligatoires pour avoir une transformation bactérienne est la compétence des souches bactériennes. La compétence est la capacité d'une bactérie à recevoir un ADN exogène.

Deux souches de *R. sullivanii* mutantes déficientes dans la production des exopolysaccharides ont été prises, il s'agit de la souche A6m, souche mutante de l'espèce *R. sullivanii* A6 et la souche F2s, souche mutante de l'espèce *R. sullivanii* RHF.

Ces deux souches mutantes (A6m et F2s) ont été obtenues après irradiation des deux souches sauvages *R. sullivanii* A6 et RHF par un agent mutagène physique ; la lumière ultraviolette, selon un protocole expérimental décrit par (Heyde, 2004) et l'utilisation du calcofluor a permis leur sélection (Annexe 4) (Gharzouli, 2006). Ces mutants se caractérisent par leur aspect sec et rugueux sur le milieu YMA et leur incapacité à noduler la plante *H. coronarium* L.

Les bactéries à transformer sont rendues compétentes par une incubation dans leur milieu de culture additionné de 50mM de CaCl₂. Les souches bactériennes mutantes de *Rhizobium sullivanii* F2s et A6m sont inoculées dans le milieu YMB+CaCl₂ 50mM et incubées à 28°C pendant 24 heures. Alors que la souche bactérienne *Escherichia coli* est incubée dans le même milieu à 37°C pendant 24 heures.

A 150µl de chaque culture bactérienne (de la souche F2s, A6m et *E. coli*) on ajoute 5 µl de l'ADN plasmidique extrait de la souche RHF ou A6. Le mélange est placé dans la glace 15 à 20 min. Puis rapidement il est transféré dans l'étuve réglée à 42°C pendant 45 secondes (pour provoquer un choc thermique), puis remis une autre fois 1 à 2 minutes dans la glace. 500µl du milieu YMB+CaCl₂ 50 mM est ajouté dans chaque tube eppendorf, les mutants de *R. sullivanii* sont incubés à 28°C durant 40 min et la souche d'*E. coli* est incubée à 37°C pendant 40

minutes. 100 à 200µl de chaque culture sont étalés sur le milieu YMA additionné du Calcofluor.

Les souches transformées d'*Escherichia coli* sont incubées à 37°C pendant 20 heures et les souches transformées de *Rhizobium sllae* (F2s) et (A6m) sont incubées à 28 °C pendant 20 heures.

Profil d'ADN plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose

Principe

L'électrophorèse est une technique utilisée pour séparer et caractériser les molécules, cette séparation s'effectue en fonction de la taille et de la charge des molécules.

Les ADN sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées négativement, la charge relative de l'ADN étant constante. De ce fait, l'ADN peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration TBE. Donc les molécules d'ADN vont migrer en fonction de leur taille, la molécule la plus petite migre plus loin.

Protocole

- Mélanger la solution tampon TBE 1X (Tris/Borate/EDTA) avec l'agarose à raison de 1 g d'agarose dans 100 ml de tampon. Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections. Sous une hotte chimique, on laisse le gel quelques secondes et on lui rajoute 0,1 ml de BET (bromure d'éthidium).
- Couler lentement le gel « éviter la formation des bulles d'air », mettre le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support. Laisser refroidir, puis enlever le peigne. Le gel sera prêt ainsi pour le dépôt des échantillons.
- Ajouter 2µl du tampon de charge à 10µl d'ADN plasmidique. Le bleu de bromophénol va permettre de suivre visuellement l'avancement de la migration. Ce colorant est dissout dans une solution de saccharose concentrée qui, une fois mélangée à la solution d'ADN, densifie suffisamment le mélange pour qu'il ne s'échappe pas des puits vers le tampon contenu dans la cuve.
- Remplir la cuve par du TBE 1X.
- Déposer 12µl de la solution d'ADN densifiée au fond de chaque puits. Fermer la cuve, lancer la migration à 100V pendant 20 min. La révélation des bandes d'ADN est réalisée sous UV.

10.2. Rôle du plasmide symbiotique et des EPS dans la nodulation

10.2.1. La capacité des cellules transformées à noduler la plante *H. coronarium*. L

Après avoir sélectionné des bactéries de l'espèce *R. sultae* mutantes transformées (T1 et T2) et des bactéries d'*E. coli* (EcT) transformées par le plasmide Psym des souches de *R. sultae* A6 et *R. sultae* RHF et afin d'étudier l'influence de l'incorporation du plasmide symbiotique dans les souches transformées, un test de nodulation est réalisé selon le même protocole sus-cité. Les jarres sont inoculées par les cellules transformées (T1, T2 EcT), les souches de *R. sultae* A6 et RHF sauvages, et la souche d'*E. coli*.

10.2.2. Rôle des EPS de haute et de faible masse molaire dans la restauration de la nodulation

Dans l'objectif de définir le rôle des EPS dans la nodulation ainsi que leur capacité à restaurer ou non l'infectivité des souches mutantes (F2s et A6m) déficientes dans la production d'EPS, un test de nodulation est réalisé.

Pour cela, les EPS extraits, analysés et identifiés de l'espèce *R. sultae* A6 et RHF sont utilisés. Chaque graine est inoculée par 1ml d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance d'une souche mutante et 1ml d'une suspension d'EPS de faible ou de haut poids molaire d'une concentration bien déterminée (les concentrations testées sont : 1mg/ml, 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml et 5mg/ml).

Des jarres témoins sont préparées par inoculation de 2ml d'une suspension bactérienne de l'espèce *R. sultae* A6 et RHF sauvage à partir d'une culture sur YMB à 28°C et de souches mutées.

Résultats et Discussion

1. Caractères morphologiques et microscopiques des souches utilisées

L'ensemble des souches utilisées produisent au bout de 48h des colonies ayant absorbé peu ou pas le rouge Congo avec une production élevée des PHB (Polyhydroxybuturate) (Fig. 13A). Pour le contrôle de la pureté, les bactéries n'ont pas acidifié le milieu GPA additionné de pourpre de bromocrésol. Ces résultats répondent aux caractères des bactéries nodulant les légumineuses de la famille des *Rhizobiaceae* (Vincent, 1970 ; Somasegaran et Hoben, 1994 ; Jordan, 1984).

Sur le milieu YMA, les colonies apparaissent de forme circulaire, convexe, légèrement relevées de texture crémeuse. Elles sont translucides, transparentes ou opaques et mucilagineuses (Fig. 13B). Les colonies sont visibles au bout de 24h à 48h, ce qui indique qu'elles sont à croissance rapide. Cet aspect est en accord avec la description des rhizobia par Jordan (1984).

La coloration de Gram révèle des petits bâtonnets, Gram négatif (Fig. 13C).

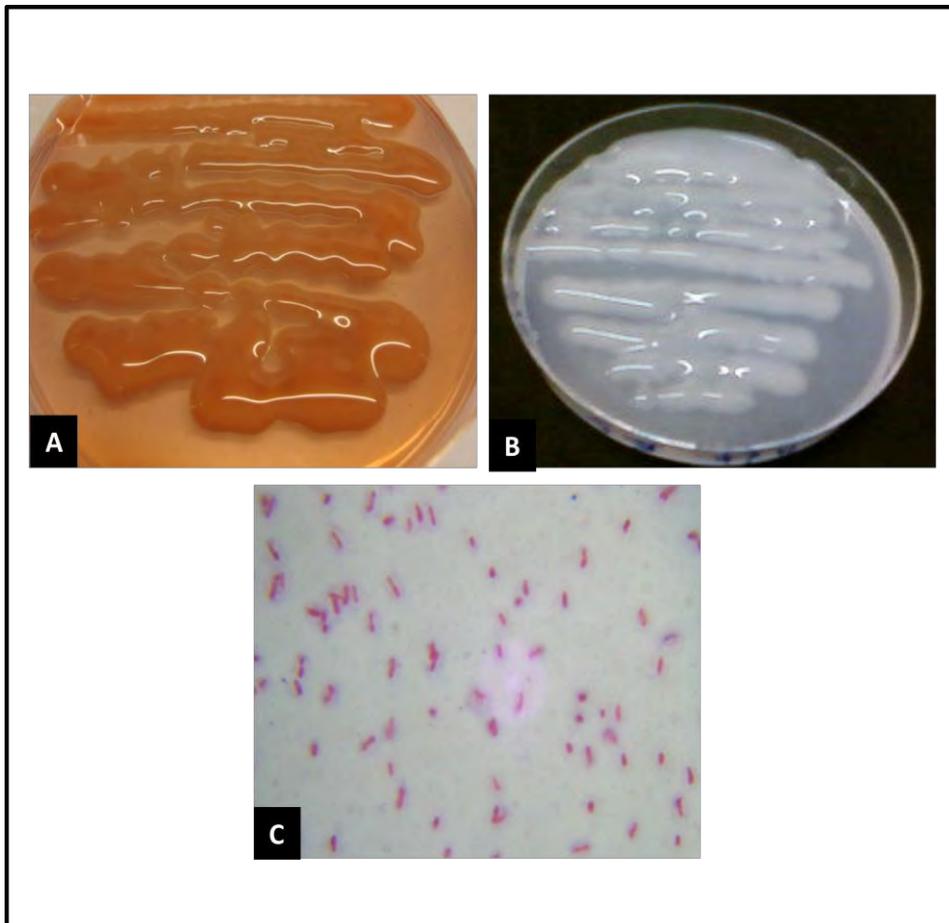


Figure 13. Aspect morphologique et microscopique des bactéries. **A** : sur YMA - rouge Congo, **B** : sur milieu YMA, **C** : sous microscope après coloration de Gram (GX 100).

2. Détection des exopolysaccharides

La détection qualitative des EPS est réalisée soit visuellement soit en ajoutant des colorants dans les milieux de culture.

2.1. Examen visuel

Toutes les souches testées donnent des colonies translucides avec un aspect de surface lisse et brillant. En soulevant les colonies avec une anse de platine, on observe la formation d'un petit filament visqueux ; ce qui indique que toutes les souches sont productrices d'EPS. (Fig. 14A)

2.2. Coloration au rouge de Ruthénium

En présence du rouge de Ruthénium, les colonies productrices d'EPS apparaissent blanches sur fond rose (Fig. 14B) par le masquage de la couleur due à une production d'EPS (Gancel et *al.*, 1988).

L'utilisation du rouge de Ruthénium a permis à Bouzar et *al* (1996) de sélectionner des clones d'une souche de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* produisant différents niveaux de polysaccharides extracellulaires.

2.3. Coloration au Calcofluor

Montrer visuellement la production des EPS (particulièrement le succinoglycane ou EPS1), les souches sont cultivées sur un milieu contenant du calcofluor (Chuang-Yien Lee, 2000). Le calcofluor « wite » est un colorant fluorescent chargé négativement, utile pour détecter les mutants de la paroi cellulaire (Clare et King, 2001).

Toutes les colonies des bactéries testées apparaissent fluorescentes sous la lumière ultraviolette (UV), indiquant une production des exopolysaccharides (Fig. 14C). Les colonies qui ne secrètent pas d'EPS ne sont pas fluorescentes sous UV en présence du calcofluor (Jordan, 1984 ; Struffi et *al.*, 1998).

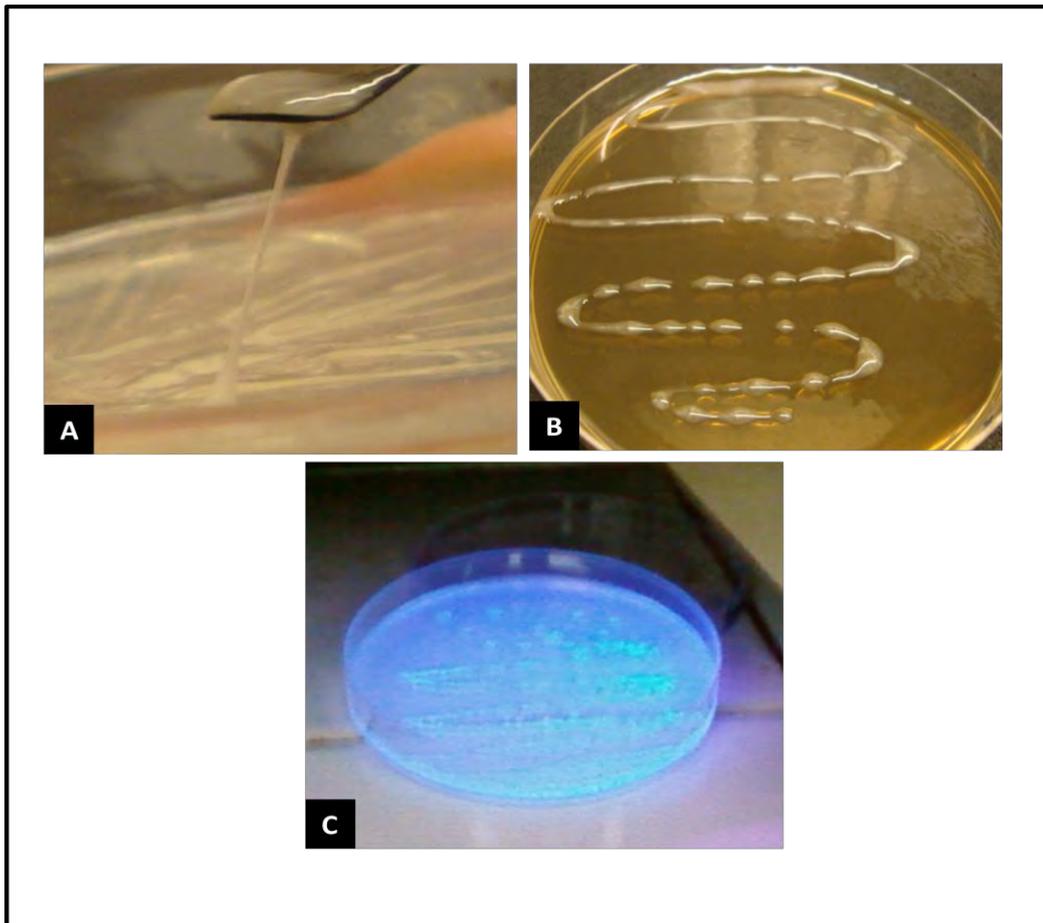


Figure 14. Mise en évidence de la production des EPS par les souches étudiées. **A** : formation d'un filament visqueux, **B** : aspect des colonies sur le milieu YMA-Rouge de Ruthénium, **C** : aspect des colonies sous UV sur le milieu YMA-Calcofluor.

Les trois tests réalisés confirment une production d'exopolysaccharides par l'ensemble des souches étudiées dans ce travail. Chez l'espèce *R. sulae*, Orgambide *et al* (1996) ont mis en évidence la production de deux types d'EPS : EPS-A et EPS-B. Leur production donne un aspect visqueux aux colonies sur un milieu solide contenant l'agar. Les mutants déficients dans la production d'EPS donnent un aspect opaque et non translucide aux colonies sur le milieu YMA, et montrent une absence de fluorescence sous UV en présence de calcofluor (Kaufisi *et al.*, 2004 ; Hotter et Scott, 1990).

3. Influence de la source de carbone sur la croissance bactérienne et la production des EPS

Afin d'évaluer l'influence de la source de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production des EPS chez les bactéries symbiotiques spécifique de la plante *H. coronarium* L, un premier test a été réalisé avec dix sources de carbone différentes sur 5 isolats (S1, S2, S3, S4 et S5) issus des racines de cette plante. Les résultats obtenus (tableau IV) nous ont permis d'y sélectionner une gamme de sucres que nous avons testés sur les souches de *R. sullae*.

Tableau IV. Influence de la source de carbone sur la croissance bactérienne (DO λ_{600}), le degré de viscosité des colonies (DV) et le rendement de production des EPS (EPS) (mg/g de biomasse bactérienne) avec les isolats obtenus des racines de la plante *H. coronarium* L.

Source De Carbone	Souches testées														
	S1			S2			S3			S4			S5		
	DO	DV	EPS	DO	DV	EPS	DO	DV	EPS	DO	DV	EPS	DO	DV	EPS
Mannitol	0,327	+	91,5	0,382	+	397,5	0,266	+	152,95	0,27	+	1068	0,291	+	18,18
Saccharose	0,35	+	611,1	0,524	+	347,1	0,316	+	433,07	0,24	+	792,8	0,267	+	220,6
Glucose	0,246	+	833,3	0,237	+	1,56	0,239	+	30	0,28	+	1,9	0,414	+/-	1,25
Galactose	0,208	+	86	0,407	+	224,8	0,169	+	1,2	0,254	+	132,6	0,211	+	208,3
Fructose	0,367	+/-	18,45	0,076	-	1	0,13	-	1,09	0,037	-	1,1	0,126	+	1,45
Maltose	0,511	+	111,1	0,468	+	1,8	0,246	+	379,32	0,26	+	117,6	0,32	+	100
Lactose	0,262	+	1	0,605	+	2	0,275	+	285,71	0,3	+	3333,3	0,148	+	1,5
Arabinose	0,217	+/-	1,30	0,146	-	1,03	0,116	-	1,25	0,05	-	1,04	0,238	+	2
Sorbitol	0,291	+	1,09	0,538	+	228,6	0,304	+	112,87	0,271	+	875	0,118	+	116,6
Xylose	0,113	-	1,2	0,147	-	1,1	0,122	-	1	0,016	-	1	0,011	-	1,06

+: viscosité importante, +/-: viscosité faible, -: pas de viscosité

Selon le tableau, on observe que le sorbitol, le saccharose, le glucose et le mannitol ont bien stimulé la croissance des 5 isolats (S1, S2, S3, S4 et S5) alors que l'arabinose, le xylose sont faiblement utilisés par les 5 souches. La bonne production bactérienne se traduit par un aspect visqueux des colonies, tandis qu'une faible production bactérienne montre un aspect moins visqueux. Les 5 isolats ne produisent pas les mêmes quantités d'EPS en fonction de la source de carbone. Une production abondante est enregistrée en présence du mannitol, saccharose, sorbitol et maltose pour la majorité des souches testées, le reste des sucres n'ont pas donné une production d'EPS assez significative. Ces résultats nous ont permis de retenir sept sucres afin de tester leur influence sur la croissance (Annexe 2) et la production des EPS par les souches de *R. sullae* (A6, RHF, RHI, RH19) et les souches de *R. leguminosarum* bv

viciae et *bv trifolii* (*R.l.v* et *R.l.t*). Le tableau V résume les résultats du rendement de production avec les souches concernées.

Tableau V. Effet de la source de carbone sur la production des EPS par les deux espèces *R. sullae* A6 et *R. sullae* RHF (la quantité de chaque sucre est de 10g/ 1l du milieu de culture).

Echantillon		Poids du Culot sec (g)	Poids des EPS totaux (mg)	Poids des EPS HMM (mg)	Poids des EPS FMM (mg)	Rendement des EPS totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Rendement des EPS HMM ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Rendement des EPS FMM ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Poids HMM/ Poids FMM
A6	Mannitol	1,0	7,7	5,0	2,7	7,5 \pm 2,0	4,8 \pm 1,0	2,7 \pm 0,9	1,85
	Saccharose	1,3	14,0	8,1	5,9	10,6 \pm 0,6	6,7 \pm 2,8	3,9 \pm 1,6	1,37
	Glucose	1,2	13,7	4,6	9,1	10,7 \pm 1,1	4 \pm 2,9	6,7 \pm 5,0	0,5
	Sorbitol	1,2	13,5	4,3	9,2	11,2	3,5	7,7	0,46
	Galactose	0,9	5,6	2,2	3,4	6,2	2,4	3,7	0,64
	Lactose	0,8	8,6	5,6	3	10,7	7,0	3,7	1,86
	Arabinose	1,2	3,4	1,4	2,0	2,8	1,1	1,2	0,70
RH F	Mannitol	0,9	10,6	4,7	5,9	11,6 \pm 1,3	4,8 \pm 2,0	6,6 \pm 2,0	0,80
	Saccharose	1,1	16,2	7,6	8,6	13,7 \pm 1,0	6,7 \pm 2,4	7,0 \pm 0,9	0,88
	Glucose	0,8	16,5	4,8	11,7	20,5	5,6 \pm 0,8	15 \pm 6,0	0,41
	Sorbitol	1,4	4,3	2,0	2,3	3,4 \pm 1,0	1,6 \pm 1,4	1,8 \pm 0,8	0,86
	Galactose	0,8	7,2	5,2	2,0	9,0	6,5	2,5	2,6
	Lactose	1,6	10,0	3,0	7,0	6,3	2,0	4,4	0,42
	Arabinose	0,9	9,4	8,1	1,3	10,4	9,0	1,4	6,23

On note que la quantité d'EPS produite varie en fonction de la source de carbone et de la souche bactérienne.

Les souches de *R. sullae* (A6, RHF, RHI, RH19) ont montré une production importante en présence de glucose et de saccharose et une production faible en présence de galactose et d'arabinose. Le maximum de production des EPS par la souche *R. leguminosarum* *bv viciae* 1003 (*R.l.v.*) est enregistré en utilisant le mannitol et le saccharose comme source de carbone. Les quantités d'EPS les plus importantes sont produites par la souche *R. leguminosarum* *bv trifolii* 843 (*R.l.t.*) lorsqu'elle est cultivée en présence du saccharose, sorbitol et glucose.

Le taux d'EPS de faible masse molaire (EPS-FMM) et haute masse molaire (EPS HMM) varie d'une souche à l'autre et d'un sucre à l'autre. Les souches A6 et RHF, en présence du glucose, du sorbitol et du galactose ont produit deux fois plus des EPS de FMM que les EPS de HMM (Tableau V). Pour les espèces de *R. leguminosarum* *bv trifolii* et *R. leguminosarum* *bv viciae* (*R.l.t* et *R.l.v.*), le saccharose a bien stimulé la production des EPS de FMM, où on note que leur quantité est deux fois plus que les EPS de HMM (Tableau VI).

Tableau VI. Effet de la source de carbone sur la production des EPS par les souches de *R. sullivanii* (RH1 et RH19) et *R. leguminosarum* bv *viciae* et *trifolii* (la quantité de chaque sucre est de 10g/ 1l du milieu de culture).

Echantillon		Poids du Culot sec (g)	Poids des EPS totaux (mg)	Poids des EPS HMM (mg)	Poids des EPS FMM (mg)	Rendement des EPS totaux (µg/mg)	Rendement des EPS HMM (µg/mg)	Rendement des EPS FMM (µg/mg)	Poids HMM/ Poids FMM
RH I	Mannitol	0,9	8,0	5,1	2,9	8,9	5,7	3,2	1,75
	Saccharose	1,8	13,5	2,3	11,2	7,5	1,3	6,2	0,20
	Glucose	1,3	11,3	5,0	6,3	8,7	3,8	4,8	0,79
	Sorbitol	0,8	4,1	2,4	1,7	5,1	3,0	2,1	1,41
	Galactose	0,6	3,3	2,3	1,0	5,5	3,8	1,6	2,3
	Lactose	1,0	3,6	1,6	2,0	3,6	1,6	2,0	0,8
	Arabinose	1,1	3,8	2,0	1,8	3,4	1,8	1,6	1,11
RH 19	Mannitol	1,0	7,5	6,2	1,3	7,5	6,2	1,3	4,76
	Saccharose	1,0	9,3	3,8	5,5	9,3	3,8	5,5	0,69
	Glucose	1,4	10,3	4	6,3	7,4	2,9	4,5	0,63
	Sorbitol	1,4	8,4	6	2,4	6,0	4,3	1,7	2,5
	Galactose	0,6	2,8	2	0,8	4,7	3,3	1,3	2,5
	Lactose	0,8	3,4	2,2	1,2	4,2	2,7	1,5	1,83
	Arabinose	0,9	2,9	1,1	1,8	3,2	1,2	2,0	0,61
<i>R.l. v.</i>	Mannitol	0,9	26,2	14,2	12,0	29,1	15,8	13,3	1,18
	Saccharose	2,1	15,2	4,7	10,5	7,2	2,2	5,0	0,44
	Glucose	2,2	10,0	3,9	6,1	4,5	1,8	2,8	0,63
	Sorbitol	0,3	24,6	19,2	5,4	82	64	18	3,55
	Galactose	0,7	4,3	2,5	1,8	6,1	3,5	2,5	1,38
	Lactose	1,5	7,5	3,2	4,3	5,0	2,1	2,9	0,74
	Arabinose	0,9	4,2	3,0	1,2	4,7	3,3	1,3	2,5
<i>R.l. t.</i>	Mannitol	0,9	16,2	7,0	9,2	18,0	7,8	10,2	0,76
	Saccharose	0,8	26,9	9,5	17,4	33,6	11,9	21,7	0,54
	Glucose	0,8	21,8	10,3	11,5	27,2	12,9	14,4	0,89
	Sorbitol	1,0	21,5	10,0	11,5	21,5	10,0	11,5	0,89
	Galactose	1,3	12,2	4,2	8,0	9,3	3,2	6,1	0,52
	Lactose	0,8	7,7	5,2	2,5	9,6	6,5	3,1	2,08
	Arabinose	1,09	10,0	6,0	4,0	9,0	5,5	3,6	1,5

Les bactéries du genre *Rhizobium* se caractérisent par la production de quantités importantes des polysaccharides de surface. Dans notre étude nous avons montré que les souches de *R. sullivanii* nodulant spécifiquement la plante *H. coronarium* L peuvent produire des EPS de FMM et HMM. Ainsi les quantités d'EPS produites sont influencées par la source de carbone.

Plusieurs paramètres ont montré une régulation quantitative et qualitative des EPS, parmi ces facteurs nous citons : la source de carbone, l'osmolarité, le réserve en azote, a faible quantité de phosphate et les conditions de croissance (pH, température...) (Spaink, 2000 ; Colpin et Cook, 1990).

Nos résultats sont en accord avec les résultats de Navarini et ses collaborateurs (1997) qui ont observé qu'une sécrétion élevée d'EPS est trouvée chez la souche *Rhizobium hedysary* HCNT1 (actuellement nommée *R. sullivanii*) lorsqu'elle est cultivée en présence du glucose et du

saccharose. Ils avaient montré que l'utilisation de différentes sources de carbone à 1% améliore à la fois la croissance bactérienne et la production des EPS.

Selon Ghosh et ses collaborateurs (2005) le mannitol est le sucre qui stimule le mieux la production des EPS suivi du glucose et du galactose pour la souche *Rhizobium* D110 isolée de la plante *Dalbergia lanceolaria*. Kumari et al (2009) ont rapporté des variations dans la production des EPS en présence de différentes sources de carbone utilisées pour les souches de *Rhizobium* isolées à partir de la plante *Indigofera*.

Singh et Sharma(1991) ont trouvé que les souches de *Rhizobium* qui produisent un maximum d'EPS en présence du saccharose, produisent moins d'EPS en présence du glucose. Alors que De et Basu (1996) ont remarqué que la production d'EPS est maximale lorsque le milieu est additionné de 3% de mannitol.

L'influence de la source de carbone sur la production des EPS est liée à l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des EPS. Velasco et al (2007) ont montré que l'activité de la perméase, enzyme nécessaire pour la pénétration des sucres, et l'activité de l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGP), enzyme nécessaire pour la synthèse du sucre précurseur UDP-glucose, sont significativement influencés par la source de carbone utilisée par la bactérie. Une faible activité de l'UGP va donner des faibles quantités de l'UDP-glucose et par conséquent un faible rendement de la production des EPS. Ainsi, la faible activité enzymatique n'affecte pas seulement le taux de production, mais elle peut également retarder la production des EPS de la phase exponentielle à la phase stationnaire de la croissance bactérienne (Velasco et *al.*, 2007).

En résumé, nos résultats montrent que parmi les quatre souches de *R. sultae* testées, la souche *R. sultae* A6 et la souche *R. sultae* RHF sont les plus productrices d'EPS. Ces deux souches ont donné un maximum de production d'EPS et un rendement très important en présence du mannitol, saccharose, glucose et sorbitol. Pour cette raison, les EPS produits par les deux souches *R. sultae* A6 et RHF cultivées en présence de l'un de ces quatre sucres, ont fait l'objet de l'analyse structurale par la RMN, la SEC, DOC-PAGE et la spectrométrie de masse.

4. Dosage colorimétrique des EPS

Afin d'estimer la quantité des sucres neutres et des sucres acides constituant les EPS, deux dosages colorimétriques sont réalisés, il s'agit du dosage à l'Anthrone pour les sucres neutres et un au dosage au *méta*-hydroxydiphényl pour les sucres acides. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VII (les valeurs de la DO les courbes d'étalonnage établies sont dans l'annexe 2).

Tableau VII. Résultats du dosage colorimétrique des sucres acides et le dosage à l'Anthrone

Echantillons d'EPS		Taux des sucres acides (µg/200µl)	Taux des sucres neutres (µg/200µl)	Rapport (sucres acides/sucres Totaux)	Rapport (sucres neutres/ sucres totaux)
Souche	Source de carbone				
<i>R. sulae</i> A6	Glucose	1,03	18,24	01/15	11/15
	Saccharose	6,07	11,66	01/04	02/04
	Maltose	1,72	8,41	01/15	05/15
	Fructose	6,90	1,06	11/15	01/15
	Mannitol	1,66	20,68	01/15	13/15
<i>R. sulae</i> IS123	Glucose	5,52	8,56	01/05	02/05
	Mannitol	8,83	5,20	03/05	01/05
	Arabinose	11,21	3,16	04/08	01/08
	Saccharose	11,28	2,1	06/12	01/12
	Galactose	1,97	/	1 / 15	/
<i>R. sulae</i> RHF	Sorbitol	6,31	24	01/08	07/08
	Inositol	5,76	7,8	01/05	02/05
	Saccharose	8,62	18,09	01/03	02/03
	Mannitol	8,79	11,5	01/03	02/03
	Glucose	/	17,59	/	3/4
<i>R. sulae</i> RH19	Mannitol	8,14	6,08	04/12	03/12
	Saccharose	7,59	2,19	04/11	01/11
	Xylose	14,69	13,05	01/02	01/02
	Sorbitol	10,72	3,18	04/08	01/08
<i>R.l.t.</i>	Galactose	1,03	12,07	01/15	07/15
<i>R.l.v</i>	Arabinose	14,86	6,32	03/06	01/06
	Xylose	6,55	2,67	03/12	01/12
	Saccharose	3,00	11,48	01/08	04/08
Isolat S1	Galactose	5,17	2,78	03/12	01/12
	Saccharose	3,79	6,21	01/08	02/08
	Sorbitol	10,17	2,06	06/11	01/11
	Mannitol	8,14	5,24	02/05	01/05
	Galactose	2,93	1,20	01/12	01/12
Isolat S2	Saccharose	6,31	/	01/04	/
	Sorbitol	10,17	2,06	06/11	01/11
	Mannitol	8,14	5,24	02/05	01/05
	Galactose	2,93	1,20	01/12	01/12
Isolat S3	Saccharose	5,97	3,37	01/05	01/05
	Mannitol	5,05	2,66	02/12	01/12
	Sorbitol	4,00	/	01/06	/
Isolat S4	Saccharose	13,93	5,42	05/10	02/10
Isolat S5	Saccharose	4,93	12,67	01/06	03/06
	Maltose	4,41	4,34	01/06	01/06

L'Anthrone, selon Morris (1948), réagit avec tous les holosides, diholosides et polysaccharides, notamment l'amidon et les diverses dextrans. Dissoute en milieu sulfurique concentré, l'Anthrone, sans sucres, est de couleur jaune clair et donne, avec les solutions glucidiques, une coloration allant du bleu au rose.

La coloration des produits obtenus par la méthode à l'Anthrone 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).

Ces deux méthodes nous ont permis d'estimer la proportion des sucres neutres et des sucres acides dans les constituants des EPS. Les résultats obtenus montrent que la teneur en sucre neutre varie de 3/4 à 1/15 et des sucres acides de 1/2 à 1/15 selon la source de carbone et la souche testée. Nos résultats montrent que les EPS du *R. sultae* sont constituées de très grandes quantités d'hexoses neutres.

Les méthodes colorimétriques sont souvent utilisées, et peuvent donner des résultats fiables mais elles ne déterminent pas exactement la teneur de chaque résidu constituant le polysaccharide (Ruas-Madiedo et De Los Reyes-Gavilan 2005).

5. Viscosité relative des EPS- HMM et EPS-FMM de l'espèce *R. sultae*

Les EPS de HMM, en raison de leur capacité à faire des liaisons hydrogène intra et intermoléculaire et leur faible solubilité, ont tendance à être plus visqueux que les EPS de FMM. La viscosité varie en fonction de la taille des EPS qui est une fonction de la source de carbone.

La viscosité relative des EPS de HMM de l'espèce *R. sultae* (A6 et RHF) varie de 0,96 à 1,11 et celles des EPS de FMM est de 0,89 à 0,98 (tableau VIII). Les souches cultivées en présence du sorbitol et d'arabinose donnent des EPS de FMM les moins visqueux par rapport à ceux obtenus lorsque les souches sont cultivées en présence des autres sucres testés.

Tableau VIII. Valeurs de la viscosité relative des EPS de HMM et de FMM

Echantillon d'EPS		Viscosité relative des EPS HMM	Viscosité relative des EPS FMM
<i>R. sullae</i> A6	Mannitol	1,10	0,91
<i>R. sullae</i> A6	Saccharose	1,03	0,93
<i>R. sullae</i> A6	Glucose	1,07	0,95
<i>R. sullae</i> A6	Sorbitol	1,10	0,89
<i>R. sullae</i> A6	Galactose	1,07	0,94
<i>R. sullae</i> A6	Lactose	1,06	0,96
<i>R. sullae</i> A6	Arabinose	0,97	0,86
<i>R. sullae</i> RHF	Mannitol	1,09	0,94
<i>R. sullae</i> RHF	Saccharose	1,03	0,98
<i>R. sullae</i> RHF	Glucose	1,11	0,9
<i>R. sullae</i> RHF	Sorbitol	0,96	0,91
<i>R. sullae</i> RHF	Galactose	1,01	0,96
<i>R. sullae</i> RHF	Lactose	0,98	0,93
<i>R. sullae</i> RHF	Arabinose	0,96	0,87
<i>R.l.v.</i>	Mannitol	0,96	0,95
<i>R.l.t.</i>	Mannitol	0,98	0,89

La viscosité des solutions est une fonction du volume occupé par les polysaccharides dans la solution, du poids moléculaire, et de la conformation de la chaîne (rigidité et ramification) du polysaccharide (Whistler et BeMiller, 1997).

La conformation de la chaîne a un effet sur la viscosité, pour un poids moléculaire donné, les molécules linéaires vont occuper un plus grand volume en solution puisqu'elles vont s'étendre au lieu de se compacter comme les molécules ramifiées et donc, vont contribuer à augmenter la viscosité des solutions (Whistler et BeMiller, 1997).

La rigidité de la chaîne peut avoir un effet sur la viscosité, Tuinier et ses collaborateurs (2001) ont mis en évidence une corrélation positive entre la rigidité et la viscosité intrinsèque. Enfin la charge globale des EPS influence la viscosité du polymère ; il a été montré que les EPS anioniques augmentent la viscosité plus que les EPS neutres (Ayala-Hernández *et al.*, 2009).

Les polysaccharides adoptent généralement une forme de pelotes flexibles aléatoires favorisant une augmentation de la viscosité des solutions (Bertrand, 2008).

Tuinier et ses collaborateurs (2001) ont étudié l'effet du poids moléculaire, de la rigidité et de la ramification d'EPS purifiés produits par *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* sur la viscosité. La valeur de la viscosité intrinsèque était plus faible dans le cas des EPS de FMM.

Kutkowska et al (2007) ont rapporté que les mutant du gène *pssB* de l'espèce *R. leguminosarum* bv *trifolii* produisent des quantités d'EPS de HMM plus élevée que les EPS de FMM et que les EPS produits par ces mutants sont 1,45 fois plus visqueux que les EPS produits par l'espèce sauvage. Ils suggèrent que ceci est dû au degré élevé de polymérisation des EPS produits par les mutants *pssB*.

6. Vitesse de reprise de la croissance après dessiccation

Nous avons noté que plus les cellules sont muqueuses « production d'EPS importante » plus le temps nécessaire pour sécher 0,1g de bactéries raclées est important (tableau VII). Ainsi le nombre de colonies obtenu pour tester la viabilité des souches est du même ordre pour toutes les souches/sucre testés (tableau IX). Ce qui indique que le nombre des cellules vivantes inoculé au départ est approximativement le même.

La cinétique de croissance des deux souches en présence des différents sucres (Fig. 15) au cours des premières 24H (phase exponentielle et début de la production des EPS par les souches) reflète mieux l'influence de la production des EPS sur la vitesse de reprise. De fortes concentrations en EPS produits augmentent la turbidité du milieu de culture, mais ceci n'est observable qu'après 40H d'incubation (phase stationnaire).

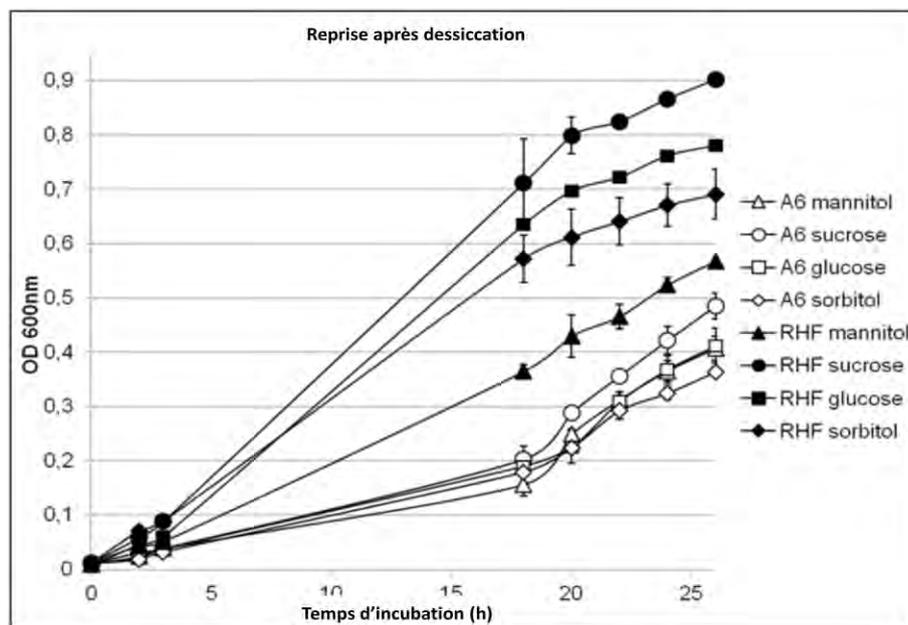


Figure 15. Cinétique de croissance des souches *R. sulae* A6 et RHF après dessiccation, cultivées en présence de différents sucres (Gharzouli et al., 2013).

Les courbes de cinétique montrent que la souche RHF résiste mieux à la dessiccation que la souche A6. Le saccharose a permis aux deux souches de reprendre leur croissance après dessiccation avec une vitesse plus grande que les autres sucres testés. La souche A6 a

repris sa multiplication plus tardivement en présence du sorbitol, alors que la souche RHF était plus lente à reprendre en présence du mannitol.

Tableau IX. Les valeurs de la densité optique ($DO_{\lambda_{600}}$) obtenus après reprise de croissance après dessiccation.

	A6 Mannitol	A6 Saccharose	A6 Glucose	A6 Sorbitol	RHF Mannitol	RHF Saccharose	RHF Glucose	RHF Sorbitol
Tps de séchage (min)	35	45	30	30	30	48	42	28
Nb de colonies (10^{-1})	15	13	11	12	14	15	17	14
0H	0,013	0,017	0,014	0,013	0,019	0,018	0,020	0,017
2H	0,024	0,029	0,022	0,019	0,053	0,064	0,072	0,069
3H	0,039	0,042	0,044	0,036	0,061	0,085	0,081	0,088
18H	0,135	0,210	0,230	0,185	0,377	0,694	0,620	0,568
20H	0,240	0,298	0,267	0,218	0,432	0,812	0,682	0,610
22H	0,318	0,345	0,365	0,276	0,488	0,838	0,715	0,635
24H	0,384	0,423	0,412	0,313	0,537	0,873	0,768	0,670
26H	0,429	0,510	0,451	0,364	0,583	0,902	0,792	0,702
42H	0,602	0,702	0,560	0,438	0,581	0,935	0,987	0,782
44H	0,643	0,762	0,591	0,471	0,594	/	0,902	0,839
46H	0,692	0,784	0,623	0,501	0,623	/	0,918	0,887
48H	0,722	0,820	0,678	0,544	0,645	/	/	0,921
50H	0,773	0,853	0,801	0,582	0,718	/	/	/
68H	0,810	/	/	0,640	0,902	/	/	/
70H	0,835	/	/	0,674				
72H	/	/	/	0,703				
74H	/	/	/	0,752				

Les recherches concentrées sur l'identification des EPS et leurs activités montrent que ces derniers participent à l'adaptation des bactéries qui les produisent aux conditions environnementales de dessiccation, température, pression et salinité (Poli et al; 2009).

Béna (2008) rapporte que la production des polysaccharides semble jouer un rôle protecteur contre la dessiccation, car les souches qui ne montrent pas une production importante des polysaccharides, tolèrent moins les conditions de dessiccation. Garmiri et Coles (2008) ont montré que les bactéries à Gram négatif tels que les rhizobia synthétisent des lipopolysaccharides au niveau de leur paroi qui assurent un rôle protecteur contre la dessiccation.

Venderlinde et ses collaborateurs (2009) ont rapporté que les mutants de l'espèce *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841 affectés au niveau du lipide A des LPS sont sensibles à la dessiccation par comparaison aux souches sauvages. Ceci suggère que la structure intacte des LPS rhizobiens est également importante pour la protection des cellules contre le stress de dessiccation.

Béna (2008) a remarqué que l'inoculation d'une souche plus tolérante à la dessiccation permet une meilleure croissance de la plante par rapport à l'inoculation d'une souche moins tolérante ayant présenté un déficit de croissance. L'auteur a conclu que ce résultat restait à approfondir.

Sachant que le rôle intrinsèque des EPS est de protéger la bactérie des stress abiotiques (Potts, 1994), nous avons comparé la vitesse de reprise de la croissance des souches par rapport à la production d'EPS en présence de différentes sources de carbone (Fig. 16).

Dans un premier temps, on constate que la souche RHF résiste mieux à la sécheresse que la souche A6 (Fig. 16B), et produit en grande quantité les EPS de HMM (Fig. 16A). En effet, lorsqu'une souche/source de carbone produit une bonne quantité d'EPS de HMM, la résistance à la sécheresse est plus importante, c'est-à-dire que la reprise de sa croissance en milieu liquide est plus efficace. C'est le cas de RHF/saccharose et RHF/glucose qui produisent les plus grandes quantités d'EPS de HMM. On retrouve cette corrélation pour tous les cas de la souche A6. Les EPS de HMM étant visqueux, plus la bactérie en produit, plus son enveloppe sera visqueuse et meilleure sera sa résistance à la sécheresse.

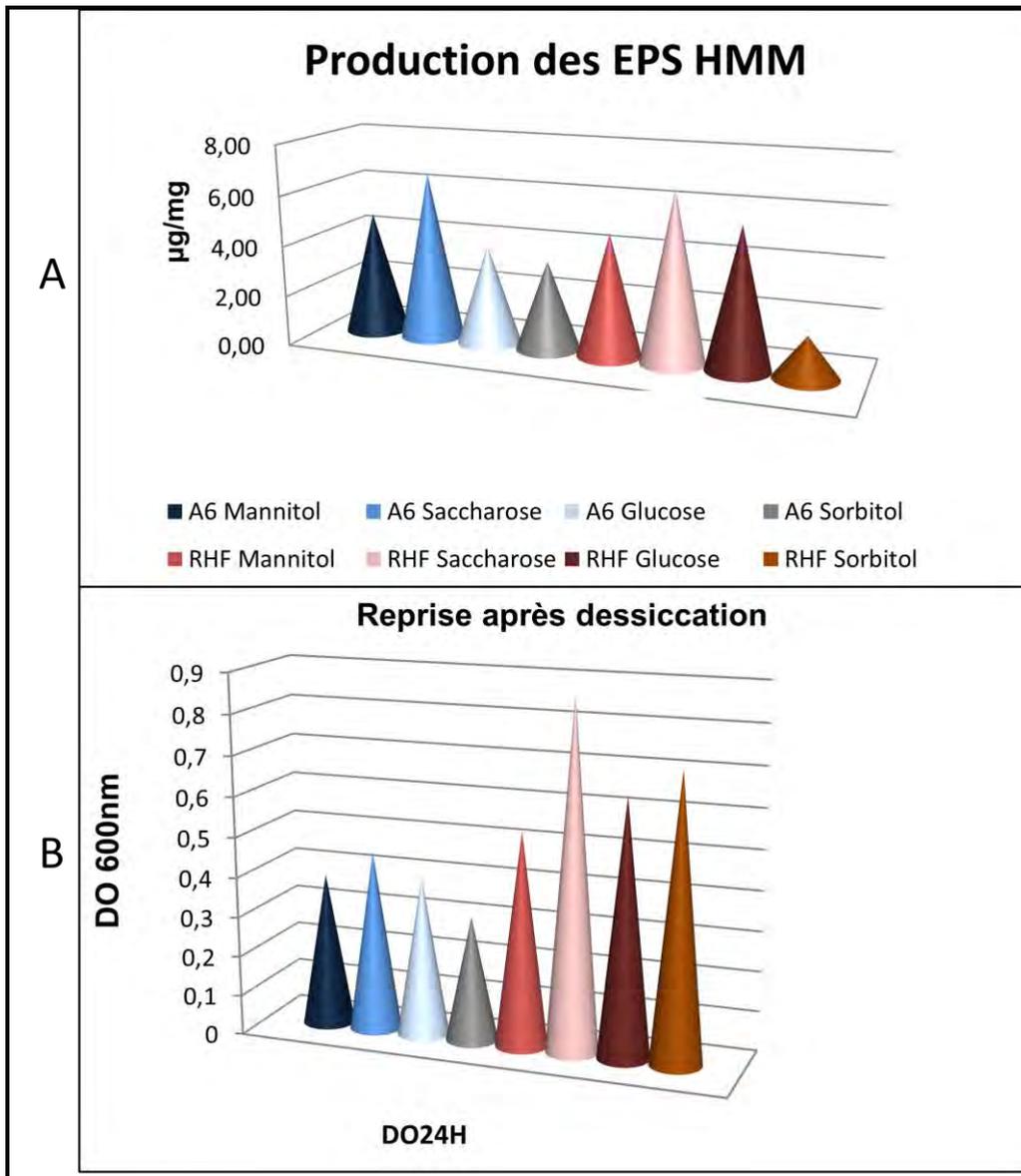


Figure 16. Corrélation entre A : La production des EPS à HPM des EPS de *R. sulae* avec les différentes sources de carbone. B: la capacité des souches à reprendre leur multiplication dans un milieu liquide après dessiccation.

7. Identification structurale des EPS de l'espèce *R. sultae*

7.1. Analyse par GC/MS des EPS

L'identification des sucres neutres et des acides uroniques est réalisée par comparaison des temps de rétention et des spectres de masse (EI^+) par rapport à des standards et à une banque de données spectrales (NIST).

La quantification des sucres se fait au moyen des facteurs de réponse relatifs entre les standards qui ont été déterminés (0,94 Glc= 1Gal, 1,05 Fuc=1Gal, 2,5 GalA=1Gal, 1,9 Man=1Glc, 2,8 Rha=1Gal). Les chromatogrammes obtenus à partir des échantillons polysaccharidiques (EPS) sont superposés avec ceux des standards (Fig.17). Un coefficient de réponse propre à chaque résidu est appliqué à l'aire des pics obtenus pour quantifier chaque monosaccharide (**Annexe 3**).

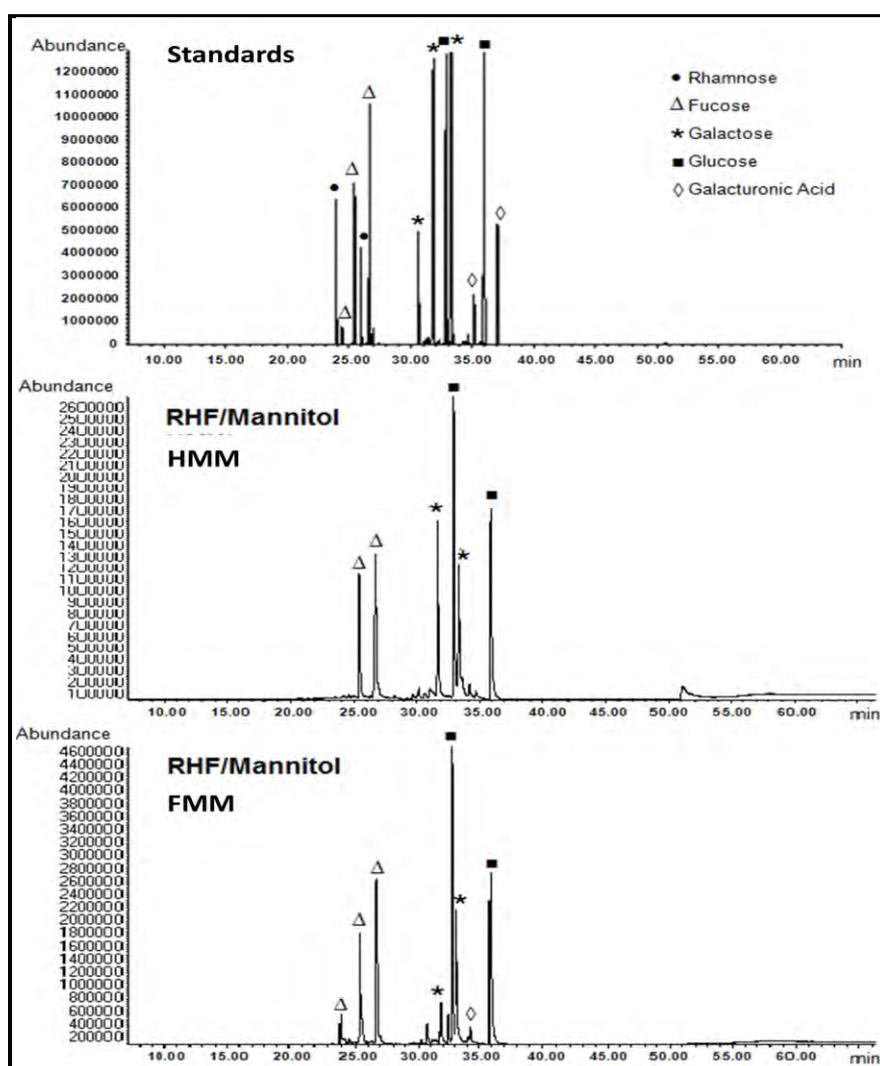


Figure 17. Chromatogrammes de l'analyse GC/MS obtenus après silylation des standards et après hydrolyse et silylation des EPS-HPM et FPM de la souche *R. sultae* RHF cultivée en présence du mannitol (Gharzouli et al., 2013).

Les résultats de la GC/MS ont permis d'établir le tableau X qui présente les pourcentages des résidus constituant les EPS analysés par GC/MS. Les EPS de *R. sultae* analysés sont principalement formés par du glucose (Glc), du galactose (Gal) et du fucose (Fuc), en plus dans certains échantillons des traces de mannose (Man) et de rhamnose (Rha) sont détectés (Annexes 3). Les proportions de chaque constituant dépendent de la source de carbone utilisée pour la croissance de la bactérie.

Tableau X. Composition saccharidique des EPS des deux souches *R. sultae* A6 et RHF déterminés par GC/MS analysés par Hydrolyse et TMS

		EPS FMM						
Souche	Source de Carbone	Glc%	Gal%	Fuc%	Man%	Gal A%	Rha%	Rib%
A6	Mannitol	32±1	30,5±2.5	37±4	0,5	0,5	0,5	n.d
	Sucrose	16,5±3.5	32,5±7.5	51±11	0,5	0,5	n.d	n.d
	Glucose	26±1.4	30,5±7.7	29,5±28.9	4,5±6.3	9±12.7	0,5	n.d
	Sorbitol	60,5±10.5	22,5±5.5	1	8,5±8.5	0,5	8,5±0.5	n.d
RHF	Mannitol	38±5	30,5±3.5	30,5±2.5	0,5	1	0,5	n.d
	Sucrose	33,5±16.5	29±4	37,5±12.5	0,5	0,5	0,5	n.d
	Glucose	15±7.07	25±7.07	50±14	5±7.7	5±7.7	n.d	n.d
	Sorbitol	37±12	34±3	27,5±9.5	0,5	0,5	n.d	n.d
		EPS HMM						
Souche	Source de Carbone	Glc%	Gal%	Fuc%	Man%	Gal A%	Rha%	Rib%
A6	Mannitol	45±5	32,5±7.5	10±10	n.d	12,5	0,5	n.d
	Sucrose	30±10	36,5±5.3	17±16	3,5±3.5	10,5	0,5	n.d
	Glucose	39,5±9.5	44±32.6	16,5±23.12	0	0,5	0	n.d
	Sorbitol	41,5±8.5	25±8	n.d	8,5±8.5	9	17	n.d
RHF	Mannitol	28,5±14.5	28±0	14±14	28,5±28.5	n.d	n.d	n.d
	Sucrose	46±21	28,5±3.5	12,5±12.5	0,5	13,5	n.d	n.d
	Glucose	53,5±30.7	30±7.13	17±22.86	n.d	0,5	n.d	n.d
	Sorbitol	33±0	33±0	33±0	n.d	0,5	n.d	n.d
		EPS Totaux						
Souche	Source de Carbone	Glc%	Gal%	Fuc%	Man%	Gal A%	Rha%	Rib%
A6	Mannitol	42,7±6.5	33,4±1	19,9±13.5	0,2	9,0	0,5	n.d
	Sucrose	24,7±6.7	34,9±2	30,4±17	2,3	6,6	0,3	n.d
	Glucose	32,0	36,5	23,7	2,5	5,2	0,3	n.d
	Sorbitol	54,4±9.5	23,3±1.2	0,7	8,5	3,2	11,2	n.d
RHF	Mannitol	34,1±4.7	29,5±1.2	23,6±8.2	12,3±12.3	0,6	0,3	n.d
	Sucrose	39,5±6.5	28,8±0.3	25,5±12.5	0,5	6,7	0,3	n.d
	Glucose	26,6	26,5	40,1	3,5	3,6	n.d	n.d
	Sorbitol	35,5±2	33,6±0.5	29,5±2.7	0,3	0,5	n.d	n.d

Glc, glucose ; Gal, galactose ; Fuc, fucose ; Man, mannose ; GalA, acide galacturonique; Rha, rhamnose ; Rib, ribose ; n.d, non détecté.

Comme nous observons que les EPS-HMM et FMM de la même souche n'ont pas forcément la même composition osidique (Fig.17). Ceci indique qu'il existe différentes populations de polysaccharides et qu'il ne s'agit pas seulement d'une différence au niveau de leur degré de polymérisation. Les proportions de l'acide galcturonique (GalA) déterminées par GC/MS sont moins précises puisque la silylation de cet acide uronique conduit à des résultats sous estimés et variables.

La purification des échantillons est réalisée par une double précipitation des EPS, les fractions obtenues sont propres. Puisque, la GC/MS des dérivés des sucres avant et après hydrolyse n'a pas révélé la présence des acides aminés, de lipides, ni de ribose.

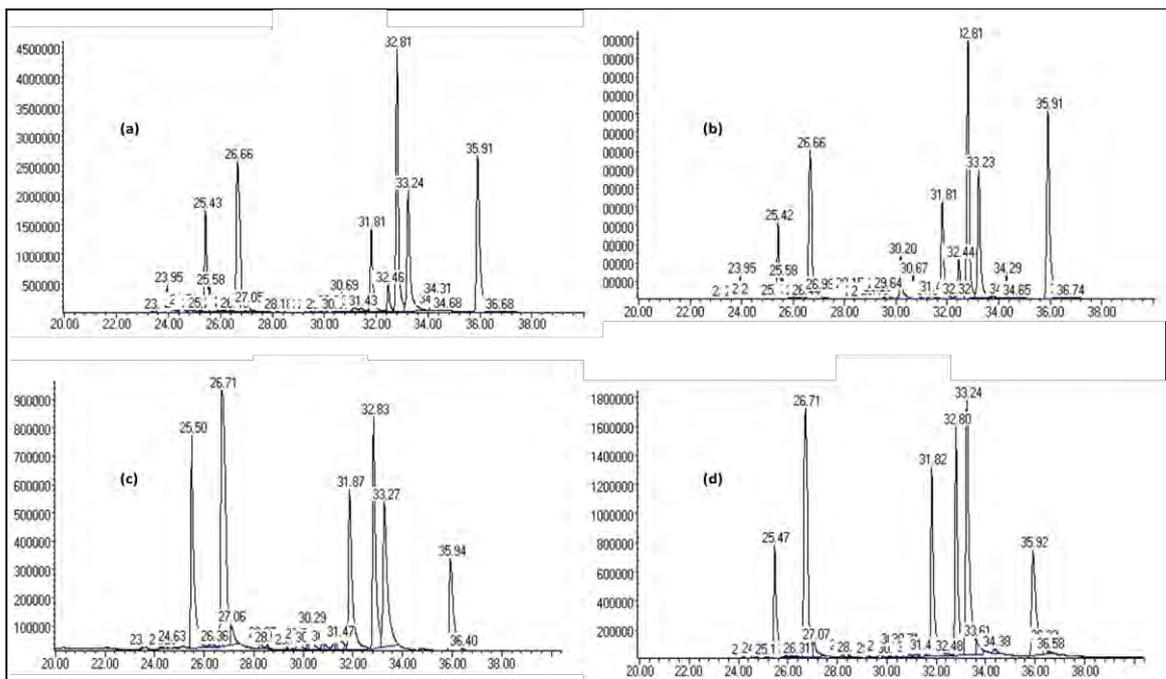


Figure 18. Les chromatogrammes des EPS-FMM de la souche RHF en présence des différents sucres, (a) mannitol, (b) saccharose, (c) glucose, (d) sorbitol.

La proportion en monosaccharides dans les EPS varie d'une souche à l'autre et d'une source de carbone à l'autre.

Pour la souche RHF il y a une variabilité dans l'influence de la source de carbone sur le taux de fucose et la structure des EPS (Fig.18, 19). Les deux catégories d'EPS de la souche A6 (FMM, HMM) ont montré leur taux maximal en fucose lorsque la souche est cultivée en présence du saccharose (51% pour FMM, 17% pour les HMM). Pour cette même souche, le sorbitol n'a pas mené à l'apparition du fucose (Fig. 20, 21), mais à celle du rhamnose dans la structure des 2 types d'EPS de la bactérie (Tableau X) et avec un taux maximal (8.5% pour les FMM, 17% pour les HMM).

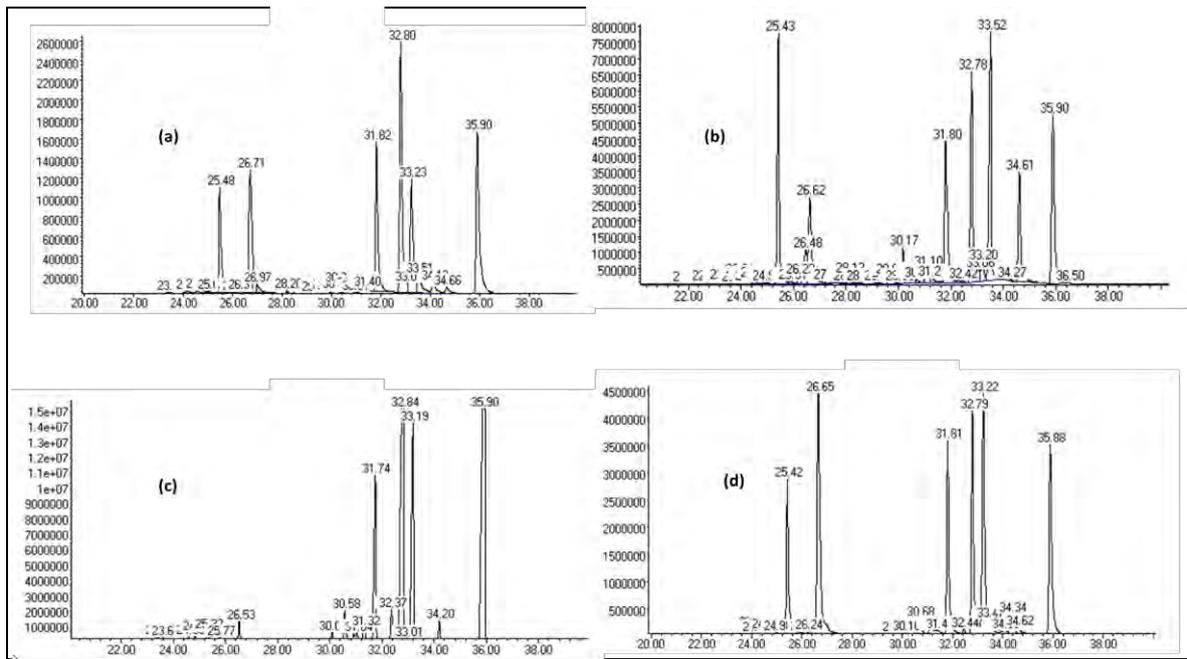


Figure 19. Les chromatogrammes des **EPS-HMM** de la souche **RHF** en présence des différents sucres, (a) mannitol, (b) saccharose, (c) glucose, (d) sorbitol.

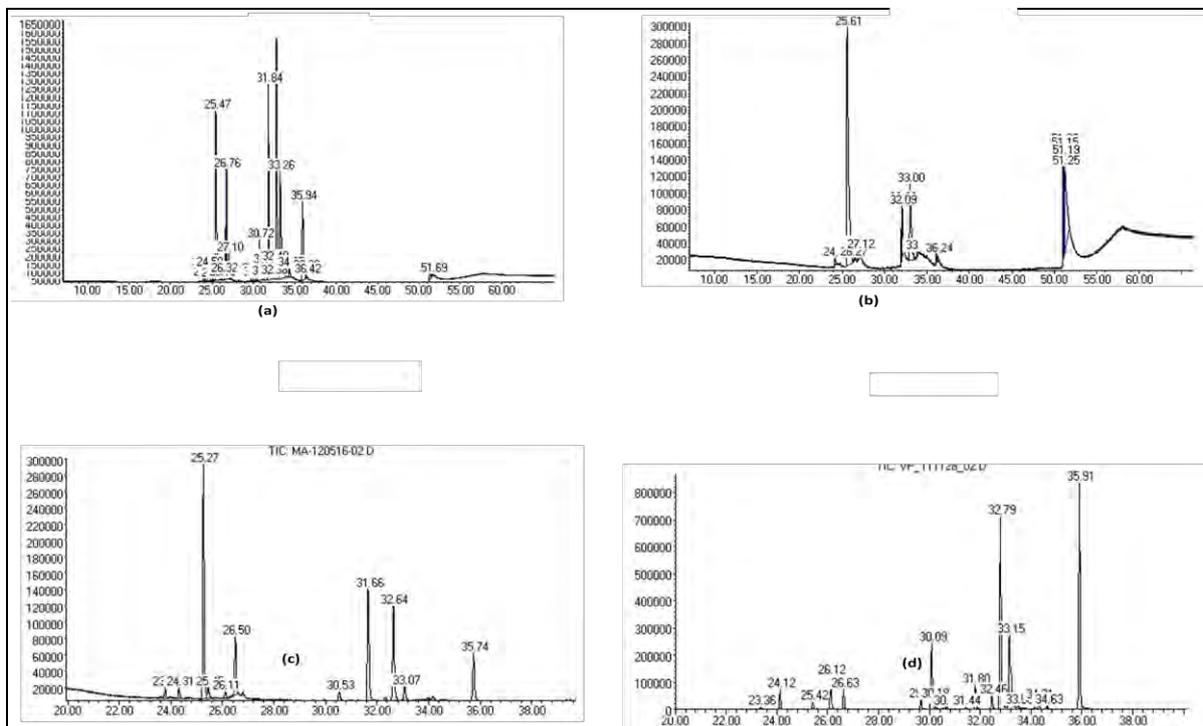


Figure 20. Les chromatogrammes des **EPS-FMM** de la souche **A6** en présence des différents sucres, (a) mannitol, (b) saccharose, (c) glucose, (d) sorbitol.

Ainsi, les cas d'A6/sorbitol et A6/glucose (Fig. 22), où les sources de carbone sont de même stéréochimie, soulèvent des questions sur la biosynthèse de leurs EPS. En partant d'une

même stéréochimie (glucose et sorbitol), les sucres utilisés donnent des EPS composés soit de rhamnose, soit de fucose, qui son épimères en 2.

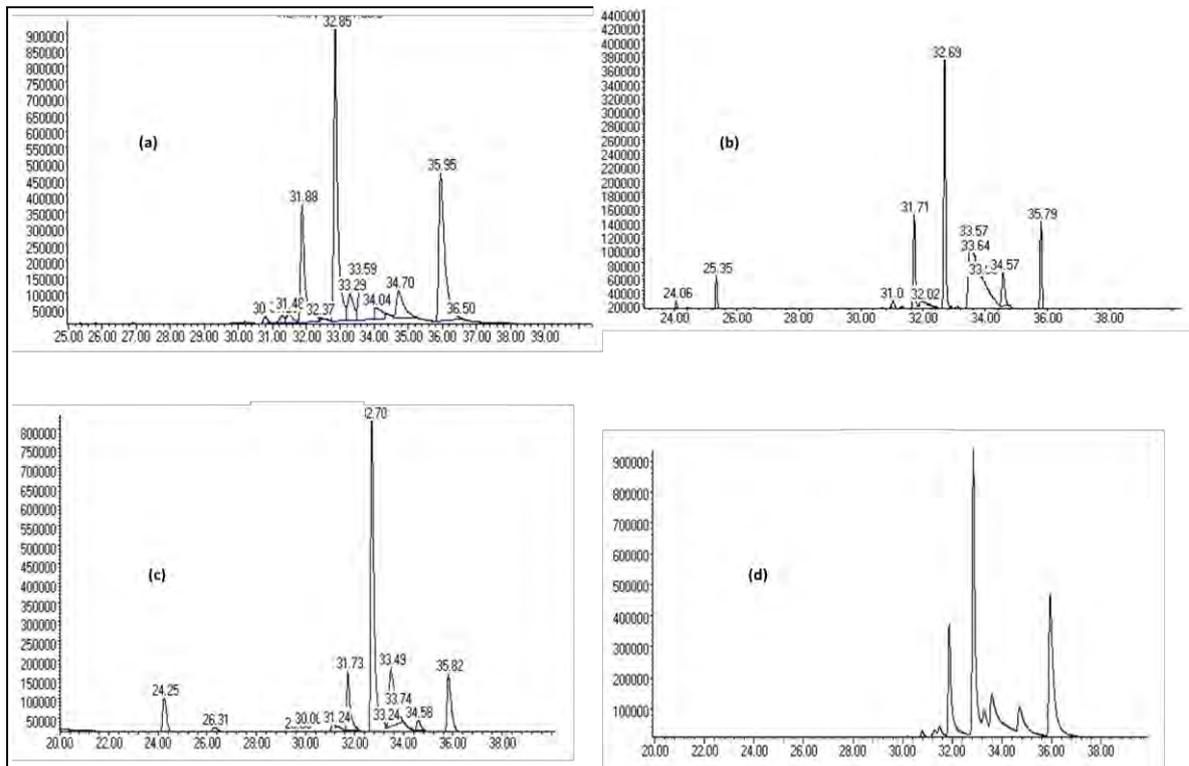


Figure 21. Les chromatogrammes des EPS-HMM de la souche **A6** en présence des différents sucres, (a) mannitol, (b) saccharose, (c) glucose, (d) sorbitol.

L'analyse de la GC/MS réalisée après hydrolyse des EPS confirme les résultats des tests colorimétriques, puisque elle révèle que les sucres neutres sont les sucres majoritaires formant les EPS et comme elle montre que les acides uroniques sont les moins présents dans la structure des EPS (la détermination de l'acide uronique en GC/MS est mauvaise cf la RMN). La comparaison des résultats du dosage colorimétrique avec les résultats de la GC/MS nous laisse suggérer que le dosage à l'Anthrone reflète mieux la composition osidique des EPS que le dosage des sucres acides.

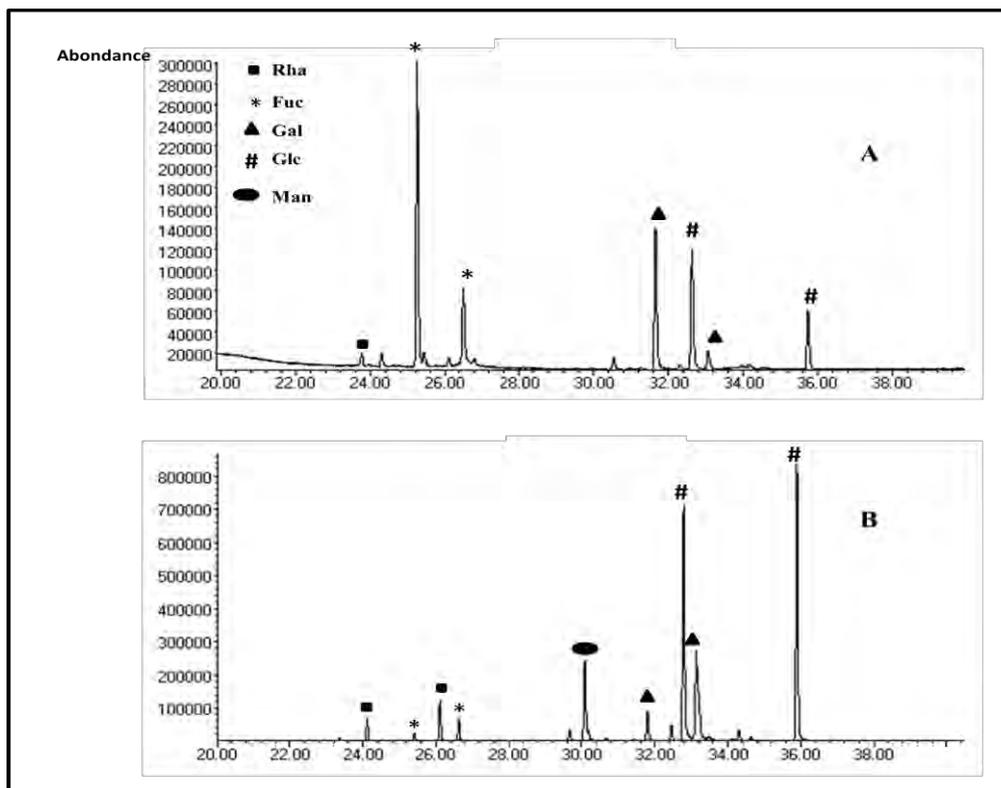


Figure 22. L'analyse GC/MS EI^+ des dérivées TMS hydrolysées : A : des fractions des EPS à FMM de la souche A6 cultivée en présence du glucose, B : des fractions des EPS à FPM de la même souche cultivé en présence du sorbitol. Entre les deux on peut observer une diminution claire du contenu de fucose et une augmentation de la teneur en rhamnose.

Les résultats de la GC/MS nous ont permis de constater que chez la même souche il existe des modifications dans la composition saccharidique en fonction de la source de carbone utilisée. Cela indique que le sucre utilisé par la souche peut non seulement affecter le rendement et la viscosité des EPS produits, mais également la composition des polysaccharides bactériens.

La biosynthèse des EPS est un processus complexe et dépend de plusieurs enzymes localisés sur la membrane interne et externe de la bactérie. Le substrat de départ (la source de carbone utilisée par la bactérie) peut influencer l'activité enzymatique des enzymes responsables de la formation des nucléotides de sucre (UDP-glucose ou UDP-galactose) qui seront transformés en monomères, ses derniers seront incorporés sur l'unité répétitive du polysaccharide. Par conséquent, les modifications de l'activité enzymatique peuvent conduire à des modifications de la structure des EPS. Quelas et al (2006) ont confirmé que les conditions de culture (telle que la source de carbone) peuvent modifier la quantité et la composition des EPS de l'espèce *Bradyrhizobium japonicum*.

Les exopolysaccharides produits par les rhizobia sont principalement formés des monosaccharides comme le: D-glucose, D-galactose, D-mannose, D- l'acide glucuronique, D- l'acide galacturonique et parfois de L-rhamnose (Lepek et D'Antuono 2005 ; Doherty et *al* ; 1988). Les liaisons osidiques qui unissent ces monosaccharides sont 1,3 ou 1,4 dans une configuration de type alpha ou béta (Skorupska et *al* ; 2006). Dans la littérature, on ne retrouve du fucose que dans les EPS de *Enterobacter* (Pawlicki-Jullian et *al.* ,2010 ; Iyer et *al.* ,2005) et *Azospirillum* (Fischer et *al* , 2003).

Lorsque les bactéries de l'espèce *B. japonicum* 2143 sont cultivées en présence d'arabinose, de glucose ou de mannitol, la composition en monosaccharide des EPS est la suivante : Man/Glc/Gal/Gal A 1 :2 :1 :1, tandis que lorsqu'elles sont cultivées en présence du malate les EPS deviennent extrêmement riches en Gal (nouvelle structure) (Karr et *al* ; 2000).

Les modifications structurales des polysaccharides extracellulaires ont été fréquemment décrites comme une réponse aux différentes conditions de culture et de conditions physiologiques de la bactérie (Lloret et *al* ; 1998). Staudt et ses collaborateurs (2012) ont rapporté que la production des EPS peut être influencée par la source de carbone et d'azote utilisée par la plante et que ces facteurs peuvent conduire à des variation dans la structure et les propriétés rhéologique des EPS

Dans notre étude, on observe un effet de la source de carbone pour chaque souche étudiée. Les EPS de HMM et de FMM présentent des variations de structure au sein de la même souche mais aussi des variations dans leur composition monosaccharique selon la source de carbone et ce dans une même ratio HMM/FMM.

7.2. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les temps de rétention « Tr » obtenus avec les standards utilisés (PEG et Dextrane) permettent de tracer des courbes d'étalonnage (Annexe 3) indiquant le logarithme de la masse molaire de chacun en fonction du volume de rétention « Vr » (volume de rétention = temps de rétention x débit « =0,8 ml/min»).

Afin de vérifier la rentabilité et la reproductibilité des résultats, chaque standard et chaque échantillon est injecté 3 fois. La comparaison des aires des pics a permis de calculer la proportion de chaque polymère dans le mélange d'EPS de faible masse molaire (tableau XI).

Tableau XI. Résultats de la SEC des EPS à faible poids moléculaire

Echantillons		Pics	Tr (min)	Vr	Masse molaire (Dalton)	Concentration (mg/ml)	Proportion (%)	
A6	Glucose	P1	9,34	7,47	58000	1,6	32	
		P2	14,33	11,46	8000	2,15	43	
		P3	16,95	13,56	<1000	1,2	24	
	Sorbitol	P1	9,85	7,88	58000	2,95	59	
		P2	14,45	11,58	6000	0,675	13,5	
		P3	15,53	12,42	500	1,375	27,5	
	Saccharose	P1	10,06	8,048	62000	0,12	2,5	
		P2	10,7	8,56	59000	2,2	44	
		P3	14,16	11,32	10500	0,16	3,2	
		P4	15,05	12,04	1800	1,68	33,6	
		P5	16,98	13,58	< 1000	0,82	16,4	
	RHF	Glucose	P1	9,58	7,88	58000	0,9	18
			P2	14,38	11,5	7000	2,45	49
			P3	16,83	13,46	< 1000	1,65	33
		Saccharose	P1	9,23	7,384	59000	3,35	67,67
P2			14,32	11,46	8000	0,95	19,19	
P3			16,83	13,46	< 1000	0,65	13,13	
Sorbitol		P1	10,99	8,79	60000	1	20	
		P2	13,92	11,13	15000	0,25	5	
		P3	14,86	11,88	2800	3,35	67	
		P4	17,67	14,13	<1000	0,4	8	
Mannitol		P1	9,61	7,68	60000	0,95	19	
		P2	10,37	8,29	58000	2,45	49	
		P3	13,48	10,78	25800	0,12	2,5	
		P4	14,31	11,44	8000	0,95	19	
		P5	16,02	12,81	<1000	0,5	10	
R.l.t	Mannitol	P1	10,23	8,18	60000	0,35	7	
		P2	14,07	11,26	12000	0,27	5,5	
		P3	15,05	12,04	1800	3,95	79	
		P4	17,95	14,36	INF1000	0,42	8,5	
	Sorbitol	P1	11,32	9,056	64000	0,4	8	
		P2	14,47	11,58	6000	2,6	52	
		P3	17	13,60	< 1000	1,95	39	
	Glucose	P1	10,14	8,11	63000	0,4	8	
		P2	11,66	9,32	59000	1,85	37	
		P3	14,16	11,33	10000	0,075	1,5	
		P4	15,25	12,2	1000	1,25	25	
		P5	18,08	14,41	< 1000	1,35	27	
	Saccharose	P1	10,14	8,11	59000	1,8	36	
		P2	15,09	12,07	1600	1,6	32	
		P3	17,84	14,27	< 1000	1,55	31	
R.l.v	Mannitol	P1	9,70	7,76	60000	1,1	22	
P2		10,29	8,23	58000	1,35	27		
P3		15,11	12,09	1500	2	40		
P4		17,80	14,24	<1000	0,55	11		
R.l.v	Glucose	P1	9,97	7,97	59000	1,45	29	
		P2	14,61	11,68	4800	2,55	51	
		P3	17,30	13,84	<1000	0,95	19	
	Sorbitol	P1	9,92	7,94	63000	0,35	7	
		P2	10,79	8,63	61000	1,05	21	
		P3	11,86	9,34	58000	0,53	10,6	
		P4	14,55	11,64	5000	2,55	51	
P5	17,18	13,74	< 1000	0,47	9,5			

La SEC permet d'estimer la masse molaire des polymères saccharidiques. Comme le montre le tableau X, les EPS de FMM de l'espèce *R. sullae* sont formés des différentes fractions de polymères de masse molaire variant de 1 à 60 kDa.

Nos résultats sont comparables avec ceux obtenus par Ciezack et *al.* (2009), dont l'analyse par la SEC des EPS de l'espèce *Oenococcus oeni* IOBE 0205 a montré la présence de 2 classes de masse différente. La première classe présente des EPS de FPM de masse molaire égale ou inférieure à 60 kDa et qui représentent 95% des EPS secrétés et la deuxième classe des EPS de HPM possède une masse supérieure à 10^6 kDa et représente 5% des EPS totaux. Alors que la souche *O. oeni* IOBE 450 secrète des EPS de poids moléculaire intermédiaire de 240 kDa.

L'analyse par SEC des EPS de l'espèce *Burkholderia tropica* a révélé des polymères possédant une masse de 300 kDa (Serrato et *al.*, 2006).

Skorupska et *al.* (2006) décrivent que le Succinoglycane (EPS I) ainsi que Galactoglucane (EPSII) sont secrétés sous deux fractions majeures reflétant les différents degrés de polymérisation : des fractions de haute masse molaire formés de 100 à 1000 unités répétées (10^6 à 10^7 Dalton) et des fractions de faible masse molaire sous forme des monomères, dimères et trimères pour les EPS I (Kaci et *al.*, 2005; Ruas-Madiedo et De Los Reyes-Gavilan, 2005) et de 15 à 20 « oligomères » unités répétées pour les EPSII (Skorupska et *al.*, 2006), ce qui on accords avec nos résultats, dont la masse molaire d'EPS de FMM de l'espèce *R. sullae* varie de 1 à 60 kDa.

7.3. DOC-PAGE

Afin d'estimer la masse molaire des EPS de HMM des souches de l'espèce *R. sullae*, ces derniers sont analysés par DOC-PAGE. Les EPS analysés ont montré la présence des fractions qui dépassent 150kDa.

Torino et *al.* (2005) ont rapporté que l'espèce *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 secrète des EPS de poids moléculaire de 1,2 à $1,9 * 10^6$ Da.

Le degré de polymérisation des chaînes des polysaccharides détermine leur masse molaire. La bactérie peut secréter des oligomères de faible masse molaire (de l'ordre de 1kDa à 60 kDa) et de polymères de taille importante qui dépasse 100 kDa.

7.4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'ensemble de spectres obtenus par cette analyse ainsi que la spectrométrie de masse et les cartes de corrélation établies ont été interprétés et réalisés par Dr Véréna Poinot avec la participation du Dr Marie-Anne Carpené (Dr en chimie analytique à l'université Paul Sabatier, Toulouse, France).

7.4.1 EPS-HMM

A cause de leur masse molaire élevée et de leur grande viscosité, la réalisation d'une RMN sur EPS de HMM était très difficile et n'a pas donné de résultats interprétables. Toutefois aucun signal n'est présent dans le domaine entre 1 et 25ppm (**Annexe 3**) ce qui indique l'absence de groupements acétates, pyruvates et succinates sur les EPS de haute masse analysés.

7.4.2 EPS-FPM

L'analyse par RMN permet de déterminer la configuration des hydrates de carbone et de déterminer le type de liaisons entre les sucres qui constituent le polysaccharide. Les déplacements chimiques ^1H et ^{13}C de chaque unité polysaccharidique sont donnés dans le tableau XII.

Tableau XII. Les données des déplacements chimiques des résidus glycosidiques des EPS produits par l'espèce *R. sultae* RHF cultivée en présence du mannitol à partir de 2D-RMN dans le D_2O à 500 MHz avec l'utilisation d'un cryosonde.

N°	Résidus Glycosidiques	Attribution (δ , ppm)					
		H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6
A	$\rightarrow 4 \alpha \text{ Gal } 1 \rightarrow$ $\rightarrow 4 \alpha \text{ Gal}(6 \text{ Succ}) 1 \rightarrow$	<i>5.41/99.1</i>	<i>3.84/68.1</i>	<i>4.13/66.5</i>	3.92/71.8*	3.72/62.5	3.82 ; 3.77/60.6 3.92 ; 3.79/64.8
B	$\rightarrow 3 \alpha \text{ Fuc } 1 \rightarrow$	5.33/96.7	4.85/70.8	4.12/71.0*	4.04/68.5*	4.38/67.2	1.22/14.5
C	$\rightarrow 3 \alpha \text{ Fuc } 1 \rightarrow$	<i>5.30/98.1</i>	<i>5.02/69.9</i>	<i>4.23/76.5</i>	4.20/69.1	4.43/66.7	1.07/14.7
D	$\alpha (4.6 \text{ Pyr}) \text{ Glc } 1 \rightarrow$	<i>5.09/92.1</i>	<i>3.54/72.1</i>	<i>3.71/79.8</i>	<i>3.39/75.9</i>	<i>3.64/69.5</i>	3.91 ; 3.82/67.7
E	$\rightarrow 4 \beta \text{ GalA } 1 \rightarrow$	4.88/100.8	3.86/80.0	3.90/78.4	3.73/76.5*	3.68/76.8	175.0
F	$\rightarrow 3 \alpha \text{ Fuc (Ac)} 1 \rightarrow$	<i>4.57/103.7</i>	<i>3.31/72.9</i>	<i>3.69/76.2</i>	<i>3.78/71.5</i>	<i>4.06/71.0</i>	<i>1.27/19.70</i>
G	$\rightarrow \beta 3 \text{ Glc}$	<i>4.53/96</i>	<i>3.25/74.1</i>	<i>3.51/82.6</i>	<i>3.42/67.7</i>	<i>3.67/61.5*</i>	3.70 ; 3.64/60.6
	Succinate	<i>2.08/20.0</i>	<i>173</i>	<i>183</i>			
	Pyruvate	<i>1.37/24.8</i>	<i>100.1</i>	<i>176</i>			
	Acetate	<i>1.86/22.4</i>	<i>181</i>				

* Des attributions qui peuvent être changées les uns des autres

Les attributions en italique sont déterminées par COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ et HSQC $^{13}\text{C}/^1\text{H}$

Afin d'avoir la meilleure résolution possible, l'étude par RMN a été réalisée sur les EPS de faible masse molaire précipités avec 10 volumes d'éthanol, contenant des oligosaccharides qui sont plus solubles et forme moins d'interactions moléculaires. Pour tirer

le maximum d'information sur la structure des EPS, la RMN est réalisée en trois modes COSY ^1H - ^1H , HSQC et HMBC ^1H - ^{13}C .

L'expérience COSY permet d'obtenir des informations importantes. Cette expérience permet de corréliser les protons qui sont couplés scalairement, en d'autres termes celle-ci permet de transférer la magnétisation d'un proton sur un proton cliniquement voisin et permet donc de visualiser les constantes de couplage J^3 entre 2 protons. La RMN de type HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des protons portés par un carbone. La HMBC permet d'obtenir les corrélations et les couplages entre un proton et un carbone plus ou moins voisin $J^{3,4}$, ces informations sont importantes pour déterminer la séquence de l'oligosaccharide.

Les carbones anomériques portent deux oxygènes, ils ont donc des déplacements chimiques à champs faibles (95-104 ppm). Les signaux des protons anomériques de configuration α sont situés entre 4,5ppm et 5,5 ppm et ceux de configuration β sont entre 4,4ppm et 5 ppm. Entre 3,5 ppm et 4,4 ppm, les signaux sont dus aux protons portés par les carbones C-2, C-3, C-4, C-5 et C-6. Sous 3 ppm, les signaux correspondent au substituant des sucres.

Attribution des spectres ^1H et ^{13}C

Les spectres à 500MHz des EPS de faible masse molaire de l'espèce *R. sullae* RHF cultivée en présence du mannitol ont montré la présence d'une unité répétitive hexasaccharidique contenant le Fuc, Glc, Gal, GalA dans un rapport 2 :2 :1 :1 et la présence des groupes O-acétyl, succinyl et pyruvyl.

On observe une légère différence entre cette composition et la composition présentée dans le tableau 9 « tableau de la GC/MS » puisque dans la RMN on observe un seul échantillon alors que les valeurs présentées dans le tableau 9 sont des valeurs moyennes sur trois cultures différentes. Par contre la structure obtenue par RMN correspond parfaitement à la figure 15 qui présente les chromatogrammes du même échantillon après hydrolyse et silylation.

L'analyse par RMN des EPS-FMM de la souche RHF cultivée en présence du mannitol a donné des spectres résolus et interprétables (Fig.23). Grâce à leur grande similitude avec les spectres obtenus avec les EPS-FMM de la souche A6 cultivée en présence du saccharose, les spectres de la souche RHF ont permis de tirer beaucoup d'information sur la structure des EPS de l'espèce *R. sullae* et d'établir le tableau XII.

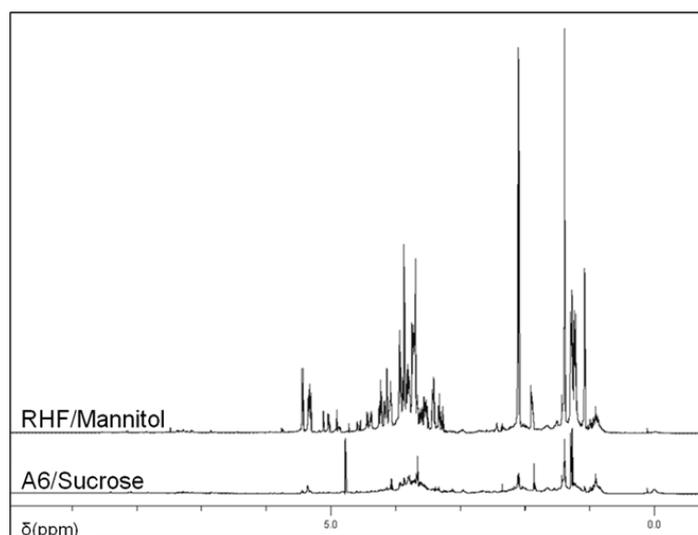


Figure 23. Spectre de la RMN ^1H des ESP-FMM de la souche RHF cultivée en présence du mannitol et de la souche A6 cultivée en présence du saccharose (Gharzouli et al., 2013).

Systématiquement, des taches de corrélation ont été observées dans les expériences COSY entre les positions anomériques H-1, H-2 et suivie par H-3. Ces signaux ^1H ont pu être mis en corrélation avec les signaux ^{13}C en étudiant la surface HSQC (Fig. 24). Pour l'attribution des déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des positions de 4 à 6 de chaque sucre, l'interprétation des corrélations HMBC est nécessaire (Fig. 26). Les déplacements chimiques ainsi déterminés ont été comparé à la littérature (Kaci et al., 2005 ; Evans et al., 2000 ; Plock et al., 2001 ; Cescutti et al., 2005 ; Perry et al., 2007 ; Ihara et al., 2010 ; Zhao et al., 2010 ; MacLean et al., 2010).

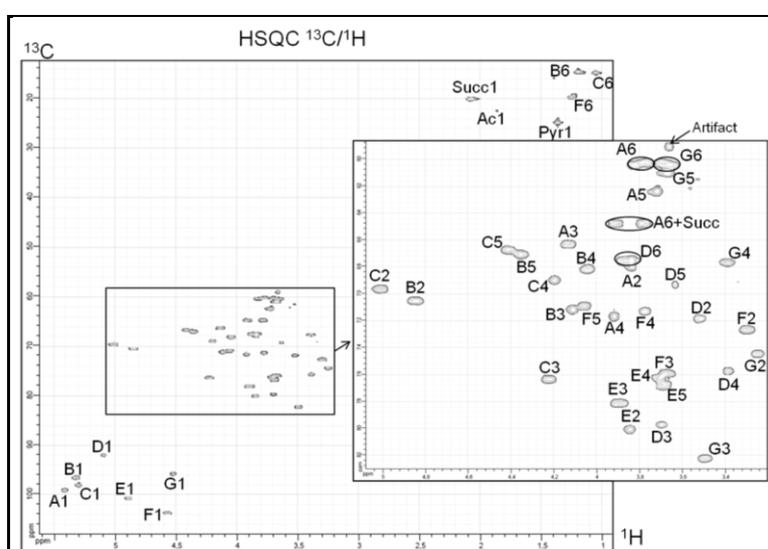


Figure 24. Carte de corrélation de la RMN : $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC des EPS-FMM de la souche *R. sultae* RHF cultivée en présence du mannitol. Les pics de corrélation attribués correspondent aux attributions présentés dans le tableau XII (Gharzouli et al., 2013).

Pour établir une séquence, des corrélations HMBC sont observées entre ^{13}C -1 du fucose acétylé (δ 103.7 ppm) et ^1H -3 Fuc (δ 4.23 ppm) (Fig.25, F1/C3). Aussi, des corrélations entre ^1H -4 du Galactose succinylé (δ 3,92 ppm) et ^{13}C -6 du Glucose pyruvylé (δ 67,7 ppm) (Fig. 25 D6/A4), des corrélations ^{13}C -5 du fucose acétylé (δ 71,0 ppm) et ^1H -2 du Gal A (δ 3,86 ppm) (Fig. 25 F5/E2).

Les configurations α et β sont déterminées par la constante de couplage COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$: $J^3_{\text{H}_1, \text{H}_2}$. Dans la région aliphatique du spectre ^1H (Fig.24), trois substituants sont trouvés sur la chaîne principale des sucres. Un succinate CH_2 : 2.08 ppm, un pyruvate CH_3 : 1.37 ppm et un acétate CH_3 : 1.86 ppm. On observe également dans ce domaine le CH_3 du désoxy sucre.

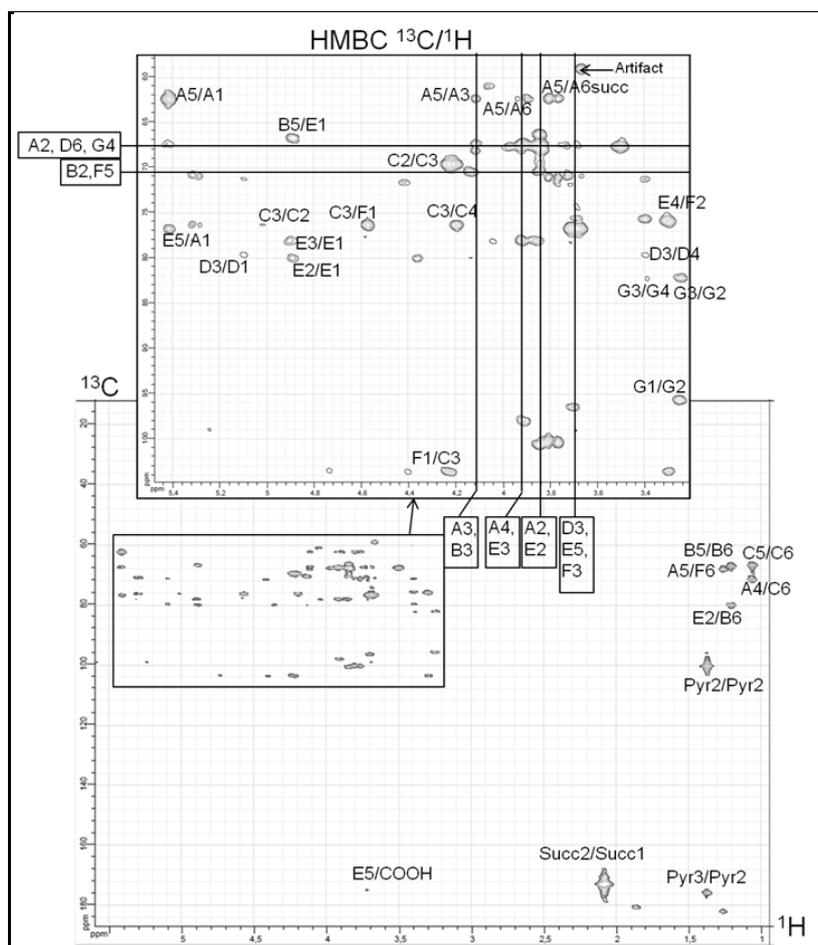


Figure 25. La carte de corrélation de la RMN : $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HMBC des EPS-FPM de la souche *R. sullae* RHF cultivée en présence du mannitol. Les pics de corrélation attribués correspondent aux attributions présentés dans le tableau XII (Gharzouli et al., 2013).

Un signal HMBC fort est trouvé pour le pyruvyl entre ^{13}C (δ 100.1 ppm) et ^1H (δ 3.82, 3.88 et 3.70 ppm) correspondant respectivement aux deux H-6 et H-3 ou H-4 d'un hexose.

Une attribution du déplacement chimique correspondant à des atomes de carbone quaternaire (C et COOH) des substituants est effectuée en utilisant les données HMBC.

Pour la pyruvylation, un seul signal est observé pour un hexose pyruvylé, indiquant qu'elle est totale. Une acétylation était partielle sur la position 4 du fucose, la présence de 2 types de signaux par le même sucre est observée. De même, on peut observer que la succinylation est partielle.

7.5. La spectrométrie de masse (ESI-ToF MS) des EPS de faible masse molaire

Les mêmes échantillons analysés par RMN sont étudiés par spectrométrie de masse. L'ion m/z 1041.31 correspondant à une molécule de masse $M=1042\text{g/mol}$, déprotonée monochargée $[M-H]^-$. Cette masse concorde avec un hexasaccharide pyruvylé et qui peut porter également un groupement O-acétyl (ion m/z 1083.3) et/ou un succinyl (ion m/z 1141.4) (Fig. 26A). La fragmentation de l'ion $[M-H]^-$ à m/z 1041.41 est analysée par MS/MS. Les spectres montrent un mode de fragmentation de type B et Y.

La différence de masse entre l'hexasaccharide (1041,31) et l'ion m/z 879 est de 162.1 unité de masse atomique ce qui correspond à un hexose neutre (comme un glucose ou un galactose) en position terminale.

La masse moléculaire de l'oligosaccharide correspondant à un hexamère formé par 2 désoxy-hexose (dHex), 2 hexoses (Hex), un acide uronique (HexA) et un hexose pyruvylé (PyrHex) comme le confirme le spectre de la fragmentation (Fig. 26B).

En effet, dans le domaine de faible masse, les ions m/z 145, 161, 176 et 249 ont pu être observés, correspondant respectivement à un ion B de dHex, Hex, HexA et PyrHex. Le fragment m/z 733 correspond à la perte d'un disaccharide formé d'un hexose et d'un désoxy-hexose à partir de l'ion parent. Le fragment à m/z 587 correspond à l'entité HexA-Hex-HexPyr. Comme le fragment m/z 337 est systématiquement présent (il correspond à la perte neutre de 338 uma observé sur le spectre) et que la perte seule d'un HexA n a pu être observé. Il est raisonnable de supposer que l'hexasaccharide est sous forme complètement linéaire.

En conclusion cette expérience faite sur les EPS à faible poids moléculaire de l'espèce *R. sultae* a montré la présence d'un hexasaccharide portant toujours un pyruvate et partiel un succinyl supplémentaire et/ou un groupe acétyl. Ce saccharide contient 3 hexoses (Hex), 2 désoxy-hexose (dHex) et un acide uronique (HexA) (Fig. 26C). La séquence déduite par la MS/MS, confirme celle obtenue par la RMN. Les composants polaires (Suc, Pyr) sont situés sur un coté et les composants hydrophobes (Fuc, Ac) de l'autre coté.

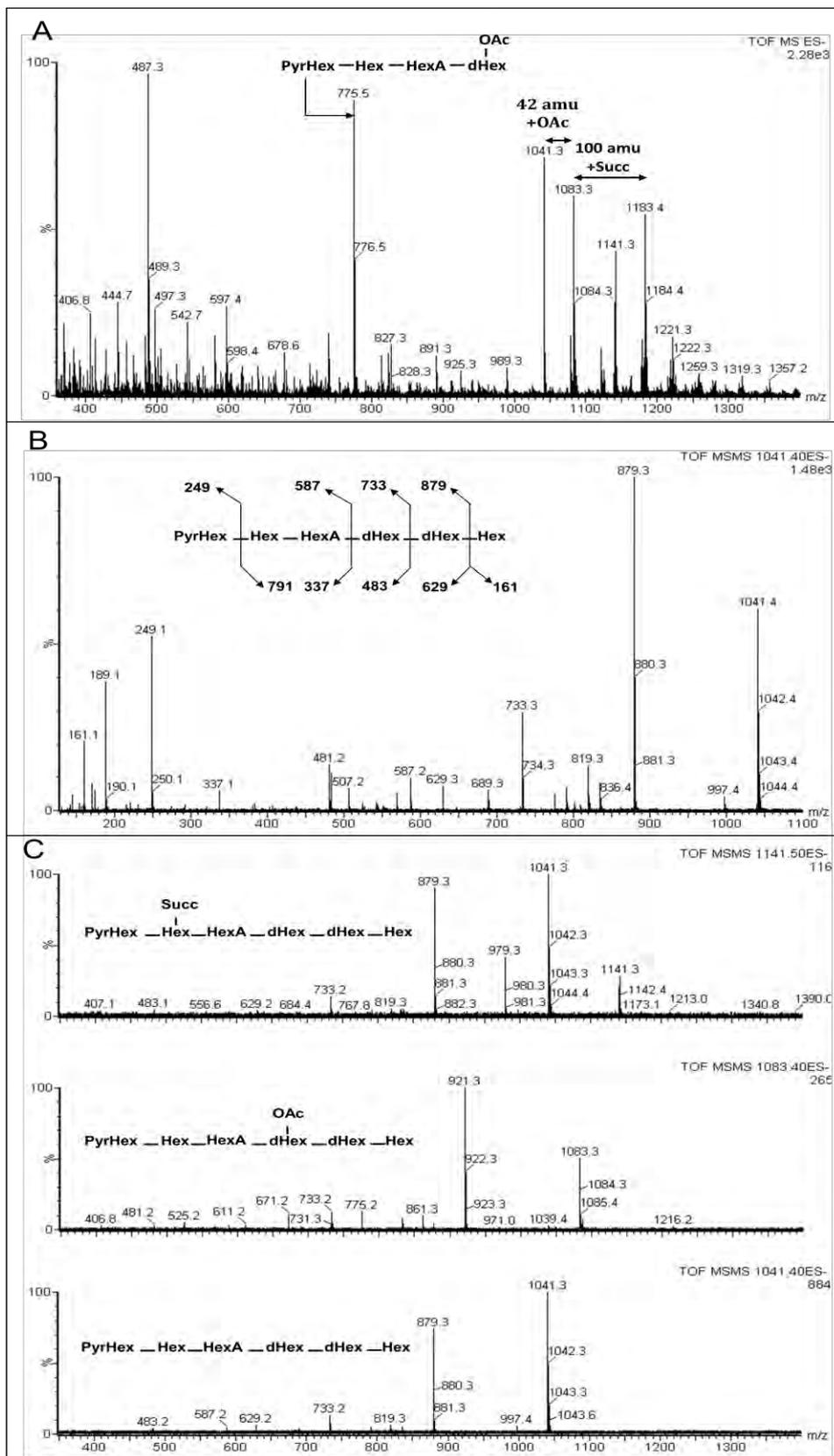


Figure 26. Spectre en mode ESI-MS négatif obtenu avec le système QqToF Ultima (waters). A : spectre MS des EPS avec introduction directe, B : spectre MS-MS de l'ion m/z 1041,4 [M-H]⁻, C : spectre MS-MS des possibles variations structurales : nue, acétylé ou succinylé (Gharzouli et al., 2013).

La RMN, et en particulier les corrélations HMBC ont été utiles pour déterminer les sucres formant l'unité répétitive, mais en raison des nombreuses corrélations, interruptions de séquence ^1H et ^{13}C et recouvrement de déplacements, une analyse ESI-MS a été nécessaire pour déterminer la séquence de cette unité. Cela met en évidence le fait que pour la caractérisation structurale des molécules complexes, il est important de coupler la spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse.

Une grande diversité dans la structure chimique des EPS peut être trouvée dans les espèces de rhizobia, concernant la composition en sucre, les types de liaisons, la taille de l'unité répétitive, le degré de polymérisation ainsi que les substituants non glucidique (Skorupska et al., 2006 ; Reeves et al., 1996).

Les polysaccharides extracellulaires sont des polymères d'hydrates de carbone complexes, spécifiques de l'espèce. La structure des EPS produits par le genre *Rhizobium* et autres espèces des *Proteobacteria* est constitué d'un grand hétéropolymère formé par des unités répétitives complexes enchainées (Spaink, 2000).

Dans notre étude, notre attention a été consacrée à une structure d'EPS de faible masse molaire particulièrement riche en fucose produite par l'espèce *R. sullivanii*. L'analyse ESI-MS des EPS de faible masse molaire de la souche RHF cultivée en présence du mannitol a montré que l'unité répétitive de ce polymère est formée par un hexamère. Les résultats de QqTof MS/MS ont montré que cette unité est formée de trois hexoses, deux désoxy-hexose et un acide uronique. Cet hexamère est pyruvylé, et peut porter un groupement O-succinyl ou O-acétyl supplémentaire.

La combinaison entre les résultats obtenus par la RMN et la spectrométrie de masse a permis de déterminer la structure de l'unité répétitive des EPS de faible masse molaire de l'espèce *R. sullivanii*. La spectrométrie de masse a donné la nature et la composition des sucres ainsi que leur enchainement. La RMN a déterminée la nature des liaisons osidiques de type : α -1,3, α -1,4 et β -1,3, et a montré que le groupement pyruvyl est porté par un glucose. Par ces deux techniques, on observe que 40% des molécules sont succinylés sur le galactose et 40% sont également substituées par un groupement O-acétyl sur un résidu de fucose (Fig. 27).

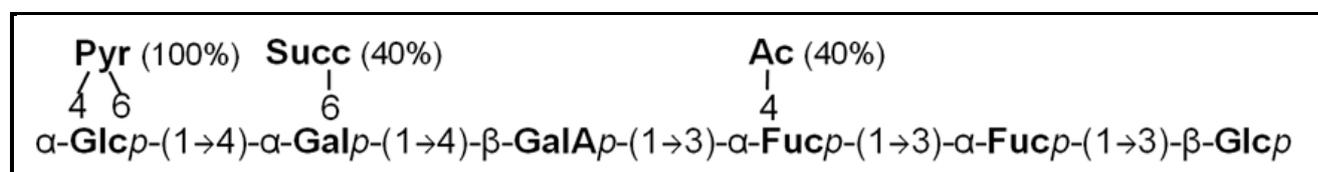


Figure 27. Structure détaillée de l'unité répétitive des EPS à faible poids moléculaire de l'espèce *R. sullivanii* (Gharzouli et al., 2013).

Il est rare de trouver des désoxy-sucres dans la structure des EPS des rhizobia. D'ailleurs, c'est la première fois que le fucose est trouvé dans la structure des EPS des bactéries du genre *Rhizobium*. Ce sucre rarement trouvé dans la structure des EPS bactérien, a été identifié généralement dans les EPS des *Enterobacter* (Pawlicki et al., 2010) ou dans les LPS rhizobiens comme par exemple des espèces *B. japonicum*, *R. leguminosarum* bv *trifolii* et bv *viciae* et *R. etli*, respectivement décrits par Carrion et al., 1990 ; Dazzo et al., 1991 ; Zhang et al., 1992 ; Noel et al., 2004.

Le glucose, le galactose et l'acide glucuronique sont couramment trouvés dans les EPS des différentes souches de l'espèce *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv *viciae*, *R. leguminosarum* bv *trifolii*, *M. loti*, *A. radiobacter* (Spaink 2000 ; Fraysse et al., 2003 ; Duta et al., 2006). La présence du mannose et de l'acide galacturonique caractérise les EPS de l'espèce *B. japonicum*. Le rhamnose et l'acide galacturonique sont trouvés chez *S. fredii* HH303 (Fraysse et al., 2003). L'unité répétitive formée par le rhamnose et l'acide glucuronique est trouvé dans les EPS nodulaire (NPS) de l'espèce *B. japonicum* et *B. elkanii* (Fraysse et al., 2003 ; Guentas et al., 2001) qui a été démontré comme étant différent des autres EPS produit par les bactéries dans les cultures isolées. Nathalie Pawlicki-Jullian et al., (2010) ont trouvé que le fucose est présent à 40% dans les EPS de l'espèce *Enterobacter ludwigii*, à 35% dans les EPS de *Raoultella terrigena* (provenant de la zone 15), à 30% chez l'espèce *Raoultella terrigena* (provenant des zone 13 et 14) et à 10% chez *Raoultella terrigena* (provenant des zones 1, 2, 4 et 5). Donc, pour la première fois nous décrivons des EPS rhizobiens contenant un taux important du fucose dans leur structure (30%). Une structure originale et qui est spécifique des EPS de l'espèce *R. sulae* nodulant spécifiquement la plante *H. coronarium* L.

8. Influence de la source de carbone sur la nodulation

L'aptitude des bactéries à infecter les racines de la plante-hôte et à induire la formation des nodules est appelée 'l'infectivité', alors que le terme 'efficacité' ou 'effectivité' désigne l'aptitude des plantes nodulées à fixer l'azote moléculaire (Beck et *al.*, 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 l'infectivité des isolats (S1, S2, S3, S4) et des souches *R. sultae* A6 et *R. sultae* RHF nous avons mesuré leur aptitude à faire former des nodules à l'espèce légumineuses *H. coronarium* L. sous des conditions bactériologiques contrôlées.

8.1. Les résultats obtenus avec les isolats (S1, S2, S3, S4)

Les résultats de ce test de nodulation diffèrent selon la source de carbone et la souche inoculée, notamment la taille et le nombre des nodules obtenus (Fig. 28).

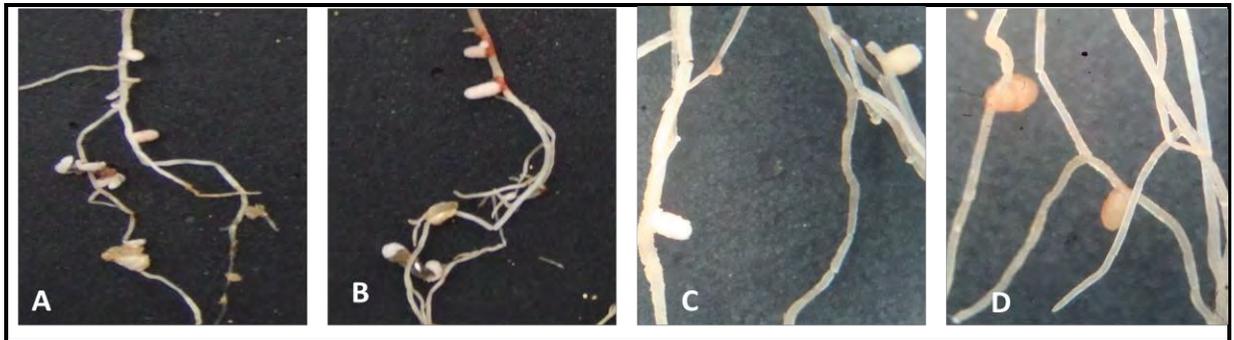


Figure 28. Résultats du test de nodulation avec l'isolat S2 cultivée en présence de différents sucres ;
A : Mannitol, B : Saccharose, C : Galactose, D : Lactose.

Les plus petits nodules (1 à 1,5mm de long) sont de couleur blanche, alors que les plus gros nodules (2,5 à 3mm) sont de couleur rose. La couleur rose des nodosités racinaires indique l'efficacité de la symbiose (présence de la leghémoglobine) (Fig. 29).

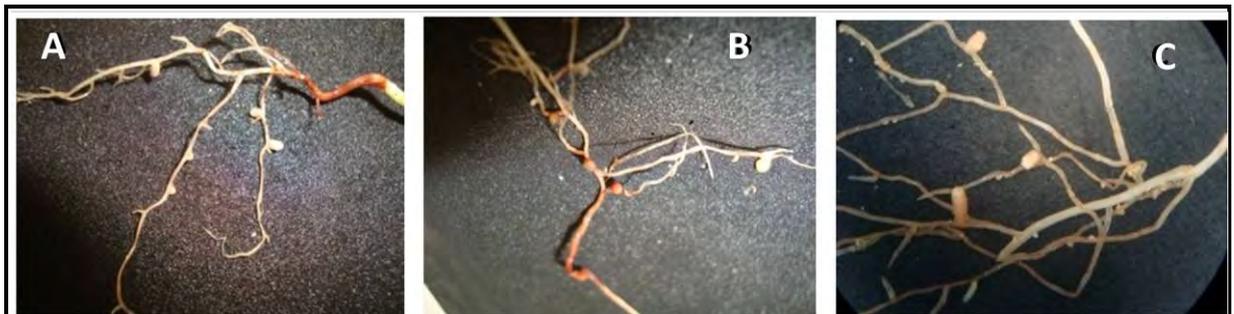


Figure 29. Résultats du test de nodulation avec l'isolat S3 cultivé en présence de différents sucres ;
A : Mannitol, B : Saccharose, C : sorbitol.

Afin d'évaluer l'influence de la source de carbone sur la capacité de nodulation, trois répétitions sont réalisées pour chaque souche/sucre. Le calcul du nombre moyen de nodules

obtenus (Tableau XII), nous a permis de tracer des histogrammes (Fig. 30) pour comparer le degré de l'influence de chaque sucre sur la capacité de nodulation.

Tableau XIII. Résultats du test de nodulation avec les souches S1, S2, S3, S4 et S5

Souche	source de carbone	Essai 1 (nombre de nodule)	Essai 2 (nombre de nodule)	Essai 3 (nombre de nodule)	Nombre Moyenne	Taille moyenne des nodules
S1	Mannitol	1	1	1	1	≤1,5 mm
	Saccharose	3	3	1	2,3	≤1,5 mm
	Glucose	3	2	3	2,7	≤2 mm
	Galactose	1	0	1	0,7	≤1 mm
	Maltose	1	2	1	1,3	<1 mm
	Lactose	1	1	0	0,7	≤1 mm
	Sorbitol	2	1	1	1,3	<1,5 mm
	S2	Mannitol	3	4	2	3
Saccharose		3	3	3	3	≤2,5 mm
Glucose		2	0	1	1	≤1 mm
Galactose		3	2	3	2,7	≤1,5 mm
Maltose		1	0	1	0,7	≤1,5 mm
Lactose		2	1	0	1	<1 mm
Sorbitol		2	3	2	2,3	<1,5 mm
S3		Mannitol	5	4	3	4
	Saccharose	6	8	8	7,3	≤2 mm
	Glucose	2	1	3	2,0	≤1,5 mm
	Galactose	1	1	1	1,0	≤1 mm
	Maltose	3	2	2	2,3	≤1,5 mm
	Lactose	2	1	2	1,7	<1 mm
	Sorbitol	3	4	5	4,00	≤2,5 mm
	S4	Mannitol	2	3	4	3
Saccharose		2	3	2	2,3	≤1,5 mm
Glucose		1	0	1	0,7	≤1 mm
Galactose		2	1	0	1	<1 mm
Maltose		1	1	1	1	<1 mm
Lactose		3	4	4	3,7	≤1,5 mm
Sorbitol		2	1	2	1,7	<1 mm

Les quatre souches ont donné une bonne infectivité en présence de mannitol et le saccharose. Le sorbitol et le maltose ont stimulé modérément la nodulation, par contre le galactose et le lactose n'ont pas stimulé la nodulation, à l'exception de la souche S4 qui a donné le maximum de nodules en présence du lactose (Fig. 30).

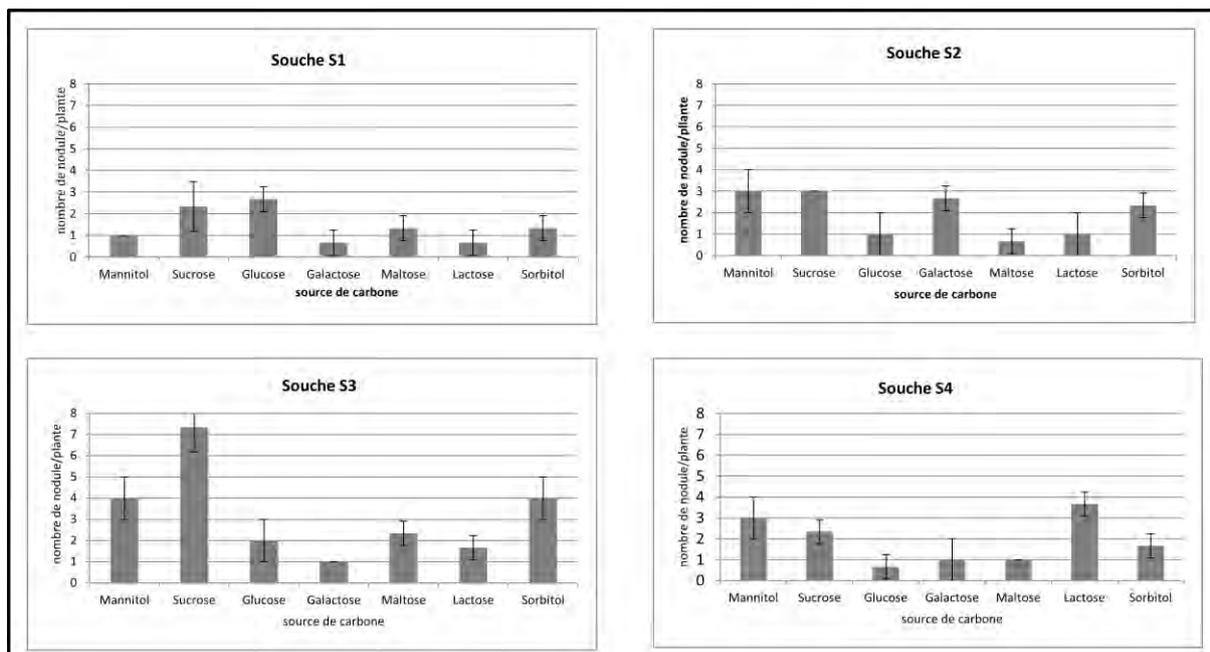


Figure 30. L'influence de la source de carbone sur la capacité de nodulation des isolats (S1, S2, S3, S4)

On note que le sucre qui stimule mieux la croissance bactérienne, permet de produire les plus grandes quantités d'EPS (Tableau IV), et permet une bonne infectivité au regard de la formation des nodules de taille importante et de couleur rose. Ceci semble confirmer l'existence d'une relation entre la quantité des EPS produites et l'infectivité des souches.

8.2. Les résultats obtenus avec l'espèce *R.sullae* A6 et *R.sullae* RHF

Deux souches de *R. sullae* A6 et RHF ont démontré leur infectivité vis à vis la plante *H. coronarium* L. par la formation des nodules de nombre et de taille variables (tableau XIV) (Fig. 31, 32).

Tableau XIV. Résultats du test de nodulation avec les souches *R. sullae* A6 et *R. sullae* RHF

Souche	source de carbone	Essai 1 (nombre de nodule)	Essai 2 (nombre de nodule)	Essai 3 (nombre de nodule)	Nombre Moyenne	Taille moyenne des nodules
<i>R. sullae</i> A6	Mannitol	3	4	2	3,0	≤ 2 mm
	Saccharose	7	18	5	10,0	≤2,5 mm
	Glucose	4	7	6	5,7	≤2 mm
	Sorbitol	3	6	2	3,7	≤2 mm
<i>R. sullae</i> RHF	Mannitol	2	3	3	2,7	≤2,5 mm
	Saccharose	2	3	4	3,0	≤1,5 mm
	Glucose	3	8	5	5,3	≤2 mm
	Sorbitol	1	1	2	1,3	≤ 1,5 mm

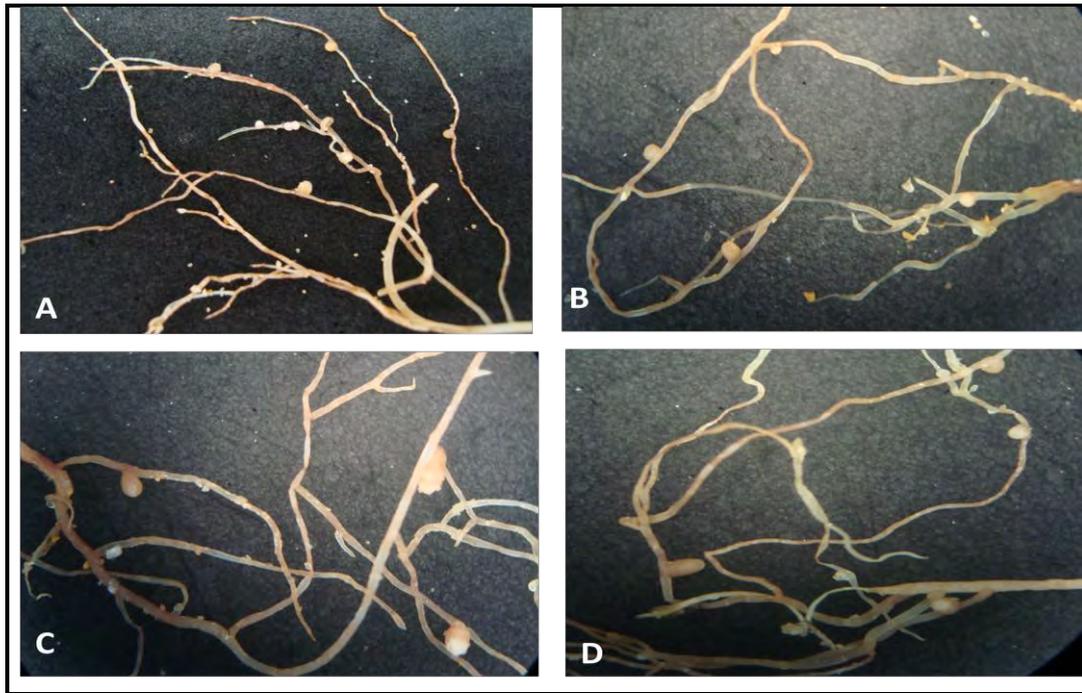


Figure 31. Résultats du test de nodulation obtenus avec la souche *R. sullae* A6 cultivée en présence du ; A : Saccharose, B : Glucose, C : Sorbitol, D : Mannitol.

La souche A6 cultivée en présence du saccharose est la plus performante puisqu'elle produit 10 nodules en moyenne. Lorsque la même souche est cultivée en présence de glucose, 5,7 nodules en moyenne ont été formés sur la racine de la plante *Sulla*. Le sorbitol et le mannitol ont aussi stimulé la nodulation mais dans une moindre mesure (3,7 et 3 nodules respectivement) (Fig.33).



Figure 32. Résultats du test de nodulation obtenus avec la souche *R. sulae* RHF cultivée en présence du; A : Glucose B : Saccharose, C : Mannitol, D : Sorbitol.

La souche F est la plus infective lorsqu'elle est mise en culture en présence de glucose (5,3 nodules en moyenne). Une faible infectivité est enregistrée en présence du sorbitol (1,3 nodules). La nodulation est moindre quand la bactérie est cultivée en présence du mannitol et saccharose (2,7 et 3 nodules respectivement) (Fig.33).

On remarque que la souche A6 est globalement plus infective que la souche RHF, ce qui est en accord avec les travaux de Benguedouar (2000). La première (A6) est isolée à partir des racines de la légumineuse spontanée *H. coronarium* L. d'un sol algérien (Constantine, Algérie) et la deuxième (RHF) isolée de la même légumineuse cultivée sur un sol Italien (Pise, Italie).

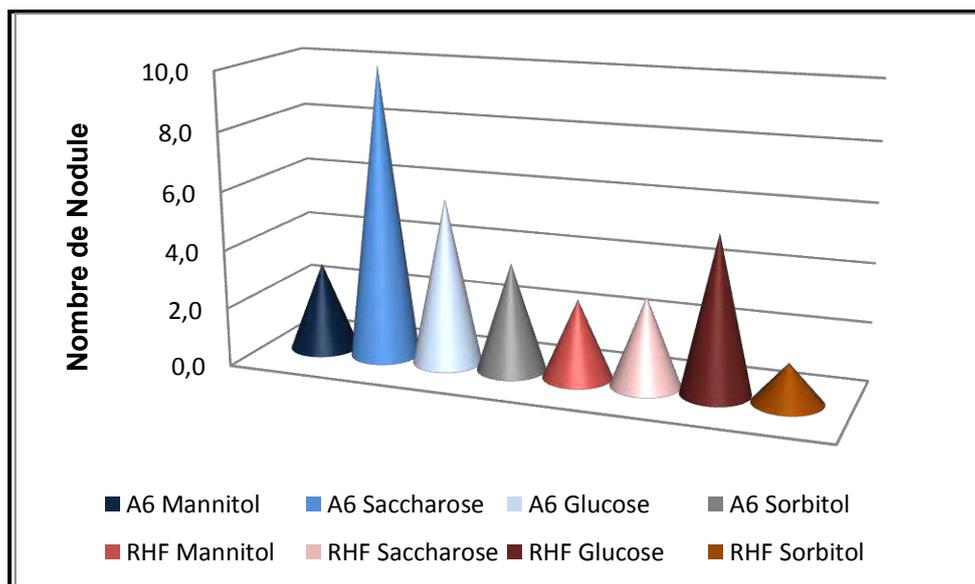


Figure 33. Influence de la source de carbone sur la capacité de nodulation des souches de *R. sullivanii* A6 et *R.sullivanii* RHF.

Les résultats obtenus avec les souches de *R. sullivanii* A6 et *R.sullivanii* RHF semblent montrer que le sucre qui permet d'avoir des quantités d'EPS totaux importantes, stimule mieux la capacité de nodulation. En effet les deux souches ont formé le maximum de nodules en présence du sucre qui donne le maximum des d'EPS totaux (la souche A6 a formé 10 nodules en moyenne en présence du saccharose, poids d'EPS totaux égale 14,0mg et la souche RHF a donné 5,3 nodules en présence du glucose, poids des EPS totaux égale 16,5mg). Ainsi le minimum de nodules est observé lorsque les souches ont produit des faibles quantités d'EPS (souche A6 : 3 nodules sont formés en présence du mannitol, masse des EPS produits est de 7,7mg et la souche RHF 1,3 nodule est formé en présence du sorbitol où le taux des EPS est de 4,3 mg seulement).

Morgante et al (2007) ont rapporté que les mutants NET30-M1024 produisent de faibles quantités d'EPS par rapport aux bactéries sauvages (NET30-wt). Cependant, les quantités produites par ces mutants varient en fonction de la source de carbone utilisée dans le milieu de culture. Le nombre de nodules obtenus après inoculation de la plante *Arachis hypogaea* L. corrèle avec la quantité des EPS produite. Ainsi les auteurs ont observé que la souche mutante qui produit 57% d'EPS par rapport au type sauvage a été la plus infective par rapport aux autres mutants qui ont été moins et/ou pas infectifs du tout. Ce résultat a permis à Morgante et ses collaborateurs de conclure que la bonne infectivité (nombre de nodules obtenus important) est due au rôle des EPS dans la suppression des réactions de défense de la plante pendant l'infection, ce qui permettent l'entrée des bactéries dans le tissu végétal et la

formation des nodules. Les EPS sont parmi les molécules responsables de l'entrée des bactéries dans le cortex des cellules racinaires et la propagation du cordon d'infection pendant la formation des nodules, et semblent nécessaires pour la suppression des réactions de défense de la plante (Niehaus et *al.*, 1997).

Les analyses moléculaires ont révélé que les étapes précoces de la nodulation, comprenant l'attraction des bactéries vers la plante, la structuration du fil d'infection et la suppression des réponses de défense de la plante, dépendent d'un échange des petites molécules de signalisation entre les deux partenaires symbiotiques (Mendrygal et Gonzalez, 2000 ; Skorupska et *al.*, 2006).

Les polysaccharides bactériens sont nécessaires pour une symbiose *Rhizobium*-légumineuse fonctionnelle (Serrato et *al.*, 2008). Les exopolysaccharides (EPS), les lipopolysaccharides (LPS), les polysaccharides capsulaires (KPS) et les glucanes cycliques sont importants pour la formation du cordon d'infection et le développement des nodules (Lloret et *al.*, 1998).

Janczarek et ses collaborateurs (2003) ont rapporté que les exopolysaccharides (EPS) produits par les bactéries du genre *Rhizobium* jouent un rôle important dans l'association symbiotique avec les légumineuses qui forment des nodules de type indéterminé. Or *Hedysarum coronarium* L. est l'une des plantes légumineuses caractérisées par la formation des nodules de type indéterminé (Tola et *al.*, 2009).

Les mutants des rhizobia déficients dans la synthèse des EPS sont capables d'induire la formation des nodules. Cependant, ces nodules sont vides et incapables de fixer l'azote, contiennent un nombre réduit des cellules intracellulaires (bactéroïdes). (Caetano-Anolles et *al.*, 1990).

Afin de comprendre quel(s) paramètre(s) influence(nt) la variation de la nodulation, nous avons procédé à une étude de relation structure/activité, et nous nous sommes intéressés à la relation : production des EPS/composition des EPS/capacité de nodulation (Fig.34).

En ce qui concerne la souche RHF, la corrélation entre les 3 paramètres est significative. Par exemple, le plus fort taux de fucose (50%) est atteint lorsque la source de carbone est le glucose (tableau X) ce qui correspond à la plus forte nodulation (5.3 nodules en moyenne). Lorsque la source de carbone est le sorbitol, le taux de fucose est plus faible (27,5% environ) et la nodulation est faible (1.3 nodule en moyenne).

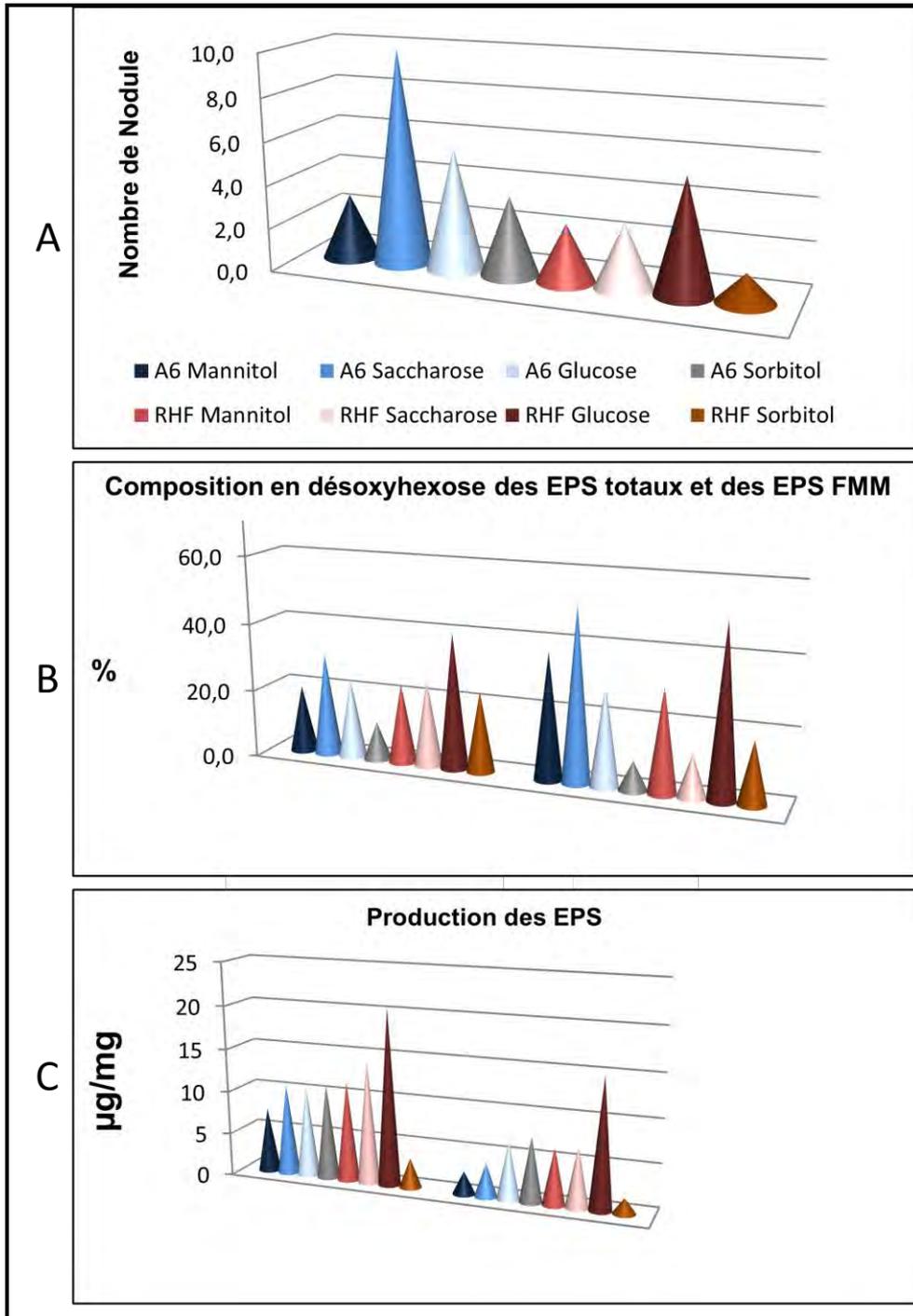


Figure 34. La corrélation entre ; A : la capacité de nodulation qui représente l'activité symbiotique des souches de *R. sultae* en présence de différentes sources de carbone. B : le taux des désoxy sucre dans la composition des EPS totaux et les EPS à FMM. C : le taux de production des EPS totaux et les EPS à FMM en fonction des différentes sources de carbone.

De plus, pour ces deux exemples, la production des EPS de FMM, est forte (15.0 µg/mg) lorsque le glucose est la source de carbone, mais faible (1.8 µg/mg) lorsque le sorbitol est la source de carbone. Ce qui appuie l'hypothèse que le fucose contenu dans les EPS de

FMM influe la nodulation. Les deux autres sources de carbone présentent des valeurs intermédiaires pour le taux de fucose dans les EPS à FMM (30,5 et 37,5%) et leurs productions (6.6 et 7.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$) et par conséquent des nodulations moyennes (2.7 à 3.0 nodules).

Pour la souche A6, on observe une importante variabilité biologique, notamment lorsque la source de carbone est le glucose. Les corrélations entre la production, la composition et la nodulation sont, de ce fait, moins significatives. Par exemple, lorsque le saccharose est la source de carbone, le taux de fucose est d'environ 50%, et le nombre total de nodule est le plus important (10 en moyenne). Or la production est 2 fois plus faible pour A6/saccharose que pour A6/glucose, qui présente un taux de fucose très variable dont la moyenne est environ de 30%. Malgré un équilibre du taux de fucose total à la surface de la bactérie, la nodulation d'A6/glucose est 2 fois plus faible que pour A6 avec le saccharose comme source de carbone. Si l'on observe, en revanche, le taux de fucose des EPS totaux d'A6/saccharose et A6/glucose (tableau IX), celui-ci est plus important pour A6/saccharose. De plus, la production d'EPS totaux est très comparable pour ces deux sources de carbone, ce qui pourrait expliquer qu'A6/saccharose est d'une nodulation plus importante qu'A6 glucose, puisque le taux de fucose total est plus fort.

Notons aussi un autre cas, pour la souche A6, lorsque le sorbitol est la source de carbone, il n'y a pas de fucose dans les EPS à FMM, ni dans les EPS totaux, en revanche, la présence de rhamnose est détectée en GC-MS (tableau IX). La nodulation semble ne pas être influencée par le fait que le désoxyhexose soit différent, de plus la production des ESP à FMM est la plus importante (7.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$) ce qui pourrait compenser le taux assez faible en désoxyhexose (8.5%). Cette production plus importante rend A6/sorbitol comparable à A6/mannitol vis-à-vis de la nodulation. En effet, pour A6/mannitol le taux de fucose est de 37% et la production de 2.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (la plus faible des A6). Pour ces deux sources de carbone, la nodulation est quasi-identique soit 3.7 et 3.0 nodules au total.

9. Activité symbiotique des EPS de masse molaire et de haute masse molaire de l'espèce *R. sultae*

Pour les jarres témoins, les souches sauvages A6 et RHF ont démontré leur infectivité par la formation des nodules de couleur rose, alors que les souches mutantes (A6m et F2s) déficientes dans la production des EPS sont incapables d'infecter les racines de la plante hôte (Fig. 35).

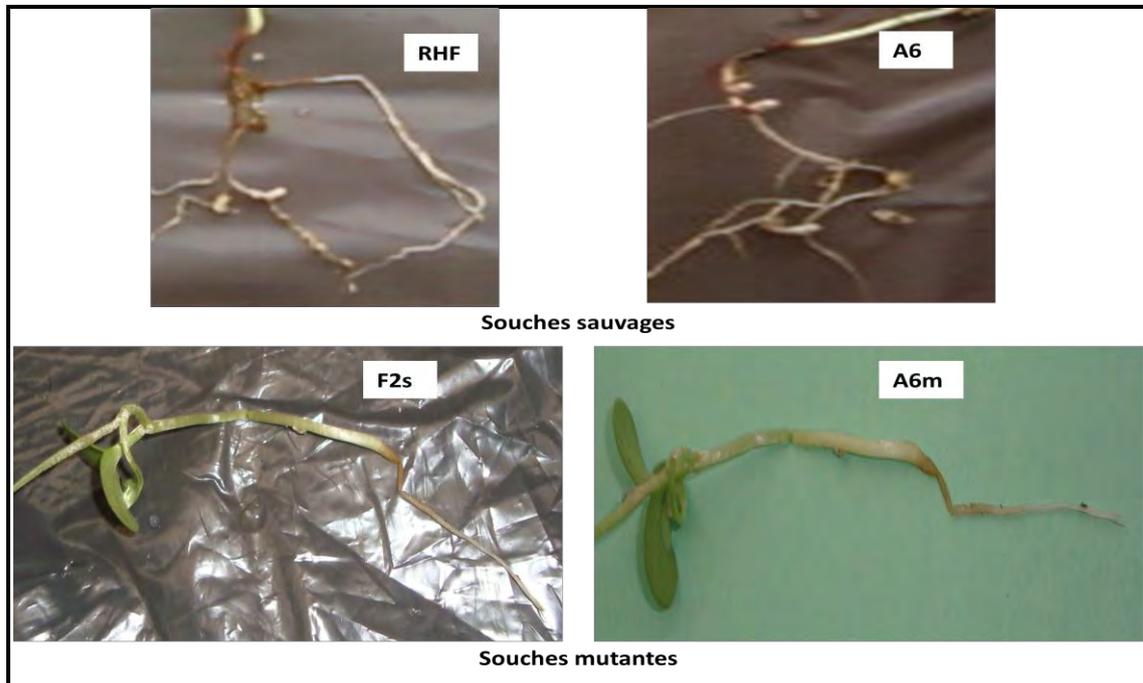


Figure 35. Résultats du test de nodulation ; test positif avec les souches sauvages (RHF et A6) et négatif avec les souches mutantes (F2s et A6m).

La co-inoculation des plantes par les bactéries mutantes additionnées d'EPS de faible masse molaire à des concentrations de 1 mg/ml à 5 mg/ml a pu restaurer la capacité de nodulation avec les souches mutantes F2s et A6m. A une concentration de 4mg/ml et 5mg/ml les EPS de haute masse molaire ont influencés d'une façon remarquable la capacité de nodulation des souches mutantes par la formation de nodules de petite taille et de couleur blanche (Fig. 36).

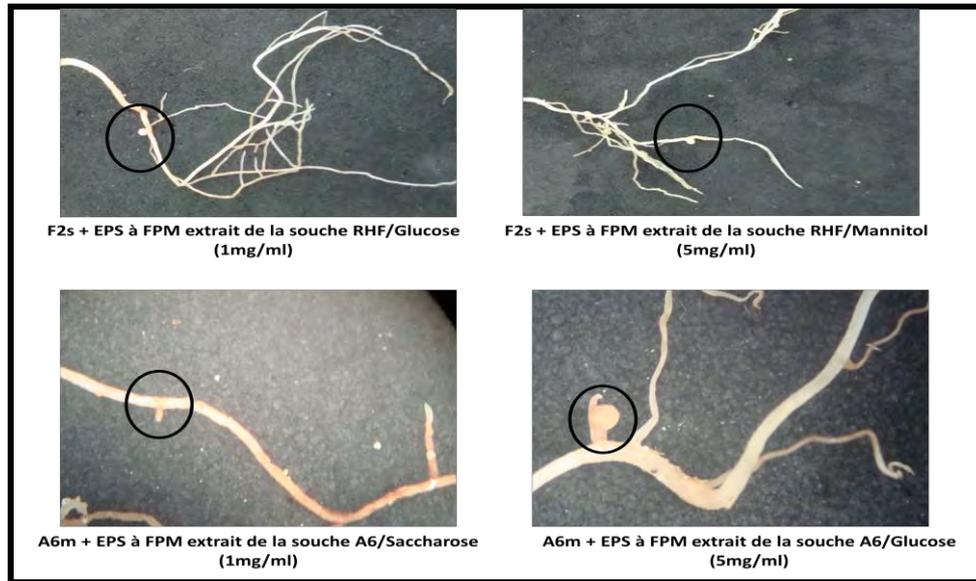


Figure 36. La co-inoculation des graines par des mutants et des solutions des EPS à faible poids moléculaire a permis de restaurer la capacité de nodulation.

Ce sont uniquement les EPS de haute masse molaire des souches A6 et RHF cultivées en présence du saccharose et préparés à une concentration de 2mg/ml et 1mg/ml respectivement qui ont restauré l'infectivité des souches mutantes (Fig. 37).



Figure 37. La co-inoculation des graines par des mutants et des solutions des EPS à haut poids moléculaire a permis de restaurer la capacité de nodulation.

Les résultats de ce test de nodulation nous laissent suggérer que les EPS de faible masse molaire de l'espèce *R. sultae* sont importants pour une reconnaissance et une interaction symbiotique entre la bactérie et la plante-hôte.

Plusieurs études effectuées sur des mutants de *Rhizobium* ont montré que les EPS jouent un rôle majeur dans l'infection des racines des plantes légumineuses (Spaink, 2000).

Les EPS de faible masse molaire de type EPS I, EPS II et les KPS trouvés chez *S. meliloti* sont nécessaires pour l'élongation du cordon d'infection, bien que les trois polysaccharides

n'ont pas la même efficacité à moduler le processus de nodulation (Brewin 1998; Lepek et D'Antuono 2005). Ganzalez et ses collaborateurs (1996, (b)) ont rapporté que l'addition des EPS de faible masse molaire sur des mutants *exo⁻* restaure leur capacité de nodulation, ce qui indique que ces molécules ont une fonction de signalisation plutôt qu'une fonction structurale dans la formation du cordon d'infection (Ghosh et *al.*, 2005).

En plus des facteurs Nod, les exopolysaccharides (EPS) rhizobiens ont été proposés comme des molécules de signalisation spécifique de l'hôte et nécessaires pour l'attachement des bactéries aux poils racinaires (Ganzalez et *al.*, 1996 (b), Pelloket *al.*, 2000).

Plusieurs travaux ont montré que la production des EPS est nécessaire pour l'invasion racinaire des légumineuses qui forment des nodules de type indéterminé (Laus et *al.*, 2004, Rolfe et *al.*, 1996). Cependant, les mutants déficients dans la production des EPS sont altérés pour une induction efficace, en particulier au niveau du recourbement des poils racinaires et la formation du fil d'infection (Pellock et *al.*, 2000; van Workum et *al.*, 1998). Le recourbement des poils racinaires et la formation du cordon d'infection peuvent être restaurés par une co-inoculation des mutants avec des petites quantités d'EPS pures (Laus et *al.*, 2005). Skorupska et Krol (1995) sont parmi les premiers à prouver que l'addition des quantités pures des EPS à faible poids moléculaire à des mutant *exo⁻* de l'espèce *R. leguminosarum* bv *trifolii* 241 permet la restauration de la formation des nodules efficaces capables de fixer l'azote atmosphérique chez la plante hôte.

10. Etude des propriétés du plasmide symbiotique de l'espèce *R. sulae* et son rôle dans la nodulation

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides (*exo/exs* ou *pss*) forment un grand groupe de gènes situé sur le plasmide symbiotique pSymB (Skorupska *et al.*, 2006).

Ces gènes codent pour la synthèse des deux types d'EPS : les succinoglycanes (EPSI) et les galactoglycanes (EPSII). La biosynthèse d'EPS I est dirigée par le produit des gènes *exo*, par contre l'EPS II est produit par les enzymes encodés par les gènes *exp* (Kaufusi *et al.*, 2004).

Les mutants déficitaires dans la production d'EPS utilisés dans notre travail (A6m et F2s) se caractérisent par un aspect sec et rugueux sur le milieu YMA, ces mutants sont sélectionnés dans des conditions d'obscurité en présence du calcofluor (0,02%). Les souches mutantes ont une faible fluorescence sous la lumière UV, en opposition avec la fluorescence élevée des souches sauvages. Un tel phénotype indique une mutation au niveau de la production de succinoglycane (EPSI), dont les gènes sont localisés sur le plasmide pSym B (Kaufusi *et al.*, 2004).

Après l'application du protocole de transformation, les bactéries sont cultivées sur le milieu YMA additionné du calcofluor (0,02%).

Les souches transformées sélectionnées donnent des colonies fluorescentes, lisses et visqueuses par rapport aux souches témoins (souches mutantes F2s, A6m et la souche *E.coli*) qui donnent des colonies non fluorescentes, sèches et rugueuses (Fig. 38).

Le retour au phénotype sauvage indique probablement l'incorporation de l'ADN plasmidique par les souches transformées, ce qui permet la restauration de la production d'EPS chez les souches mutantes et l'acquisition de nouveau caractère (production des EPS spécifiques aux rhizobia) par la souche *E.coli*.

L'irradiation par la lumière Ultraviolette est parmi les agents utilisés pour provoquer un cure plasmidique (perde du plasmide) ou pour créer des mutations génétiques. Lorsque l'irradiation par UV provoque des dommages sur l'ADN plasmidique, ces derniers peuvent ne pas induire efficacement les systèmes de réparation de l'ADN par la bactérie (Chattoraj *et al.*, 1984). Ceci indique qu'une mutation située sur le plasmide peut persister par rapport à une mutation située sur le chromosome. La réapparition du phénotype sauvage des souches

transformées, nous laisse suggérer que probablement les souches mutantes utilisées portent des mutations sur les gènes plasmidiques et non pas sur les gènes chromosomiques.

Brom et ses collaborateurs (1991) ont montré que les plasmides portés par l'espèce *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42 se caractérise par des fréquences de réarrangement importantes tel que des délétion, amplification et des co-intégrations.

L'acquisition de nouveaux gènes symbiotiques peuvent présenter un avantage écologique du genre *Rhizobium*, probablement la capacité de nodulation de certaines plantes, perdu après plusieurs repiquages ou par mutation (Ibanez et *al.*, 2009).

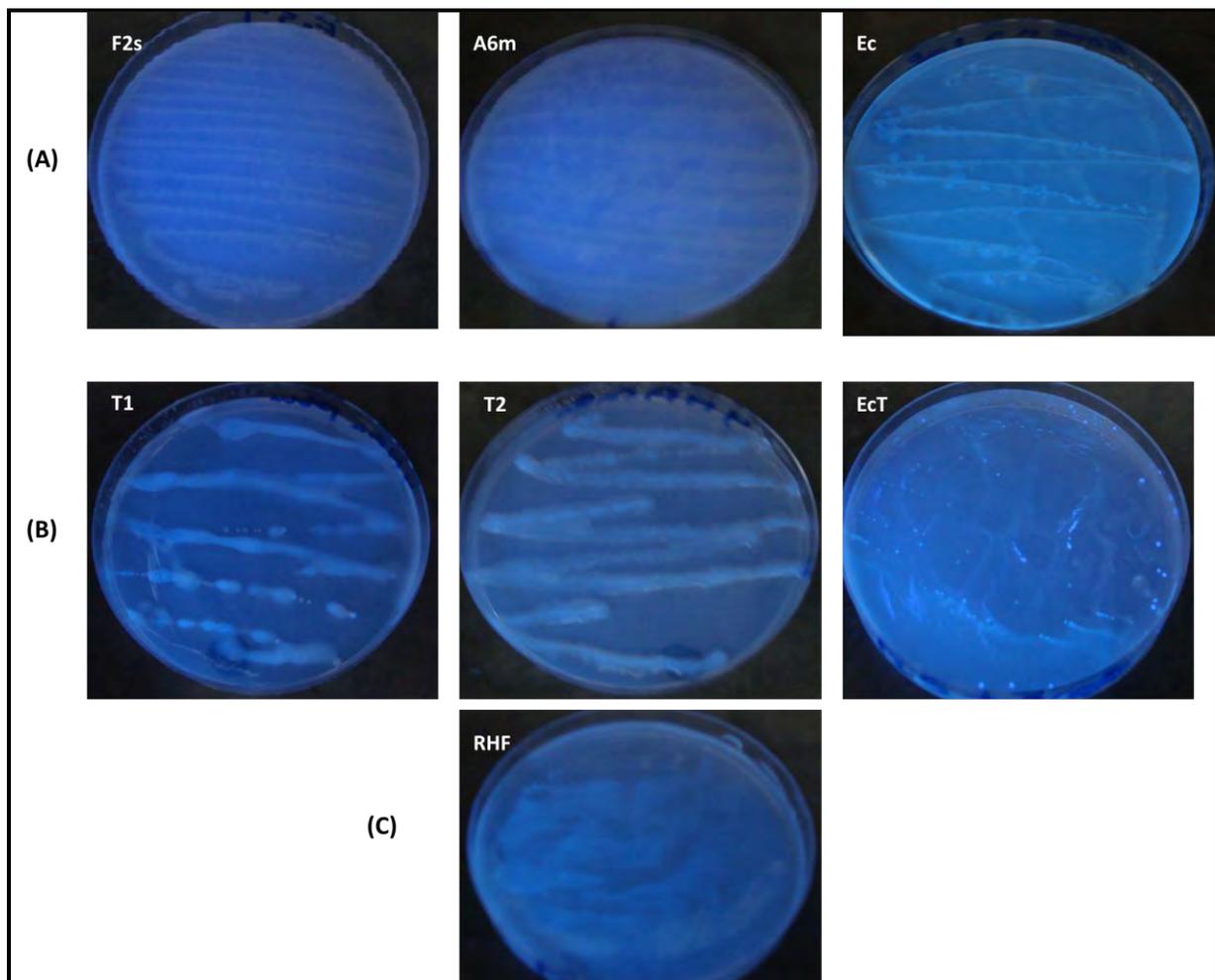


Figure 38. Aspect des colonies sous UV sur milieu YMA contenant le Calcofluor. (A) : aspect sec, rugueux et non fluorescent des souches mutantes et *E. coli*. (B) aspect lisse et fluorescent des souches transformées sélectionnées (T1 : F2s transformée par l'ADN plasmidique de souche RHF, T2 : A6m transformée par l'ADN plasmidique de la souche A6, EcT : *E. coli* transformé par l'ADN plasmidique de la souche RHF). (C) : aspect lisse et fluorescent de la souche sauvage RHF.

10.1. Profil d'ADN plasmidique sur gel d'agarose

La présence de l'ADN plasmidique chez les trois types de souches (sauvages, mutantes, transformées) est vérifiée par un profil d'ADN sur le gel d'agarose (1%).

La migration d'ADN plasmidique sur gel d'agarose a montré des spots d'ADN de taille identique pour les trois types de souches (sauvages, mutantes et transformantes).

10.2. Capacité de nodulation des souches après transformation

Après une période de culture de six semaines dans une chambre de culture sous des conditions contrôlées, les plantes sont prélevées pour évaluer la formation des nodules.

Les souches sauvages ont montré leur infectivité par la formation des petits nodules (Fig. 39 A). Alors que les souches mutantes sont incapables d'infecter les racines de la plante hôte (Fig. 39 B).

Les deux souches transformées T1 et T2 ont montré leur infectivité par la formation d'un petit nodule sur les racines de la plante *sulla* (Fig. 39 C). Ce que nous laisse suggérer que la restauration de la synthèse des EPS après transformation bactérienne a permis aux bactéries d'infecter les racines de la plante hôte. Cette capacité de nodulation indique la présence chez les bactéries transformées de tout le matériel génétique nécessaire au processus de nodulation ainsi d'une spécificité entre la bactérie et la plante.

Le plasmide pSymB porte les gènes nécessaires pour la biosynthèse des exopolysaccharides qui sont nécessaires pour l'établissement d'une relation symbiotique (Mendoza et *al.*, 2005).

Par contre, la bactérie transformée de la souche *E. coli* (EcT), malgré l'acquisition de nouvelles versions de gènes d'origine rhizobial, et malgré l'aspect lisse des colonies, demeure toujours non infective pour la plante légumineuse *sulla*, puisqu'elle ne dispose pas tout le matériel génétique nécessaire au processus de nodulation.

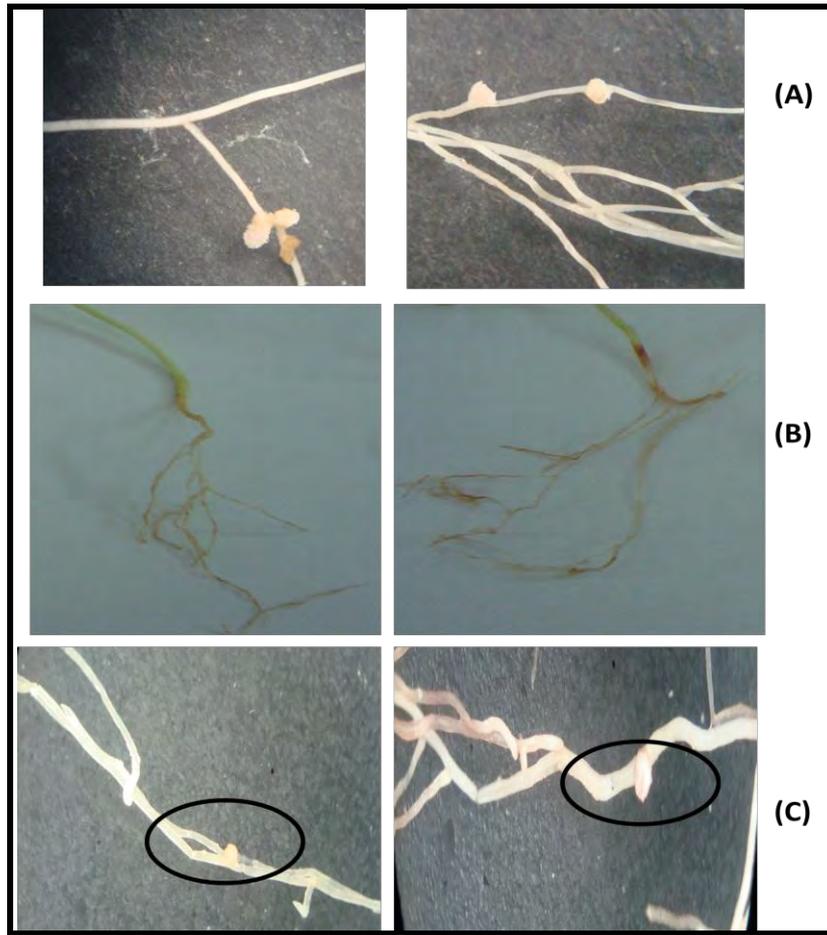


Figure 39. Test de nodulation positif avec les souches sauvage (A), les souches mutantes sont non infectives (B), restauration de l'infectivité avec les souches transformées (C).

Les gènes impliqués dans la nodulation et dans la fixation d'azote (*nod*, *nif* et *fix*) sont habituellement localisés sur un ou plusieurs plasmides de grande taille (pSym) ou sur des régions chromosomiques. En plus, ces plasmides contiennent des gènes bénéfiques à la survie et à la compétitivité des rhizobiums dans la rhizosphère, des gènes impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides et lipopolysaccharides, de l'utilisation des différentes sources de carbone ainsi que les gènes nécessaires au transfert conjugatif des plasmides (Ding et Hynes, 2009).

Plusieurs travaux ont mis en évidence un transfert horizontal des plasmides portés par les espèces du genre *Rhizobium*, ce transfert joue un rôle important dans l'évolution des rhizobiums particulièrement dans leur capacité à établir une fixation d'azote symbiotique. Ainsi le transfert des plasmides entre espèces différentes peut jouer un rôle dans la génération de nouvelles souches dans le sol (Ding et Hynes, 2009).

Escherichia coli est un bon modèle pour l'étude des propriétés des gènes (application de la transformation) dans laquelle les échanges génétiques sont facilement réalisables. Les

plasmides portés par cette espèce sont souvent utilisés pour la construction des vecteurs de clonage afin d'étudier la régulation des gènes des espèces du genre *Rhizobium*, comme l'espèce *R. meliloti* 41 et *A. tumefaciens* GV2260 (Ferencsi et al., 2004).

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

La présence d'un plasmide de grande dimension ou mégaplasmide (Psym) est une caractéristique intéressante dans toutes les espèces du genre *Rhizobium*. Les gènes impliqués dans la nodulation (Nod) et la fixation de l'azote (Fix, Nif) dans les souches de *Rhizobium* sont situés sur ce simple réplicon symbiotique, des gènes codant pour des bactériocines et pour la production des pigments sont aussi présents (Werner, 1992, Pelmont, 1995, Patricia et al., 1998).

Après le séquençage complet de l'espèce *S. meliloti*, il apparait que seulement 2 sur 11 régions sont engagés dans la biosynthèse des exopolysaccharides qui sont localisées sur le plasmide PsymB. 14% de ce plasmide (223 Kpb) portent des gènes dont leur fonction est impliquée dans la biosynthèse des polysaccharides (Skorupska et al., 2006).

Chez l'espèce *S. meliloti* plusieurs régulateurs de la synthèse des EPS I et II ont été identifiés sur le chromosome (*exo R*, *exo S*, *exp R*, *Syr M*, *muc R* et *exo D*) et sur le mégaplasmide PsymB (*exs B*, *exp G* et *exo Y*) (Janczarek et Skorupska, 2011).

Le gène *pss A* trouvé chez *R. leguminosarum* code pour le premier enzyme impliqué dans la synthèse d'EPS. Une mutation au niveau de ce gène conduit à un phénotype non mucoïde des colonies bactériennes et conduit à la formation des nodules non infectifs (Skorupska et al., 2006). L'incorporation chez ce type de mutants des plasmides portant le gène *pss A* permet la restauration du phénotype mucoïde aux colonies et la production d'EPS.

L'étude de la transmission des plasmides constitue un moyen efficace de contrôle de leur rôle fonctionnel et évolutif. Ces réplicons contribuent à la plasticité des génomes, intervenant dans le processus d'adaptation et de divergence bactérienne (Tejerizo et al., 2010).

**Discussion
Générale
et
Conclusion**

Discussion Générale et Conclusion

Les polysaccharides de surface des rhizobia jouent un rôle fondamental dans la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote. La compréhension des mécanismes d'action, en relation avec la structure des polysaccharides de surface des rhizobia, permettrait de mieux appréhender et maîtriser les processus d'infection qui sont à la base de cette symbiose. Le fait de mieux comprendre les différents processus clés peut permettre de mieux intégrer la symbiose légumineuse-*Rhizobium* dans les cycles de culture afin d'aller vers un développement durable.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux exopolysaccharides produits par l'espèce *R. sullivanii*, le microsymbiote spécifique de la légumineuse *H. coronarium* L., plante spontanée et cultivée, largement distribuée en Algérie. Ces polymères sont particulièrement importants pour une invasion et élongation du cordon d'infection, étapes clé dans la formation des nodules de type indéterminé produits par cette plante.

Nos souches ont montré une production d'EPS, la production importantes des polysaccharides de surface fait partie des principales caractéristiques des bactéries appartenant au genre *Rhizobium*.

Les souches de *R. sullivanii* sont capables de produire des EPS de haute masse molaire et des EPS de faible masse molaire. Le taux de croissance des bactéries et le rendement de production sont significativement influencés par la source de carbone utilisée dans le milieu de culture. Plusieurs enzymes sont impliqués dans la synthèse des EPS, dont l'activité peut être influencée par la source de carbone utilisée lors de la culture bactérienne. La biosynthèse des EPS est un processus génétiquement contrôlé. Les gènes codant pour la biosynthèse et la régulation de production des EPS (*exo/exs* ou *pss*) forment un large groupe localisé sur le chromosome et sur le mégaplasme symbiotique (Skorupska et al., 2006). Chez les espèces du genre *Rhizobium*, la biosynthèse des EPS est influencée par plusieurs paramètres environnementaux (source de carbone, source d'azote, température, pH...). L'existence d'un processus très complexe de la transcription et post-transcription a été rapporté (Becker et Pühler, 1998).

Dans notre étude, nous avons observé que chez l'espèce *R. sullivanii* la source de carbone influe fortement sur le taux de production des EPS/g de bactérie, sur la proportion des EPS HMM /FMM et sur la composition saccharidique des EPS. Ils sont principalement constitués de sucres neutres. Cette technique révèle la présence d'hexoses (glucose, galactose, mannose), de désoxysucres (fucose, rhamnose) et d'acides uroniques (acide galacturonique).

Jusqu'à nos jours aucune publication n'a rapporté la présence du fucose dans la structure des EPS de bactéries appartenant au genre *Rhizobium*. Le fucose a été trouvé dans les EPS d'*Enterobacter* avec un pourcentage variant de 40% à 10%. La présence d'un taux important de fucose dans les EPS de *R. sullivanii* a prouvé que nous sommes en présence d'une nouvelle classe d'EPS de *Rhizobium*.

Les EPS de HMM et de FMM de la même souche n'ont pas la même composition, indiquant que les divers types d'EPS contribuent aux deux classes différentes d'EPS. On note que le saccharose augmente le taux de fucose dans les EPS de la souche A6, contrairement au sorbitol qui a bien stimulé l'apparition du Rhamnose. Il est intéressant de signaler la présence d'EPS de HMM riches en mannose quand la souche RHF est cultivée en présence du mannitol.

Il est à noter, que dans notre étude et pour la première fois une nouvelle catégorie d'EPS riches en désoxysucres est mise en évidence. Sa composition et sa production dépendent de la source de carbone utilisée par la bactérie.

La mesure de la viscosité n'a pas été de déterminer le paramètre qui influe sur la viscosité, puisque plusieurs travaux ont déjà confirmé l'influence de la composition et la taille sur les propriétés rhéologiques des polysaccharides. Le but est d'essayer de mettre en évidence parmi les trois critères : composition, taille et viscosité lequel est déterminant pour l'activité symbiotique des EPS.

Certains travaux ont rapporté que la présence de désoxyhexoses dans les EPS suggère que la viscosité des EPS pourrait en être renforcée (Meyer et al., 2009 ; Yemmas et al., 2003). Nos résultats ne mettent pas en évidence une telle corrélation. A l'exception de la viscosité des EPS de FMM qui semble être reliée au taux de fucose pour les deux souches. Pour les EPS de HMM aucune relation n'est mise en évidence entre les valeurs de la viscosité relative et la composition des EPS (tableau VII, IX).

Afin de comprendre pourquoi l'espèce *R. sullivanii* est capable de se développer dans des sols très secs (Tola et al., 2009), nous avons étudié la résistance à la sécheresse des différentes souches en présence de diverses sources de carbone et montré que la vitesse de reprise de la croissance est liée à la présence des EPS.

Il semble que les EPS permettent aux bactéries de mieux résister à la sécheresse. Si l'enveloppe d'EPS est plus visqueuse, elle sera plus rigide, plus hydratée et la bactérie sera d'autant plus protégée des variations d'humidité de son environnement (Potts, 1994).

La réalisation d'une étude par RMN et de spectrométrie de masse nous a permis de déterminer la structure de l'unité répétitive des EPS I de la souche RHF cultivée en présence du mannitol. Cette unité est un hexamère formé du Glc, Gal, Fuc, GalA : 2 :1 :2 :1 liés entre eux par des liaisons osidique de type α -1,3, α -1,4 et β -1,3. L'unité répétitive est substituée par un pyruvyl porté par un glucose, 40% de la molécule peut être succinylé sur un galactose et 40% substitué en plus par un acétyl porté par un résidu de fucose.

Le glucose, le galactose et l'acide glucuronique sont souvent trouvés dans la structure des EPS des différentes souches rhizobienne telles que *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv *viciae*, *R. leguminosarum* bv *trifolii*, *M. loti*, *A. radiobacter* (Spaink 2000 ; Fraysse et al., 2003 ; Duta et al., 2006). Ce qui apparait intéressant et original dans la structure des EPS de l'espèce *R. sultae* est la présence d'un taux très important de fucose (2 résidu/6 résidu par unité répétitive).

En plus de leur rôle dans la protection, les EPS possèdent une activité symbiotique importante notamment dans la suppression des réactions de défense de la plante lors de l'infection (Niehaus et al., 1993, 1997; van Workum et al., 1998). Par conséquent, nous avons étudié l'infectivité des souches produisant des EPS différent dans leur structure.

Les deux souches de *R. sultae* étudiées (A6 et RHF) présentent une capacité à infecter la plante *Hedysarum coronarium* L. Cette interaction est caractérisée par la formation de nodules, de nombre et de taille variable, selon la souche et la source de carbone mise à la disposition des bactéries.

L'inoculation de la plante par des mutants déficients dans la production des EPS n'a montré aucune infectivité, aucun nodule n'est formé. Les EPS sont considérés comme des molécules de signalisation nécessaires pour la reconnaissance et l'adhésion des bactéries aux poils racinaires de la plante.

Nous avons constaté que le taux de désoxyhexose dans les EPS de FMM (Fig. 34B), influence la nodulation (Fig. 34A), en fonction de la quantité de d'EPS de FMM produite par la souche/source de carbone (Fig. 34C).

Plus généralement, le taux de fucose dans les EPS de FMM rapporté à la production, influence la nodulation. Cependant pour la souche RHF, la nodulation est toutefois moins importante que pour la souche A6, malgré des taux de désoxyhexose et de production du même ordre de grandeur (excepté pour la production de RHF/glucose).

L'addition de suspensions d'EPS de FMM et HMM a permis la restauration de la capacité de nodulation chez les mutants. Les EPS de FMM ont montré une activité symbiotique plus importante que ceux de HMM. Ces derniers ont montré leur activité à partir des concentrations importantes (4 à 5mg/ml).

Afin d'étudier les propriétés du plasmide symbiotique porté par les souches de *R. sultae*, une technique de transformation bactérienne par choc thermique est appliquée. L'incorporation du plasmide dans les souches mutantes a restauré l'aspect visqueux des colonies donc la capacité à produire les EPS, ce qui permet à ce type de souches de noduler à nouveau la plante *H. coronarium* L.. La restauration de l'infectivité est liée à la production d'EPS. Un grand nombre de gènes nécessaires pour la synthèse des EPS est localisé sur le plasmide symbiotique, leur introduction dans un système qui permet leur expression, a permis à nouveau la synthèse des EPS sur la surface des bactéries transformées.

Le développement des nodules nécessite la synthèse et la perception des molécules de signalisation en particulier les facteurs Nod et les polysaccharides de surface bactérienne qui jouent un rôle important dans les étapes précoces de la formation des nodules.

Chez *R. leguminosarum* et *S. meliloti*, en absence d'EPS, le cordon d'infection ne progresse pas et des aberrations (poches) apparaissent. Ainsi, les EPS jouent un rôle dans l'inhibition des réactions de défense des plantes, dans la progression du cordon d'infection, dans l'organisation du cytosquelette des racines et la redirection de la croissance de bout des poils racinaires (Morgante et al., 2007). Kumari et ses collaborateurs (2009) ont rapporté que les EPS nodulaires contribuent à la fixation de l'azote peuvent contribuer avec la leghémoglobine en empêchant les pressions élevées de l'oxygène.

Il a été souvent indiqué que la production d'une variété de polysaccharides symbiotiquement actifs permet aux souches de rhizobia de s'adapter aux conditions environnementales et d'interagir efficacement avec les plantes légumineuses.

Parmi le grand nombre de gènes connus chez les rhizobia nécessaires à l'initiation et l'élongation du cordon d'infection, on cite les gènes responsables de la production des différents types de polysaccharides. L'utilisation des mutants déficients dans la production des EPS a été souvent utilisée pour étudier les fonctions des gènes codant la synthèse des EPS, qui sont principalement localisés sur le mégaplasmide symbiotique P_{sym} (Skorupska et al., 2006).

Afin de comparer la structure des EPS de HMM et de FMM produits par l'espèce *R. sultae*, il semble intéressant de reprendre l'identification structurale des EPS de HMM, notamment la réalisation d'une RMN solide et d'une spectrométrie de masse pour déterminer la structure détaillée de l'unité répétitive. Il est aussi important d'étudier les EPS des bactéries transformées et de faire une transformation avec un plasmide P_{sym} d'une bactérie qui produit des EPS non fucosylés ainsi d'étudier les EPS d'autres bactéries nodulantes des légumineuses (BNL).

Vue le rôle des EPS dans l'adaptation aux conditions environnementales, il est important d'étudier le rôle des EPS de l'espèce *R. sultae* aux différents stress en particulier le stress salin.

Références Bibliographiques

Abdelguerfi-Berrakia R, Abdelguerfi A, Bounaga N, Guittonneau GG. 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.

Ara Begum A, Leibovitch S, Migner P, Zhang F. 2001. Specific flavonoids induced *nod* gene expression and pre-activated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J. Exp. Bot.* **360**: 1537-1543.

Ayala-Hernandez I, Hassan AN, Goff HD, Corredig M. 2009. Effect of protein supplementation on the rheological characteristics of milk permeates fermented with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Food Hydrocolloids* **23 (5)**: 1299-1304.

Barbour MW, Dennis T, Hattermann R, Stacey GT. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to Soybean Exudates. *Appl Environ Microbiol.* **57 (9)**: 2635.

Beck DP, Materon LA, Afandi F. 1993. -Practical *Rhizobium*- Legume Technology Manual. ICARDA. Syria.

Becker A, Pühler A. 1998. Production of exopolysaccharides in *Rhizobiaceae*. In *The Rhizobiaceae* (Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J., eds.) Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, Boston, London, pp 97-118.

Bélangier A. 1998. Purification et caractérisation des facteurs de nodulation de *rhizobium* sp. (*oxrtropis arctobia*) souche N33. Thèse de doctorat de l'université de Laval.

Benahmed A. 2010. Rôle et influence des exopolysaccharides bactériens sur la nodulation de la légumineuse *Hedysarum coronarium*. Mémoire de Magister en Biotechnologie végétale. Université Constantine. Algérie.

Benguedouar A, Corich V, Giacomini A, Squartini A, Nuti MP. 1997. Characterization of symbiotic bacteria from the mediterranean legume crop *Hedysarum coronarium* (sulla) by multilocus enzyme electrophoresis. *Agricoltura Mediterranea.* **127**:173-177.

Benguedouar A. 2000. Etude de la symbiose *Rhizobium*- *Hedysarum coronarium*: essai de caractérisation de l'espèce *Rhizobium "hedysari"*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie.

Béna G. 2008. Diversité et Evolution des Bactéries Symbiotiques Fixatrices d'azote. Université Montpellier II.

- Bergmaier D. 2002.** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *LB. Rhamnosus* RW -9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de Philosophie Doctor (Ph.D.). De l'Université Laval.
- Beringer J E.** 1974. - R-Factor transfer in rhizobium legume. *J. Gen. Microbiol.*, **84**: 188-198.
- Bertrand ME.** 2008. Etude des propriétés gélifiantes et viscosifiantes de systèmes mixtes isolat de protéines de lactosérumpolysaccharides en conditions associatives. Thèse de doctorat en Sciences et technologie des aliments pour l'obtention du grade de philosophiæ docteur (Ph.D). Université Laval. Québec.
- Birnboim HC.** 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymology*. **100**: 243 - 255.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G.**1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*. **54**: 484-489.
- Bouzar FM, Cerning J, Desmazeaud M.** 1996. Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbnreckii ssp. bulgancus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *Journal of Dairy Science*. **79**: 205-211.
- Brewin NJ.** 1998. Tissue and cell invasion by Rhizobium: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In *The rhizobiaceae* (Spaink, H. P., Kondorosi, A. & Hooykaas, J. J., eds.), Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, Boston, London, pp 417-429.
- Brom S, Santos AGL, Girard ML, Davila G, Palacios R, Romero D.**1991. High-Frequency Rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Plasmids. *Journal of bacteriology*. 1344-1346.
- Broughton W, Jabbouri S, Perret X.** 2000. Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of Bacteriology* . **182**:5641-5652.
- Buchanan BB, Grisse W, Jones JDG.** 2001. Illustrations from Biochemistry and molecular biology of plants. BIOTXT-CD300. American Society of Plant Biologist.
- Caetano-Anolles G, Lagares A, Bauer WD.**1990. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide Mutants Elicit Feedback Regulation of Nodule Formation in Alfalfa1. *Plant Physiol*. **91**: 368-374
- Carrion M, Bhat UR, Reuhs B, Carlson RW.** 1990. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*. **172**:1725-1731.

- Casella S, Gault RR, Reynolds KC, Dyson JR, Brockwell J.** 1984. Nodulation studies on legumes exotic to Australia: *Hedysarum coronarium*. FEMS Microbiol. Lett. **22**: 37-45.
- Cerning J, Bouillanne M, Landon M, Desmazeaud MJ.** 1990. Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. Science Aliments **10**: 443-451.
- Cescutti P, Kallioinen A, Impallomeni G, Toffanin R, Pollesello P, Laisola M, Eerikäinen, T.** 2005. Structure of the exopolysaccharide produced by *Enterobacter amnigenus*. Carbohydrate Research. **340**:439-447.
- Chataigné G.** 2007. Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse.
- Chattoraj DK, Cordes K, Berman ML, Das A.** 1984. Mutagenesis and mutation transfer induced by ultraviolet light in plasmid-cloned DNA. Gene. 27(2): 213-22.
- Chuang -Yien Lee J.** 2000. Expression Studies on the exo Y Promoter Region in *Rhizobium meliloti*. Bug journal vol.3.
- Ciezack G, Hazo L, Chambat G, Heyraud A, Lonvaud-Funel A, Dols-Lafargue M.** 2009. Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. Journal of Applied Microbiology. 1364-5072.
- Clare A, King RD.** 2001. Machine learning of functional class from phenotype data. University of Wales Aberystwyth, SY23 3DB, UK.
- Colpin DL, Cook D.** 1990. Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. Molecular Plant-Microbe Interaction. **3**: 271-279.
- Cooper JE.** 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. Journal of Applied Microbiology. **103**:1355-1365.
- D'Haese W, Glushka J, De Rycke R, Holsters M, Carlson RW.** 2004. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. Molecular Microbiology. **52**:485-500.
- Davet P.** 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Edition INRA, Paris.
- Dazzo FB, Truchet GL, Hollingsworth RI, Hrabak EM, Pankratz HS, Philip-Hollingsworth S, Salzwedel JL, Chapman K, Appenzeller L, Squartini A.** 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. Journal of Bacteriology. **173**:5371-5384.

Deléglise A. 2001. Vers une diminution de l'utilisation d'engrais azoté. Thèse de Doctorat. Québec science.

De PS, 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.

Dénarié J, Debelle F, Rosenberg C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. Annual Review of Microbiology.46: 497-531.

Dénarié J, Debelle F, Truchet G, Promé, J C. 1993. *Rhizobium* and legume nodulation: a molecular dialogue. In New Horizons in Nitrogen Fixation ed. Palacios, R., Mora, J. and Newton, W.E. pp. 19–30. Dordrecht: Kluwer.

De Philippis R, Vincenzini M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**:151-175.

Ding H et Hynes MF. 2009. Plasmid transfer systems in the rhizobia. Canadian Journal of Microbiology. **55**: 917-927.

Doherty D, Leigh JA, Glazebrook J, Walker GC. 1988. *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. Journal of Bacteriology. **170**: 4249-4256.

Douglas G B. 1984. Seed production of Sulla. A plant for soil conservation. Proceedings .Of the New Zeland Grassland Association. **45**: 239-242.

Dreywood R. 1946. Qualitative test for carbohydrates. Industrial and Engineering Chemistry research. **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 FP, De França FP, De Almeida Lopes LM. 2006. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium sp.* using the response surface method. Electronic Journal of Biotechnology. **9**:391-399.

Evans LR, Linker A, Impallomeni G. 2000. Structure of succinoglycan from an infectious strain of *Agrobacterium radiobacter*. International Journal of Biological Macromolecules. **27**:319-326.

Fahraeus G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass 640 slide technique. J. Gen. Microbiol. **16 (2)**:374-381.

Ferencsi S, Ganyu A, Blaha B, Semesey S, Nagy T, Csiszovszki Z, Orosz L, Papp PP. 2004. Integrative plasmid vector for constructing single-copy reporter systems to study gene regulation in *Rhizobium meliloti* and related species. *Plasmid* **52**: 57-62.

Fischer SE, Miquel MJ, Mori JB. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *FEMS Microbiology Letter*. **219**: 53-62.

Fraysse N, Couderc F, Poinsot V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *European Journal of Biological Chemistry*. **270**:1365-1380.

Gage DJ et Margolin W. 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology*. *Current Opinion in Microbiology*. **3**:613–617.

Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of Temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews, American Society for Microbiology*. **68 (2)**: 280-300.

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.

Garmiri P et Coles KE. 2008. Role of outer membrane lipopolysaccharides in the protection of *Salmonella enterica serovar* Typhimurium from desiccation damage." *Fems Microbiology Letters* **281(2)**: 155-159.

Gharzouli R. 2006. Influence d'agents mutagènes, les rayons Ultra-violet, sur la nodulation et les caractères phénotypiques de quelques espèces de *Rhizobium* sp. . Mémoire de Magister en génétique moléculaire. Université Constantine. Algérie.

Gharzouli R, Carpéné MA, Couderc F, Benguedouar A, Poinsot V. 2013. Relevance of Fucose-rich Extracellular Polysaccharides produced by *Rhizobium sllae* strains nodulating *Hedysarum coronarium* L. legume. *Applied and Environmental Microbiology*. **79 (6)**: 1764-1776. DOI: 10.1128/AEM.02903-12.

Ghosh AC, Ghosh S, Basu PS. 2005. Production of extracellular polysaccharides by a *Rhizobium* species from root nodules of the leguminous tree *Dalbergia lanceolaria*. *Engineering in Life Science*. **5**:378-382.

Glenn SA, Gurich N, Feeney MA and Gonzalez JE. 2007. The ExpR/Sin Quorum-Sensing System Controls Succinoglycan Production in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. **189(19)**:7077- 7088.

Glucksmann MA, Reuber TL, Walker GC. 1993. Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. **175**: 7045.

Goh KTK, Haisman D R, Singh H. 2005. Development of an improved procedure for isolation and purification of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2483. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**: 202–208.

González JE, York GM, Walker GC. 1996 a. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene*. **179**:141-146.

Gonzalez JE, Reuhs B, Walker GC. 1996 b. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* promotes nodule invasion of alfalfa. *Proceeding National Academy of Science USA* **93**: 8636-8641.

Gore RS, Miller KJ. 1993. Cyclic β -1,6-1,3 glucans are synthesized by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids within soybean (*Glycine max*) root nodules. *Plant Physiology*. **102**:191–94.

Gorlier P, Germain G. 1998. La viscosité et sa mesure. « La mesure » TIPE.

Guentas L, Pheulpin P, Michaud P, Heyraud A, Gey C, Courtois B, Courtois J. 2001. Structure of a polysaccharide from a *Rhizobium* species containing 2-deoxy-b-D-arabino-hexuronic acid. *Carbohydrate. Research*. **332**: 167–173.

Hannachi-Salhi A, Combes D, Baatout H, Figier J, Boussaid M, Marrakchi M, Trifi-Farah N. 2004. Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI – FAO, Issue No.130, pp 65-72.

Heyde, M (2004)- Isolement et caractérisation des mutants. Liste de protocoles de travaux pratique. Université Lyon 1.

Hopkins WG. 2003. Les plantes et l'azote. *In Physiologie végétale*. Deuxième édition de boeck et Larcier s.a. pp 99-121. ISBN : 2-7 445-0089-5.

Hotter GS, Scott DP. 1990. Exopolysaccharide Mutants of *Rhizobium loti* Are Fully Effective on a Determinate Nodulating Host but Are Ineffective on an Indeterminate Nodulating Host. *American Society for Microbiology. Journal of bacteriology*. pp 851-859.

Ibarburu I, Soria-Díaz ME, Rodríguez-Carvajal MA, Velasco SE, Tejero-Mateo, P, Gil-Serrano AM, Irastorza A, Dueñas MT. 2007. Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal Applied of Microbiology*. **103**:477-486.

Ibanez F, Reinoso H, Fabra A. 2009. Experimental evidences of pSym transfer in a native peanut-associated rhizobia. *Microbiological Research in Microbiology*. **154**: 433-442

Ihara H, Hanashima S, Okada T, Ito R, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Ikeda Y. 2010. Fucosylation of chitooligosaccharides by human α 1,6-fucosyltransferase requires a nonreducing terminal chitotriose unit as a minimal structure. *Glycobiology*. **20**:1021-1033.

Iyer A, Mody K, Jha B. 2005. Characterization of an exopolysaccharide produced by a marine *Enterobacter cloacae*. *Indian Journal of Experimental Biology*. **43**: 467-471.

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

Janczarek M, Skorupska A. 2011. Modulation of *rosR* Expression and Exopolysaccharide Production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by Phosphate and Clover Root Exudates. *International Journal of Molecular Sciences*. **12**: 4132-4155.

Janczarek M, Kutkowska J, Piersiak T, Skorupska A. 2010. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Microbiology*. **10**: 284.

Janczarek M. 2011. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in Rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*. **12**:7898-7933.

Jordan DC. 1984. *Family III. Rhizobiaceae*. In: Kreig, N.R., Holt, J.H., 1938, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp 234-254.

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*. **152**:522-531.

Kambara K. 2008. Regulation and Effects of the Type-three Secretion System of *Rhizobium* species NGR234. Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève pour obtenir le grade de Docteur ès sciences en biologie. Université de Genève.

Karr DB, Liang RT, Reuhs BL, Emerich DW. 2000. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. *Planta*. **211**: 218-26.

- Kaufusi PH, Forsberg LS, Tittabutr P.** 2004. Regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, *rpoH2* Microbiology. DOI10.1099/mic.027092-0. **150**: 3473-3482
- Kumari BS, Ram RM, Mallaiah KV.** 2009. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from Indigofera. African Journal of Microbiology Research. **3**: 10-14.
- Kutkowska J, Janszerek M, Kopcinska J, Urbanik-Sypniewska T, Skorupska A.** 2007. Effects of *pssB* mutation on surface polysaccharides and symbiotic phenotype of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. Acta biologica aracovienslia series Botanica. PL ISSN 001-5296 Polish Academy of Sciences, Cracow. **49(2)**: 81-89.
- Laus MC, Logman TJ, Van Brussel AA, Carlson RW, Azadi P, Gao MY, Kijne JW.** 2004. Involvement of *exo5* in production of surface polysaccharides in *Rhizobium leguminosarum* and its role in nodulation of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. Journal of Bacteriology. **186**: 6617-6625.
- Laus MC, Van Brussel AA, Kijne JW.** 2005. Exopolysaccharide Structure Is Not a Determinant of Host-Plant Specificity in Nodulation of *Vicia sativa* Roots. The American Phytopathological Society. DOI: 10.1094/MPMI -18-1123. 1123–1129.
- Lepek CV, D'Antuono LA.** 2005. Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. Lotus Newsletter. **35**:93-105.
- Leigh J.A, Lee C.C.** 1988. Characterization of Polysaccharides of *Rhizobium meliloti* *exo* Mutants That Form Ineffective Nodules. Journal of Bacteriology. American Society for Microbiology. 3327-3332.
- Lindström K, Terefework Z, Suominen L, Lortet, G.** 2002. Signalling and development of *Rhizobium*-legumes symbioses. Biology and environment. **102**: 61-64.
- Lloret J, Wulff BH, Rubio JM, Dowine JA, Bonilla I, Rivila R.** 1998. Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. Applied and Environmental Microbiology. **64**:1024-1028.
- MacLean LL, Vinogradov E, Pagotto F, Farber JM, Perry MB.** 2010. The structure of the O-antigen of *Cronobacter sakazakii* HPB 2855 isolate involved in a neonatal infection. Carbohydrate Research. **345**:1932-1937.
- Marghali S, Trifi-Farah N, Ghariani S, Marrakchi M.** 2002. Etude du polymorphisme moléculaire par AFLP d' accessions d' *H. coronarium* en Tunisie. Grassland Science in Europe volume 7.
- Mendoza DP, Sepúlveda E, Pando V, MuñozS, Nogales J, Olivares J, Soto M J, Herrera-Cervera JA, Romero D, Brom S, Sanjuán J.** 2005. Identification of the *rctA*

Gene, Which Is Required for Repression of Conjugative Transfer of Rhizobial Symbiotic Megaplasmiids. *Journal of bacteriology*. 7341–7350.

Mendrygal KE, Gonzalez JE. 2000. Environmental Regulation of Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, **182**: 599-606.

Meyer W, Luz S, Schnapper A. 2009. Lectin histochemical aspects of mucus function in the oesophagus of the reticulated python (*Python reticulatus*). *Anatomia Histologia Embryologia journal information*. **38** :316-318.

Morgante C, Angelini J, Castro S, Fabra A. 2005. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 1436–1444.

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 DL.1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent. *Science*, **107**:254-255.

Murray JD. 2011. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular Plant Microbe Interaction*. **24**:631-639.

Navarini L, Stredansky M, Matulova M, Bertocchi C. 1997. Production and characterization of an exopolysaccharide from *Rhizobium hedysari* HCNT 1. *Biotechnology Letter*. **19**:1231-1234.

Niehaus K, Kapp D, Pühler A. 1993. Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPSI-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta*. **190**: 415–425.

Niehaus K, Baier R, Kohring B, Flashl E, Pühler A. 1997. Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. In *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture* (Legoki, A., Bothe, H. & Pühler, A. eds.), Springer Verlag, Heidelberg, Germany, p110-114.

Noel KD, Box JM, Bonne VJ. 2004. 2-O-methylation of fucosyl residues of a rhizobial lipopolysaccharide is increased in response to host exudate and is eliminated in a symbiotically defective mutant. *Applied Environment Microbiology*. **70**:1537-1544.

Orgambide GG, Philip-Hollingsworth S, Tola E, Cedergren RA, Squartini A, Dazzo FB, Hollingsworth RI, Nuti MP. 1996. Glycoconjugate and lipid components of *Rhizobium 'hedysari'* IS123, a root nodule symbiont of the stress-tolerant legume, *Hedysarium coronarium*. *Canadian Journal of Microbiology*. **42**:340-345.

Patriarca EJ, Tate R, Iaccarino M. 2002. Key Role of Bacterial NH₄⁺ Metabolism in Rhizobium-Plant Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66**:203-222.

- Patriarca EJ, Tate R, Ferraioli S, Iaccarino M.** 2004. Organogenesis of Legume Root Nodules. *International Review of Cytology*. Elsevier. **234**: 0074-7696/04.
- Patricia P, Raposeiras PR, Macedo AM, Seldin L, Paiv E, Nad MHS.** 1998. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains. *Revista de Microbiologie*. 0001-3714.
- Pawlicki-Jullian N, Courtois B, Pillon M, Lesur D.** 2010. Exopolysaccharide production by nitrogen-fixing bacteria within nodules of *Medicago* plants exposed to chronic radiation in the Chernobyl exclusion zone. *Research in microbiology*. **161**:101-108.
- Pellock BJ, Cheng HP, Walker GC.** 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology*. **182**: 4310-4318.
- 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*. Thèse de doctorat : Physiologie végétale. Université Montpellier II. Sciences et techniques du Languedoc URF des Sciences. 70p.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64 (1)**: 180-201.
- Perry MB, MacLean LL, Patrauchan MA, Vinogradov E.** 2007. The structure of the exocellular polysaccharide produced by *Rhodococcus sp.* RHA1. *Carbohydrate Research*. **342**:2223-2229.
- Plock A, Beyer G, Hiller K, Gründemann E, Krause E, Nimtz M, Wray V.** 2001. Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. *Phytochemistry*. **57**:489-496.
- Poli A, Kazak H, Gurleyendag B, Tommonaro G, Pieretti G, Toksoy Oner E, Nicolaus B.** 2009. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrate Polymers*. **78**:651-657.
- Pottier-Alapetite G.** 1979. Flore de la Tunisie. Angiospermes Dicotylédones. Apétales-Dialypétales . Imprimerie Officielle de la République Tunisienne.
- Potts M.** 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Community of Microbiological Reviews*. **58**:755-805.

Quelas J I, Lopez-Garcia S L, Casabuono A, Althabegoiti J, Elias J, Mongiardini M, Perez-Gimenez J, Couto A, Lodeiro A R. 2006. Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. *Archives of Microbiology*. DOI 10.1007/s00203-006-0127-3. **186**:119–128.

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

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

Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, Skurnik M, Whitfield C, Coplin D, Kido N, Klena J, Maskell D, Raetz CRH, Rick PD. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology*. **4**:495-503.

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.

Rojas-Escudero E, Alarcón-Jiménez AL, Elizalde-Galván P, Rojo-Callejas F. 2004 Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *Journal of Chromatography. A*, **1027(1-2)**:117-120.

Rolfe BG, Carlson RW, Ridge RW, Dazzo FB, Mateos PF, Pankhurst CE. 1996. Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Australian Journal of Plant Physiology*. **23**: 285-303.

Rougeaux H, Talaga P, Carlson RW, Guezennec J. 1998. Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* originating from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research.*, **312**: 53-59.

Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **12**: 163-171.

Ruas-Madiedo P, De Los Reyes-Gavilan CG. 2005. Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **88**: 843-856.

Serrato RV, Sasaki LG, Gorin P AJ, Cruz L M, Pedrosa F O, Choudhury Biswa, Carlson RW, Iacomini M. 2006. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Canadian Journal of Microbiology*. **52**: 489–493

Serrato RV, Sasaki LG, Gorin P AJ, Cruz L M, Pedrosa F O, Choudhury Biswa, Carlson RW, Iacomini M. 2008. Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogenfixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Carbohydrate Polymers* **73**:564–572.

Singh A, Sharma PB. 1991. Biochemical characteristics and salt tolerance by *Rhizobium* species isolated from legume crops. *Indian Journal of Microbiology*. **11**: 33- 42.

Skorupska A, Krol J. 1995. Nodulation response of exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* to addition of acidic exopolysaccharide. *Microbiology Research*. **150** : 297-303.

Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Krol J. 2006. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories*. vol5, 7

Spaink HP. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology*. **54**:257-288.

Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legumes- *Rhizobium* Technology. Springer - Verlage New York. Inc p.450. ISBNB : 0-387-9413467.

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

Squartini A, Struff P, Doring H, Selenska-Pobell S, Tola E, Giacomini, A, Vendramin E, Velazquez E, Mateos PF, Martinez-Molina E, Dazzo FB, Casella S, Nuti MP. 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.

Staudt AK, Wolfe LG, Shrout JD. 2012. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. *Archives of Microbiology*. **194**:197–206.

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

Sutherland IW. 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.*, **23**:79-150.

Sutherland IW. 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.

Teillet A. 2008. Caractérisation de deux déterminants moléculaires impliqués dans le processus d'infection lors de l'interaction symbiotique entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et *Sinorhizobium meliloti*. Thèse de doctorat de l'université Paul Sabatier. Toulouse.

Tejerizo GT, Del Papa MF, Giusti M I A, Draghi W, Lozano M, Lagares A, Pistorio M. 2010. Characterization of extrachromosomal replicons present in the extended host range *Rhizobium*. sp. LPU83. *Plasmid*. **64**: 177-185.

Tola E, Henriquez-Sabà JL, Polone E, Dazzo FB, Concheri G, Casella S, Squartini, A. 2009. Shovel roots: a unique stress-avoiding developmental strategy of the legume plant *Hedysarum coronarium* L. *Plant Soil*. **322**:25-37.

Torino MI, Mozzi F, Font G, de Valdez. 2005. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-004-1865-2. **68**: 259–265.

Tortora GJ, Funk BR, Case CL. 2003. Dans “Introduction à la microbiologie“. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Nb de page 945.

Tuinier R, Ten Grotenhuis E, Holt C, Timmins PA, De Kruif CG.1999. Depletion interaction of casein micelles and an exocellular polysaccharide. *Physical Review (Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics)*, **60 (1)**: 848-856.

Tuinier R, van Casteren WHM, Looijesteijn PJ, Schols HA, Voragen AGJ, Zoon P. 2001. Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*, *Biopolymers*, **59 (3)**: 160-166.

van Workum WAT, van Slageren S, van Brussel AAN, Kijne JW. 1998. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.**11**:1233-1241.

Vanderlinde EM, Muszyn´ski A, Harrison JJ, Koval S F, Foreman DL, Ceri H, Kannenberg EL, Carlson R W, Yost CK. 2009. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility. DOI 10.1099/mic.0.025031-0. *Microbiology*. **155**: 3055–3069.

Velasco SE, Yebra MJ, Monedero V, Ibarburu I, Dueñas MT, Irastorza A. 2007. Influence of the carbohydrate source on β -glucan production and enzyme activities involved

in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. International Journal of Food Microbiology. **115** : 325–334.

Vincent JM.1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP handbook n°15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford.

Vincent BB. 2002. Revue de littérature : cycle de l'azote. Mémoires et thèses de l'université Laval.

Werner D. 1992. The *Rhizobium/Bradyrhizobium* Fabales symbiosis. In Symbiosis of plants and microbes. Chapman & Hall. ISBN: 0412362309. 49-55.

Wilbert A T, Workum V, Slageren SV, van Brussel A AN, Kijine JW.1998. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* as Host-Specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. MPMI vol 11, The American Phytopathological Society.**12**:1233-1241.

Whistler RL et BeMiller JN. 1997. Polysaccharides, Dans Carbohydrate chemistry for food scientists, AACC Chemist, Eagan Press, St-Paul, Minnesota, USA, pp. 63-89.

Yates Mg. 1988. The role of oxygene and hydrogene in nitrogene fixation. The nitrogene and sulfur cycle. F. S. Cole J.A. Cambridges, Cambridge University press. **42**: 383-416.

Yemmas L, Soetaert W, Vandamme EJ. 2003. Enzymatic conversion of the clavan exopolysaccharide by *Streptomyces* sp. YSDL-20. Commun. Agriculture and Applied Biological Science. **68**:327-330.

York WS, Darvill AG, McNeil M, Stevenson TT, Albersheim, P. 1986. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. Methods in Enzymology. **118**: 3-40.

Zhang Y, Hollingsworth RI, Priefer UB. 1992. Characterization of structural defects in the lipopolysaccharides of symbiotically impaired *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF-39 mutants. Carbohydrate Research. **231**:261-271.

Zhao L, Chen Y, Ren S, Han Y, Cheng H. 2010. Studies of chemical structure and antitumor activity of an exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613. Carbohydrate Research. **345**:637-643.

Annexes

ANNEXE 1

Les milieux de culture et Solutions

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

Mannitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extrait de levure	0.5 g

L'eau distillé 1.0 litre

pH 6.8

Autoclave 120° C pendant 20 minutes.

Milieu: Yest – Mannitol Agar (YMA)

YMB	1.0 litre
Agar	15 g

Préparation :

Préparer le YMB

Ajouter l'agar, autoclave à 120 ° C pendant 20 minutes.

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 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 des plantes : (Fåhraeus, 1957)

CaCl ₂	0.100 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.120 g
KH ₂ PO ₄	0.100 g
Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	0.150 g
Citrate ferrique	0.005 g

*Solution stock des oligoéléments 1.0 ml

* Solution stock des oligoéléments : (g/l)

H ₃ BO ₄	2.86 g
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	2.03 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0.22 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0.08 g
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0.14 g

Milieu: Tryptone-Yest (TY) (Beringer, 1974)

Tryptone	5.0 g
Extrait de levure	3.0 g
CaCl ₂ . H ₂ O	0.87 g
L'eau distillé	1000 ml

pH 6.8 -7.2

Autoclave 120° C pendant 20 minutes

Pour le milieu TY agar, ajouter 12 g d'agar avant autoclavage.

Solutions utilisées pour l'analyse des oligosaccharides par gel DOC-PAGE

Solution Stock	Composition
Solution A	30% d'acrylamide, 0.8% de bisacrylamide (mélange commercial).
Solution B	22.7g de Tris, 75ml d'eau ultrapure, ajuster le pH à 8.8 par HCl 1M amener à 100ml.
Solution C	DOC à 0,25%, une pastille de soude.
Solution D	7.7g Tris, 75mL d'eau ultrapure, ajuster le pH à 6.8 par HCl 1M amener à 100 mL.
Tampons	Composition
Migration	Pour la cathode : 21.7g/L de glycine, 4.5 g/L de Tris, 2,5 g/L de DOC
Chargement	Pour l'anode : 24.28 g/L de Tris 4mL de solution C, 5mg de bleu de Brompphanol, 2mL de glycérol, 14 mL eau ultrapure.
Gels	Composition
Séparation	6mL de A, 2mL de B, 2mL de C, 18µL de persulfude de sodium à 10%, 10µl de TEMED.
Concentration	340µL de A, 500µL de D, 1.6mL d'eau ultrapure, 10µl de persulfude de sodium à 10%, 1.2µL TEMED

**Solution utilisée pour la coloration au bleu d'alcian et au nitrate d'argent des Gels
DOCPAGE**

Coloration	Composition
Bleu d'alcian	0.005% bleu, 50% eau ultrapure, 45% EtOH, 5% CH ₃ COOH.
Périodate de Sodium	0.3 g/L périodate (60mg dans 200mL d'eau).
Nitrate d'argent	AgNO ₃ 2g/L (280mg dans 140mL d'eau), 1.5 mL NaOH 5M, puis NH ₄ OH jusqu'à disparition du précipité.
Citrate de Sodium	100mL d'eau ultrapure, 50μL HCOOH, 50μL de citrate de sodium 10%
Solution de fixation	50% eau ultrapure, 45% EtOH, 5% CH ₃ COOH.

ANNEXE 2

Les valeurs de la densité optique

Influence de la source de carbone sur la croissance des bactéries de l'espèce *R. sultae*

	A6	RHF	RH19	RHI	<i>R.l.t</i>	<i>R.l.t</i>
Mannitol	0,791	0,723	0,495	0,583	0,624	0,470
Saccharose	0,671	0,585	0,475	0,351	0,340	0,310
Glucose	0,587	0,754	0,496	0,543	0,438	0,648
Sorbitol	0,640	0,434	0,680	0,514	0,504	0,528
Galactose	0,365	0,365	0,374	0,178	0,434	0,510
Lactose	0,187	0,226	0,186	0,236	0,276	0,167
Arabinose	0,323	0,210	0,204	0,287	0,344	0,284

Les valeurs de la DO du dosage à l'Anthrone et le dosage des sucres acide.

Echantillons d'EPS		DO λ_{620}	DO λ_{520}
Souche	Source de carbone		
<i>R. sultae</i> A6	Glucose	0,456	0,000
	Saccharose	0,292	0,146
	Maltose	0,210	0,020
	Fructose	0,027	0,170
	Mannitol	0,517	0,018
<i>R. sultae</i> IS123	Glucose	0,214	0,130
	Mannitol	0,130	0,226
	Arabinose	0,079	0,295
	Saccharose	0,053	0,297
	Galactose	/	0,027
<i>R. sultae</i> RHF	Sorbitol	0,600	0,153
	Inositol	0,195	0,137
	Saccharose	0,452	0,220
	Mannitol	0,288	0,225
	Glucose	0,440	/
<i>R. sultae</i> RH19	Mannitol	0,152	0,206
	Saccharose	0,055	0,190
	Xylose	0,326	0,396

	Sorbitol	0,080	0,281
<i>R.l.t.</i>	Galactose	0,302	0,000
<i>R.l.v</i>	Arabinose	0,158	0,401
	Xylose	0,067	0,160
	Saccharose	0,287	0,057
Isolat S1	Galactose	0,070	0,120
	Saccharose	0,155	0,080
	Sorbitol	0,052	0,265
	Mannitol	0,131	0,206
	Galctose	0,030	0,055
Isolat S2	Saccharose	/	0,153
	Sorbitol	0,052	0,265
	Mannitol	0,131	0,206
	Galctose	0,030	0,055
Isolat S3	Saccharose	0,084	0,143
	Mannitol	0,067	0,116
	Sorbitol	/	0,086
Isolat S4	Saccharose	0,136	0,374
Isolat S5	Saccharose	0,317	0,113
	Maltose	0,109	0,098

Temps d'écoulement obtenus par le viscosimètre

Pour la mesure de la viscosité l'équation utilisée est : $\eta_{rel} = t/t_0$.

t = temps d'écoulement d'un volume donné de solution au travers d'un capillaire et t_0 = durée d'écoulement d'un même volume de solvant pur. Le temps d'écoulement (moyen) de l'eau (à 25°C) est de 10,03 secondes. Les valeurs moyennes des temps d'écoulement des solutions d'EPS sont dans le tebeaul ci-dessous :

Tableau : Valeurs moyennes des temps d'écoulement des EPS à 25°C (seconde)

Echantillon d'EPS		Temps d'écoulement des EPS (s) HPM	Temps d'écoulement des EPS (s) FPM
<i>R. sullae</i> A6	Mannitol	11,13	9,13
<i>R. sullae</i> A6	Saccharose	10,33	9,38
<i>R. sullae</i> A6	Glucose	10,73	9,55
<i>R. sullae</i> A6	Sorbitol	11,03	8,93
<i>R. sullae</i> A6	Galactose	10,73	9,45
<i>R. sullae</i> A6	Lactose	10,63	9,63
<i>R. sullae</i> A6	Arabinose	9,75	8,65
<i>R. sullae</i> RHF	Mannitol	10,93	9,40
<i>R. sullae</i> RHF	Saccharose	10,33	9,87
<i>R. sullae</i> RHF	Glucose	11,13	9,45
<i>R. sullae</i> RHF	Sorbitol	9,64	9,18
<i>R. sullae</i> RHF	Galactose	10,13	9,67
<i>R. sullae</i> RHF	Lactose	9,83	9,31
<i>R. sullae</i> RHF	Arabinose	9,63	8,73
<i>R.l.v.</i>	Mannitol	9,64	9,57
<i>R.l.t.</i>	Mannitol	9,83	8,93

Les courbes d'étalonnage du dosage colorimétrique

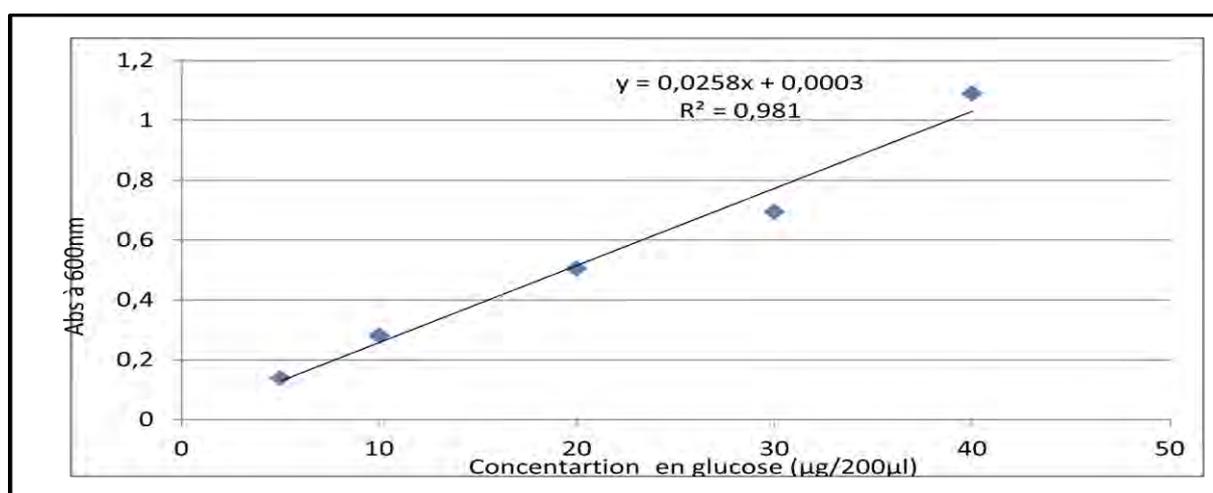


Figure. Courbe d'étalonnage obtenue par le glucose avec l'Anthrone

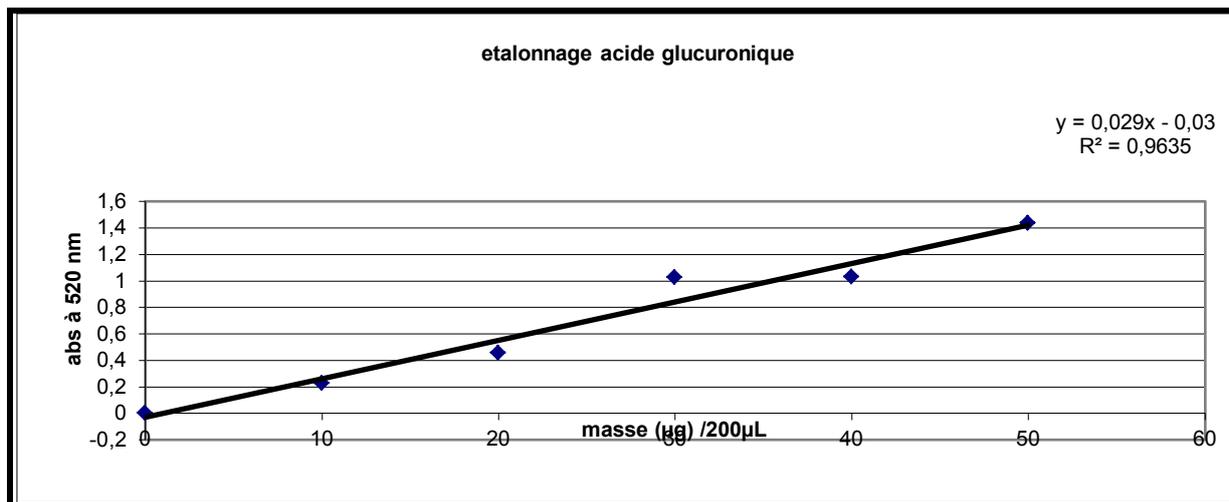
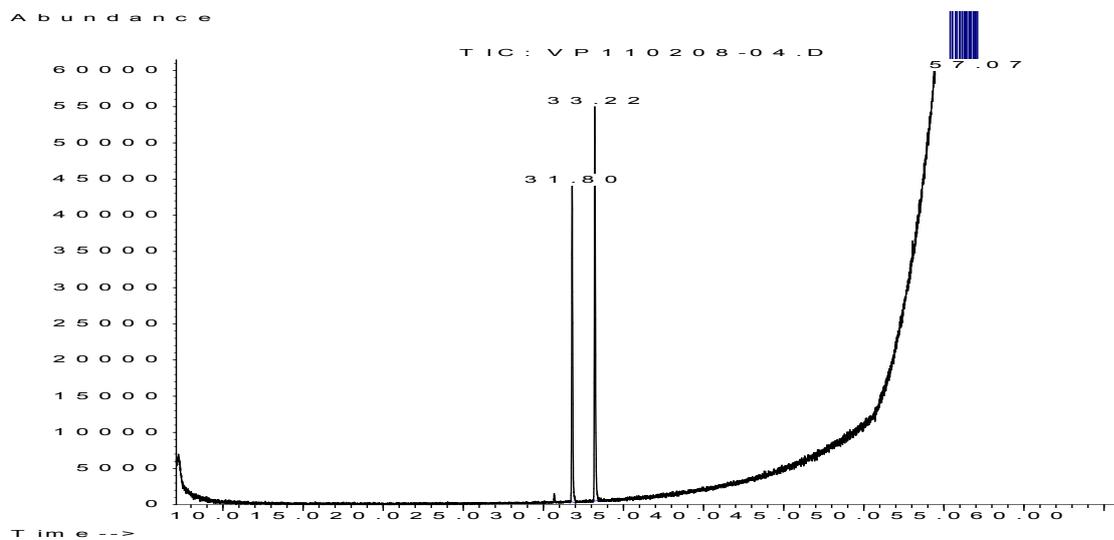


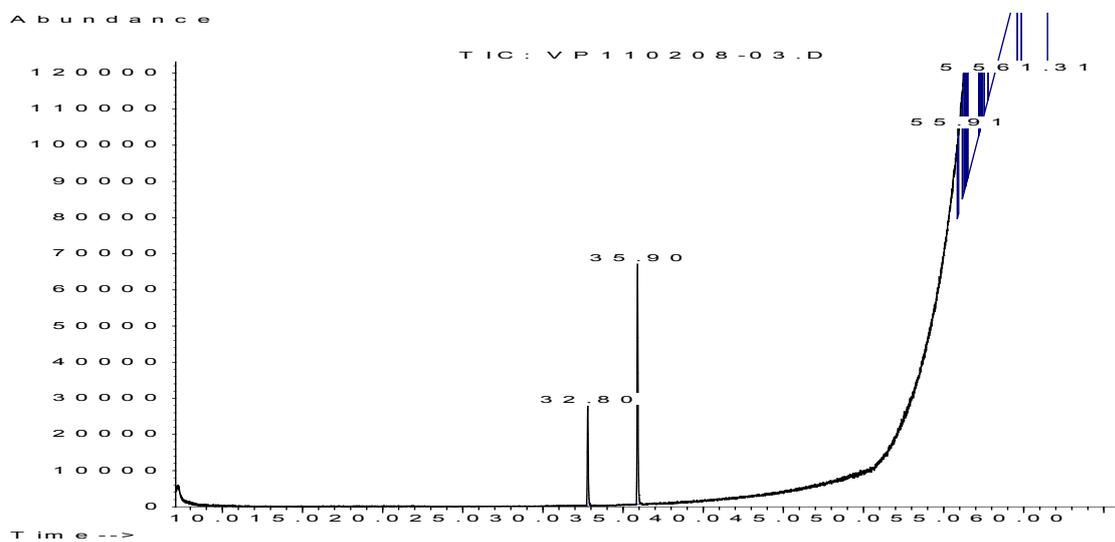
Figure. Courbe d'étalonnage obtenue par l'acide glucuronique avec le *mé*ta-hydroxydiphenyl

ANNEXE 3

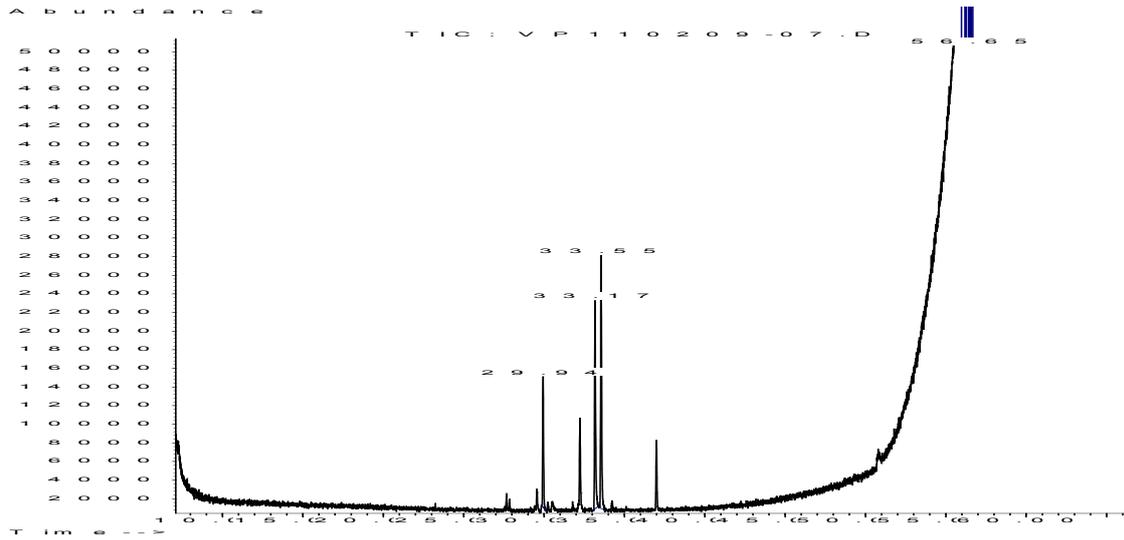
Les chromatogrammes obtenus avec les standards et la composition des EPS



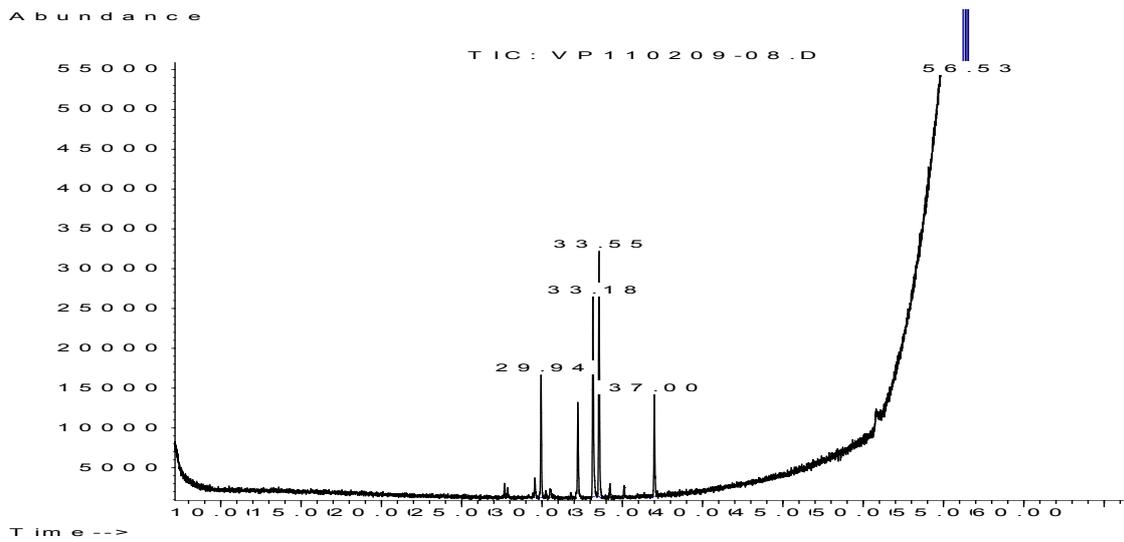
Chromatogramme du galactose seul



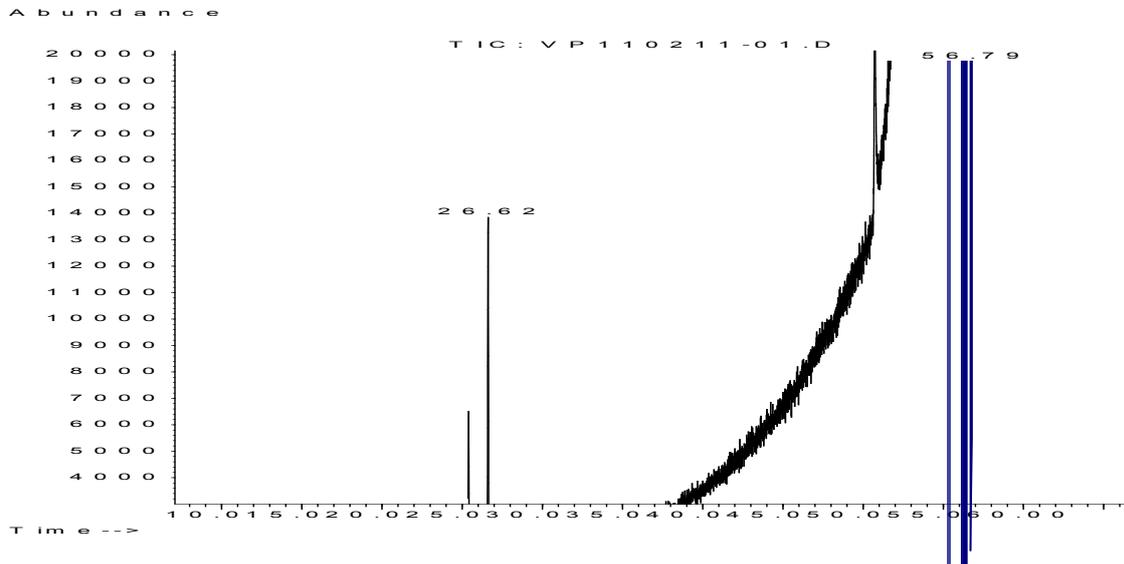
Chromatogramme du glucose seul



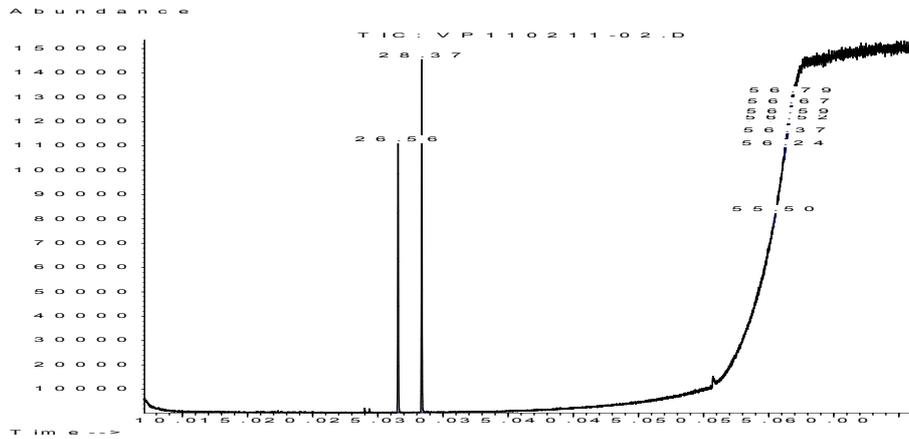
Chromatogramme de l'acide glucuronique seul



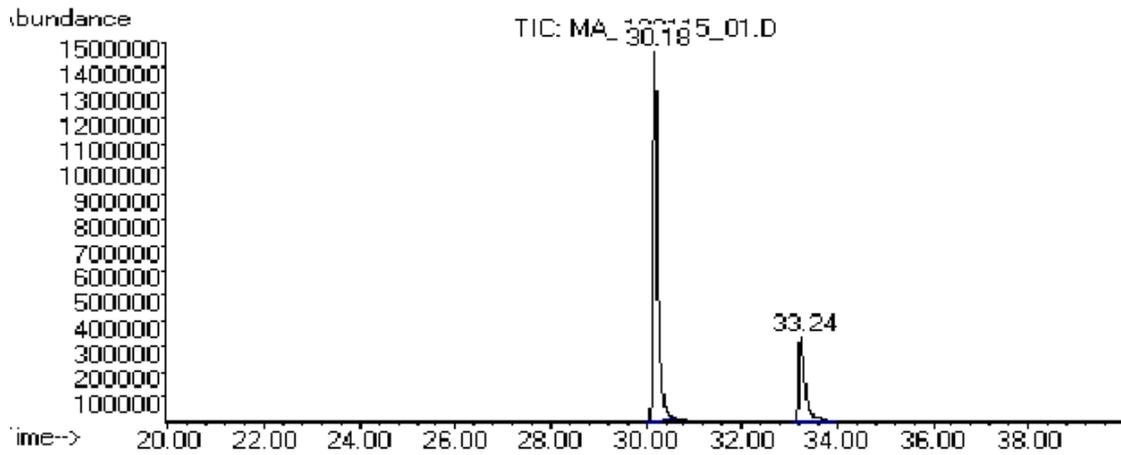
Chromatogramme de l'acide galacturonique seul



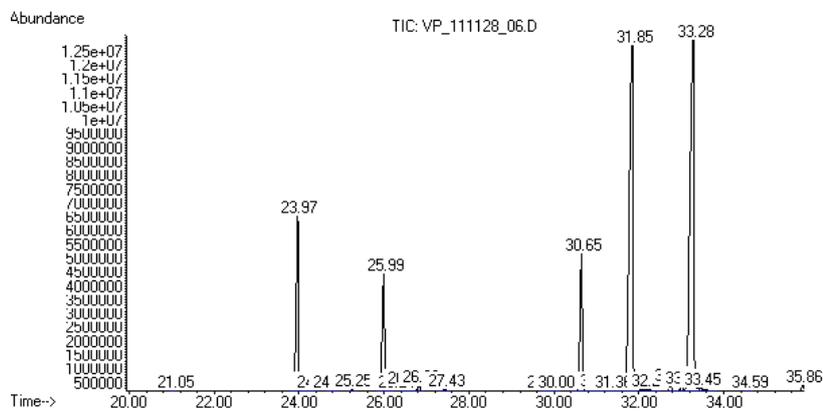
Chromatogramme du fucose seul



Chromatogramme du xylose seul



Chromatogramme du mannose seul

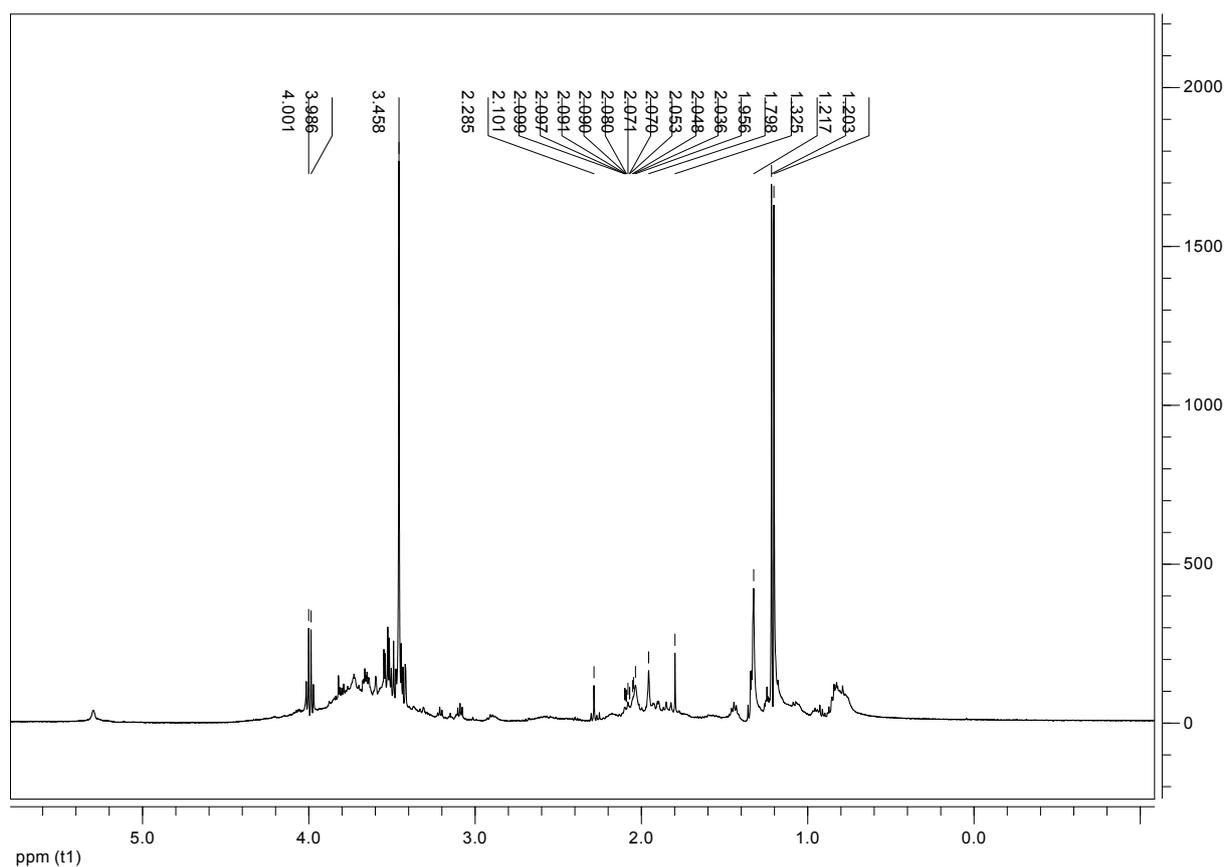


Chromatogramme du galactose et le rhamnose

Tableau : Formule globale des EPS déterminée par GC/MS

		EPS FPM
Souche	Source de Carbone	Formule Globale
A6	Mannitol	Glc Ga ₁ Fuc
	Sucrose	Glc Gal ₂ Fuc ₃
	Glucose	Glc ₃ Gal ₃ Fuc ₃ GalA
	Sorbitol	Glc ₆ Gal ₃ Man Rha
RHF	Mannitol	Glc Gal Fuc
	Sucrose	Glc ₂ Gal Fuc ₂
	Glucose	Glc Gal ₂ Fuc ₃ (Man)
	Sorbitol	Glc ₃ Gal ₂ Fuc ₂
		EPS HPM
Souche	Source de Carbone	Formule Globale
A6	Mannitol	Glc ₅ Gal ₃ Fuc GalA
	Sucrose	Glc ₃ Gal ₃ Fuc ₂ GalA (Man)
	Glucose	Glc ₃ Gal ₂ Fuc (GalA)
	Sorbitol	Glc ₄ Gal ₃ Man GalA Rha ₂
RHF	Mannitol	Glc ₂ Gal ₂ Fuc Man ₂
	Sucrose	Glc ₄ Gal ₂ Fuc ₁ GalA
	Glucose	Glc ₃ Gal Fuc
	Sorbitol	Glc Gal Fuc (GalA)
		EPS Totaux
Souche	Source de Carbone	Formule Globale
A6	Mannitol	Glc ₄ Gal ₃ Fuc ₂ GalA
	Sucrose	Glc ₂ Gal ₃ Fuc ₃ (Man, GalA)
	Glucose	Glc ₃ Gal ₃ Fuc ₂ Man (GalA)
	Sorbitol	Glc ₄ Gal ₃ Man, Rha (GalA)
RHF	Mannitol	Glc ₃ Gal ₂ Fuc ₂ Man
	Sucrose	Glc ₃ Gal ₂ Fuc ₂ (GalA)
	Glucose	Glc ₂ Gal ₂ Fuc ₃ (Man, GalA)
	Sorbitol	Glc Gal Fuc (Man, GalA)

Spectres de la RMN des EPS à HPM de la souche *R. sullae* A6 cultivée en présence du Saccharose



Les d'étalonnage de la SEC

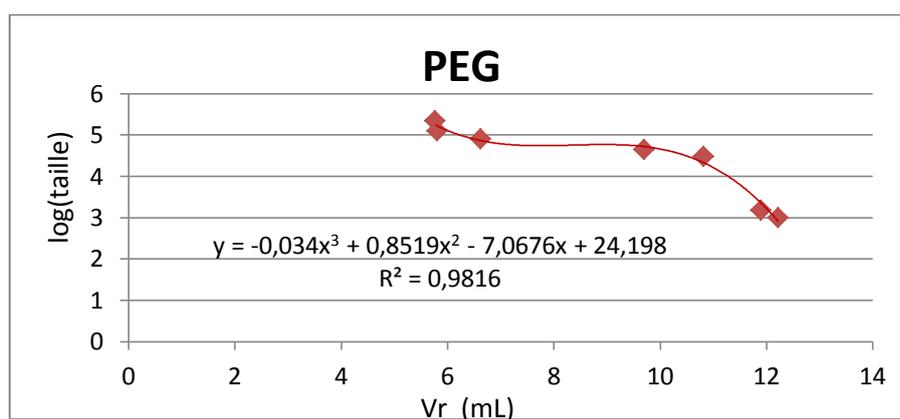


Figure. Courbe d'étalonnage obtenue avec le Polyéthylène glycol (PEG)

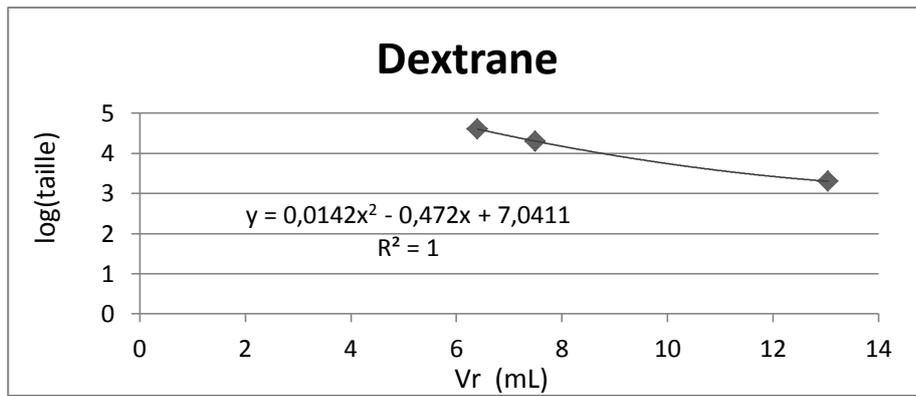


Figure. Courbe d'étalonnage obtenue avec les Dextranes

Annexe 4 :

Mutagenèse et sélection des mutants

Pour obtenir des mutants de l'espèce *R. sultae*, les souches bactériennes sont soumises à l'action d'un agent mutagène de nature physique : **les rayons ultraviolets**, à une longueur d'onde égale à 320 nm, sous une hotte à flux laminaire dotée d'une lampe à UV.

(Kottermann 8511, Tu V, Norddeutschland (GS) geprüfte Sicherheit). L'irradiation est effectuée pendant différents temps et à une distance constante de 73 cm.

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par (Heyde, 2004)

- **Préculture de la souche à mutagéniser**

Les souches sont ensemencées dans des tubes à essai contenant 2 ml du milieu YMB. Incuber à 28°C sous faible agitation pendant 24h (les bactéries seront en phase exponentielle de croissance).

- **Culture de la souche à mutagéniser**

Ensemencer 25 ml du bouillon YMB avec 0,5 ml de la préculture. Incuber dans un bain marie agitateur à 28°C pendant une heure à une heure 30 minutes (les bactéries seront en phase exponentielle de croissance).

- **Mutagenèse**

- transférer la suspension bactérienne dans un tube de centrifugation.
- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 8000 g. (Centrifugeuse : Biofuge 22R ; Heraeus SEPATECH)
- vider délicatement le surnageant.
- ajouter 1 ml de MgSO₄ 0,1 M (stérile)
- remettre le culot en suspension à l'aide d'un vortex.
- ajouter environ 23 ml de Mg SO₄ 0,1 M (stérile).
- incuber à 4°C pendant 10 minutes.
- transférer 5 ml de suspension dans des boîtes de Pétri petit format

- **La courbe de survie**

Les radiations UV donnent une courbe de survie d'allure exponentielle, à partir de laquelle on détermine la dose sublétales (correspond à 1% de survivant) du mutagène qu'on veut utiliser

Pour tracer la courbe de survie de chaque souche :

- Les boîtes de Pétri petit format contenant 5 ml de suspension, sont irradiées, ouvertes, sous la hotte pendant des temps variables (10s, 15s, 20s, 25s, 30s, 35s, 40s, 45s, 50s, 60s, 70s,

75s, 85s, 100s) à une distance fixe de 73 cm de la source des rayons ultraviolets et gardé une boîte de chaque souche non irradiée comme témoin.

- A partir de chaque suspension (irradiée et témoin) réaliser des dilutions en cascade de 10^{-1} à 10^{-5} (selon la charge de la suspension de chaque souche) dans des tubes à essai contenant 9 ml de l'eau physiologique stérile. Agiter le tube avant chaque prélèvement. Eviter l'exposition des suspensions et des dilutions à la lumière.

- Prélever à partir de chaque dilution 0,1 ml de la suspension et étaler délicatement sur la surface des boîtes contenant le milieu YMA. Aussitôt l'étalement réalisé, couvrir les boîtes dans du papier aluminium.

- Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h. Après l'incubation, on détermine le nombre de colonies dans chacune des boîtes puis on calcule le pourcentage de survivant et on trace la courbe de survie pour chaque souche.

De la même manière, on procède pour obtenir des mutants, seulement que, les boîtes seront exposées aux UV à une distance constante de 73cm et pendant des temps allant de 25 à 60 secondes. Dans ces conditions la survie des souches est estimée de 45 à 1%. Les boîtes témoins ne seront pas irradiées.

- **Etalement des suspensions irradiés et témoin**

La détermination et l'identification des mutants nécessite la réalisation de l'étalement suivant : prélever à partir de la dilution 0,1 ml de la suspension et étaler délicatement sur la surface des boîtes contenant le YMA plus **0,02%de Calcofluor**.

Couvrir les boîtes par le papier aluminium. Incuber les boîtes à 30°C pendant 24h.

- **Identification des mutants**

Le Calcofluor est un colorant de la cellulose et les structures capsulaires. Il est fluorescent sous la lumière ultraviolette (UV). Les colonies altérées au niveau des gènes codant la synthèse des polysaccharides ne seront pas fluorescentes (sèche ou mois visqueuse par rapport aux souches sauvages).

Les colonies qui apparaissent sombre sous la lumière UV, sont repiquées sur le YMA puis conservées à 4°C.

Les mutants obtenus sont identifiés phénotypiquement par comparaison avec les souches sauvages (non irradiées).

Principales différences phénotypique entre les souches sauvages et mutantes sont résumées dans le tableau suivant :

	<i>R. sulae</i> A6	A6m	<i>R. sulae</i> RHF	F2s
Aspect des colonies	Visqueux et lumineux	Sec et rugueux	Visqueux et lumineux	Sec et rugueux
Capacité de nodulation	+	-	+	-
Besoins nutritifs :				
- Sorbitol	+	+/-	+	+/-
- Citrate de sodium	+	+/-	+	+/-
- Glutamate de sodium	+	+/-	+	+/-
- Biotine	+	+/-	+	+/-
Température 50°C	+	-	+	-
CMI métaux lourds (µg/ml):				
- HgCl ₂	500	250	750	250
- ZnCl ₂	2750	2500	/	/
- CuCl ₂	1500	1750	1500	1750
CMI antibiotique (µg/ml) :				
- Kanamycine	600	500	20	300
- Acide nalidixique	500	2000	5000	1500
- Streptomycine	5000	3000	/	/
- Rifampicine	200	50	/	/

Nom :	G HARZOULI	
Prénom :	Razika	
Titre	Etude Structurale et Génétique des Exopolysaccharides produits par l'espèce <i>Rhizobium sullan</i>	
Nature du diplôme :	Doctorat En Science en Génétique Moléculaire	
Résumé	<p>L'interaction symbiotique entre les bactéries du sol, les rhizobia, et leur plante légumineuse hôte, conduit à la formation des nodules racinaires. Ce processus implique un dialogue moléculaire complexe entre les deux partenaires. Les rhizobia synthétisent différentes classes de polysaccharides : les exopolysaccharides (EPS), les polysaccharides capsulaires riches en Kdo (KPS), les lipopolysaccharides (LPS) et le glycane cyclique. Ces différentes classes de polymères sont importantes pour l'établissement d'une association symbiotique avec les légumineuses.</p> <p>Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des EPS produits par l'espèce <i>Rhizobium sullan</i>, le microsymbiont spécifique de la plante légumineuse <i>Hedysarum coronarium</i> L. (sulla) largement distribuée en Algérie. Une nouvelle structure d'EPS riche en fucose est mise en évidence, suite à une caractérisation structurale complète de ces derniers. Ce déoxysucre inhabituelle dans la structure des EPS des rhizobia a montré une activité symbiotique importante par une performance de la capacité de nodulation.</p> <p>Des souches mutantes de l'espèce <i>R. sullan</i> déficientes dans la production d'EPS sont transformées de l'ADN plasmidique extrait des souches sauvages en appliquant une technique de choc thermique. L'utilisation du calcofluor a permis de sélectionner les bactéries transformées et l'incorporation de l'ADN plasmidique est vérifiée grâce à un profil plasmidique sur le gel d'agarose (1%). L'insertion d'ADN plasmidique a restauré la capacité de production des EPS par les souches transformées et par conséquent leur capacité de noduler la plante hôte.</p> <p>Finalement, l'activité symbiotique des EPS à haute masse moléculaire (HMM) et à faible masse molaire (FMM) est testée avec les souches mutantes. Les résultats obtenus montrent que les EPS à FMM sont symbiotiquement plus actives que les EPS à HMM.</p>	
Mots clés :	<i>R. sullan</i> , <i>H. coronarium</i> L. Structure des exopolysaccharides, Symbiose, Transformation bactérienne, Plasmide symbiotique, EPS.	
Laboratoire de recherche	Laboratoire d'écologie Microbienne, Faculté des Sciences de la nature, Université Constantine 1.	
Directeur de recherche	A. BENGUEDOUAR	Professeur - Université de Constantine 1
Membres de jury :	Présidente : D. SATT	Professeur - Université de Constantine 1
	Examineurs : V. POINSOT	Directeur de Recherche – CNRS (Toulouse, France)
	N E. KARAM	Professeur – Université Oran Es Senia
	Y. KACI	Professeur – Université USTHB Bab Ezzouar
	Y.BENHIZIA	Professeur – Université de Constantine 1