

N° D'ORDRE : 05/2006-E/S.N.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENE
USTHB / ALGER**

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES

THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat
en Sciences de la Nature

Spécialité : Microbiologie des sols

par Mr Yahia KACI

SUJET

**Les bactéries productrices de polysaccharides dans la rhizosphère du blé
dur (*Triticum durum*) : effet sur l'agrégation du sol.**

Soutenue publiquement le 04 / 10 / 2006 devant le jury composé de :

Mr R. BAKOUR , Professeur à l'USTHB, Alger	Président
Mr T. HEULIN , Directeur de recherche LEMIRE/CEA/Cadarache	Directeur de thèse
Mr S. BENALLAOUA , Professeur à l'université de Béjaia	Examineur
Mme N. BOUGUEDOURA , Professeur à la FSB/USTHB	Examineur
Mr H. HACENE , Professeur à la FSB/USTHB	Examineur
Mr N. SABAOU , Professeur à l'ENS, Alger	Examineur
Mr A. HEYRAUD , Directeur de Recherche CNRS/ CERMAV/Grenoble	Examineur

Remerciements

Le présent travail a été réalisé conjointement au Laboratoire de Biologie du sol de la FSB/USTHB et au Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère CEA Cadarache. Deux courts séjours au Laboratoire des biopolymères CERMAV de Grenoble et dirigé par Mr Alain HEYRAUD, m'ont permis d'analyser les polysaccharides bactériens sur le plan structural.

J'exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance à Monsieur Thierry HEULIN (Directeur de recherche et Directeur de Département DEVM/CEA Cadarache) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir fait partager ses compétences et son savoir. Je le remercie vivement pour la confiance qu'il a placée en moi pour mener à bien ce travail. Depuis maintenant plusieurs années, j'ai eu à apprécier son amitié, sa gentillesse et sa disponibilité en toute circonstance.

Il m'est particulièrement agréable de remercier Monsieur Alain HEYRAUD qui m'a spontanément accueilli au CERMAV et mis à ma disposition tous les moyens du laboratoire qu'il dirige. Sa contribution a été déterminante pour l'analyse structurale des EPS.

Je remercie aussi l'ensemble des membres du LBS pour le soutien et les encouragements qu'ils n'ont cessé de prodiguer. Merci à Saïd Amrani pour son amitié et sa confiance, j'espère qu'il sera le suivant !

Les membres du LEMIR que j'ai eu l'occasion d'apprécier et avec lesquels j'ai eu de longues discussions scientifiques qui ont permis d'enrichir ma culture scientifique. Un grand merci à Wafa, toujours disponible avec son dynamisme qui la caractérise, Mohamed et Odile pour leur précieuse aide.

Je remercie Mr R. BAKOUR pour ses encouragements permanents. C'est un honneur pour moi de le voir présider ce jury.

Mes remerciements s'adressent également à Mr Hacène Hocine qui a bien voulu examiner ce travail.

Un grand merci à Mr S. Benallaoua qui m'a toujours accueilli de façon admirable à l'université de Béjaia et qui m'a sans cesse encouragé, merci aussi d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement Mme N. Bouguedoura pour ses encouragements et pour avoir accepté spontanément de participer à ce jury. C'est un grand plaisir pour moi de l'associer à ce jury.

Je remercie tout particulièrement Mr N. Sabaou qui a toujours été présent par sa gentillesse et sa disponibilité ainsi que ses encouragements, malgré nos rencontres malheureusement peu fréquentes. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A tous les amis et collègues qui sont restés en Algérie ou qui sont aujourd'hui ailleurs (Mr L. GUILLOU, Mr T. BHATNAGAR) ou qui nous ont malheureusement quitté, je pense particulièrement au Pr A. CHIKHI et Mr K. MEDIOUNI, j'ai eu la chance d'apprécier leurs qualités humaines et c'est avec eux que j'ai fais mes premiers pas dans le monde de la recherche.

Je ne pourrais clôturer cet avant propos sans remercier mon épouse qui m'a beaucoup aidé et soutenu tout au long de ce parcours et qui s'est plus d'une fois sacrifiée pour que « naisse » enfin ce travail. Il est aussi sien !

A Rym, Hocine et Yasmine, Merci d'avoir compris que votre papa avait du travail !

Table des matières

Avant propos

Liste des abréviations et symboles

Introduction	1
Revue bibliographique.....	3
1. Les polysaccharides bactériens.....	3
1.1. Localisation.....	3
1.2. Structure et classification.....	3
1.3. Voies de biosynthèse des EPS	4
1.3.1. <i>Synthèse extracellulaire</i>	<i>4</i>
1.3.2. <i>Synthèse intracellulaire.....</i>	<i>4</i>
1.4. Propriétés des EPS.....	6
1.5. Rôles des EPS.....	6
1.5.1. <i>Protection</i>	<i>6</i>
1.5.2. <i>Nutrition</i>	<i>6</i>
1.5.3. <i>Adhésion</i>	<i>6</i>
2. Le sol.....	7
2.1. La texture.....	7
2.2. Relation entre texture du sol et rétention d'eau.....	8
2.3. La structure.....	8
2.4. Relation entre structure et rétention d'eau.....	10
2.5. Dynamique de l'agrégation	10
2.6. Stabilité structurale.....	11
3. La rhizosphère	13
3.1. Définition.....	13
3.2. La rhizodéposition.....	14

3.2.1. Exsudation racinaire.....	14
3.2.2. Sécrétion et excrétion.....	15
3.2.3. Desquamation.....	15
3.3. Conséquences de la rhizodéposition.....	15
4. Implication des microorganismes dans l'agrégation du sol rhizosphérique.....	17
Matériel et Méthodes	19
1. Matériel.....	19
1.1. Les sols	19
1.1.1. Localisation et situation bioclimatique des sites d'étude.....	19
1.1.2. Caractérisation pédologique	20
1.2. Le végétal.....	21
1.2.1. Caractéristiques agronomiques de la semence de blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha)	21
1.2.2. Détermination du pouvoir de germination.....	22
1.2.3. Détermination de l'histogramme de fréquence des graines.....	23
2. Méthodes.....	23
2.1. Méthodes appliquées aux sols	23
2.1.1. Granulométrie.....	24
2.1.2. Mesure du pH _{eau}	24
2.1.3. Le carbone organique.....	24
2.1.4. L'azote total.....	24
2.1.5. Teneur en calcaire total.....	24
2.1.6. Mesure des humidités des sols	24
2.1.6.1. Humidité actuelle	24
2.1.6.2. Perte en eau par dessiccation.....	25
2.1.6.3. Mesure des pF.....	25
2.1.7. Evaluation de la stabilité structurale du sol.....	26
2.2. Méthodes appliquées aux bactéries.....	26
2.2.1. Protocole expérimental.....	26
2.2.2. Estimation des bactéries mésophiles totales	27
2.2.3. Estimation des bactéries productrices d'EPS.....	27
2.2.4. Isolement et purification des bactéries productrices d'EPS.....	28
2.2.5. Caractérisation phénotypique des isolats producteurs d'EPS.....	29
2.2.5.1. Caractérisation morphologique.....	29

2.2.5.2. Caractérisation biochimique.....	29
2.2.6. Caractérisation génotypique.....	31
2.2.6.1. Amplification par PCR des régions inter-REP.....	31
2.2.7. Identification moléculaire des souches bactériennes.....	33
2.3. Méthodes appliquées aux EPS	35
2.3.1. Production d'EPS et calcul des rendements.....	35
2.3.2. Extraction des EPS et détermination des rendements.....	36
2.3.2.1. Précipitation des EPS.....	36
2.3.2.2. Purification des EPS.....	36
2.3.3. Analyses chromatographiques.....	37
2.3.3.1. Hydrolyse acide des EPS.....	37
2.3.3.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (H.P.L.C.).....	37
2.3.3.3. Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.).....	38
2.3.4. Analyse structurale par Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	40
2.3.5. Mesure de la viscosité des EPS	40
2.4. Bilans de production d'EPS.....	41
2.4.1. Production.....	41
2.4.2. Consommation de saccharose.....	41
2.4.2.1. Principe	41
2.4.2.2. Calculs et expression des résultats.....	42
2.5. Protocole d'inoculation de la rhizosphère du blé dur (Triticum durum L. var. Waha).....	42
2.5.1. Préparation du sol.....	42
2.5.2. Stérilisation des graines de blé.....	42
2.5.3. Préparation des inoculums bactériens.....	43
2.5.4. Mise en culture du blé dur.....	43
2.5.5. Récupération des racines et du sol adhérent.....	43
2.5.6. Détermination des poids secs de sol et de matière végétale.....	44
2.5.7. Suivi des inoculums bactériens.....	44
2.6. Méthode d'analyse statistique	45

Chapitre I

Les bactéries productrices d'exopolysaccharides : taille des populations et isolement des souches bactériennes

1. Dénombrement des populations bactériennes dans la rhizosphère du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha).....	47
1.1. Dénombrement des bactéries rhizosphériques mésophiles totales.....	47
1.2. Dénombrement des bactéries productrices d'EPS.....	49
1.3. Conclusion.....	53
2. Isolement des bactéries productrices d'EPS de la rhizosphère du blé dur	53
2.1. Critères de sélection des souches.....	54
2.2. Distribution globale des isolats producteurs d'EPS.....	54
2.3. Distribution des isolats producteurs d'EPS dans les racines et dans le sol adhérent	58
2.4. Distribution des bactéries productrices d'EPS Gram+/Gram-.....	60
2.5. Distribution en fonction de l'étage bioclimatique.....	62
2.6. Distribution en fonction de la vitesse de croissance des bactéries.....	63
3. Production d'EPS à partir de différents substrats carbonés.....	65
3.1. Production d'EPS sur milieu solide.....	65
4. Analyse de la diversité phénotypique des souches hyperproductrices d'EPS.....	68
4.1. Activités métaboliques	70
5. Sélection, caractérisation et identification de trois souches bactériennes productrices d'EPS.....	73
5.1.Critères de sélection des souches	73
5.2.Identification phénotypique.....	75
5.3.Identification moléculaire par étude phylogénétique du gène <i>rrs</i>	77
5.3.1.Positionnement phylogénétique des souches KYT15 et KYEGB2.....	78
5.3.2.Positionnement phylogénétique de la souche KYGT207.....	80

6. Discussion.....	82
7. Conclusion	87

Chapitre II Production, structure et propriétés rhéologiques des exopolysaccharides produits par <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 et <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207
--

1. Production des EPS bactériens.....	89
1.1. Introduction.....	89
1.2. Influence de la nature de la source de carbone.....	89
1.2.1. Choix des substrats carbonés.....	89
1.2.2. Effet des 3 substrats carbonés.....	90
1.3. Effet des conditions de milieu (RCV-liquide et solide).....	92
1.4. Cinétique de production des EPS (RCV-liquide).....	93
1.5. Cinétique de production de biomasse cellulaire.....	95
1.6. Cinétique de consommation du saccharose.....	96
1.7. Evaluation des teneurs en glucose et en fructose.....	98
2. Discussion	100
3. Conclusion.....	102
4. Étude structurale des exopolysaccharides KYT15, KYEGB2 et KYGT207 et mesure de leur viscosité	102
4.1. Étude structurale.....	102
4.1.1. Analyse qualitative et quantitative des EPS par HPLC et CPG.....	103
4.1.1.1. Analyse des EPS KYT15 et KYEGB2	103
4.1.1.2. Analyse de l'EPS KYGT207.....	105
4.1.2. Détermination de la structure des EPS par RMN.....	107
4.1.2.1. Étude structurale des EPS KYT15 et KYEGB2.....	108
4.1.2.2. Étude structurale de l'EPS KYGT207.....	110
5. Propriétés rhéologiques des EPS en solution.....	115
5.1. Détermination de la viscosité relative des EPS.....	115
5.1.1. Comparaison des viscosités relatives des deux polymères dans l'eau.....	115

5.1.2. Effet de la température sur la viscosité.....	116
5.1.3. Effet de différents polyélectrolytes sur la viscosité relative.....	118
6. Discussion.....	120
7. Conclusion	123

Chapitre III Effets des EPS bactériens (KYEGB2 et KYGT207) sur les propriétés physiques du sol
--

1. Détermination de la rétention d'eau des moûts bactériens.....	126
1.1. Composition relative (biomasse cellulaire-EPS)	126
1.2. Détermination de l'humidité des moûts bactériens.....	126
2. Les polysaccharides purifiés.....	128
2.1. Cinétique de perte en eau à 105 °C.....	128
2.2. Cinétique de perte en eau à 105 °C.....	129
3. Les EPS en association avec les sols.....	131
3.1. Cas d'un sol à texture argileuse et à structure élaborée (ITGC).....	133
3.1.1. Effet de différentes concentrations en EPS sur la rétention en eau (pF 2,7).....	133
3.1.2. Effet sur la réserve en eau utile.....	135
3.1.3. Effet des EPS sur la rétention en eau du sol après ressuyage (humidité équivalente à la capacité au champ).....	136
3.1.4. Cinétique de perte en eau par dessiccation (105 °C).....	138
3.1.5. Évaluation de la stabilité structurale.....	139
3.2. Cas des sols sableux.....	140
3.2.1. Effet sur la rétention d'eau (pF 2,7)	140
3.2.1.1. Sol d'El Goléa.....	140
3.2.1.2. Sol de Tamanrasset.....	141
3.2.2. Effet sur la stabilité structural.....	141

3.2.2.1. Sol d'El Goléa.....	142
3.2.2.2. Sol de Tamanrasset.....	143
3.2.3. Cinétiques de perte en eau à 105°C.....	144
3.2.3.1. Sable d'El Goléa.....	145
3.2.3.2. Sable de Tamanrasset.....	145
4. Discussion.....	146
5. Conclusion.....	152

Chapitre IV Effet de l'inoculation de deux souches bactériennes (<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 et <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207) sur une culture de blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha)

1. Colonisation bactérienne de la rhizosphère.....	156
1.1. Les bactéries inoculées.....	156
1.1.1. Morphologie des colonies.....	156
1.1.2. Morphologie des cellules bactériennes.....	157
1.2. Dénombrement des bactéries inoculées.....	158
1.2.1. La plante.....	159
1.2.2. Le sol.....	159
1.3. Colonisation racinaire par les bactéries inoculées.....	159
1.3.1. Colonisation après deux semaines de culture.....	160
1.3.2. Colonisation après quatre semaines de culture.....	162
2. Effet de l'inoculation de deux souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur l'agrégation du sol rhizosphérique.....	164
2.1. Effet sur la masse de sol adhérent	164
2.2. Effet sur la biomasse racinaire.....	165
2.3. Effet sur le rapport SA/RA.....	165
2.4. Effet sur la biomasse aérienne.....	166

3. Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur la stabilité structurale du sol rhizosphérique.....	167
3.1. Effet global.....	167
3.2. Effet sur différentes tailles d'agrégats	168
4. Discussion.....	170
5. Conclusion.....	175
Conclusion générale	175
Références bibliographiques.....	179

Publication

Annexes

Index

Liste des abréviations et symboles

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Agrégats stables à l'eau
ARN	Acide Ribonucléique
Atm	Atmosphère
a_w	Activité de l'eau
BET	Bromure d'éthyldium
b-F	b-Fructosidase
bv	Biovar
C/N	Rapport « Carbone/azote »
CAC	Capacité au champ
CEC	Capacité d'échange cationique
COSY	Correlation Spectroscopy
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
D	Trajet optique
D₂O	Eau lourde
DEPT	Distortionless Enhancement Polarization Transfer
DNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DNTP*	Désoxyribonucléotide triphosphate radioactif
DO	Densité Optique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EPS	Exopolysaccharides
EUP	Eau Ultra Pure
F	Feuilles
G-	Gram-
G+	Gram+
G-6-P-DH	D Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase
Gal	Galactose
Galp	Ganactopyranose
Glc	Glucose
Glc-1-P	Glucose-1-P
Glc-6-P	Glucose-6-phosphate
GlcA	Acide glucuronique

Glcp	Glucopyranose
GN	Gélose nutritive
HK	Exokinase
HMBC	Heteronuclear Multibond Coherence
HMQC	Heteronuclear MultiQuanta Correlation Transfer
HPa	Hectopascal
HPLC	Chromatographie en phase liquide haute performance
Hz	Hertz
Ia	Hexokinase (phosphoexokinase)
Ib	Isomérase (phosphoglucomutase)
IP	Isoprénylphosphate=phospholipide (C ₅₅)
IP-P	Isopropényl pyrophosphate
IP-P-Pase	Isopropénylpyrophosphate phosphatase
ITGC	Institut de technologie des grandes cultures
Kb	Kilobases
Kcal	Kilocalories
Kda	Kilodaltons
LB	Milieu de culture « Luria Bertani »
M	Molaire
m/m	Masse / masse
Man	Mannose
ManA	Acide mannuronique
mbar	Millibar
mg	Milligramme
MHz	Méga hertz
min.	Minute
ml	Millilitre
N	Normale
NA	Nutrient Aga
nm	Nanomètre
PA	Partie aérienne
Pa	Pascal
Pb	Paires de bases
PCR	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PF	Poids frais.
pF	Point de flétrissement

PGI	Phospho-Gluco-Isomérase
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
Pi	Double liaison
Po	Poise
ppm	Partie par million
PR	Partie racinaire
PS	Poids sec
PSn	Polysaccharide natif
qsp	quantité suffisante pour
r²	Facteur de corrélation
RA	Biomasse racinaire
REP	Repetitive Extragenic Palindromic sequences
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Rotation par minute
SA	Sol adhérent
SA/RA	Rapport « poids sec de sol adhérent/ poids sec racinaire »
Sac	Saccharose
SR	Sol rhizosphérique
T	Témoin
TAE	Tampon acétate EDTA
TFA	Acide trifloracétique
Tm	Température de transition
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
t_r	Temps de rétention
TSA	Tryptic Soy Broth
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra violet
V/V	Volume / volume
var.	Variété
%	Pour cent
ε	Coefficient d'extinction molaire
δ (H , C)	Déplacements chimiques des protons et carbones
τ	Contrainte de cisaillement
Ψ	Potentiel hydrique
η	Viscosité du polymère
γ	Vitesse de cisaillement.
Ψ_g,	Potentiel gravitaire
μm	Micromètre

η_o	Viscosité du solvant
η_{rel}	Viscosités relatives
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
^{13}C RMN	Résonance magnétique nucléaire du carbone
^1H RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
$^1J_{C,H}$ et $^3J_{H,H}$	Constantes de couplage
2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions

INTRODUCTION

La céréaliculture occupe une place privilégiée en Algérie. Malgré les espaces importants réservés à cette culture, les rendements demeurent faibles. Les moyennes annuelles nationales fluctuent entre 10 et 20 qx/ha. Cette production couvre seulement 30% des besoins en Algérie, le reste étant importé, principalement du Canada.

L'un des facteurs limitant la production de blé dur en Algérie est sans conteste le facteur climatique, caractérisé par une pluviométrie faible et irrégulière. De plus, les sols réservés à la céréaliculture présentent très souvent une texture meuble et sont pauvres en matière organique, ce qui a pour conséquence une faible capacité de rétention d'eau et de cations échangeables.

Il est donc important de tenir compte de la fragilité structurale des agrosystèmes céréaliers, en adaptant des modes d'exploitation des sols appropriés, à même de pérenniser la production céréalrière. Ainsi, le sol, théâtre de nombreuses transformations initiées par des organismes vivants, voit son fonctionnement perturbé par les pratiques de l'agriculture intensive qui englobent la mécanisation, l'utilisation souvent abusive des amendements chimiques ainsi que de nombreuses substances phytosanitaires, source de pollution des sols et des nappes d'eau souterraines. La stabilité et la durabilité d'un écosystème dépendent principalement de l'équilibre structural du sol. Celui-ci est en effet un élément déterminant dans la dynamique de l'eau et des éléments minéraux, nécessaires au développement des végétaux (Crawford, 1994), notamment par la facilitation de la croissance racinaire (Alexander et Miller, 1991).

Il apparaît donc que dans le cadre d'une agriculture durable, la préservation du sol contre les différents facteurs d'érosion est un enjeu considérable. La prise de conscience de la nécessité de préserver l'environnement obligent une remise en cause du mode d'exploitation et de gestion des écosystèmes. Maîtriser de façon durable le fonctionnement des agrosystèmes, impose une connaissance approfondie non seulement des différentes composantes du sol (Physiques, chimiques et biologiques), mais aussi d'une sélection variétale performante et adaptée aux conditions pédoclimatiques.

La composante biologique rhizosphérique constitue à ce titre un facteur déterminant dans l'agrégation du sol. Elle est constituée par la flore, la faune et les microorganismes telluriques. Cette dernière joue un rôle particulièrement intéressant dans la rhizosphère, grâce à la diversité de ses activités biochimiques. L'activité microbienne constitue aujourd'hui un indicateur de « bonne santé » du sol.

Des études sur les microorganismes telluriques ont permis ces dernières années de développer le concept « d'engrais biologique », basé essentiellement sur des propriétés dites « bénéfiques » de certains microorganismes. Cependant, les nombreuses recherches dans ce domaine se sont orientées préférentiellement vers la fixation biologique de l'azote

atmosphérique qui a occupé une place de choix (Tisdall et Oades, 1979 ; Metzger *et al*, 1987 ; Tisdall, 1994) au détriment des autres activités microbiennes du sol.

Les bactéries dites « PGPR » (Plant Promoting Growth Rhizobacteria), beaucoup moins étudiées, induisent aussi une augmentation de la biomasse végétale.

D'autres encore sont capables de solubiliser des minéraux dans la rhizosphère, comme les phosphates, qui se traduit par une mobilisation de cet élément et donc une meilleure disponibilité pour la plante et les microorganismes.

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

Ces bactéries trouvent un terrain d'application dans le domaine agricole en structurant le sol rhizosphérique. L'introduction d'EPS extraits de cultures microbiennes, a conduit à une amélioration de l'agrégation du sol ainsi que sa stabilité structurale (Chaney et Shift, 1986 ; Chenu *et al.*, 2000). Ces modifications structurales ont un effet sur les propriétés physiques et chimiques du sol, engendrant transferts plus importants d'eau et des éléments minéraux du sol vers la plante.

Les interactions plante-microorganismes-sol illustrent en partie de la complexité du système rhizosphérique, en raison des nombreux facteurs biotiques et abiotiques intervenant. Il apparaît donc difficile d'appréhender de telles études qui mettent en jeu des mécanismes multiples et interactifs. Si la plante prélève les éléments dont elle a besoin pour sa nutrition à partir de ce sol rhizosphérique, elle agit aussi comme un fournisseur d'éléments nutritifs, en particulier en exsudant des hydrates de carbone et peut être à ce titre, considérée comme un « bioréacteur ».

Cette particularité qu'offre la plante par l'intermédiaire de son système racinaire peut être mise à profit dans le cadre de l'inoculation de bactéries productrices d'EPS performantes pour améliorer la structure du sol rhizosphérique. En effet, sur le plan agronomique il est difficile de concevoir un épandage d'EPS bactériens, étant données les grandes surfaces à traiter. L'inoculation au champ de ces bactéries peut constituer une alternative intéressante, à condition que ces souches bactériennes prolifèrent et se maintiennent dans la rhizosphère.

Ce travail se veut une contribution à l'étude des EPS bactériens dans la structuration du sol et de ses conséquences. Il s'inscrit dans le contexte de la problématique de l'eau, par l'amélioration des capacités hydriques du sol, en utilisant des bactéries productrices d'EPS.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'estimation des populations bactériennes productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (Chapitre I), qui constitue une donnée fondamentale pour l'étude de l'implication des EPS dans le phénomène d'agrégation du sol.

Nous avons procédé ensuite à la sélection de représentants producteurs d'EPS efficaces, basée essentiellement sur la productivité des souches ainsi que la viscosité et l'élasticité des EPS (Chapitre II). La production de ces souches choisies a été évaluée.

L'identification des EPS a été réalisée grâce à des analyses structurales (Chapitre II). La capacité agrégeante des EPS dépendant étroitement de certaines propriétés rhéologiques, il nous a paru opportun de réaliser des mesures de viscosité pour mieux en apprécier l'effet sur le sol nu (Chapitre III).

Enfin, un essai d'inoculation de deux souches productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) en pots a été réalisé pour estimer leur pouvoir colonisateur ainsi que les effets à la fois sur le sol et la plante (Chapitre IV).

1. Les polysaccharides bactériens

Le monde microbien offre une possibilité de choix de production de polysaccharides très large, avec des applications multiples dans divers domaines.

Lors d'un stress physique ou chimique, les bactéries produisent des EPS, pour créer un micro-environnement protecteur et échapper ainsi aux contraintes générales du milieu. Ces contraintes peuvent être de natures diverses, comme un stress hydrique ou une forte salinité par exemple.

D'autre part, la nature anionique de la majorité des EPS, leur confère une capacité de rétention d'eau, de cations et de nutriments, importante (Sutherland, 1988 ; Whitfield, 1988). Ces caractéristiques des EPS nous intéressent particulièrement dans le cadre de ce travail, puisqu'elles confèrent au sol une meilleure agrégation et une plus grande stabilité structurale (Chenu *et al.*, 2000).

C'est pour ces raisons que les milieux extrêmes, comme les écosystèmes sahariens par exemple, peuvent constituer un moyen de criblage très intéressant de ces bactéries.

1.1. Localisation

Selon leur localisation, les polysaccharides bactériens se répartissent en trois groupes :

- Les polysaccharides intracellulaires qui servent de source de carbone et d'énergie.
- Les polysaccharides pariétaux (acides téichoïques, les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides)
- Les polysaccharides extracellulaires dont on distingue 2 groupes :
 - o les exopolysaccharides (EPS),
 - o les polysaccharides capsulaires (PSC).

1.2. Structure et classification

Les polysaccharides sont constitués de nombreuses sous-unités qui sont, soit des sucres simples, soit leurs dérivés. Ils peuvent former des chaînes linéaires, ramifiées ou non. (Martens et Frankenberger, 1992). En fonction de la nature des monomères constitutifs de l'unité de répétition des EPS, on distingue les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides.

- *Les homopolysaccharides* : ils ne contiennent qu'un seul type de résidus osidiques, comme les lévanes, qui sont des polymères de fructose ou les dextranes, polymères de glucose. D'autre part, la structure de ces polymères détermine leur comportement en solution. C'est ainsi que la cellulose, le scléroglycane (ou pullulane) et le curdlane, tous les trois composés exclusivement de glucose ont des propriétés rhéologiques très

différentes : la cellulose est insoluble dans l'eau, le scléroglycane très visqueux et le curdlane se présente sous forme de gel.

- *Les hétéropolysaccharides* : l'unité de répétition de ce type d'EPS est composée de deux à une dizaine de résidus osidiques, c'est le cas du xanthane, de l'alginate par exemple. Il s'agit du groupe d'EPS le plus important, en raison de la diversité de ses représentants. En général, le D-glucose, le D-galactose, le D-mannose, le L-fucose et le L-rhamnose représentent les monosaccharides le plus souvent rencontrés. Ces polysaccharides bactériens peuvent également contenir des acides uroniques, des pentoses, des heptoses ou encore des sucres aminés.

Les polysaccharides présentent une hydrophilie importante, ce qui permet de les utiliser pour modifier les propriétés des systèmes aqueux, comme par exemple une viscosité élevée à faibles concentrations, des propriétés gélifiantes, une bonne solubilité dans l'eau et des propriétés adhésives permettant aux bactéries les synthétisant, de se lier fortement à des supports (Sanin *et al.*, 2003).

1.3. Voies de biosynthèse des EPS

La synthèse des EPS peut varier en fonction des conditions environnementales et de la phase de croissance de la bactérie étudiée (Huang *et al.*, 1995). Toutes leurs voies de biosynthèses ne sont pas encore connues, car elles sont différentes et spécifiques à chaque bactérie. La biosynthèse de quelques EPS a toutefois été particulièrement étudiée et les modèles décrits ne concernent que quelques espèces bactériennes, prises comme modèles d'étude.

1.3.1. Synthèse extracellulaire

Les dextranes sont exclusivement composés de glucose. Ils sont synthétisés par des bactéries (*Streptococcus* et *Leuconostoc*), qui n'utilisent qu'un substrat spécifique, le saccharose. En l'absence de ce substrat, la bactérie se développe, mais elle est incapable de synthétiser le polymère. La synthèse de ce polysaccharide est très particulière comme celle du mutane et du lévane, puisqu'elle a lieu dans la paroi cellulaire ou à l'extérieur de la cellule.

Ce type de synthèse concerne essentiellement le dextrane et le lévane qui sont constitués d'un seul type de monomère. Ils représentent de ce fait la structure la plus simple des EPS bactériens. En général, les bactéries appartenant au genre *Leuconostoc* synthétisent le dextrane, alors que les *Bacillus* ou *Paenibacillus* produisent surtout un lévane.

La synthèse du lévane se déroule entièrement à l'extérieur de la cellule bactérienne et le saccharose n'a pas besoin de pénétrer dans la cellule (Whitfield, 1988). Le lévane est produit en utilisant le saccharose comme source de carbone et d'énergie, grâce à une seule enzyme : la lévane-saccharase (Gross *et al.*, 1989). La synthèse de cet EPS commence par le greffage d'un fructose sur un saccharose.

1.3.2. Synthèse intracellulaire

C'est le cas de la plupart des EPS étudiés jusqu'à présent et qui sont produits essentiellement par des bactéries à Gram négatif (Sutherland, 1994). Les molécules organiques complexes subissent d'abord une hydrolyse extracellulaire. Les molécules simples issues de cette hydrolyse sont ensuite transférées à l'intérieur de la cellule (Whitfield, 1988). Il y aurait donc pénétration des substrats carbonés, biosynthèse, puis sécrétion sous forme polymérisée. Ces EPS se présentent soit **(i)** sous forme d'une capsule enrobant la cellule bactérienne : polysaccharide capsulaire « slime » en anglais, soit **(ii)** sécrétés dans le milieu environnant: les exopolysaccharides.

Le système enzymatique permettant la synthèse de tels polymères est propre à chaque bactérie. Cependant, l'absence d'une amorce bloque l'élongation de la partie osidique.

De manière générale, la majorité des EPS est synthétisée par des mécanismes intracellulaires, qui nécessitent l'introduction du substrat dans la cellule. Il est d'abord phosphorylé, puis éventuellement modifié en fonction de la nature de l'EPS.

Les résidus ainsi obtenus sont transformés en "nucléotides sucres" (uridine-5'-diphosphoglucose ou UDP glucose par exemple) qui sont les précurseurs activés du polymère. Le premier monosaccharide peut être lié à un transporteur lipidique (undecaprenyl phosphate ou isoprénoïde pyrophosphate). La polymérisation des monosaccharides activés est réalisée sur la face interne de la membrane cytoplasmique ou bien l'unité répétitive est transportée à travers la membrane avant la polymérisation (De Vuyst *et al.*, 2001).

Le polymère est enfin libéré dans le milieu de culture ou reste attaché à la membrane en formant une capsule enrobant la cellule.

Le premier monosaccharide peut être lié à un transporteur lipidique : un décaprényl phosphate ou isoprénoïde pyrophosphate.

La polymérisation des monosaccharides activés est réalisée sur la face interne de la membrane cytoplasmique ou alors l'unité répétitive est transportée à travers la membrane avant la polymérisation. Le polymère est enfin libéré, après la sécrétion dans le milieu de culture ou reste attaché à la membrane en formant une capsule autour de la cellule.

En plus des résidus osidiques, les EPS comprennent des groupements fonctionnels appelés aussi substituants. Ces modifications ont lieu sur les monosaccharides avant la construction de l'unité répétitive ou après la polymérisation (Fig. 1).

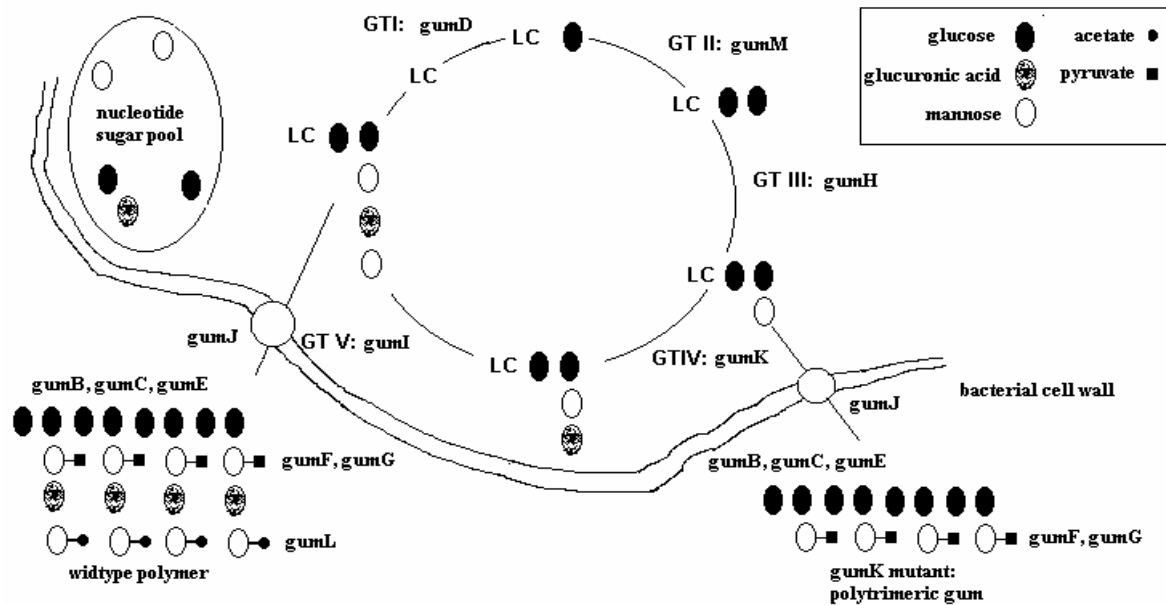


Figure 1. Schéma représentant un modèle simplifié de la biosynthèse du xanthane (d'après Coplin et Cook, 1990).

La synthèse du xanthane est extracellulaire, GT : Glycotransferase, LC : Lipid Carrier.

1.4. Propriétés des EPS

Les propriétés rhéologiques de ces polymères, c'est-à-dire leur comportement mécanique en solution, font de cette famille de molécules organiques, la source principale d'agents hydratants, texturants, épaississants, émulsifiants, gélifiants et solidifiants pour les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques (Ashtaputre et Shal, 1995 ; Huang *et al.*, 1995).

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

1.5. Rôles des EPS

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

1.5.1. Protection

L'un des premiers rôles attribués aux EPS bactériens consiste en la protection des bactéries vis à vis du milieu environnant. C'est ainsi que dans des conditions naturelles, en particulier dans les milieux extrêmes, les populations bactériennes sont soumises à de nombreuses contraintes de nature physique et chimique. Dans le sol, même si la nature et l'intensité de ces contraintes ne sont pas aussi importantes, les populations microbiennes

subissent des agressions d'ordre physique, chimique et/ou biologique. La production d'EPS constitue ainsi une réponse physiologique, offrant à la bactérie qui le synthétise une protection contre la dessiccation, la pression osmotique, la carence en nutriments, la prédation, l'action des antibiotiques et de toxines par exemple (Foley et Gilbert, 1996).

1.5.2. Nutrition

Les EPS, grâce à leur caractère anionique, peuvent fixer les ions et des substances nutritives qui circulent dans leur voisinage immédiat, permettant ainsi leur transfert à la bactérie. Ces EPS peuvent ainsi constituer une réserve de nutriments, indispensables au maintien et à la prolifération des bactéries (Costerton et Irwin, 1981 ; Sutherland, 1972). Ces EPS sont aussi capables de retenir des quantités d'eau importantes, offrant ainsi à la bactérie un micro-environnement, qui échappe aux contraintes de l'environnement par la mise en place d'une zone tampon entre le milieu extérieur et la milieu intracellulaire (Roberson et Firestone, 1992).

1.5.3. Adhésion

Certaines bactéries ont la capacité d'adhérer à des supports solides, grâce à la synthèse d'EPS (Sutherland, 1972 ; Whitfield, 1988). Dans le sol, cette adsorption des EPS à la surface des particules élémentaires est à l'origine de la formation des agrégats et de l'amélioration des forces de cohésion. L'une des premières étapes de la colonisation rhizosphérique consiste en l'adhésion des bactéries aux racines.

2. Le sol

Le sol est la couche superficielle meuble, de l'écorce terrestre, dans laquelle se développent les racines des plantes. Il est le résultat d'un long processus de dégradation de la roche mère : **pédogénèse**, sous l'action combinée de facteurs abiotiques (climatiques par exemple) et de facteurs biotiques (couvert végétal, faune et microorganismes). Il est constitué de deux compartiments différents :

- le compartiment organique : qui comprend la matière organique vivante métaboliquement active et la matière organique morte,
- le compartiment minéral : composé d'éléments de tailles différentes, classés en fonction de leur volume en : cailloux, graviers, sables grossiers sables fins, limons et argiles.

Le sol est donc un milieu complexe et hétérogène qui ne peut être dissocié du monde vivant (végétaux, microfaune et microorganismes). Pour les agronomes, il est considéré comme un support pour les cultures et, à ce titre, il doit répondre à des exigences fonctionnelles spécifiques imposées par la plante.

L'une des caractéristiques physiques les plus importantes réside dans la structure du sol, définie comme étant l'agencement spatio-temporel des éléments qui la constituent. Cette organisation physique des particules élémentaires du sol, tient aussi compte de la notion de texture qui représente la proportion relative en éléments minéraux. Les particules primaires

englobent aussi les éléments organiques qui servent de ciments dans le processus d'agrégation (Christensen, 1992).

2.1. La texture

La texture du sol est définie d'après la distribution pondérale des différentes fractions minérales, appelée aussi granulométrie (Tableau I).

Tableau I. Classement des particules minérales en fonction de leur taille.

Catégorie	Diamètre extrême
Sable grossier	200-2000 μm
Sable fin	50-200 μm
Limon grossier	20-50 μm
Limon fin	2-20 μm
Argile	0-2 μm

La détermination de la classe texturale est un critère important, non seulement dans la classification d'un sol, mais aussi dans la compréhension des phénomènes physiques et chimiques régissant le fonctionnement d'un sol. La fraction minérale solide, représente à elle seule près de 93 à 95 % du poids total du sol.

2.2. Relation entre texture du sol et rétention d'eau

La texture d'un sol est un caractère important qui détermine la capacité de rétention d'eau. En effet, les argiles, au même titre que la matière organique du sol, permettent d'améliorer le statut hydrique d'un sol (Tableau II) et la stabilité de sa structure (Kouakoua *et al.*, 1999).

Tableau II. Relation entre la texture et la capacité de rétention d'eau. (Henin, 1977)

Texture	Capacité de rétention d'eau
Sable grossier	9 - 10 %
Sable fin	16 - 20 %
Sable fin organique	20 - 21 %
Argilo-sableux	22 - 23 %
Argilo-limoneux	23 - 24 %
Argile	35 - 36 %

2.3. La structure

L'une des premières définitions des agrégats du sol consiste en un regroupement de particules de sol, basé sur leurs forces de cohésion (Martin *et al.*, 1955). Depuis, de nombreuses recherches ont porté à la fois sur le phénomène d'agrégation et sur la nature des ciments les constituant.

La structure d'un sol résulte de l'agencement de ses particules élémentaires les unes par rapport aux autres (Fig. 2). Celles-ci sont agglomérées par un ciment d'origine minérale (argile, oxyde de fer, silice amorphe) ou organique (polysaccharides, substances humiques), formant des unités structurales de petite taille (micro-agrégats) réunies en unités plus importantes (macro-agrégats) dans l'édifice (Tisdall et Oades 1982 ; Dexter, 1988).

La matière organique, fraction déterminante dans les phénomènes d'agrégation, provient de l'activité de tous les organismes présents à la surface ou à l'intérieur du sol. Elle sert de ciment entre les particules minérales ou entre les agrégats. Une partie de cette matière organique est produite par des organismes vivants (déjections animales, exsudats racinaires, litière végétale, humus, polysaccharides microbiens etc...), le reste est constitué par les débris des végétaux morts, les cadavres d'animaux et les cellules microbiennes lysées.

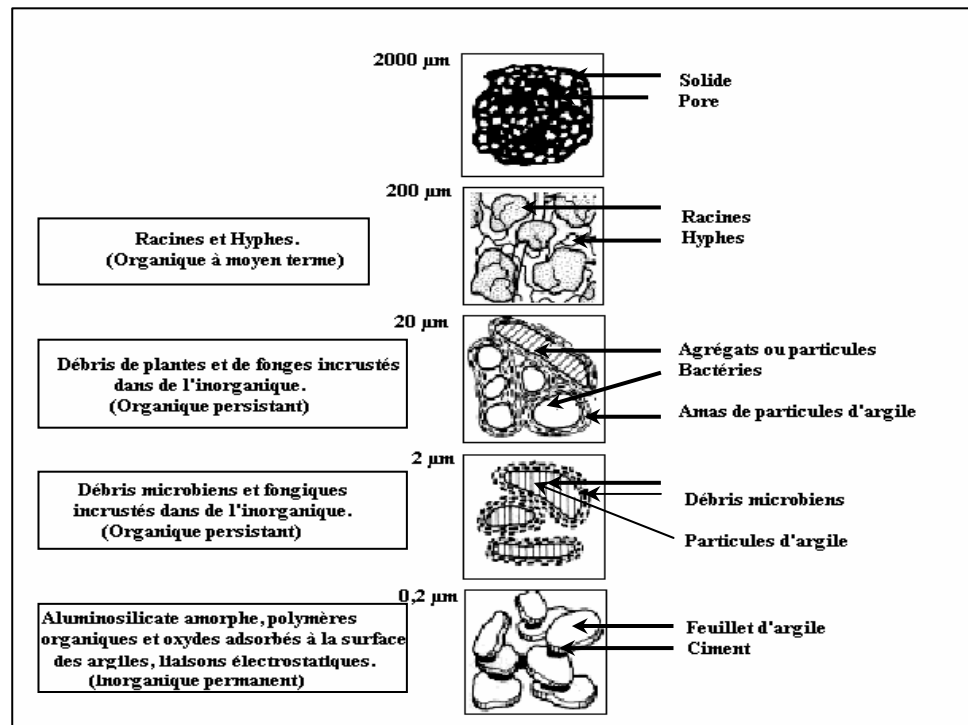


Figure 2. Modèle d'organisation des agrégats avec les agents de liaison majoritaires (Tisdall et Oades, 1982).

C'est ainsi que certains auteurs classent la matière organique, impliquée dans le processus d'agrégation, en fonction de leur taille (Puget *et al.*, 2000).

Pour les agrégats de taille $\leq 200 \mu\text{m}$, les EPS bactériens sont particulièrement actifs dans la consolidation de la structure (Tisdall et Oades, 1982 ; Fig. 2) et permettent d'éviter les phénomènes de compaction par une augmentation de la plasticité des agrégats (Ball *et al.*, 1996).

Pour les agrégats de taille $\geq 200 \mu\text{m}$, la fraction organique impliquée dans la structuration et la stabilisation de l'agrégation est essentiellement représentée par les hyphes mycéliens et les racines fines (Fig. 2). Il n'est pas exclu que les polysaccharides microbiens, ainsi que le mucilage produit par les racines, aient une action stabilisatrice de la structure du sol.

D'autres travaux ont montré que les cyanobactéries filamenteuses étaient impliquées dans le processus d'agrégation et pouvaient même agglomérer des particules de sable. Un tel effet a été expliqué par une action conjuguée des filaments (action physique) et des polysaccharides sécrétés par ces cyanobactéries (Zhang *et al.*, 2006).

Il apparaît donc clairement qu'il est difficile de fractionner les effets de la matière organique sur l'agrégation du sol, en raison de la complexité des interactions « plante-microorganismes-sol » qui s'y déroulent et de l'hétérogénéité du sol. Par ailleurs, la structure du sol, en particulier dans les agrosystèmes, est en renouvellement permanent sous l'action de nombreux facteurs : climatiques, pratiques culturales et de la nature des espèces cultivées. C'est ainsi que des cultures en rotation induisent une augmentation de l'agrégation et une meilleure perméabilité (Weill *et al.*, 1988 ; Meek *et al.*, 1990).

La stabilité de ces agrégats dépend donc de la quantité de mucilage produite, de sa nature, sa persistance dans le sol et du nombre d'hyphes (Tisdall, 1991 et 1994).

L'arrangement spatial des différentes fractions déterminant l'agrégation du sol ménage ainsi des interstices appelés pores. Ces derniers sont remplis par :

- une phase liquide qui constitue la solution du sol et
- une phase gazeuse composée d'un mélange d'azote, d'oxygène de dioxyde de carbone et de vapeur d'eau.

Ainsi, le volume poral ou porosité totale du sol joue un rôle important dans l'activité biologique de la rhizosphère. Il détermine à la fois l'état physiologique des racines, mais aussi la nature fonctionnelle des populations microbienne rhizosphériques.

Il apparaît donc que la structure d'un sol doit être appréhendée à différentes échelles, pour en comprendre sa dynamique et surtout la préserver. Dans les écosystèmes méditerranéens, semi-arides dégradés, des programmes de reforestation permettent d'éviter l'érosion des sols par la conservation de la biodiversité (Caravaca *et al.*, 2003).

2.4. Relation entre structure et rétention d'eau

Pour avoir une idée physiologique de l'humidité du sol et de sa localisation, nous avons reporté les relations entre la taille des pores et la tension de succion nécessaire pour les vider de leur eau (Tableau III).

Les racines des plantes puisent l'eau dans la « réserve utile » du sol et la disperse dans l'atmosphère par évapotranspiration.

Tableau III. Relation entre la taille des pores et la tension de succion nécessaire pour les vider de leur eau (d'après Rowell, 1994)

Taille des pores (en μm)	Tension de succion (en hPa)	Commentaires
20 000	0,15	Grosse crevasse
4 000	0,75	Galerie de vers
300	10	Diamètre d'une racine de blé
60-30	50-100	Tension de succion à la capacité au champ
2	1 500	Limite de pore contenant de l'eau facilement utilisable
0,2	15 000	Point de flétrissement
0,003	1 000 000	Tension de succion d'un sol séché à l'air

Si l'eau disponible diminue tandis que la tension de succion du sol augmente, les racines ont de plus en plus de difficulté à extraire l'eau. Au-dessous d'une tension de succion de 1 atm (1000 hPa), l'absorption de l'eau par les racines est fortement diminuée; elle devient nulle lorsque le point de flétrissement est atteint (en général 16 atm, soit $pF = 4,2$). Ce point de flétrissement permanent varie beaucoup avec la texture du sol.

2.5. Dynamique de l'agrégation

L'agrégation est considérée comme un phénomène dynamique dont les variations à court terme relèvent du jour et de la semaine (Angers, 1998).

Ces mouvements structuraux sont étroitement liés à la dynamique de l'eau dans les agrégats et sont définis comme un « effet climatique ». Des conditions extrêmes de saturation en eau ou au contraire de sécheresse, génèrent des phénomènes d'éclatement des agrégats, surtout dans le cas des sols argileux (Angers, 1998). La présence d'un couvert végétal peut atténuer ces effets, par l'intermédiaire de son système racinaire qui joue un double rôle :

- il structure le sol rhizosphérique grâce à la rhizodéposition,
- il se comporte comme une pompe à eau, occasionnant ainsi une alternance « dessiccation-humectation ». (Semmel *et al.*, 1990 ; Materechera *et al.*, 1992).

Par ailleurs, Angers (1998) a pu observer un changement rapide (à l'échelle de quelques années) de la proportion de macroagrégats, sous l'influence du travail du sol, de la pratique des rotations et de l'application d'amendements organiques.

2.6. Stabilité structurale

La stabilité structurale d'un sol définit sa capacité à conserver sa forme structurale. Elle dépend essentiellement de la nature des forces de cohésion impliquées et définies par les

propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. Les principaux facteurs qui agissent sur la stabilité structurale sont :

- la nature de la matière organique,
- les cycles d'humectation-dessiccation, et
- le travail du sol (surtout la mécanisation).

Sur un plan quantitatif, Chaney et Swift (1984) ont établi une étroite corrélation entre la teneur en matière organique et la stabilité structurale du sol. Par ailleurs la nature de la matière organique présente une importance capitale. C'est ainsi que Piccolo et *al.* (1999) attribuent une fonction protectrice des agrégats aux composés humiques, grâce à l'hydrophobie de ces molécules organiques. En effet, cette caractéristique lui confère un rôle protecteur contre la biodégradation d'une autre fraction de la matière organique dite « biodégradable » impliquée dans l'agrégation du sol.

La dominance des fractions de la matière organique humifiée correspond souvent à des sols structurés, dans lesquels l'activité microbiologique est intense. Dans ces sols, la matière organique est complexée avec les argiles; elle contribue à l'agrégation du sol et sert de tampon pour les éléments nutritifs.

Il existe trois grands types de fractions humiques: les acides fulviques, les acides humiques et l'humine qui correspondent à des niveaux de polymérisation différents (Fig. 3)

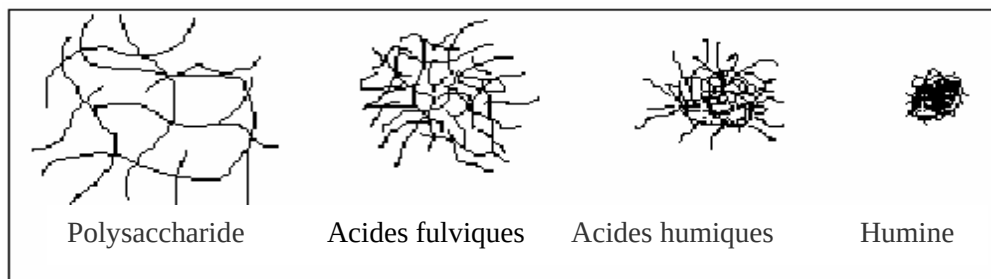


Figure 3. Représentation schématique des composants de la matière organique (humus) en fonction de leur degré de polymérisation.

En dehors de la fraction organique du sol, d'autres composés minéraux comme les argiles peuvent renforcer la structure du sol. Des travaux sur des sols des régions intertropicales montrent que la stabilité de l'agrégation est très élevée (Six *et al.*, 2002). Ces auteurs expliquent cette grande stabilité structurale par la composition minéralogique des sols, dominée par des argiles associées à des hydroxydes métalliques.

La stabilité des agrégats à l'eau est définie d'après leur capacité à résister à une humidification brutale (agitation mécanique dans l'eau). Cette propriété est utilisée pour étudier le degré de cohésion des agrégats et la dynamique des liaisons entre particules de sol. La stabilité des agrégats diminue à mesure qu'augmente la vitesse d'imbibition ; elle est liée à la compression de l'air piégé au sein des agrégats ainsi qu'à l'expansion des argiles.

La stabilité structurale d'un sol est généralement évaluée par des techniques anciennes, qui consistent à déterminer les taux d'agrégats stables à l'eau (Hénin, 1958). Même si les techniques ont évolué, le concept reste identique (Darbyshire *et al.*, 1993). La stabilité des agrégats à l'eau et la stabilité structurale sont donc considérées comme des notions similaires (Kay et Angers, 1999).

Les meilleures méthodes pour déterminer la stabilité ou la distribution des agrégats en fonction de leur taille ont évolué avec la standardisation des forces destructives appliquées et des efforts pour les rendre comparables à celles qui prévalent au champ. L'intensité de la dégradation est estimée par la proportion (en masse) des agrégats fragmentés en agrégats ou particules primaires inférieurs à une taille donnée (Kemper et Rosenau, 1986).

L'alternance des effets multiples de l'environnement sur le processus d'agrégation du sol peut être schématisée (Fig. 4). La structure du sol représente donc un concept dynamique, dans lequel les phénomènes de structuration et de destructuration se succèdent au rythme des facteurs environnants. Ce remaniement constant fait que, selon sa localisation, la matière organique a un âge (persistance) et une dynamique particulière (Puget *et al.*, 2000).

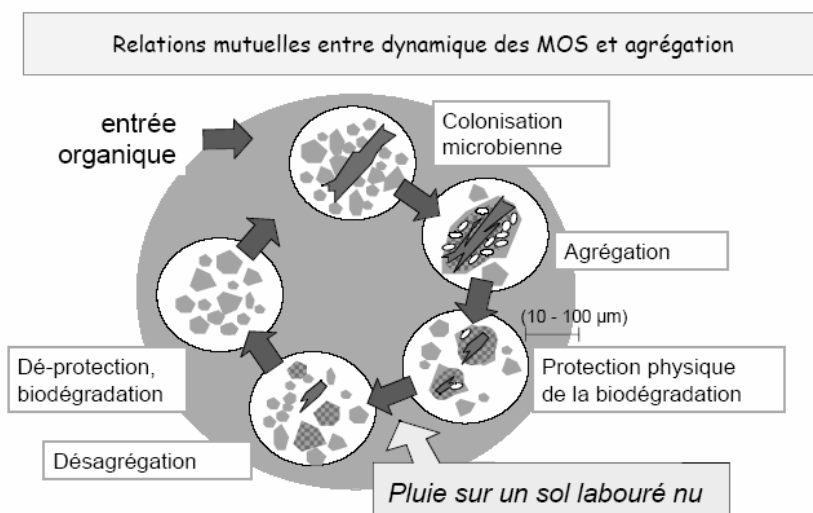


Figure 4. Relations mutuelles entre dynamique des matières organiques et l'agrégation du sol (Balesdent, communication personnelle)

La préservation d'une quantité de matière organique minimale dans le sol est indispensable pour le fonctionnement des écosystèmes, tant sur le plan physique, chimique et biologique. L'immobilisation de carbone dans le sol permet à la fois de maintenir la biodiversité et de réduire les risques d'érosion en préservant sa stabilité structurale. Par ailleurs, de nombreuses études ont porté sur l'effet protecteur des argiles vis-à-vis de la matière organique (Feller et Beare, 1997 ; Sorensen *et al.*, 1971 ; Hassink, 1997 ; Merckx *et al.*, 1985 ; West et Marland, 2002) contre sa biodégradation par les microorganismes telluriques, offrant ainsi une plus grande longévité à la structure du sol.

La répartition et la résistance des zones de rupture vont conditionner la répartition de la taille des agrégats en différentes classes. Les caractéristiques de ces zones de rupture sont

principalement fonction de la texture du sol, de sa teneur en matière organique et de la composition des ciments qui lient les particules organiques et inorganiques entre elles (Kay et Angers, 1999).

3. La rhizosphère

3.1. Définition

C'est au tout début de 20^{ème} siècle que fut définie la rhizosphère, comme étant la matrice de sol sous l'influence directe des racines (Hiltner, 1904).

La rhizosphère comprend (Gobat *et al.*, 2004) :

- l'endorhizosphère (intérieur de la racine),
- le rhizoplan (surface racinaire) et
- l'exorhizosphère ou sol rhizosphérique.

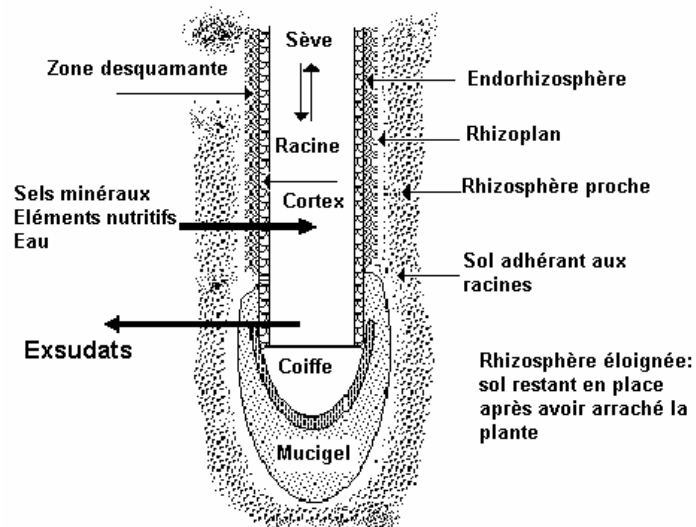


Figure 5. Représentation schématique de la rhizodéposition.

D'après Lespinat et Berlier (1975).

Le sol rhizosphérique est aussi considéré comme un manchon de sol entourant les racines et intimement lié à ces dernières : **sol adhérent** (Fig. 5).

3.2. La rhizodéposition

La rhizodéposition comprend différents composés organiques, certains libérés de façon active (sécrétions, mucilages), d'autres de façon passive (exsudats, lysats, exsudats).

Cet apport trophique des racines à la rhizosphère se fait essentiellement selon trois phénomènes :

3.2.1. Exsudation racinaire

Ces molécules sont variées et comprennent des glucides, des acides organiques (tels que l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique), des vitamines, des acides gras, des enzymes, des hormones (flavonoïdes etc...). Ces composés, de faible poids moléculaire, sont libérés de façon passive.

La nature et la quantité de ces exsudats racinaires varient suivant l'espèce végétale considérée (Rovira *et al.*, 1979) et pour une même espèce, selon l'âge ou le stade de développement. Selon Hamlen *et al.* (1972), la quantité de glucides libérés par unité de masse de matière sèche diminue avec le temps. Des études portant sur la quantification des exsudats racinaires du blé ont montré qu'après seulement 14 j de culture sur un milieu minéral minimum, les plantules de blé sécrétaient 2,8 % de leur poids sec, sous forme de saccharose, de glucose et de fructose ; le saccharose représentant la plus grande proportion de composés carbonés sécrétés (Hess *et al.*, 1985 ; Derrien *et al.*, 2004).

3.2.2. Sécrétion et excrétion

La sécrétion est un processus actif, elle concerne généralement des composés de poids moléculaires élevés, tels que les mucilages, qui sont pour l'essentiel des composés insolubles constitués de polysaccharides (Materechera *et al.*, 1992).

3.2.3. Desquamation

Les débris de cellules racinaires peuvent servir de source de carbone et d'énergie pour un grand nombre de microorganismes. Ils résultent du phénomène de desquamation, en particulier des cellules de la coiffe et des parenchymes corticaux qui sont constamment renouvelés (Rovira *et al.*, 1979 ; Meharg, 1994).

La rhizodéposition est tributaire de nombreux facteurs endogènes et exogènes. Comme nous l'avons signalé pour l'exsudation racinaire, celle-ci est dépendante de l'espèce végétale, parfois même de la variété considérée ainsi que de l'âge de la culture. Chez le maïs, cultivé en conditions stériles, la quantité de « rhizodépôts », donc la teneur en C et N diminue avec l'âge de la plante (Tremblay-bœuf, 1995).

Aussi, les conditions de culture ont une importance capitale, à la fois sur la nature et la quantité de matières exsudées. Une augmentation de la température stimule l'exsudation de sucres, sans affecter celle des acides aminés (Vancura, 1967). Une diminution de la pression partielle en CO₂ ou en O₂ stimule l'exsudation racinaire (Whipps, 1984 ; Rittenhouse et Hale, 1971). La majorité du CO₂ rhizosphérique provient de la respiration (racines, microorganismes et pédofaune) ; il représente entre 70 et 80 % de l'atmosphère rhizosphérique (Rovira, 1972).

L'effet de la photopériode sur le phénomène d'exsudation racinaire est cependant controversé. Pour certains d'entre eux, ils relèvent une capacité d'exsudation plus importante le jour que la nuit (Liljeroth *et al.*, 1990), alors que pour d'autres, il n'y a pas de différence significative (Lepinat *et al.*, 1975).

Le processus de rhizodéposition apparaît donc comme un flux énergétique d'une importance capitale pour le maintien des activités métaboliques dans la rhizosphère

(Balesdent et Balane, 1992 ; Fischer *et al.*, 1994 ; Wardle et Van Der Putten, 2002). Il joue aussi un rôle régulateur des population microbiennes en favorisant les antagonismes des pathogènes (Brimecombe *et al.*, 2000).

D'autre part, les acides organiques libérés par les racines sont impliqués dans l'altération, la dissolution et la mobilisation des éléments minéraux (Neumann et Römheld, 2001).

3.3. Conséquences de la rhizodéposition

Le sol adhérent constitue un espace de transition obligatoire, non seulement de l'eau et des nutriments qui sont prélevés par la plante, mais aussi pour les composés « libérés » par la plante dans le sol : **la rhizodéposition**.

La rhizosphère présente à ce titre un statut particulier, caractérisé par sa richesse en nutriments, de nature diverse. Il en résulte une abondance de microorganismes et une stimulation de nombreuses activités métaboliques. C'est ainsi que Lynch et Wipps (1990) ont indiqué que les bactéries sont 5 à 50 fois plus abondantes dans la rhizosphère que dans le reste du sol. Les deux processus biologiques que sont la photosynthèse et la respiration ne sont pas indépendants.

Les molécules carbonées élaborées grâce à la photosynthèse alimentent directement ou indirectement le stock de substrat organique, sur la base duquel se développent les microorganismes hétérotrophes pour le carbone. Parmi ceux-ci les bactéries productrices d'exopolysaccharides (EPS) contribuent à la formation du sol adhérent aux racines, prenant l'allure, chez le blé, d'un manchon continu de sol le long de la racine (Fig. 6).



Figure 6. Illustration physique de la rhizosphère du blé dur.

À gauche photographie d'un système racinaire de blé dur (*Triticum durum* L.) avec le sol rhizosphérique, à droite un schéma illustrant le manchon de sol adhérent.

La nature des composés déposés par la plante est très variable et dépend étroitement des espèces végétales et quelques fois même des variétés.

Du point de vue quantitatif, les composés carbonés, considérés comme source d'énergie par les populations microbiennes rhizosphériques, représentent entre 5 et 21 % du carbone

fixé par photosynthèse (Marschner, 1995 ; Martin 1977 ; Whipps, 1984 ; Lambers, 1987 ; Derrien *et al.*, 2004).

La nature de ces composés organiques revêt une importance particulière dans le processus d'agrégation. C'est ainsi que le caractère hydrophobe contribue à consolider la structure du sol et à augmenter sa longévité (Tarchitzky *et al.*, 2000), par rapport à celle qui est hydrophile, dont la persistance dans la rhizosphère est faible, donc très rapidement biodégradable (Piccolo *et al.*, 1999).

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

En dehors de l'effet quantitatif représenté par la densité bactérienne et spécifique à chaque type de végétal, il existe aussi un effet qualitatif qui est la pression de sélection du végétal et qui porte sur la diversité des microorganismes. Sur une échelle de temps importante, ces microorganismes ont co-évolué avec le végétal. À titre d'exemple, certains auteurs ont mis en évidence une prédominance de bactéries appartenant à l'espèce *Paenibacillus polymyxa* dans la rhizosphère du blé (Mavingui *et al.*, 1992 ; Gouzou *et al.*, 1993). Cette espèce bactérienne a été étudiée pour ses nombreuses implications dans les interactions plantes-bactéries. C'est ainsi que des auteurs ont mis en évidence un pouvoir antagoniste vis à vis de certains microorganismes pathogènes (Beatty et Jensen, 2002).

Les rhizobactéries exercent des effets multiples sur la plante, qui peuvent être :

- positifs (cas des symbioses ou PGPR),
- négatifs (cas de parasitisme) ou
- neutres (microorganismes opportunistes).

La manifestation de ces effets dépend étroitement des conditions environnementales et de l'équilibre microbien dans la rhizosphère.

Les rhizobactéries dites à effet PGPR permettent, non seulement une augmentation de la production végétale, évaluée entre 10 et 30 % (Suslow, 1982), mais protègent également les plantes vis-à-vis des microorganismes pathogènes (Weller, 1988), ainsi que des nématodes (Kloepper et Beauchamp, 1992). Certaines bactéries productrices d'EPS ont aussi un effet PGPR. C'est ainsi que *Rhizobium* sp YAS34, bactérie productrice d'EPS présente un effet PGPR sur le tournesol (Alami *et al.*, 2000). L'interdépendance des nombreuses activités métaboliques impliquant le végétal, les microorganismes et le sol, de leur rôle et des conditions de manifestation de telles activités, rendent l'explication du fonctionnement de la rhizosphère difficile.

4. Implication des microorganismes dans l'agrégation du sol rhizosphérique

La rhizosphère représente le siège d'une intense activité microbienne, nécessaire à la transformation des éléments ; elle participe ainsi aux cycles biogéochimiques (Raffaelli *et al.*, 2002).

La formation des agrégats dans le sol est le résultat de l'action combinée de molécules produites ou résultant de l'activité microbienne et d'une action mécanique directe des organismes filamenteux, par l'intermédiaire de leur hyphes (Bethlenfalvay *et al.*, 1999 ; Shreiner *et al.*, 1997 ; Wright et Anderson, 2000).

Par ailleurs, de nombreux microorganismes telluriques, en particulier les bactéries qui prolifèrent et se développent au contact des racines sont capables de produire des polysaccharides. L'influence de ces composés sur l'agrégation du sol a été démontrée directement, en mélangeant les EPS à des argiles (Chenu et Guérif., 1991), ou encore en inoculant le sol avec des bactéries produisant ces polymères (Amellal *et al.*, 1998 et 1999 ; Alami *et al.*, 2000 ; Kaci *et al.*, 2005). Des expériences de co-localisation des bactéries inoculées et des EPS synthétisés *in situ*, ont prouvé l'implication de ces polymères dans l'agrégation du sol (Santaella *et al.*, 2001).

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

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

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

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Les sols

Les échantillons de sol proviennent de parcelles cultivées en blé dur (*Triticum durum* L.) et provenant de régions différentes d'Algérie. Le critère primordial pour le choix des stations est la culture de blé dur. Les stations choisies se caractérisent par une diversité pédoclimatique et leur antécédent cultural. Concernant ce dernier caractère, nous avons retenu l'historique du sol, qui peut avoir une incidence particulière sur les caractéristiques microbiologiques des sols, c'est ce que l'on appelle la pression de sélection du végétal.

La diversité pédologique est basée essentiellement sur la texture et la structure des sols (des textures sableuses à structures élémentaires et des textures équilibrées à structure élaborée).

L'échantillonnage a été effectué au mois de juillet et août 1997 après les moissons, sur une profondeur de 25 cm, zone de sol qui a été soumise à l'action du végétal par l'intermédiaire de son système racinaire, encore présent. Un échantillon moyen a été réalisé sur 5 prélèvements par station.

1.1.1. Localisation et situation bioclimatique des sites d'étude

Les échantillons de sol ont été prélevés dans différentes régions d'Algérie. Nous avons délibérément favorisé les régions semi-arides et arides, puisque nous pensons qu'il s'agit d'environnement particuliers n'ayant pas subi une influence anthropique excessive.

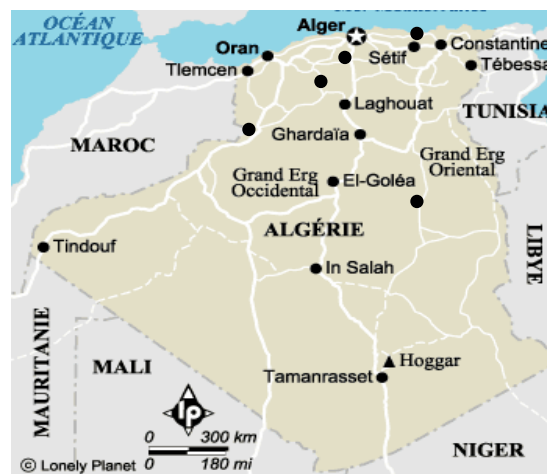


Figure 7. Localisation géographique des stations d'étude

Le climagramme d'Emberger (Emberger, 1952), basé d'une part sur le quotient pluviothermique d'Emberger « Q_2 » qui donne l'étage bioclimatique et d'autre part sur « m »

indicateur de la variante bioclimatique, nous permet de définir les étages bioclimatiques des différentes stations (Tableau IV).

Tableau IV. Localisation et caractéristiques climatiques des stations étudiées

Stations	Coordonnées		Etage bioclimatique
	Latitude	Longitude	
Tiaret	35°24' N	01°18' E	Sub humide à hiver frais
Oued Smar (Alger)	36°46' N	03°03' E	Sub humide à hiver chaud
El Kseur	36°45' N	05°05' E	Sub humide à hiver chaud
Souk El Thenine	36°38' N	05°20' E	Sub humide à hiver chaud
Oran	35°44' N	00°39' O	Semi-aride à hiver chaud
Ain Defla	36°04' N	05°33' E	Semi-aride à hiver doux
Rogassa	34°22' N	00°21' E	Aride à hiver froid
Naama	33°16' N	00°19' O	Aride à hiver frais
El Goléa	30°34' N	02°53' E	Aride à hiver frais
Ouargla	31°54' N	05°20' E	Aride à hiver tempéré
Gassi Touil	30°07' N	06°30' E	Aride à hiver tempéré
Laghouat	33°48' N	02°53' E	Saharien à hiver frais
Ghardaia	32°29' N	03°40' E	Saharien à hiver doux

1.1.2. Caractérisation pédologique

Les résultats d'analyses pédologiques reportées dans le Tableau V montrent qu'à l'exception du sol de Ain Defla, la majorité des sols étudiés se caractérise par une très faible teneur en matière organique. Celle ci pourrait expliquer en partie la structure souvent grumeleuse ou même quelques fois particulière, comme c'est le cas des sols des régions semi-arides ou arides (Oran, El Goléa, Ouargla, Gassi Touil, Laghouat et Ghardaia).

Tableau V. Caractérisation pédologique sommaire des sols.

Caractéristiques Stations	Texture	Structure	Carbone total (%)	Azote total(%)	Calcaire total (%)	pH eau	C.E.C. (meq/100g sol sec)
Tiaret	LSA	Grumeleuse	0,8	0,07	10	8,6	5,8
Oued Smar (ITGC)	A	Massive polyédrique	0,9	0,05	-	7,7	12
El Kseur	LSA	Grumeleuse	0,6	0,02	-	7,9	4,2
Souk El Thenine	LS	Grumeleuse	0,9	0,01	-	7,8	3,9
Oran	S	Particulaire	0,3	0,03	-	8,7	-
Rogassa,	LS	Grumeleuse	0,15	0,01	12	8	-
Ain Defla	A	Massive polyédrique	1,43	0,02	-	7,8	10,5
Nâama	SAL	Grumeleuse	-	-	9,5	7,9	-
El Goléa	LS	Particulaire	0,07	0,001	8	8.1	-
Ouargla	S	Particulaire	Traces	Traces	-		-
Gassi Touil	S	Particulaire	0,09	0,05		7.7	-
Laghouat	S	Particulaire	Traces	Traces	7		-
Ghardaia	SL	Grumeleuse	Traces	Traces	-	8	-

Par ailleurs, la capacité d'échange cationique de ces sols est également faible. Elle est probablement la conséquence des faibles teneurs en matière organique, mais aussi d'un déficit de structure du sol. Elle traduit une faible rétention d'éléments minéraux, nécessaires à la nutrition de la plante. Cette situation pédologique atteste de la fragilité des sols de ces régions, particulièrement ceux qui se trouvent dans les régions arides et semi-arides

Remarque : même dans le cas des sols, traditionnellement connus pour des cultures de blé, ces valeurs restent insuffisantes pour assurer une bonne nutrition du blé dur, capable de procurer des rendements élevés. C'est le cas du sol de Tiaret qui présente une teneur en carbone total estimée à 0,7%.

Nous pouvons effectuer les regroupements suivant la texture des sols, leur structure et leur étage bioclimatique. Ainsi, nous pouvons distinguer :

- Des sols à texture plus ou moins équilibrée avec une structure élaborée (massive polyédrique ou grumeleuse) et c'est le cas généralement des sols du Nord. Ce type de structure est favorable aux cultures.
- Des sols à texture meuble, sableuse très peu évoluée (généralement particulaire) et c'est le cas des sols sahariens. Ces derniers présentent une très faible capacité de rétention d'eau et d'éléments minéraux, caractéristique essentiellement liée à la texture sableuse et à la structure particulaire de ces sols.

1.2. Le végétal.

Pour l'évaluation du potentiel bactérien producteur d'exopolysaccharides, l'isolement de représentants de cette microflore ainsi que leur inoculation à la rhizosphère du blé, nous avons utilisé des graines de blé dur *Triticum durum* L., appartenant à une variété très répandue en Algérie appelée Waha et fournies par l'Institut de Technologie des Grandes Cultures (ITGC) de Oued Smar.

1.2.1. Caractéristiques agronomiques de la semence de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha).

- Origine : Mexique.
- Type : blé de printemps.
- Précocité : précoce à très précoce.
- Hauteur : courte (< 100 cm).
- Tallage : moyen à fort.
- Productivité : élevée.
- Graine : poids des 1000 graines élevé (> 40 g), claire, ambrée à rousse.
- Paille : courte et demi-pleine.
- Epi : demi-lâche, compact et roussâtre.

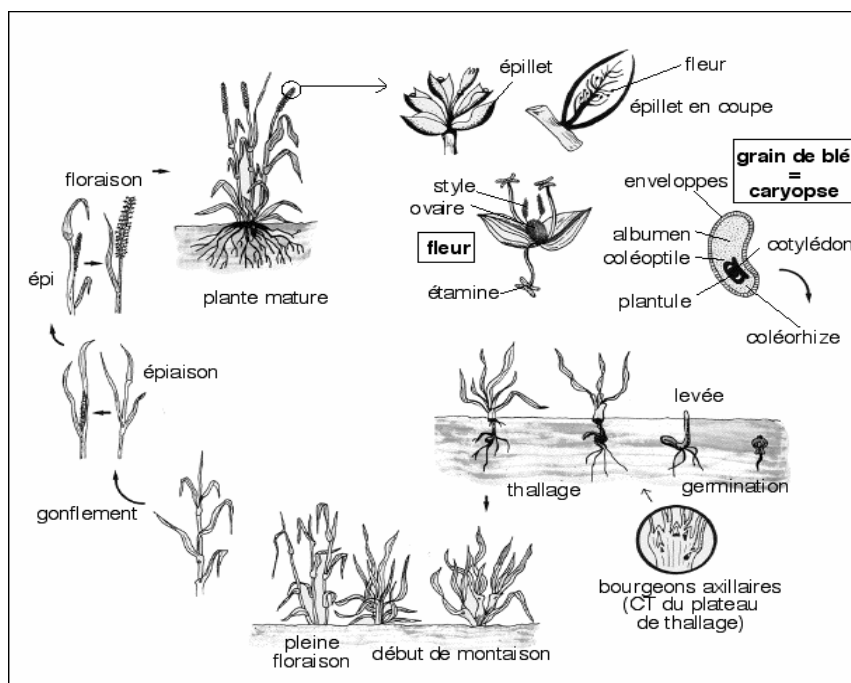


Figure 8. Cycle de développement du blé dur (*Triticum durum*)

La figure 8 montre les différents stades phénologiques du blé dur allant de la germination à la plante mature. En fonction de facteurs abiotiques (bioclimat, sol) et de facteurs biotiques liés aux caractéristiques variétales, la durée de la culture du blé dur varie entre 5 et 8 mois.

L'étude des populations bactériennes rhizosphériques, qui nous intéresse particulièrement, concerne principalement les stades phénologiques compris entre la germination et le tallage. En effet, c'est pendant cette période que l'exsudation racinaire est maximale.

Dans un travail antérieur sur les bactéries fixatrices d'azote non symbiotique dans la région de Tiaret, nous avons montré que dans la rhizosphère du blé dur, les populations bactériennes fixatrices d'azote étaient abondantes entre le mois de novembre et le mois de mars (période correspondant au stade tallage) et avaient tendance à diminuer entre le mois de Mars et le mois de juin (Kaci, 1988). Nous avons attribué ces variations aux conditions favorables qu'offre la rhizosphère du blé dur pendant cette période, particulièrement à une intense activité d'exsudation racinaire.

1.2.2. Détermination du pouvoir de germination.

Une autre caractéristique biologique importante des graines de blé dur, concerne la capacité de germination des graines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha), évaluée grâce à la détermination du taux de germination.. (Tableau VI)

Tableau VI. Evaluation du taux de germination des graines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha).

Durée d'incubation (j)	1	2	3	5	6	7
Pouvoir germinatif (%)	87	90	93	95	97	97

La détermination de la capacité de germination a porté sur un échantillon de 200 graines de blé dur *Triticum durum* L. appartenant à la variété Waha, prélevées de manière aléatoire.

Elles sont préalablement lavées à l'eau du robinet abondamment, puis rincées à l'eau distillée 5 fois, puis mises à germer dans des boîtes de Petri tapissées de papier filtre humide.

Les graines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) présentent un pouvoir de germination élevé, estimé à 97% (Tableau VI). Après seulement 24 heures d'incubation à 24 °C, le taux de germination atteint une valeur élevée (87%). Celui-ci s'améliore avec le temps et après 6 jours d'incubation, le taux de germination avoisine 97%.

1.2.3. Détermination de l'histogramme de fréquence des graines.

Les graines de blé dur peuvent être caractérisées par leur poids, leur dimension, leur forme ainsi que leur densité. Dans le cas présent, nous avons utilisé le poids des graines comme caractéristique essentielle. Nous avons par la suite dressé un histogramme de fréquence des poids des graines en utilisant un intervalle de classe restreint (2 mg) pour limiter la variabilité des résultats (Fig. 9). Les graines utilisées dans l'ensemble des expérimentations où le blé dur est présent appartiennent à la classe modale (52-53 mg).

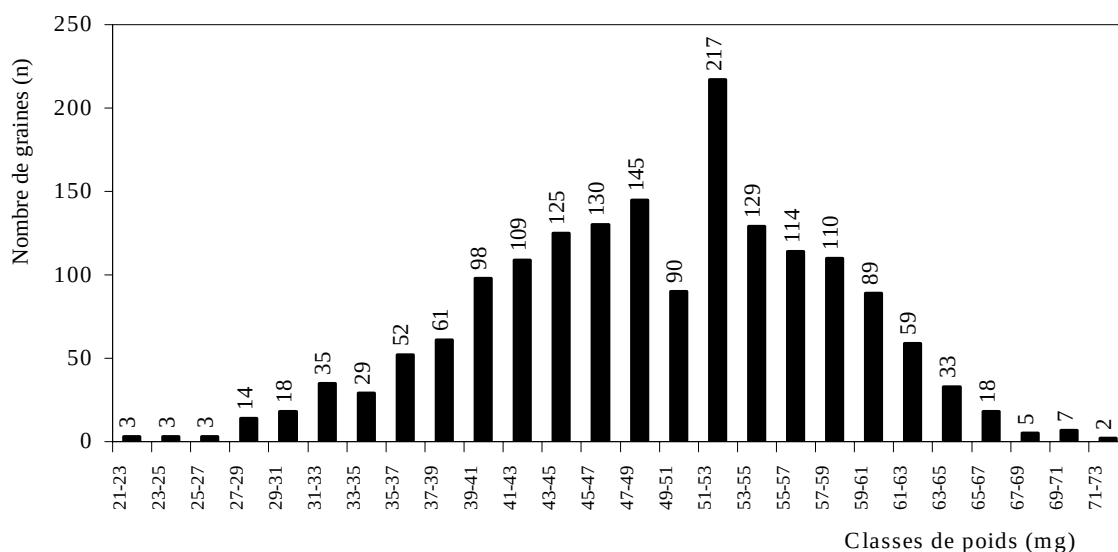


Figure 9. Histogramme de fréquence des poids des graines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha).

2. Méthodes

2.1. Méthodes appliquées aux sols

Les échantillons de sol sont prélevés au niveau de la rhizosphère du blé dur (sol prospecté par le système racinaire) dans différentes régions (Tableau IV). Ils sont ensuite séchés au laboratoire, débarrassés des cailloux et débris végétaux puis tamisés à 2 mm (maille ronde).

2.1.1. Granulométrie

Afin de déterminer la classe texturale des sols étudiés, une analyse granulométrique fine est réalisée, après attaque de la matière organique à l'eau oxygénée à chaud (H_2O_2 , 30 volumes, 100°C). Les particules minérales de sol sont dispersées sous agitation rotative, avec du pyrophosphate de sodium (50 g.l^{-1}). Le contenu des flacons est transvasé dans des éprouvettes graduées et ajustées à 1 litre avec de l'eau distillée.

Les argiles et les limons fin sont prélevés à la pipette de Robinson. Les limons grossiers, les sables fins et les sables grossiers sont récupérés après lavage (pour éliminer la fraction argiles + limons fins) par décantation ; ils sont ensuite fractionnés par tamisage. Les poids secs de toutes ces fractions granulométriques sont déterminés après séchage à 105°C . La proportion relative de chacune d'elles est exprimée en % et reportée sur le triangle de texture (USDA) pour la détermination de la classe texturale.

2.1.2. Mesure du pH_{eau}

Le pH est mesuré par méthode électrométrique sur une suspension « sol/eau » avec un rapport de 1/2,5.

2.1.3. Le carbone organique

Le carbone organique est dosé suivant la méthode classique d'Anne (1945).

2.1.4. L'azote total

L'azote total est dosé suivant la méthode classique de Kjeldahl.

2.1.5. Teneur en calcaire total

Le calcaire total est déterminé suivant la technique classique en utilisant le calcimètre de Bernard.

2.1.6. Mesure des humidités des sols

La mesure de l'humidité d'un sol correspond à l'eau contenue dans sa porosité. Il s'agit donc de l'eau retenue par le sol grâce à des forces qui sont plus ou moins importante, en fonction de la taille des pores. Il est clairement établi que la localisation de l'eau dans la porosité du sol, dépendra de l'énergie d'extraction de cette eau (Température ou pression) exercée lors du pré-traitement. La détermination des humidités des sols est réalisée à l'étuve (105°C) jusqu'à obtention d'un poids sec constant (en général, après 48 h).

2.1.6.1. Humidité actuelle

Elle est déterminée après séchage de l'échantillon de sol à 105° pendant 48 h. Elle représente l'humidité de l'échantillon au moment du prélèvement. La mesure de cette humidité est importante, puisqu'elle sert à rapporter le nombre de bactéries à l'unité de poids sec de sol.

2.1.6.2. Perte en eau par dessiccation

Pour déterminer les capacité de rétention d'eau des sols mélangés avec les EPS à différentes concentration, nous avons soumis les sol à une humidité équivalente à 50 % de la capacité au champ.

Un échantillon de 2 g de sol ou de mélange « sol-EPS » est placé sur le plateau de la thermobalance à infra rouge (Sartherius) à une température de 105°C. Une pesée est réalisée automatiquement toutes les 2 min. La perte en eau est déterminée par rapport au poids sec de sol et l'eau « perdue » exprimée en %. Des cinétiques de perte en eau des sols sont réalisées, dont la pente correspond à la vitesse d'évaporation.

2.1.6.3. Mesure des pF

La mesure des humidités d'un sol revêt un caractère capital. Il détermine les propriétés physiques et chimiques du sol, mais également biologiques. La mesure de l'humidité équivalente à pF 2,7 ou à pF 4,2 d'un sol présente un caractère physiologique en relation avec la plante. En effet, la différence entre l'humidité à pF 2,7 et celle à pF 4,2 représente la réserve utile d'un sol : c'est cette humidité qui peut être prélevée par les racines des plantes.

La mesure des pF nous renseigne aussi sur la taille des pores sol et sur leurs volumes respectifs du. En effet, une augmentation progressive pression exercée sur les sols se traduit par une extraction de l'humidité retenue dans des pores de taille de plus en plus petite.

Le pF est une représentation logarithmique de la tension, exprimée en cm d'eau.

- Le pF 2,7

Cette humidité est déterminée en utilisant la marmite de Richards. Celle ci est reliée à une bouteille d'air comprimée munie d'un manomètre. Le sol est introduit dans des anneaux cylindriques et placés sur une plaque de porcelaine (photo 1). Les sols sont humectés par capillarité pendant une nuit et introduits dans la marmite de Richard. Une pression de 800 mbar (pF 2,7) est exercée durant 12 h. Après un tel traitement, l'humidité résiduelle est déterminée par séchage des échantillons de sol à 105°C. Exprimée en % d'eau, cette humidité correspond à l'humidité équivalente à pF 2,7.



Photo 1. Mise en place des sols dans les anneaux et humectation pour la mesure de l'humidité équivalente à pF2,7.

- Le pF 4,2

Le principe régissant la détermination du pF 4,2 est le même que précédemment. Dans ce cas, nous utilisons une presse à membrane, qui résiste à des pressions importantes. Les échantillons de sol sont humectés de la même manière que précédemment, par capillarité, puis soumis à une pression de 16 Bars dans la presse à membrane pendant 12 h. La teneur en eau est déterminée par séchage des sols à 105°C.

2.1.7. *Evaluation de la stabilité structurale du sol*

Il s'agit d'une technique qui permet d'évaluer les forces de cohésion des agrégats du sol. Elle est déterminée indirectement par rapport à la proportion d'agrégats stables à l'eau. Les échantillons de sol séchés puis calibrés (2 mm) sont ainsi soumis à l'action destructrice de l'eau, par immersion brutale et répétée dans un cristalliseur rempli d'eau. Les agrégats ayant résisté à ce traitement sont pesés et leurs proportions déterminées.

• *Protocole*

10 g de l'échantillon de sol préalablement séchés et tamisés à 4 mm (maille carrée) sont placés dans le tamis de l'appareil de Feodoroff (Feodoroff, 1960). Ce tamis d'un diamètre de maille de 200 µm plonge alternativement dans un cristalliseur plein d'eau, en faisant un double mouvement de rotation (plan horizontal) et de « va et vient » (plan vertical). On effectue 20 passages dans l'eau à une vitesse régulière, pour soumettre l'ensemble des échantillons aux mêmes conditions.

Après un tel traitement, les agrégats qui restent dans le tamis sont considérés comme stables à l'eau. Leurs poids secs sont déterminés, après séchage à l'étuve à 105°C pendant 48 heures et leurs taux calculés.

La stabilité structurale d'un sol est ainsi proportionnelle au taux d'agrégats stables à l'eau. Il s'agit d'une donnée qualitative qui permet d'estimer de manière indirecte les forces de cohésion des agrégats de sol.

2.2. **Méthodes appliquées aux bactéries**

L'estimation de la population bactérienne productrice d'EPS ne peut être efficacement interprétée que si elle est rapportée à l'ensemble des bactéries du sol. Ainsi, par le biais d'une évaluation relative, on peut en apprécier l'importance écologique. Cette estimation a été réalisée au niveau de la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L var. Waha), par la méthode NPP.

2.2.1. *Protocole expérimental*

Les sols sont placés dans des pots de 5 cm de diamètre et 15 cm de hauteur (3 répétitions / sol). Dans chaque pot, on sème 10 graines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) préalablement stérilisées. L'humidité des sols est maintenue à 60 % de la capacité au champ, par un arrosage quotidien. La quantité d'eau à rajouter est déterminée par pesée (perte en eau quotidienne).

Après 30 j de culture, les plantules de blé dur sont déterrées et le dénombrement des bactéries mésophiles totales et des bactéries productrices d'EPS est effectué.

2.2.2. Estimation des bactéries mésophiles totales

Les échantillons de sol ou de racines sont soigneusement prélevés, pesés sous une hotte stérile, puis broyés dans 10 ml d'eau physiologique stérile (NaCl, 0,9 %) pour constituer la « solution mère ». Des suspension-dilutions sont préparées (entre 10^{-1} et 10^{-8}) et serviront à ensemencer des boîtes de Petri contenant le milieu TSA (Difco). L'incubation est réalisée à 30°C et les dénombrements effectués toutes les 24 h pendant une semaine.

Le milieu TSA est un milieu qui sert donc au dénombrement de la majorité des bactéries car il n'a pas d'exigences particulières. Il peut être utilisé sous deux formes : complet ou dilué au $1/10^{\text{ème}}$.

- Composition du milieu T.S.A. dilué au $1/10^{\text{ème}}$

Tryptic Soy Broth	3 g
Agar agar	15 g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

Le pH du milieu est ajusté à 6,8 et la stérilisation réalisée par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

2.2.3. Estimation des bactéries productrices d'EPS

Dans le but d'estimer les populations bactériennes productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha), nous nous sommes intéressés dans un premier temps au choix du milieu de culture pouvant servir à cette évaluation. Il s'agit de mettre au point une technique simple, d'utilisation rapide et donnant une image assez proche de ce qui se passe dans la nature.

Sur boîte de Petri, le principal critère permettant de mettre en évidence les bactéries productrices d'EPS et de les dénombrer, réside dans l'aspect et la consistance des colonies bactériennes, obtenues sur milieu RCV-saccharose, RCV-glucose ou RCV-mannitol (aspect muqueux des colonies).

Les milieux de culture testés reposent sur une même base : le milieu RCV qui a été mis au point pour l'étude de *Rhodopseudomonas capsulata* par Weaver *et al.* (1975). Il a été modifié par Heulin *et al.* (1987), pour étudier des bactéries fixatrices d'azote, notamment celles appartenant au genre *Azospirillum*.

Pour l'étude des bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur, nous avons adapté ce milieu de culture, par modification de la nature du substrat carboné, en ajoutant suivant le cas du mannitol, du saccharose ou du glucose. Les concentrations en sucre ont été délibérément augmentées (20 g.l^{-1}) de manière à favoriser la production d'EPS bactérienne. Dans de telles conditions, les colonies bactériennes apparaissent très muqueuses. Pour la suite de cette étude, ces milieux de culture seront appelés : RCV-saccharose, RCV-mannitol et RCV-glucose. Nous avons opté pour le saccharose, comme seule source de carbone et

d'énergie, puisque lors des dénombrements des populations bactériennes productrices d'EPS, c'est ce substrat qui a donné les plus grandes valeurs.

- *Composition du milieu RCV-saccharose.*

La composition du milieu RCV saccharose est complexe. Elle nécessite un nombre important de composés et surtout, pour certains, à des doses relativement faibles.

C'est pour cette raison que des solutions dites « intermédiaires » sont préparées pour en faciliter la préparation.

- « *solution éléments* »

ZnSO ₄	(7 H ₂ O)	0,43 g
MnSO ₄	(H ₂ O)	1,30 g
NaMoO ₄	(H ₂ O)	0,75 g
H ₃ B ₃		2,80 g
CuSO ₄	(5 H ₂ O)	0,026 g
CoSO ₄	(7 H ₂ O)	0,07 g
Eau distillée (qsp)		1000 ml

Cette solution « éléments » d'une 2^{ème} solution appelée « supersalts ».

- « *Solution supersalts* »

MgSO ₄	(7 H ₂ O)	2 g
CaCl ₂	(2 H ₂ O)	2 g
FeSO ₄	(7 H ₂ O)	0,44 g
EDTA		0,40 g
Solution « éléments »		20 ml
Eau distillée (qsp)		1000 ml

Une troisième solution est préparée « tampon phosphate » composée de :

K ₂ HPO ₄	60 g
KH ₂ PO ₄	40 g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

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

Solution « supersalts »	50 ml
Tampon phosphate	15 ml
Extrait de levure	0,1 g
Saccharose	20 g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

Le pH du milieu est ajusté à 6,8 et la stérilisation se fait par autoclavage à 110°C pendant 20 min.

Les milieux RCV-glucose et RCV-mannitol sont strictement préparés de la même manière, à l'exception de la source de carbone qui est remplacée dans le premier cas par du glucose et dans le deuxième cas par du mannitol (20 g.l⁻¹).

Ces milieux de culture sont solidifiés par addition d'agar agar, à raison de 15 g.l⁻¹.

2.2.4. Isolement et purification des bactéries productrices d'EPS

Nous avons procédé à l'isolement de souches bactériennes productrices d'EPS, sur les mêmes boîtes de Petri, ayant servi aux dénombrements. C'est l'aspect muqueux des colonies qui détermine sa capacité à produire des EPS.

Dans ce cas, les boîtes de Petri sont incubées durant 8 j à 30°C. Les isolats appelés dans ce travail « hyper producteurs » sont des isolats qui se caractérisent par leur production importante d'EPS sur milieu RCV-solide. Cette appréciation est réalisée dans un premier temps par observation à l'œil nu.

La purification de ces isolats est réalisée par repiquages successifs sur le milieu TSA (1/10^{ème}), pour mettre en évidence d'éventuels contaminants et sur le milieu RCV- (saccharose, glucose ou mannitol) pour vérifier à chaque étape que les isolats sont toujours producteurs d'EPS.

Une collection de souches bactériennes productrices d'EPS est ainsi réalisée. Pour leur conservation, elles sont d'abord cultivées sur milieu TSB 1/10^{ème} pendant 24 h à 30°C, puis centrifugées à 6000 rpm pendant 20 min. Dans un cryotube, le culot contenant les cellules bactériennes est repris dans 1 ml de TSB, auquel on ajoute 1 ml de glycérol (v/v 50%). Les tubes sont ensuite à - 80 °C.

2.2.5. Caractérisation phénotypique des isolats producteurs d'EPS

Nous avons sélectionné dans cette partie du travail les souches les plus productrices d'EPS appelées aussi hyper-productrices.

2.2.5.1. Caractérisation morphologique

Cette caractérisation a porté sur un certain nombre de tests morphologiques classiques (relatifs aux colonies et aux cellules bactériennes) mais aussi biochimiques.

La morphologie des colonies est déterminée sur milieu TSA 1/10 après une incubation de 24 à 48 heures à 30 °C.

Une observation au microscope photonique sur des cellules en phase exponentielle permet de préciser la morphologie des cellules bactériennes.

2.2.5.2. Caractérisation biochimique

La détermination du caractère Gram est réalisée suivant la méthode enzymatique décrite par Cerny (1976), celle du caractère oxydase à l'aide de disques (bioMérieux).

- *Utilisation des substrats carbonés (test Biolog)*

L'utilisation de substrats carbonés est déterminée sur des galeries d'identification Biolog (GN ou GP) suivant le cas. Le système Biolog (Biolog Inc. Hayward, CA, USA), permet de tester l'utilisation de 95 substrats carbonés. Le test est réalisé sur des microplaques. L'oxydation du substrat par la bactérie est couplée à la réduction d'un composé incolore (violet de tétrazolium) en un composé coloré (formazan) dont on peut mesurer l'absorbance à 590 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Dynatech MR 5000) et l'interprétation nécessite une base de données Microlog I software (version 3.0).

- *Inoculation des plaques Biolog*

Les bactéries sont cultivées dans 5 ml de bouillon nutritif LB pendant 24 heures, sous agitation à 30 °C.

- *Composition du milieu LB*

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Les bactéries sont recueillies par centrifugation (6000 rpm, pendant 20 min). Pour éliminer les traces du milieu, le culot est lavé 2 fois à l'aide d'une solution de KCl stérile (0,9 %), et centrifugé, après chaque lavage (6000 rpm, pendant 15 min).

Le culot est ensuite dilué dans 20 ml de KCl stérile (0,9 %) et la densité optique de cette suspension est enfin calibrée à 0,5 (longueur d'onde 550 nm), cela correspond approximativement à une concentration bactérienne de 3×10^8 bactéries.ml⁻¹. Un volume de 150 µl de cette suspension est ensuite distribué dans chacun des 96 puits des plaques Biolog, puis incubées à 30 °C pendant 24 heures.

- *Lecture*

Les D.O. sont mesurées à 590 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Dynatech, MR 5000) après 24 heures d'incubation. Elles sont ensuite comparées à celle du témoin (non inoculé) :

Si DO > 160 % du témoin : résultat positif

Si DO < 130 % du témoin : résultat négatif

Si $230 < DO < 160\%$ du témoin : intermédiaire

L'interprétation de ces résultats pour une identification des souches bactériennes est réalisée à l'aide d'une base de données Microlog I.

- *Test API 50CHB*

Ces galeries permettent de tester l'utilisation de 49 sources de carbone. Il s'agit d'un test utilisé pour l'identification de *Bacillus cereus*.

Dans notre cas, nous avons utilisé ce test, combiné à des observations morphologiques (forme et taille de la cellule bactérienne, présence ou absence de spore, Gram et catalase) pour une meilleure identification.

Les galeries sont inoculées avec une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance, cultivée sur milieu LB pendant 12 h à 30°C. Les cellules sont recueillies par centrifugation à 6000 rpm pendant 20 min. puis lavées 2 fois avec de l'eau physiologique stérile (KCl 0.9%). Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans l'eau physiologique stérile et la densité optique de la solution est calibrée ($DO = 0,25 - \lambda = 550 \text{ nm}$).

- *Composition de la galerie*

BANDE N° 1 Tube/Substrat	BANDE N° 2 Tube/Substrat	BANDE N° 3 Tube/Substrat	BANDE N° 4 Tube/Substrat	BANDE N° 5 Tube/Substrat
0 Témoin	10 Galactose	20 α -Méthyl-D Mannoside	30 Melibiose	40 D-Turanose
1 Glycerol	11 Glucose	21 α -Méthyl-D Glucoside	31 Saccharose	41 D-Lyxose
2 Erythritol	12 Fructose	22 N-Acétyl Glucosamine	32 Thréalo	42 D-Tagatose
3 D-Arabinose	13 Mannose	23 Amygdaline	33 Inuline	43 D-Fucose
4 L-Arabinose	14 Sorbose	24 Arbutine	34 Melezitose	44 L-Fucose
5 Ribose	15 Rhamnose	25 Esculine	35 Raffinose	45 D- Arabitol
6 D-Xylose	16 Dulcitol	26 Salicine	36 Amidon	46 L-Arabitol
7 L-Xylose	17 Inositol	27 Cellobiose	37 Glycogène	47 Gluconate
8 Adonitol	18 Mannitol	28 Maltose	38 Xilitol	48 2-kéto-gluconate
9 β Méthyl-D-Xyloside	19 Sorbitol	29 Lactose	39 Gentiobiose	49 5-kéto-gluconate

Les lectures sont effectuées après 24 et 48 h d'incubation à 30°C. L'acidification produite dans chaque puits est matérialisée par le virage du rouge de phénol au jaune

2.2.6. Caractérisation génotypique

2.2.6.1. Amplification par PCR des régions inter-REP (Annexe II)

Dans le but de savoir si les caractères phénotypiques sont suffisants pour différencier les isolats, nous avons procédé à une analyse génotypique REP-PCR.

Cette analyse repose sur l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire, basée sur l'amplification par PCR de fragments d'ADN situés entre des régions possédant des séquences répétées (Repetitive Extragenic Palindromic sequences). Il s'agit de séquences de 35 paires de bases découvertes chez les Enterobactéries : *Escherichia coli* et *Salmonella thyphimurium* (Stern *et al.*, 1984). Ces séquences représentent environ 1 % du génome bactérien et ont été mises en évidence à la fois chez les bactéries à Gram- et à Gram+.

- *Protocole d'amplification*

L'analyse des souches est réalisée à partir de colonies bactériennes cultivées sur TSA 1/10^{ème}. Elles sont mises en suspension dans 200 µl d'eau ultra pure (EUP). Les suspensions bactériennes sont stockées à - 20°C. Les amplifications sont effectuées directement à partir des cellules bactériennes, sans extraction préalable d'ADN (Versalovic *et al.*, 1991).

Le mélange réactionnel pour l'amplification des régions inter-REP est préparé pour (n+1) tubes (Tableau VII) et réparti dans des tubes de 200 µl. Les cellules bactériennes sont ajoutées à chaque tube (5 à 10 µl). L'ensemble subit les cycles d'amplification (Tableau VIII) dans un thermocycleur (Biométra).

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

REP 1R-I : 5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3'
REP 2-I : 5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3'
(I=Inosine)

- *Obtention et analyse des profils électrophorétiques*

Les produits d'amplification d'ADN chromosomiques sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % contenant 2 à 4 µl de bromure d'éthidium (BET).

Après ajout de 5 µl de bleu de bromophénol par tube (annexe I), chaque amplifiat est déposé sur le gel (10 µl par puit). La migration est réalisée en présence de tampon TAE 0,75 x (annexe I).

Après migration pendant 2 heures à 50 V, le gel est examiné et photographié sous lumière UV.

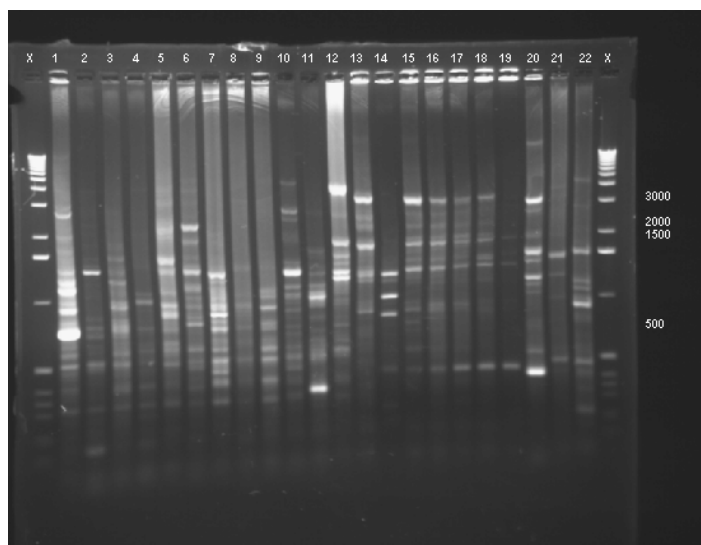
Les profils obtenus sont analysés et comparés entre eux (nombre de bandes, taille, intensité). La comparaison avec un marqueur de taille « DNA molecular-weight marker X » (Boehringer Mannheim) permet d'estimer la taille de chacune des bandes observées. Chaque profil d'amplification constitue ainsi un profil spécifique de la souche bactérienne correspondante (Fig. 10).

Tableau VII. Mélange réactionnel pour l'amplification des régions inter-REP

Réactifs	Volume (µl/tube)	Concentration finale
Tampon (10X)	2,5	
MgCl ₂ (1 M)	0,15	6 mM
DMSO	2,5	
dNTP (20 mM)	4,8	3,84 mM
REP 1 (60 µM)	1,5	3,6 µM
REP 2 (60 µM)	1,5	3,6 µM
Hot Goldstar (5 U / µl)	0,6	12 U / 100 µl
Eau Ultra Pure (EUP)	6,45	
Suspension bactérienne	5,0	
Volume final	25,0	

Tableau VIII. Cycles d'amplification des régions inter-REP

Etapes	Nombre de cycles	Température (°C)	Durée (min)
Pré-cycle	1	95	10
Dénaturation		94	1
Hybridation	35	40	1
Elongation		65	8
Elongation finale	1	65	16
Fin	1	20	---

**Figure 10.** Profil électrophorétique sur gel d'agarose des séquences inter-REP d'un échantillon de 22 isolats bactériens producteurs d'EPS.

1 à 22 : isolats bactériens testés.

X : marqueur de PM X (Annexe I)

L'analyse de l'électrophorégramme (Fig. 10), montre que globalement, ces souches bactériennes ont des profils REP différents, à l'exception de 3 souches (17, 18 et 19), ce qui représente seulement 13.6 %. Un seul exemplaire de ces souches identiques est retenu. De ce fait, nous pouvons dire que sur la base de caractères « phénotype des colonies » la plupart des souches isolées sont génotypiquement différentes entre elles.

2.2.7. Identification moléculaire des souches bactériennes.

Les souches bactériennes sont caractérisées dans un premier temps par des techniques classiques (tests morphologiques et biochimiques), puis identifiées dans un second temps par des techniques de biologie moléculaire, permettant la détermination de la séquence de l'ADNr 16S et sa comparaison à celle d'une banque de données « BLAST ».

- *Amplification par PCR de gène codant pour l'ARNr 16 S*

L'amplification du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a pour principe l'obtention de plusieurs copies de ce fragment d'ADN, grâce à l'utilisation d'une enzyme : la DNA polymérase. Cette synthèse est tributaire de la présence d'amorces dans le milieu réactionnel. Elles sont choisies en fonction de la région à amplifier (fD1 et rD1, dans notre cas). La visualisation de cette amplification se fait par électrophorèse, qui fait apparaître une seule bande, correspondant à la taille de l'ADN amplifié.

Elle est réalisée directement sur des culots bactériens par PCR (Polymerase Chain Reaction), sans extraction d'ADN, en utilisant des amorces universelles pour ce gène, fD1 et rD1 (Weisburg *et al.*, 1991) qui correspondent aux positions respectives 8-27 et 1524-1540 du gène *rrs* d'*Escherichia coli* et permettent d'amplifier des fragments du gène *rrs* d'environ 1500 pb (Fig. 12).

rD1	5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'
fD1	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'

Figure 11. Séquences des amorces rD1 et fD1 (Weisburg *et al.*, 1991)

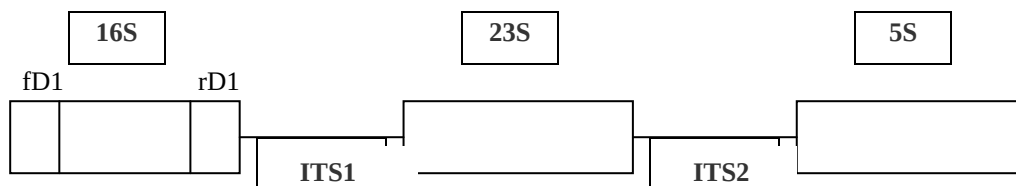


Figure 12. Organisation schématique de l'opéron ribosomique procaryotique

- *Protocole expérimental*

Les cellules bactériennes sont cultivées sur un milieu TSA 1/10^{ème}. Après 24 h d'incubation à 30°C, une colonie est soigneusement prélevée et remise en suspension dans 100 µl d'eau ultra pure (EUP).

Nous procédons en parallèle à la préparation d'un mélange réactionnel (Tableau IX).

Tableau IX. Préparation du mélange réactionnel

Réactifs	volume
Tampon "Goldstar Reaction Buffer" (10 x)	2,50 µl
Mg Cl ₂ (25 mM)	1,50 µl
dNTP (5 mM)	0,50 µl
fD ₁ (10 µM)	1,25 µl
rD1 (10µM)	1,25 µl
Eau ultra pure (EUP)	10,5 µl
Total / tube (µl)	17,5 µl
Suspension bactérienne (µl)	2,50 µl

Les cellules bactériennes sont lysées, lors d'un précycle de 15 min à 95°C et 5 µl de DNA polymérase « Goldstar » diluée au 1/50^{ème} sont ajoutés à ce milieu, ce qui représente : 0,1 µl d'enzyme pur (5 U/µl) + 4,9 µl d'EUP. L'ADN va ensuite subir 35 cycles, comme indiqué dans le tableau X.

Tableau X. Amplification de l'ADN16s

35 cycles	1 minute à 94°C
	1 minute à 55°C
	2 minutes à 72°C
Elongation	3 minutes à 72°C
fin	4°C

Les produits PCR sont ensuite récupérés et la vérification de l'amplification réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, permettant de mettre en évidence l'apparition d'une seule bande de 1500 pb (Fig. 13).

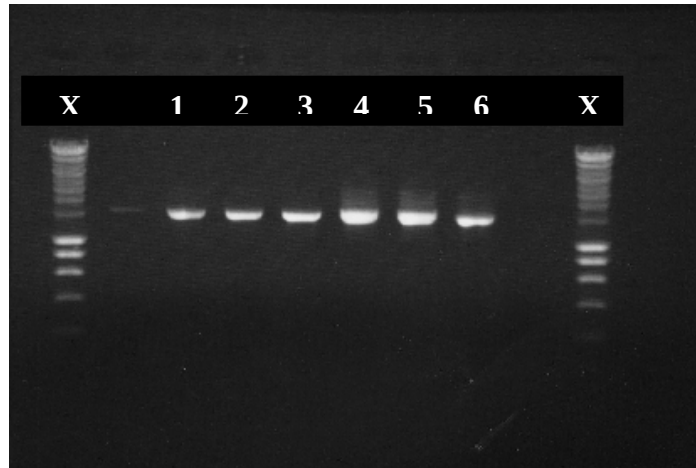


Figure 13. Profil électrophorétique sur gel d'agarose des produits PCR du gène codant pour l'ARNr 16S de 6 souches bactériennes productrices d'EPS. De 1 à 6 : souches bactériennes, X : marqueur de poids moléculaire (Annexe I).

Les produits PCR sont enfin purifiés à l'aide du kit « QIAquick PCR purification » (Qiagen) et les réactions de séquence produites avec le kit « ABI PRISM Dye Terminator Ready Reaction » en suivant les recommandations du constructeur « Perkin Elmer ». Le type de séquenceur utilisé est : ABI PRISM 377 DNA, Perkin Elmer).

2.3. Méthodes appliquées aux EPS

2.3.1. Production d'EPS et calcul des rendements

Cette expérience est réalisée pour permettre une évaluation plus précise de la production d'EPS. Elle est réalisée sur milieu RCV-saccharose (20 g.l^{-1}) liquide, dans des Erlen Meyer de 500 ml contenant chacun 100 ml de milieu. Les précultures sont préparées dans un milieu LB, incubation 30°C pendant 24 heures. Les cellules sont recueillies par centrifugation (6000 rpm, 20 min), puis lavées 2 fois avec de l'eau physiologique stérile (KCl 0,09 %). Elles sont remises en suspension, homogénéisées et calibrées au spectrophotocolorimètre de façon à avoir la même concentration bactérienne pour tous les inoculums testés. Les cellules bactériennes ainsi traitées sontensemencées dans les Erlen Meyer à raison de 2 ml de la suspension, représentant 10^6 bactéries (10 flacons par souche bactérienne). Les cultures sont placées sous agitation (250 rpm) dans une étuve à 30°C pendant 10 j.

Chaque jour, un flacon est sacrifié et les paramètres suivants déterminés :

- poids sec EPS,
- biomasse bactérienne sèche,
- teneur en saccharose,
- teneur en glucose et
- teneur en fructose.

2.3.2. Extraction des EPS et détermination des rendements

2.3.2.1. Précipitation des EPS

La production d'EPS bactériens est réalisée en milieu liquide ou solide. Elle est cependant toujours produite à partir du milieu RCV-saccharose (20 g.l⁻¹).

Quand le milieu de culture est liquide, la production d'EPS est réalisée sous agitation (250 rpm) dans une étuve à 30°C.

Après 7 à 8 j d'incubation, les bouillons de culture sont centrifugés à 6000 rpm. Le surnageant est ensuite récupéré et les EPS précipités avec de l'isopropanol II, dans un rapport volumique : 1 volume de surnageant/3 volumes d'isopropanol II. En raison de la difficulté de la précipitation de certains EPS, liée à leur structure, d'autres solvants organiques peuvent être utilisés comme l'acétone, méthanol ou l'éthanol. Il est parfois recommandé de placer le mélange pendant toute une nuit à 4 °C pour favoriser la précipitation. Cette opération permet de recueillir les EPS sous forme d'une gomme, à l'aide d'une spatule (photo 2).



Photo 2. Aspect des EPS bactériens après précipitation à l'éthanol.

Il est quelques fois nécessaire de placer les mélanges « surnageant-alcool » à 4°C pendant une nuit pour faciliter la précipitation. A la suite de ce traitement, les solutions sont centrifugées à 7000 rpm, pendant 20 min pour récupérer le culot contenant les EPS.

Après plusieurs lavages à l'éthanol (3 lavages), les EPS sont lyophilisés et conservés. Cette technique a été utilisée pour la quantification de la production d'EPS, les résultats sont exprimés en poids sec d'EPS.ml⁻¹ de milieu ou de biomasse cellulaire sèche.

2.3.2.2. Purification des EPS

Pour l'analyse structurale, les EPS sont remis en solution (1 g.l⁻¹) et bien homogénéisés, pendant une nuit. Ils sont ensuite filtrés sous vide respectivement sur des membranes de 8 µm,

5 μm , 3 μm , 1 μm et 0,45 μm (de diamètre de pores) pour éliminer les impuretés et les cellules bactériennes résiduelles qui pourraient ce type d'analyses. Il est quelques fois nécessaire de diluer d'avantage les « solutions EPS » pour faciliter la filtration, particulièrement pour les filtres de faible maille (microfiltres de 1 μm et 0,45 μm).

Les polysaccharides ainsi débarrassés des cellules bactériennes et des impuretés sont récupérés par addition de 3 volumes d'éthanol absolu à froid. Cette technique permet ainsi de précipiter les EPS de haut poids moléculaire (HPM) et de laisser dans le surnageant les EPS à bas poids moléculaire (BPM).

Les exopolysaccharides ainsi recueillis sont enfin lyophilisés.

2.3.3. Analyses chromatographiques

La première démarche dans la détermination de la structure d'un EPS consiste en l'analyse des fractions osidiques, en utilisant des techniques de séparation (CPG et HPLC). Leur utilisation respective nécessite au préalable une étape d'hydrolyse des EPS.

2.3.3.1. Hydrolyse acide des EPS

Pour caractériser les oses constitutifs du polysaccharide, une hydrolyse acide à chaud du polymère est nécessaire. Celle ci est réalisée dans un tube en verre muni d'un bouchon hermétique et contenant:

- 40 mg d'EPS lyophilisés
- 20 ml d'acide trifluoroacétique (TFA, 2N)
- 5 % inositol (témoin interne)

Le polymère est ensuite hydrolysé à chaud dans une étuve à 100°C, pendant 3 heures. Pour éliminer l'acide, les produits ainsi hydrolysés vont subir une série de lavages à l'eau distillée (5 à 6 lavages), suivis à chaque fois d'une distillation sous vide (rotavapor, 45°C), jusqu'à dessiccation complète. Cette opération est terminée quand les solutions de polymères ont atteint un pH avoisinant la neutralité.

Pour déterminer la composition des polysaccharides en monomères, nous avons fait appel à deux techniques complémentaires : HPLC et CPG.

2.3.3.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (H.P.L.C.)

L'analyse qualitative et quantitative des polysaccharides est réalisée sur colonne échangeuse de cations sous forme de plomb CHO-682 (300 x 7,8 mm, Interchim, France) éluée à l'eau distillée à 85 °C, avec un débit de 0,4 ml.min⁻¹.

La détection est réalisée par un réfractomètre différentiel (Waters R410) qui permet, à l'aide d'un photo-détecteur, de mesurer la quantité de lumière réfléchi.

L'identification des oses se fait par comparaison des temps de rétention avec ceux d'oses étalons (Fig. 14), traités de la même façon que l'échantillon.

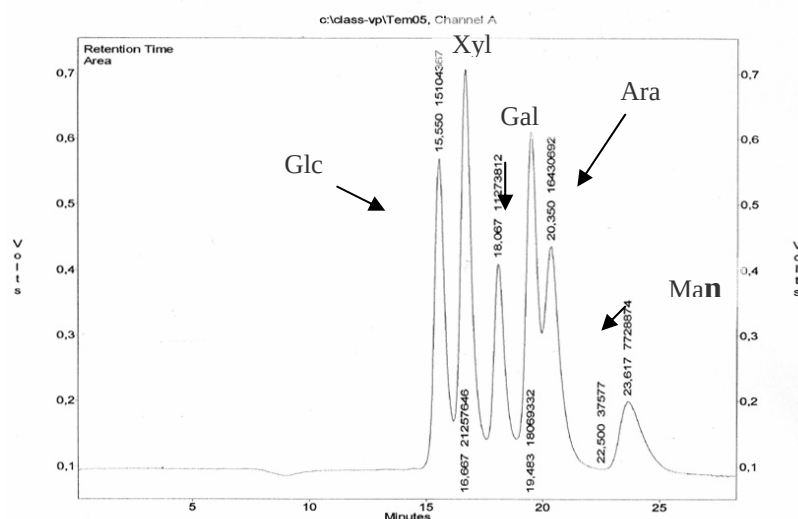


Figure 14. Chromatogramme «standard» obtenu en HPLC avec un mélange « étalon » constitué de : Glucose, Xylose, Galactose, Arabinose et Mannose. Colonne CHO-682, éluant eau à 85°C, débit 0,4 ml.min⁻¹.

2.3.3.3. Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.)

- Principe de la préparation des acétates d'alditols (Albersheim et al., 1967)

Les EPS hydrolysés sont traités avec du borohydrure de sodium pour réduire les fonctions aldéhydes pendant 2 à 3 heures à température ambiante. La réaction est arrêtée par neutralisation du pH, après ajout d'une goutte d'acide acétique à 50%. Cette opération permet la transformation des borates en acide borique qui est volatile.

Dans ces conditions, la réduction d'un aldose donne un seul alditol, alors qu'un cétose donne deux alditols. La réduction au borohydrure de sodium a pour but de stabiliser et de réduire le nombre d'entités chimiques formées, en transformant l'extrémité terminale réductrice présente sous les deux formes α et β , en un alditol unique.

Les EPS ainsi traités, subissent 4 à 5 lavages avec une solution de méthanol-chlorhydrique (1 ml HCl dans 99 ml méthanol), permettant d'éliminer les sels de borate par évaporation.

Les produits sont ensuite acétylés en présence de 250 μ l de pyridine et 250 μ l d'anhydride acétique pendant une nuit. Après 3 à 4 évaporations à l'eau, les acétates d'alditol sont repris dans du méthanol et évaporés à sec une dernière fois. Les produits sont enfin repris dans du chloroforme et sont ainsi prêts pour l'injection en CPG.

Le chromatographe en phase gazeuse (HP 5890, Hewlet Packard, France) est muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne macrobore SP 2380 (30 m x 0,53 mm).

La détection est réalisée par ionisation de flamme (alimentée par un mélange : air comprimé/hydrogène). Les paramètres de d'analyse en chromatographie en phase gazeuse sont reportés sur le Tableau XI.

Tableau XI. Paramètres d'analyse en CPG.

<i>Paramètres d'analyse</i>	
Température de l'injecteur :	260°C
Température du détecteur :	280°C
Température du four :	220°C (isotherme)
Débit du gaz vecteur (N ₂) :	20 ml.min ⁻¹
Débit H ₂ :	20 ml.min ⁻¹
Débit air comprimé :	300 ml.min ⁻¹

Les pics d'acétates d'alditol correspondant aux oses (Fig. 15) sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux d'oses d'un mélange « étalon » soumis aux même conditions expérimentales.

Un mélange « standard » sert de référence pour l'identification et la quantification des monomères constituant l'EPS. Il est constitué de : Rhamnose, Fucose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galactose, Glucose et Inositol (1 mg de chaque ose dans 10 ml de chloroforme pur). Il est indispensable que les échantillons soient parfaitement secs. Les volumes de ce mélange injecté dans le chromatographe est égal à 0,6 µl.

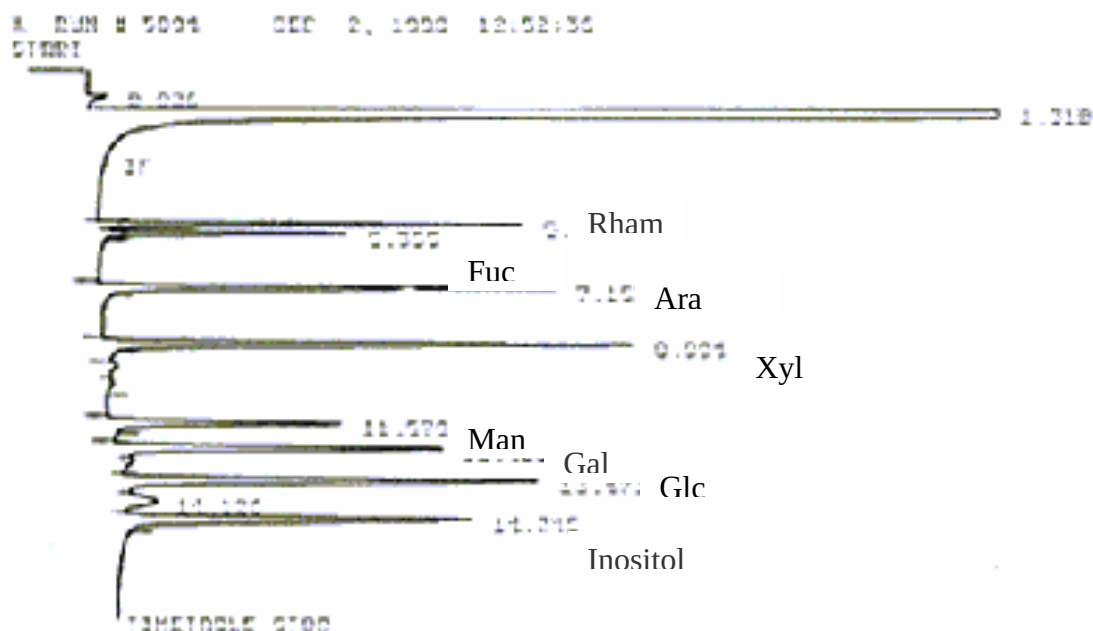


Figure 15. Chromatogramme « standard » obtenu en chromatographie en phase gazeuse

Le Chromatogramme est obtenu après acétylation et méthylation des oses. Les pics correspondent aux acétates d'alditol

2.3.4. Analyse structurale par Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les polysaccharides bactériens sont analysés par RMN du proton (RMN H^1) et du carbone (RMN C^{13}). Il s'agit d'une technique couramment utilisée dans l'étude structurale des polysaccharides. Elle fait appel à l'absorption moléculaire, dans le domaine des fréquences radio (de l'ordre du mégahertz), pour déterminer la nature des différents constituants du polymère ainsi que leurs rapports.

Cette technique présente l'avantage de ne pas dégrader, ni même modifier la nature du polysaccharide.

Elle permet de préciser :

- le nombre de résidus osidiques dans l'unité de répétition,
- l'anomérie (α ou β) des liaisons glycosidiques, par le déplacement des carbones anomères,
- la présence des groupes substituants (acétate, pyruvate, succinate ...).

Les échantillons d'EPS dissous dans l'eau lourde (D_2O) sont disposés dans des tubes RMN de 5 mm de diamètre à paroi fine.

Les spectres protons (1H RMN) sont réalisés à 300 MHz avec un spectromètre Bruker AM 300. Ils sont enregistrés à 80 °C pour augmenter la résolution spectrale.

Les spectres carbones (^{13}C RMN) sont réalisés avec le même appareil à 75 MHz à une température de 80 °C, dans de l'eau lourde (D_2O). On utilise alors une sonde duale $^1H/^{13}C$ de 5 mm.

Dans certains cas, les protons liés aux acétates ou aux pyruvates peuvent gêner l'interprétation des spectres 1H RMN. Pour cela, il suffit d'ajouter du NaOH pour éliminer les protons acétate et de l'acide oxalique (0,01 M) pour éliminer les protons pyruvates.

Les solutions d'EPS ($1g.l^{-1}$) sont traitées à l'aide d'une ou deux gouttes de NaOH (1N) jusqu'à atteindre un pH de 10. Placer au bain-marie à 80°C pendant 1 h (chute de la viscosité) puis neutraliser avec de l'HCl. Précipiter les EPS avec de l'isopropanol 2 et les recueillir par centrifugation (3000 rpm, pendant 15 min). le culot est ensuite repris avec 20 ml d'isopropanol 2 et centrifugé à nouveau. Enfin, dissoudre le culot (EPS désacétylé) dans 20 ml d'eau distillée et lyophiliser.

2.3.5. Mesure de la viscosité des EPS

La viscosité relative représente l'une des propriétés rhéologiques les plus intéressantes pour caractériser les polysaccharides, pour des applications diverses. Elle permet aussi de connaître le comportement de ces polymères en solution.

Les EPS bactériens préalablement purifiés et lyophilisés, sont remis en solution de faible concentration ($0,5 g.l^{-1}$) pendant une nuit à 4°C sous agitation. Les mesures de viscosité des EPS sont réalisées grâce à un viscosimètre à cylindres coaxiaux (Low Shear 30, Contraves), régulé par un thermostat Haake.

Ce type d'appareil permet des mesures de viscosité jusqu'au mPa.s, à de faible gradients de cisaillement (de 10^{-2} à 128 s^{-1}).

Nous avons aussi analysé le comportement de ces polymères en présence d'électrolytes monovalents (NaCl 0,1 M), bivalents (CaCl_2 0,1 M) et d'acide (HCl 0,1 M).

L'effet de deux températures (50 °C et 100 °C) sur la viscosité relative des EPS a été également étudié. Dans ce cas, les EPS remis en suspension dans l'eau ($0,5\text{ g.l}^{-1}$) sont traités pendant 1 h, aux températures ci dessus indiquées. Nous avons ensuite analysé les viscosités relatives par comparaison à celle obtenue à température standard (25°C).

2.4. Bilans de production d'EPS

2.4.1. Production

Les exopolysaccharides bactériens sont produits sur milieu solide RCV (Weaver *et al.*, 1975) modifié par addition : d'extrait de levure (100 mg.l^{-1}), de saccharose (20 g.l^{-1}) et d'agar agar (15 g.l^{-1}). Le pH est ajusté à 6,8 et le milieu stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Le milieu RCV-Saccharose solide est réparti en boîtes de Petri de 90 mm de diamètre et inoculé à l'aide de 100 μl d'une préculture de 24 heures d'âge, obtenue sur TSB après incubation à 30°C sous agitation (250 rpm).

Après 7 jours d'incubation, les boîtes de Petri présentent des colonies bactériennes muqueuses (moût bactérien). Celles ci sont extraites à l'aide d'une spatule préalablement stérilisée. Le moût ainsi recueilli est remis en solution dans de l'eau physiologique stérile (KCl à 0,9%). Les cellules bactériennes sont séparées des EPS par centrifugation (6000 rpm pendant 20 min). La biomasse bactérienne sèche est déterminée sur le culot après dessiccation à 100 °C. Le surnageant contenant les EPS, est traité avec 3 volumes d'éthanol absolu, servant à précipiter les EPS à haut poids moléculaire. Ceux ci sont recueillis, lavés (éthanol) puis lyophilisés et pesés.

Cette expérience nous permet de calculer les rendements de production d'EPS et de productivité.

2.4.2. Consommation de saccharose

Lors de la production d'EPS en milieu liquide, nous avons évalué la consommation de saccharose par les bactéries par un dosage enzymatique.

Nous avons utilisé un Kit enzymatique UV 340 nm (Boehringer Mannheim), contenant 4 réactifs :

Hexokinase (HK)

D-Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase (G-6-P-DH)

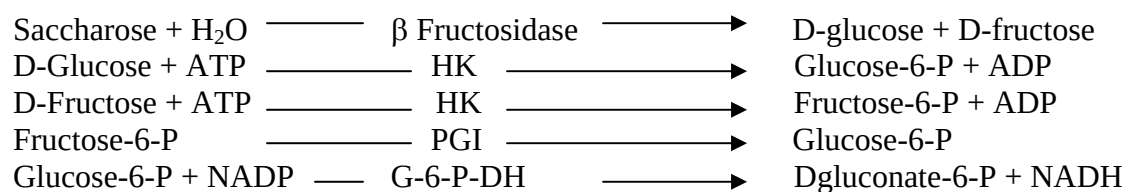
Phospho-Gluco-Isomérase (PGI)

β -Fructosidase (β -F).

2.4.2.1. *Principe*

Il s'agit d'une méthode permettant de doser à la fois le saccharose, le glucose et le fructose. Le saccharose est d'abord hydrolysé en glucose et fructose, qui sont ensuite phosphorylés respectivement en glucose-6P et fructose-6P.

Le Fructose-6P est transformé en glucose-6P grâce à une phospho-gluco-Isomérase selon les réactions suivantes :



Les densités optiques des différents produits de réactions sont mesurées dans l'UV, à une longueur d'onde de 340 nm.

2.4.2.2. *Calculs et expression des résultats*

- **Pour le D-Glucose / D-Fructose :**

$\Delta \text{DO glucose} = [\text{DO } 2 - \text{DO } 1] \text{ éch} - [\text{DO } 2 - \text{DO } 1] \text{ blanc}$

$\Delta \text{DO fructose} = [\text{DO } 3 - \text{DO } 2] \text{ éch} - [\text{DO } 3 - \text{DO } 2] \text{ blanc}$

- **Pour le Saccharose :**

$\Delta \text{DO total glucose} = [\text{DO } 2 - \text{DO } 1] \text{ éch} - [\text{DO } 2 - \text{DO } 1] \text{ blanc}$

Détermination: $\Delta \text{DO saccharose} = \Delta \text{DO total glucose} - \Delta \text{DO glucose}$

$C = V \cdot \text{MW} \cdot \Delta \text{DO (g.l}^{-1}) / \varepsilon \cdot D \cdot v \cdot 1000$

V : Volume total = 3,02 ml pour le Glucose= 3,04 ml pour le Fructose

v : Volume échantillon = 0,1 ml

MW : Masse molaire = 180,16 g.mol⁻¹

D : Trajet optique = 1 cm

ε : Coefficient d'extinction du NADH = 6,3 (l . mM⁻¹ . cm⁻¹)

2.5. **Protocole d'inoculation de la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha)**

Afin d'évaluer l'impact de l'inoculation de souches bactériennes sur la culture de blé dur, en particulier sur sa rhizosphère (sol adhérent, système racinaire), nous avons mis en place des cultures en pots en conditions contrôlées. Le sol de la station ITGC de Oued Smar a été choisi pour cette expérience. Les graines de blé dur utilisées sont stérilisées, pour éviter l'apport de contaminants par les graines. Nous allons dans cette expérience tester à la fois le pouvoir de colonisation des souches sélectionnées et leur impact sur le sol rhizosphérique et sur la plante.

2.5.1. *Préparation du sol*

Le sol de la station ITGC de Oued Smar est séché à l'air libre pendant une semaine, débarrassé de tous les débris et cailloux. Il est ensuite tamisé (2 mm mailles rondes) puis placé à l'intérieur de pots cylindriques de 5 cm de diamètre et 15 cm de hauteur, à raison de 160 g / pot.

2.5.2. Stérilisation des graines de blé

La stérilisation des graines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) constitue une étape importante dans l'évaluation de l'effet de l'inoculation de bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère. En effet, la surface des téguments des semences de blé dur, plus particulièrement au niveau du hile, de nombreux microorganismes (champignons et bactéries) sont logés, constituant ainsi des contaminants potentiels.

Les graines de blé dur sont stérilisées par passage dans une solution d'hypochlorite de calcium (2%) additionnée de 1 ml d'éthanol pendant 20 minutes avec agitation, sous un vide partiel pour permettre une plus grande efficacité de la stérilisation.

Les graines sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace d'agent stérilisant (Heulin *et al.*, 1994).

2.5.3. Préparation des inoculums bactériens

Les inoculums bactériens sont produits dans des Erlen Meyer de 1000 ml, contenant 250 ml de milieu TSB 1/10^{ème}. Ces flacons bouchés au coton cardé sont ensemencés avec une préculture de 24 h. L'incubation est réalisée sous agitation à 30°C. Après 48 h, les cultures sont centrifugées à 6000 rpm à 4°C pendant 20 min. Les culots contenant les bactéries à inoculer sont lavés 3 fois avec une solution stérile de KCl (0,9%). Les bactéries sont enfin remises en suspension dans cette même solution physiologique stérile et la concentration fixée à 10⁶ bactéries.ml⁻¹, après comptage avec une cellule de Malassez.

2.5.4. Mise en culture du blé dur

Dans chaque pot contenant 160 g de sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC), une graine de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) appartenant à la même classe de poids (classe modale) et préalablement stérilisées, est déposée à 1 cm de profondeur. Dix répétitions sont réalisées pour chaque échantillon de sol.

Cette expérience comporte :

- 10 pots inoculés avec une souche bactérienne appelée KYEGB2
- 10 pots inoculés avec une souche bactérienne appelée KYGT207
- 10 pots non inoculés, contenant une plantule de blé dur (témoins₁)
- 10 pots non inoculés, sol nu (témoins₂).

Les pots sont ensuite placés dans une chambre de culture dans les conditions suivantes :

- Température jour : 22 °C.
- Température nuit : 18 °C.
- Luminosité : 5000 Lux
- Rythme nyctéméral : 14 h jour / 10 h nuit

Il est important de maintenir dans le sol, un niveau d'humidité suffisant et constant. Pour cela, la quantité d'eau apportée dans chaque pot en début d'expérience, représente une humidité équivalente à 60% de la capacité au champ. Chaque jour, les pots sont pesés et la perte en eau est compensée par arrosage.

Après 3 j de culture, dès l'apparition du coléoptile, on introduit dans chaque pot, au voisinage immédiat de la plantule de blé dur, 1 ml de chacun des deux inoculums lavé et calibré (KYEGB2 et KYGT207). Ces cultures sont ainsi maintenues pendant 4 semaines.

2.5.5. Récupération des racines et du sol adhérent

Après 4 semaines de culture, les plantules de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) sont déterrées et les dénombrements de bactéries productrices d'EPS inoculées (KYEGB2 et KYGT207) sont effectués dans la rhizosphère.

On considère que le sol adhérent aux racines est constitué des agrégats fortement liés aux racines.

Pour récupérer cette fraction de sol adhérent, les plantules de blé dur sont placées sur un dispositif expérimental (Photo 3) qui permet une forte agitation des racines (1400 vibrations.min⁻¹, pendant 1 min). Cette étape permet distinguer le sol fortement adhérent aux racines après un tel traitement, du reste de sol rhizosphérique.



Photo 3. Dispositif permettant l'extraction du sol adhérent.

Une fraction de ce sol sert à déterminer sa teneur en eau, après passage à l'étuve (105°C) pendant 24 à 48 h. Une autre fraction, de poids connu (1 g), est réservée au dénombrement des populations bactériennes inoculées.

2.5.6. Détermination des poids secs de sol et de matière végétale.

Après séparation des racines et du sol adhérent, les teneurs en eau sont déterminées sur une fraction de ces échantillons. Les températures de séchage du végétal est de 65 °C pendant 72 h, alors que pour le sol adhérent, elle est de 105 °C pendant 48 h. La teneur en eau de ces 2 fractions est calculée par différence entre « poids frais » et « poids sec ». Les résultats sont exprimés en %.

Dans cette partie de l'étude, la détermination des poids secs de sol est nécessaire pour exprimer le nombre de bactéries unité de poids sec racinaire ou de sol adhérent. De même qu'ils serviront à l'estimation de la biomasse racinaire dans les différents traitements. Ils

permettront aussi la détermination du rapport « sol adhérent/racines » appelé aussi rapport SARA.

2.5.7. Suivi des inoculum bactériens

L'objectif visé à ce niveau du travail consiste à déterminer la capacité de colonisation de chacune des deux souches inoculées (KYEGB2 et KYGT207) confrontées à de nombreux compétiteurs naturels dans le sol. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'utiliser un sol non stérile.

La taille des inoculum apportés en début d'expérience est de 2.10^6 bactéries /plante /pot, dont une partie est apportée par enrobage des grains de blé dur, alors que l'autre partie est ajoutée au sol après germination, par aspersion. Cette méthode permet ainsi d'accroître les chances de survie et d'installation des bactéries inoculées dans la rhizosphère du blé dur.

Le dénombrement des bactéries inoculées repose sur l'utilisation d'un milieu RCV-saccharose supplémenté d'antibiotiques (Tableau XII), à raison de $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Ceux ci sont dissous dans de l'éthanol pour une concentration finale de 50 gamma.

Tableau XII. Antibiotiques ajoutés au milieu de culture pour contre-sélectionner les bactéries inoculées

Bactéries	Antibiotiques
KYGT207	Acide nalidixique + Kanamycine + Rifampicine.
KYEGB2	Streptomycine + Ampicilline

Sur ces milieux de culture, les deux bactéries inoculées présentent des morphologies particulières, qui permettent de les reconnaître (Photos 4 et 5).



Photo 4. Aspect morphologique de la souche KYEGB2 dénombrée dans le sol rhizosphérique après 4 semaines de culture, sur milieu RCV-sac (Streptomycine + Ampicilline). *Diamètre moyen des colonies : 1,5 cm après 5 jours d'incubation à 30° C*



Photo 5. Aspect morphologique de la souche KYGT207 dénombrée dans le sol rhizosphérique après 4 semaines de culture, sur milieu RCV-sac (Acide nalidixique + Kanamycine + Rifampicine). *Diamètre moyen des colonies : 1 cm après 5 jours d'incubation à 30° C*

2.6. Méthode d'analyse statistique

Pour une plus grande fiabilité des résultats, plusieurs séries de valeurs sont traitées avec un logiciel Sigma Stat 32 en effectuant des analyses de variance (1 ou 2 facteurs, ANOVA). Nous avons appliqué le test de Fisher LSD avec un niveau significatif à $P < 0,001$.

Chapitre I

Les bactéries productrices d'exopolysaccharides : taille des populations et isolement des souches bactériennes

L'écologie microbienne du sol passe nécessairement par le dénombrement des microorganismes telluriques et l'évaluation de leurs activités. Les méthodes employées font le plus souvent appel à des techniques indirectes, utilisant des milieux de cultures synthétiques.

1. Dénombrement des populations bactériennes dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha)

L'estimation de la taille et de la diversité des populations bactériennes dans le sol présente un certain nombre de difficultés, particulièrement par rapport au choix du milieu de culture, de sa composition et des conditions d'incubation (température, pH, pression partielle en O₂ etc...). La composition chimique des milieux de culture dépend étroitement des exigences nutritionnelles des microorganismes ciblés. De plus, la majorité des milieux de culture connus jusqu'à présent, sont conçus et mis au point pour des analyses de microbiologie clinique et ne sont, par conséquent, pas toujours appropriés au domaine de la biologie des sols. Ces milieux de culture dits « synthétiques » offrent donc des possibilités limitées quant à l'estimation des populations bactériennes dans le sol.

Dans le domaine de l'écologie microbienne, il est donc difficile d'estimer de manière précise la microflore tellurique. Les résultats présentés ici ne traduisent qu'une évaluation des populations bactériennes, qui nous permettra de situer sur un plan purement relatif la fertilité des sols.

Dans les différentes stations étudiées, de nombreux renseignements peuvent être apportés par l'évaluation de la microflore cultivable sur TSA 1/10^{ème}, considérée comme « la microflore tellurique cultivable totale ». En effet, dans le cas d'une culture de blé dur, nous pourrions ainsi apprécier, en fonction du compartiment considéré (racinaire ou sol adhérent), la fertilité des sols à travers les activités bactériennes globales. Concernant les bactéries productrices d'EPS, elles sont évaluées sur milieu RCV-saccharose. Le dénombrement de cette population peut nous informer sur sa répartition spatiale dans la rhizosphère, ainsi que sur son éventuelle implication dans la structuration du sol, phénomène physique permettant la consolidation et la stabilisation des agrégats. Enfin, nous pourrions ainsi mesurer l'impact d'une culture de blé dur sur la composition à la fois qualitative et quantitative des populations bactériennes rhizosphériques.

1.1. Dénombrement des bactéries rhizosphériques mésophiles totales

Pour une meilleure estimation de la taille et de la diversité de ces populations bactériennes, des essais préliminaires, portant sur le dénombrement des « bactéries mésophiles totales », ont été réalisés et ont fourni des résultats très différents selon le milieu de culture utilisé (gélose nutritive, TSA complet, TSA dilué au 1/10^{ème}).

Dans cette étude, nous avons retenu le milieu TSA 1/10^{ème}, puisque la majeure partie des éléments constitutifs de ce milieu est d'origine végétale et donc proche de ce qui se passe dans le sol. Ce milieu permet aussi de cultiver un nombre important de bactéries, avec une plus grande diversité phénotypique, appréciée sur la base de la morphologie des colonies.

Au-delà de ces considérations strictement techniques, la littérature rapporte que, selon les écosystèmes, les bactéries cultivables ne représentent que moins de 1 à 10 % de l'ensemble des communautés bactériennes estimées par observation au microscope (Amann *et al.*, 1995). Il apparaît donc que la numération des populations bactériennes mésophiles cultivables sur ces milieux synthétiques permet une évaluation par défaut mais qui peut être utilisée dans le cadre d'une approche comparative. Ces techniques sont également utilisées pour l'isolement des bactéries dont le métabolisme et les interactions avec le milieu peuvent être étudiés au laboratoire.

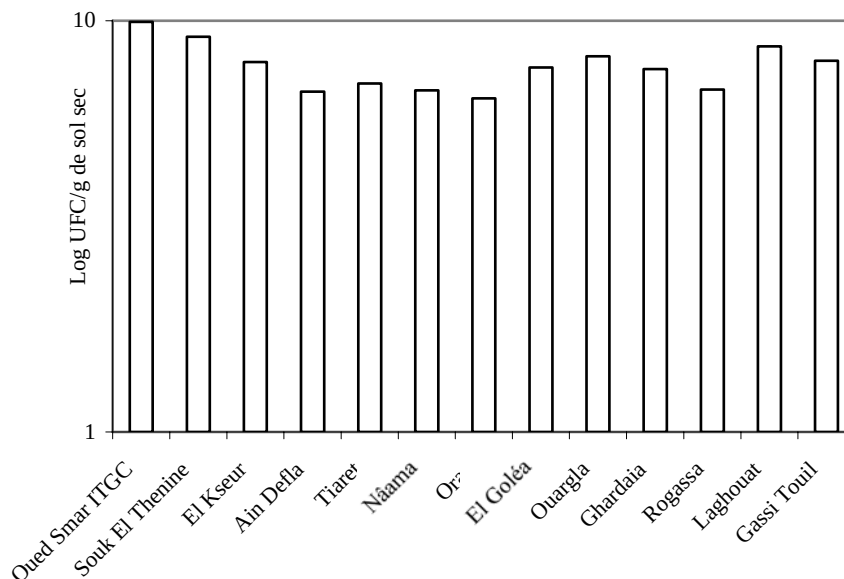


Figure 16. Importance numérique des bactéries mésophiles totales dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

De façon générale, le nombre de bactéries cultivables sur TSA 1/10^{ème}, considérées comme « bactéries mésophiles totales » est élevé dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L.), quelle que soit la région considérée (Fig. 16). Il évolue entre 3×10^6 UFC g⁻¹ de sol sec pour la station d'Oran et 8×10^9 UFC g⁻¹ de sol sec pour la station agronomique de Oued Smar. L'importance numérique du potentiel bactérien dans la rhizosphère du blé dur dans la station de Oued Smar peut s'expliquer par la nature du substrat édaphique, la teneur en matière organique, le bioclimat ainsi que de l'antécédent cultural. En effet, cette station utilisée depuis des décennies pour la sélection variétale de blé dur (*T. durum*) et tendre (*T. aestivum*) et par la suite, pour des essais d'adaptabilité d'hybrides importés, a permis le développement d'une microflore rhizosphérique abondante et probablement adaptée au blé.

Par ailleurs, dans les régions sahariennes, nous notons un nombre relativement important de bactéries cultivables sur TSA 1/10. En dépit donc des conditions pédoclimatiques rudes, comme c'est le cas des stations de Laghouat, Ouargla, Gassi Touil, Ghardaia, Rogassa et El Goléa, la rhizosphère du blé dur constitue un environnement favorable au développement des microorganismes. De ce fait, le blé dur exercerait une action bénéfique qui échapperait au cadre pédoclimatique global.

De plus, ce nombre important de bactéries dans la rhizosphère du blé dur traduirait une fertilité du sol, conséquente à une intense activité métabolique. Dans certaines régions comme Gassi Touil, Ghardaia, El Goléa et Ouargla, la taille de ces populations bactériennes (sur TSA/10) est même plus importante que celle qui a été mise en évidence dans des régions traditionnellement connues pour la production de blé, comme la région de Tiaret par exemple ($1,1 \times 10^7$ UFC g⁻¹ de sol sec). Il s'agit là d'un argument supplémentaire en faveur de l'importance de l'impact de la culture du blé dur sur l'entretien d'une microflore rhizosphérique abondante et diversifiée.

1.2. Dénombrement des bactéries productrices d'EPS

De la même manière que précédemment, nous considérons que les bactéries productrices d'EPS sont celles qui sont cultivables sur milieu RCV-saccharose et qui se présentent sous forme de colonies muqueuses, conséquence d'une forte production d'EPS.

Des essais préliminaires ont montré qu'avec des substrats carbonés différents, tel que le glucose, le saccharose et le mannitol, nous avons obtenu, sur chaque échantillon, des tailles identiques de populations bactériennes productrices d'EPS. Cependant la taille des colonies bactériennes est très différente suivant le substrat carboné utilisé, caractère qui est en relation étroite avec la production d'EPS, qui confère aux colonies des morphologies différentes, avec des aspects plus ou moins muqueux.

Au cours de ces expériences, nous avons noté une grande différence concernant la proportion de colonies muqueuses par rapport à l'ensemble des communautés bactériennes, entre le milieu RCV-saccharose d'une part et les milieux RCV-glucose et RCV-mannitol d'autre part. En effet, sur les boîtes de Petri contenant le milieu à base de saccharose, nous notons près de 80 % de colonies muqueuses, alors que pour les deux autres milieux de culture cette proportion est d'environ 50 % pour le mannitol et le glucose. C'est la preuve que les bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur présentent une capacité

d'adaptation à des environnements diversifiés. Cette aptitude à produire des EPS à partir de substrats carbonés aussi différents permet de penser que les chances de production *in situ* sont importantes.

Une fraction importante des « bactéries mésophiles totales » est représentée par les bactéries productrices d'EPS formant des colonies muqueuses sur RCV-saccharose. Leur nombre varie de 5×10^4 UFC. g⁻¹ de sol sec pour la station de Ain Defla à $8,6 \times 10^6$ UFC. g⁻¹ de sol sec pour la station ITGC de Oued Smar (Fig. 17).

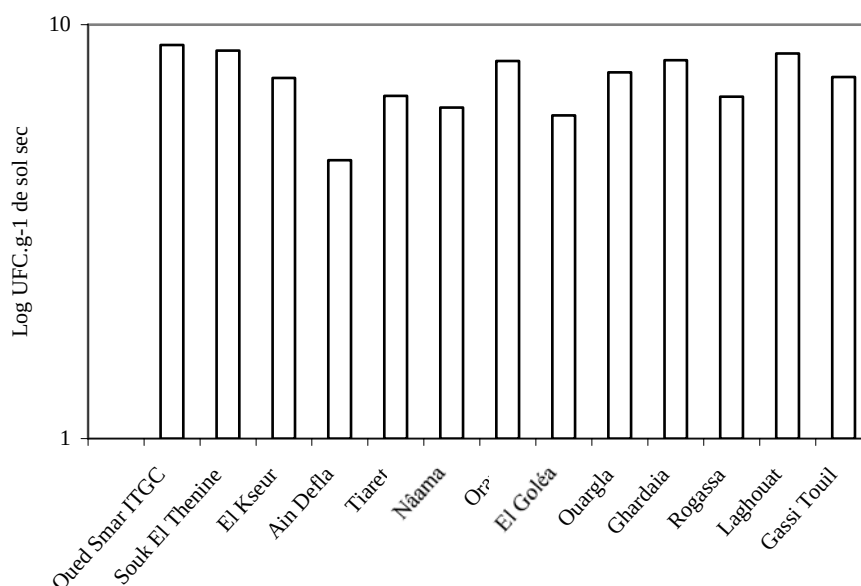


Figure 17. Dénombrement des bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L.var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

Dans les régions de Gassi Touil, Ghardaia, El Goléa et Ouargla, la taille des populations bactériennes productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (évaluée sur RCV-saccharose) est plus importante que celle obtenue dans la région de Tiaret par exemple (5×10^6 UFC.g⁻¹ de sol sec), région connue pour sa céréaliculture ancestrale. L'abondance peu prévisible de ces populations bactériennes, en raison des conditions pédoclimatiques rudes, est probablement liée à la forte exsudation racinaire du blé dur. Comme nous l'avons signalé précédemment, cette donnée est appuyée par des observations sur le terrain montrant que les racines de blé dur, dans ces régions (semi-arides et arides), sont entourées d'une importante gaine mucilagineuse sur laquelle viennent s'adsorber des particules de sable. Nous pouvons en conclure que malgré leur faible teneur en matière organique, ces sols favoriseraient l'émergence de populations bactériennes productrices d'EPS quand ils sont cultivés en blé dur.

Pour évaluer l'importance numérique relative de cette population bactérienne, nous avons déterminé la proportion de bactéries productrices d'EPS, calculée par rapport au nombre de « bactéries mésophiles totales » (Tableau XIII).

Tableau XIII. Proportion de bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

Stations	Pourcentage de bactéries productrices d'EPS (% du nombre de bactéries mésophiles totales)
Oued Smar	10
Souk El Thenine	33
El Kseur	32
Ain Defla	1
Tiaret	49
Naama	33
Oran	> 100
El Goléa	2
Ouargla	29
Ghardaia	> 100
Rogassa	78
Laghouat	72
Gassi Touil	30

Il apparaît que ces bactéries sont abondantes dans la rhizosphère du blé dur, même si dans certaines régions comme Ain Defla (1 %), El Goléa (2 %) ou encore la station ITGC de Oued Smar (10 %), ces taux apparaissent comme relativement faibles (Tableau XIII).

Pour la station agronomique de Oued Smar en particulier, la microflore cultivable sur TSA 1/10^{ème} est la plus abondante (Fig. 16), ce qui réduit considérablement la proportion des bactéries productrices d'EPS (Tableau XIII), même si le nombre de bactéries productrices d'EPS est parmi les plus importants. Cela traduit une intense activité microbienne et par conséquent une fertilité du sol.

Les taux les plus élevés sont observés avec les sols provenant des stations d'Oran et de Ghardaia, dans lesquelles les bactéries productrices d'EPS représentent la presque totalité des « bactéries mésophiles totales ». Cette situation particulière semble liée aux techniques classiques de dénombrement des bactéries sur des milieux synthétiques. En effet, dans ces deux stations, la taille de la population bactérienne productrice d'EPS est supérieure à celle des bactéries dites « mésophiles totales » : 4 à 50 fois supérieure, respectivement à Ghardaia et Oran. Cela pose la question du choix du milieu de culture pour l'étude de ces populations bactériennes. L'opportunité de l'utilisation d'un milieu de culture défini, peut être discutée, quant au choix des éléments nutritifs le constituant. La nature et la teneur des sources de carbone et d'azote par exemple, peuvent favoriser l'émergence de populations bactériennes particulières. Comme nous l'avons précisé précédemment, l'ensemble des techniques de dénombrement ne peut être considéré qu'à titre d'approche comparative dans des situations pédoclimatiques différentes. Nous pouvons par conséquent dire que dans les stations d'Oran et de Ghardaia, les bactéries productrices d'EPS représentent la majorité des populations bactériennes rhizosphériques.

Hormis ces deux stations, nous avons observé aussi des taux très élevés dans les régions de Rogassa (78 %) et Laghouat (72 %). Ces valeurs élevées ne semblent pas liées au seul facteur climatique.

En effet, dans les mêmes conditions climatiques, à El Goléa par exemple, nous notons un taux relativement faible estimé à 2 %, alors que dans le cas d'El Kseur ou Souk El Thenine (étage bioclimatique humide), ce pourcentage est de 33 %.

Il semblerait que ces populations bactériennes productrices d'EPS présentent une grande aptitude à survivre dans des conditions extrêmes, grâce à la protection que leur confèrent les EPS. D'après Cerning (1994), la perte de la capacité à produire des EPS pourrait avoir des conséquences sur la survie cellulaire dans des conditions fortement compétitives rencontrées dans certains milieux naturels. En plus des conditions climatiques rudes, le sol de la station de Rogassa présente une teneur en sel relativement élevée (20 mS.cm^{-1}) qui pourrait générer une pression de sélection vis-à-vis des populations bactériennes productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur, conséquence d'un triple stress : hydrique, ionique et osmotique.

Si le chlorure de sodium a un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries (Yap et Lim, 1983 ; Breedveld *et al.* 1993), il stimule la production d'EPS, assurant ainsi la protection de ces bactéries vis-à-vis de l'hypertonie du milieu, due à la présence de ce sel. Ces polysaccharides constituent donc une véritable barrière osmotique (Costerton et Irvin, 1981 ; Ames, 1986 ; Kennedy et Rumley, 1988 ; Zevenhuizen *et al.*, 1990). Paradoxalement, dans ces conditions de salinité, des observations de terrain montrent que le développement du blé dur, tout au moins jusqu'au stade tallage, ne semble pas affecté par le sel. Cela laisse supposer que le rôle protecteur des EPS ne se limiterait pas aux bactéries seulement, mais s'étendrait au blé dur lui-même, limitant ainsi l'effet stressant du sel.

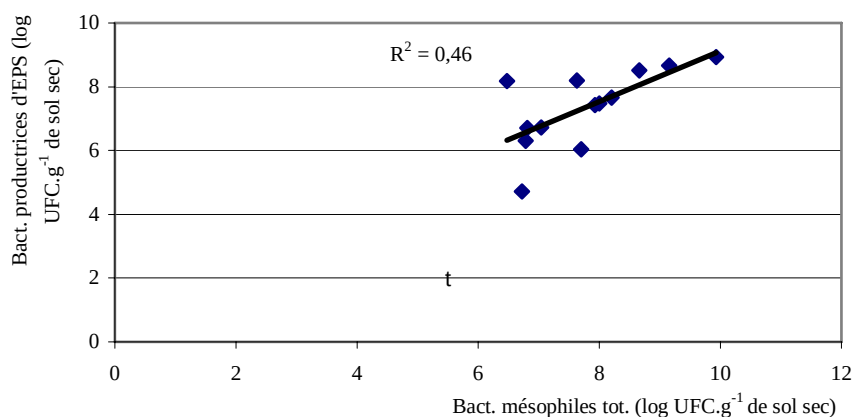


Figure 18. Courbe de corrélation "Nombre de bact. productrices d'EPS / Nombre de bactéries mésophiles".

Par ailleurs, nous n'avons pas montré de proportionnalité entre le nombre de bactéries mésophiles totales et le nombre de bactéries productrices d'EPS (coefficient de corrélation

relativement faible = 0,46 non significatif ; Fig. 18). Ce résultat semble indiquer que le blé dur exerce une pression de sélection qui se manifeste différemment, en fonction du potentiel bactérien endémique du sol (en particulier pour les faibles valeurs de bactéries mésophiles totales), par amplification de l'une de ses composantes, celle qui serait adaptée aux exsudats racinaires du blé dur lui permettant de produire des EPS.

1.3. Conclusion

De nombreuses populations bactériennes sont hébergées dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L.) dans des régions contrastées sur le plan pédoclimatique. Parmi ces bactéries, nous avons focalisé notre étude sur les populations bactériennes productrices d'EPS qui sont généralement majoritaires, même dans des régions caractérisées par des sols meubles, sans aucune structure apparente et un climat aride, comme c'est le cas de la station de Gassi Touil.

Ces observations conduisent à penser que la rhizosphère du blé dur constitue un environnement favorable au développement de ces microorganismes, qui entretiendraient une étroite relation trophique avec la plante. Il s'agit donc d'un environnement particulier qui limiterait les contraintes et les effets des facteurs limitants, liés aux conditions pédoclimatiques défavorables, comme une carence en eau par exemple.

Cette situation est beaucoup plus marquée dans les régions sahariennes, où pratiquement la seule source de carbone est fournie par la plante sous forme de rhizodéposition. **La culture de blé dur pourrait donc constituer un moyen d'amender les sols en matière organique, en utilisant par exemple des variétés de blé dur adaptées et sélectionnées, non pas sur la base des rendements en grains, mais surtout par rapport à leur capacité d'exsudation.** Cela pourrait permettre d'amorcer, dans un premier temps, un phénomène d'édification de la structure du sol rhizosphérique. Cette nouvelle situation aurait des conséquences favorables pour la plante (amélioration de la rétention d'eau, de la capacité d'échange cationique etc...). Il est vrai que cette matière organique provenant de la rhizodéposition est facilement métabolisable et présente de ce fait une durée de vie limitée. Elle demeure cependant intéressante par une production continue, en particulier durant les premiers stades de développement du blé dur.

L'ensemble de ces résultats porte sur une analyse quantitative qui ne donne pas nécessairement de vision complète du potentiel des bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur. En effet, la confrontation de l'étude quantitative et qualitative (analyse de la diversité de ces bactéries) pourrait donner une image beaucoup plus précise du potentiel bactérien producteur d'EPS et de l'éventuel impact de ces polymères dans la rhizosphère du blé dur.

L'analyse globale de ces résultats sur la taille des populations bactériennes montre que dans les stations du sud algérien, il existe un potentiel de bactéries productrices d'EPS, qui serait amplifié par la présence du blé dur, au point de représenter la majorité des « bactéries mésophiles totales ».

2. Isolement des bactéries productrices d'EPS de la rhizosphère du blé dur

La stratégie suivie, dans le cadre de l'étude de la diversité des bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur, obéit à une méthodologie qui vise à isoler les bactéries les plus productrices et les plus abondantes. C'est ainsi que les isolats bactériens ont été prélevés à partir des dilutions les plus élevées, permettant de distinguer les bactéries productrices d'EPS, d'après l'aspect muqueux des colonies qu'elles produisent sur milieu RCV-saccharose. Par conséquent, ces isolats constituent les représentants les plus fréquents et probablement les mieux adaptés à la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha).

2.1. Critères de sélection des souches

C'est sur la base de l'aspect muqueux des colonies sur milieu RCV-saccharose, ainsi que d'autres paramètres phénotypiques se rapportant à la morphologie des colonies, à celle des cellules bactériennes et enfin à des techniques de biologie moléculaire, que nous avons retenu 125 souches bactériennes (Tableau XIV).

2.2. Distribution globale des isolats producteurs d'EPS

Les 125 souches bactériennes productrices d'EPS isolées à partir de la rhizosphère du blé dur (sur les racines et dans sol adhérent aux racines), concernent des régions d'Algérie couvrant des étages bioclimatiques variés (sub-humide, semi-aride, aride et saharien) (Tableau XIV).

Nous pouvons remarquer que parmi les échantillons traités, beaucoup d'entre eux proviennent de stations du sud algérien, où les conditions pédoclimatiques sont particulièrement rudes. Le choix de ces stations est délibéré, car nous pensons que dans ces régions, les populations bactériennes sont endémiques et n'ont pas tellement subi de modifications liées à l'activité humaine. De plus, les conditions pédoclimatiques particulières pourraient avoir favorisé l'émergence d'espèces bactériennes adaptées à ces milieux extrêmes, et donc potentiellement originales.

Tableau XIV. Niveau de production d'EPS par les souches isolées de la rhizosphère du blé à partir de différentes sources de carbone, sur milieu solide.

Station	Souches	Origine des souches	Production d'EPS *		
			RCV- GLU	RCV- SAC	RCV- MAN
El Kseur	KYEK1	Racine blé	+++	+++	+++
	KYEK10	Racine blé	+++	+++	+++
	KYEK33	Racine blé	++	+++	+++
	KYEK34	Racine blé	++	+++	++
	KYEK35	Racine blé	++	++	+
	KYEK39	Racine blé	+++	+++	+++
	KYEK54	Racine blé	+	+	+
	KYEK2	Sol adhérent	+	+++	++
	KYEK31	Sol adhérent	+++	+++	++
	KYEK44	Sol adhérent	+++	+++	+++
	KYEK45	Sol adhérent	+++	+++	+++
Ain Defla	KYAD3	Racine blé	+++	+++	+++
	KYAD4	Racine blé	++	++	+
	KYAD6	Racine blé	+	+	+
	KYAD7	Racine blé	+++	+++	+++
	KYAD30	Racine blé	+	+++	+++
	KYAD47	Racine blé	+	+	+
	KYAD5	Sol adhérent	++	+++	+
	KYAD20	Sol adhérent	+	+	+
	KYAD21	Sol adhérent	++	++	++
Rogassa	KYRG9	Racine blé	+	+	+
	KYRG41	Racine blé	+	++	++
	KYRG50	Racine blé	+	+++	+++
	KYRG40	Sol adhérent	++	++	++
Tiaret	KYT12	Racine de blé	++	++	++
	KYT16	Racine de blé	+++	+++	++
	KYT11	Racine de blé	++	+++	+
	KYT13	Racine de blé	+	++	++
	KYT14	Sol adhérent	+	+	+
	KYT15	Sol adhérent	+++	+++	++
	KYT36	Sol adhérent	+	+	+
Ghardaia	KYG18	Racine blé	+++	+++	+++
	KYG19	Racine blé	+++	+++	+++
	KYG20	Racine blé	+++	+++	+++
	KYG21	Racine blé	+++	+++	+++
	KYG22	Racine blé	+++	+++	+++
	KYG23	Racine blé	+++	+++	+++
	KYG41	Racine blé	+++	+++	+
	KYG42	Racine blé	+	++	+
	KYG43	Sol adhérent	++	++	+
	KYG44	Sol adhérent	+++	+++	+
	KYG50	Sol adhérent	+	++	++
	KYG51	Sol adhérent	+++	+++	+++
	KYL12	Racine blé	+++	+++	+++
	KYL13	Racine blé	+++	+++	+++

Laghouat	KYL14	Racine blé	+++	+++	+++
	KYL15	Racine blé	+++	+++	+++
	KYL16	Racine blé	+++	+++	+
	KYL17	Racine blé	+++	+++	+++
	KYL24	Racine blé	+++	+++	+
	KYL29	Racine blé	++	+++	+
	KYL40	Sol adhérent	+	+	+
	KYL45	Sol adhérent	++	+++	+
	KYL55	Sol adhérent	+++	+++	+
Naama	KYN1	Racine blé	+++	+++	+++
	KYN2	Racine blé	+++	+++	+
	KYN3	Racine blé	+++	+++	+++
	KYN4	Sol adhérent	+++	+++	++
	KYN5	Sol adhérent	+++	+++	++
Oran	KYOR30	Racine blé	++	++	+
	KYOR33	Sol adhérent	+	+	+
	KYOR34	Sol adhérent	+	++	++
	KYOR56	Sol adhérent	+++	+++	++
Gassi Touil	KYGT36	Racine de blé	+	+	+++
	KYGT37	Racine de blé	+	+	+
	KYGT46	Racine de blé	+	+	+
	KYGT47	Sol adhérent	+	+	+
	KYGT53	Sol adhérent	++	++	++
	KYGT54	Sol adhérent	+	+	+
	KYGT201	Racine de blé	+	+	+
	KYGT203	Racine de blé	+	++	++
	KYGT204	Racine de blé	+	++	++
	KYGT205	Racine de blé	+	+	+
	KYGT206	Racine de blé	+	++	++
	KYGT207	Racine de blé	++	+++	+++
	KYGT208	Racine de blé	+	+	+
	KYGT210	Racine de blé	+	+++	++
	KYGT215	Racine de blé	+	++	++
	KYGT235	Racine de blé	+	++	+
Ouargla	KYOG6	Racine de blé	+++	+++	++
	KYOG7	Racine de blé	+	+	+
	KYOG8	Racine de blé	+++	+++	+++
	KYOG9	Racine de blé	++	++	+
	KYOG11	Racine de blé	+++	+++	+++
	KYOG25	Sol adhérent	+++	+++	+++
	KYOG27	Sol adhérent	+++	+++	++
	KYOG28	Sol adhérent	++	+++	+
	KYOG52	Sol adhérent	+++	+++	+
El Goléa	KYEGB1	Racine de blé	++	+++	++
	KYEGB2	Racine de blé	++	+++	++
	KYEGO1	Racine de blé	++	+++	++
	KYEGB3	Racine de blé	++	+++	++
	KYOSR1	Racine de blé	++	+++	++
	KYOSR2	Racine de blé	+	+++	+++
	KYOSR3	Racine de blé	++	++	++
	KYOSR4	Racine de blé	+	++	++
	KYOSR5	Racine de blé	+++	+++	+++
	KYOSR6	Racine de blé	+	+	+

Oued Smar ITGC	KYOSR7	Racine de blé	+++	+++	+++
	KYOSR8	Racine de blé	+	++	++
	KYOSR9	Racine de blé	+++	+++	+++
	KYOSR10	Racine de blé	+	++	++
	KYOSR11	Racine de blé	++	++	++
	KYOS105	Sol adhérent	++	+++	++
	KYOS115	Sol adhérent	++	++	++
	KYOS120	Sol adhérent	+	+++	+++
	KYOS130	Sol adhérent	+	+++	+++
	KYOS201	Racine de blé	+	+++	+++
	KYOS202	Racine de blé	+	+	+
	KYOS203	Racine de blé	+	++	++
	KYOS205	Racine de blé	++	++	++
	KYOS215	Racine de blé	+	+++	+++
Souk El Thenine	KYST18	Racine blé	++	++	++
	KYST24	Racine blé	+	+	+
	KYST19	Racine blé	+	+++	++
	KYST37	Racine blé	++	+++	+++
	KYST38	Racine blé	+	+	+
	KYST52	Racine blé	+	++	+
	KYST22	Sol adhérent	+	++	+++
	KYST23	Sol adhérent	+	+	+
	KYST29	Sol adhérent	+	+	++
	KYST42	Sol adhérent	+	+	+
	KYST53	Sol adhérent	+	++	++
	KYST55	Sol adhérent	+	+	+
Total des souches EPS+++			44	68	40
Pourcentage de souches EPS+++/total des souches			35	54	32

* la production des EPS est appréciée sur colonies bactériennes après 5 j de culture.

+++ Production très importante

++ Production importante

+ Production moyenne

L'analyse globale des résultats relatifs au nombre d'isolats bactériens producteurs d'EPS sélectionnés sur la base de leur diversité montre qu'il n'y a pas de corrélation entre ce nombre et le nombre de bactéries productrices d'EPS (Fig. 19).

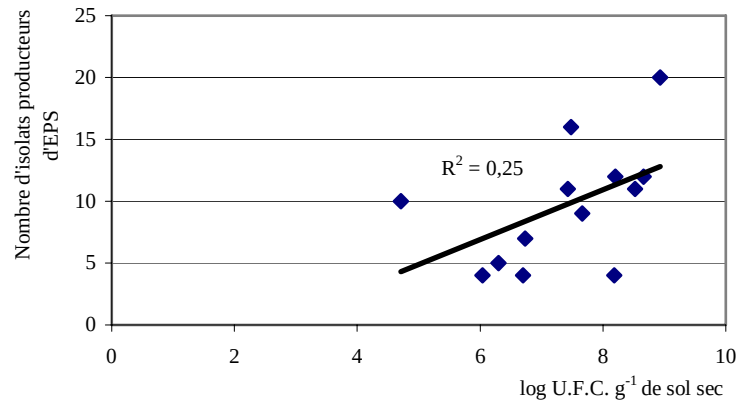


Figure 19. Courbe de corrélation "Nombre d'isolats producteurs d'EPS / Nombre de bactéries productrices d'EPS" .

En effet, le coefficient de corrélation calculé est de 0,25 (Fig. 19). Cela signifierait que dans la rhizosphère du blé dur, la diversité génétique des bactéries productrices d'EPS n'est pas liée à la taille des populations bactériennes assurant la même fonction. Il semblerait par conséquent que la seule évaluation de la taille des populations bactériennes productrices d'EPS ne soit pas un indice significatif de leur implication dans la structuration du sol.

Nous nous sommes par la suite posés la question de savoir si cette diversité était liée à la taille des populations bactériennes mésophiles totales. La réponse est apportée par le graphique de la figure 20 qui montre que, paradoxalement, ce facteur de corrélation ($R^2 = 0,60$) est plus élevé que le précédent, si l'on considère le couple « nombre de bactéries mésophiles totales/nombre d'isolats producteurs d'EPS ».

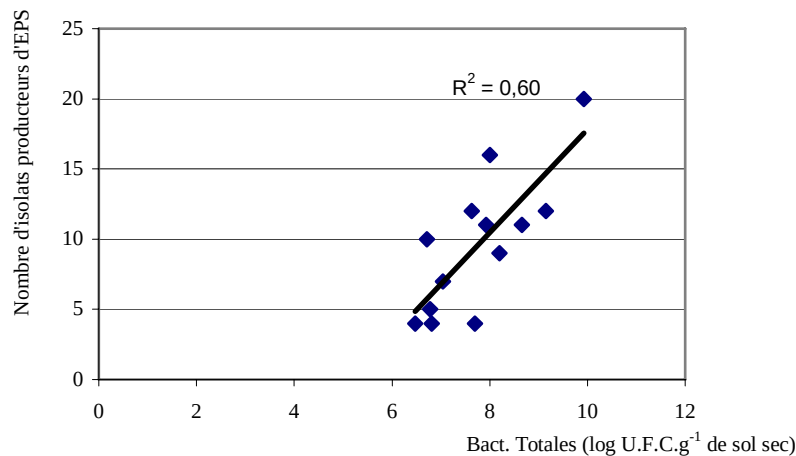


Figure 20. Courbe de corrélation entre le nombre d'isolats producteurs d'EPS et le nombre de bactéries mésophiles totales.

Ces observations traduisent une indépendance entre la diversité des bactéries productrices d'EPS d'une part et le nombre de bactéries assurant la même fonction dans la rhizosphère d'autre part.

Cela laisse supposer que la rhizosphère du blé dur imprime au sol une pression de sélection relativement forte qui se traduit par une augmentation des populations bactériennes productrices d'EPS. Il semblerait que la rhizodéposition amplifie une composante de ces populations bactériennes, celles qui seraient les plus adaptées aux exsudats racinaires du blé dur. Il s'agit là d'une relation purement trophique. Comme nous l'avons souligné précédemment, c'est à travers la nature des exsudats racinaires que se manifesterait cette sélection. Elle serait de ce fait beaucoup plus intense dans les régions sahariennes, en raison de la pauvreté de ces sols, particulièrement en matière organique, où la seule source de carbone serait constituée des molécules rhizodéposées. Par contre, dans les sols du Nord, la teneur en matière organique légèrement plus élevée (cas du sol de la station agronomique ITGC) avec une diversité moléculaire (cellulose, acides humiques, acides fulviques et humine), suggérerait une plus grande diversité bactérienne. Dans ces conditions, l'effet de pression de sélection des populations bactériennes rhizosphériques par la culture du blé dur serait amoindri.

2.3. Distribution des isolats producteurs d'EPS dans les racines et dans le sol adhérent.

L'effet « rhizosphère » ayant tendance à diminuer au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface racinaire, nous avons cherché à savoir comment étaient réparties les bactéries productrices d'EPS dans le compartiment « racinaire » et le sol rhizosphérique (sol adhérent aux racines). Nous avons montré précédemment que les bactéries productrices d'EPS étaient abondantes au niveau de la rhizosphère du blé dur. Leur nombre varie entre 5×10^4 U.F.C. g^{-1} de sol sec pour la station de Ain Defla et $8,6 \times 10^6$ U.F.C. g^{-1} de sol sec pour la station ITGC de Oued Smar.

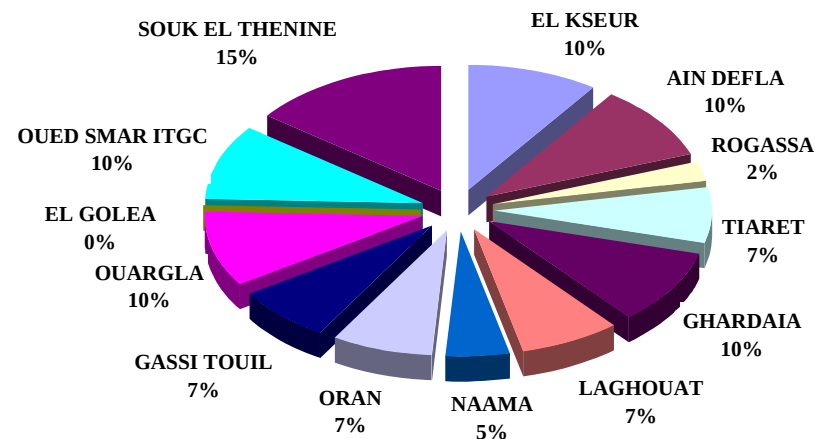


Figure 22. Pourcentage de souches bactériennes productrices d'EPS isolées à partir de sol adhérant aux racines de blé dur (*Triticum durum* L. var Waha) cultivé dans des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

Dans cette partie de l'étude, nous nous proposons d'approcher la diversité de ces

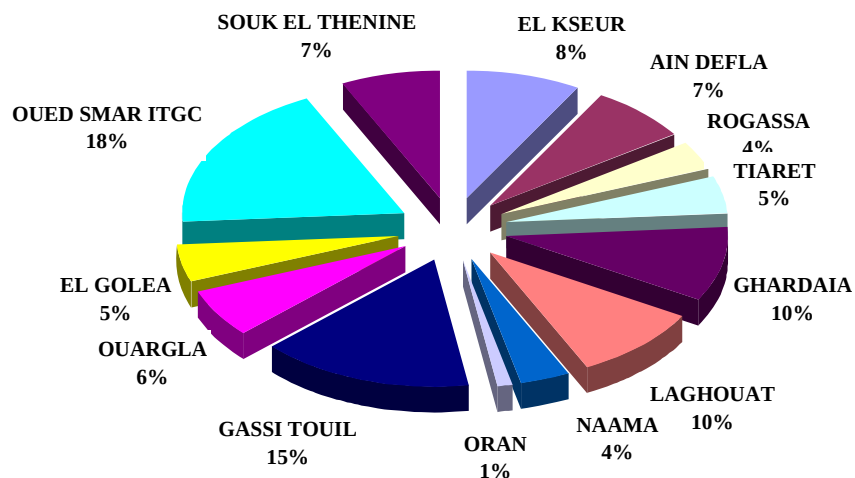


Figure 21. Pourcentage de souches bactériennes productrices d'EPS isolées à partir des racines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé dans des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

populations bactériennes productrices d'EPS de manière indirecte, par le biais de leur fréquence d'isolement, dans chaque région étudiée, et par compartiment (racines et sol adhérent). Même si cette approche ne traduit pas de manière fidèle et complète la diversité bactérienne, elle peut néanmoins constituer un élément d'appréciation.

Tableau XV. Répartition des isolats bactériens producteurs d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha), cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

Stations	Nombre souches isolées à partir des racines	Nombre de souches isolées à partir de sol adhérent.
El Kseur	7	4
Ain Defla	6	4
Rogassa	3	1
Tiaret	4	3
Ghardaia	8	4
Laghouat	8	3
Naama	3	2
Oran	1	3
Gassi Touil	13	3
Ouargla	5	4
El Goléa	4	0
Oued Smar ITGC	16	4
Souk El Thenine	6	6
Total des souches	84	41
Pourcentage	67 %	33 %

Il apparaît clairement qu'à l'exception du site d'Oran, au niveau de toutes les autres stations, l'isolement de bactéries productrices d'EPS selon nos critères est systématiquement plus fréquent à partir des échantillons racinaires qu'à partir du sol adhérent (Tableau XV). En moyenne, deux fois plus de souches productrices d'EPS ont été isolées de racines de blé dur que de sol rhizosphérique (Fig. 21 et 22). Conformément à l'hypothèse de départ, il semble que la proximité des sites d'exsudation (surface racinaire vs sol rhizosphérique) stimule la diversité des bactéries productrices d'EPS.

D'autre part, il semblerait aussi que l'effet du blé dur sur la diversité bactérienne rhizosphérique soit beaucoup plus marquée dans les stations sahariennes, comme c'est le cas en particulier de Gassi Touil, El Goléa et Ghardaia (Tableau XV). Pour la station ITGC de Oued Smar, nous pensons que le nombre important d'isolats est lié essentiellement à 3 paramètres :

- la teneur en matière organique relativement élevée,
- probablement la diversité moléculaire de la matière organique,
- le précédent cultural et ses conséquences.

Comme nous l'avons déjà indiqué, cette station a longtemps été utilisée pour des essais d'acclimatation de nouvelles variétés de blé importées. Tous ces éléments ont pu imprimer au sol une diversité bactérienne beaucoup plus grande.

Dans un autre contexte pédoclimatique (zone aride), la station de Gassi Touil par exemple, l'introduction des cultures de blé dur est plus récente, près de deux décennies, avec de fréquentes interruptions dans la mise en place de ces cultures. Malgré l'ensemble de ces contraintes d'ordre pédoclimatique et relevant d'un précédent cultural récent, la rhizosphère du blé dur est caractérisée par un nombre important de bactéries productrices d'EPS et par une grande diversité bactérienne, avec un nombre d'isolats relativement important (16).

Cela laisse supposer que même dans les régions arides, il existerait un potentiel bactérien producteur d'EPS endémique susceptible d'être stimulé, dès que les conditions deviennent favorables.

L'effet de la pression de sélection a été rapporté par de nombreux auteurs. C'est ainsi que les travaux d'Atlas et Bartha (1987) ont montré qu'il y a une différence dans la composition des populations bactériennes de la rhizosphère et celles d'un sol qui n'a pas été influencé par les racines de plantes vivantes (sol nu). Les bactéries de la rhizosphère, ont des besoins nutritionnels différents, de celles qui vivent dans le sol nu. Par exemple, les populations de *Rhizobium*, connues comme étant fixatrices d'azote symbiotiques, disparaissent rapidement en absence de plante-hôte : la légumineuse (Corman *et al.*, 1987 ; Janos, 1988 ; Perry *et al.*, 1987). Certaines de ces rhizobactéries deviennent « dormantes », alors que d'autres échappent à la prédation, en bénéficiant de la protection des agrégats du sol.

2.4. Distribution des bactéries productrices d'EPS Gram+/Gram-

Concernant les bactéries productrices d'EPS, l'une des principales différences entre les bactéries à Gram+ et à Gram- réside dans les mécanismes mis en œuvre pour leur synthèse, leur assemblage et leur exportation (Whitfield, 1988). Pour les bactéries à Gram+ : la synthèse des précurseurs est réalisée dans le cytoplasme. L'assemblage des intermédiaires liés à des lipides a lieu au niveau de la membrane cytoplasmique, et le processus d'élongation du polysaccharide dans la paroi bactérienne. Pour les bactéries à Gram-, la synthèse des précurseurs se fait dans le cytoplasme. L'assemblage des intermédiaires liés à un lipide a lieu dans la membrane interne. Dans ce cas, le siège de l'élongation du polysaccharide est l'espace périplasmique. Enfin, la translocation de l'EPS complet se fait à travers la membrane externe.

En outre, des différences concernant la nature des EPS peuvent aussi être évoquées. C'est ainsi que de nombreuses bactéries à Gram + (*Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*) synthétisent principalement des homopolysaccharides de type lévane qui sont des β -D-fructanes. Cette classe d'EPS n'est cependant pas synthétisée exclusivement par des bactéries à Gram+, puisque des espèces comme *Rahnella aquatilis* et *Pseudomonas syringae* produisent également ce type de polysaccharide. Parmi les homopolysaccharides, on peut aussi citer les α -D-Glucanes synthétisés par certaines espèces appartenant au genre *Streptococcus*.

Par contre, les bactéries à Gram- synthétisent essentiellement des hétéropolysaccharides avec une plus grande diversité moléculaire, comme les alginates (*Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter*), les émulsanes (*Acetobacter calcoaceticus*), les wellanes (*Alcaligenes sp.*), les

succinoglycanes (*Sinorhizobium*, *Agrobacterium*), le xanthane (*Xanthomonas campestris*), le gellane (*Pseudomonas* sp.) et le rhamsane (*Alcaligenes* sp.).

Compte tenu de ces différences de mécanismes de biosynthèse des EPS, de leur sécrétion et de leur diversité moléculaire, nous avons cherché à savoir quelle était la répartition de ces deux grands phylums bactériens au niveau des deux compartiments (racine vs sol adhérent), dans les différents sites étudiés.

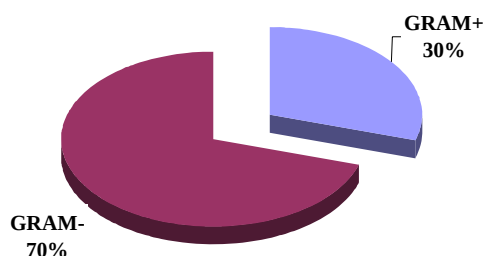


Figure 23. Répartition globale des isolats bactériens producteurs d'EPS dans le sol adhérent et au niveau des racines du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

Dans la rhizosphère du blé dur, la fréquence d'isolement des bactéries à Gram- est plus importante que celle des bactéries à Gram+ (Fig. 23). Nous nous sommes ensuite posé la question de savoir si cette répartition était identique pour les deux compartiments (racines et sol adhérent). La réponse à cette question est apportée dans les Figures 24 et 25 qui montrent toujours une prédominance des bactéries à Gram- dans les deux compartiments : racines et sol adhérent, avec des taux respectifs de 75 % et 61 %.

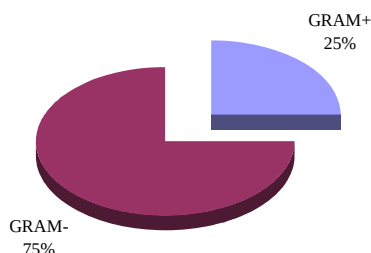


Figure 24. Répartition des isolats producteurs d'EPS à Gram+ et à Gram- au niveau des racines du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

Au niveau du sol adhérent, ces mêmes figures montrent aussi une tendance à la diminution des isolats bactériens producteurs d'EPS à Gram- (75 % racines vs 61% sol adhérent).

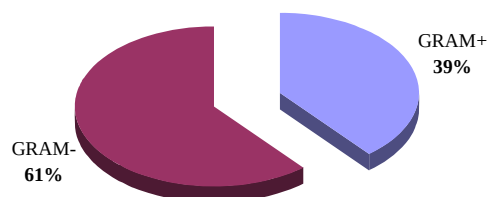


Figure 25. Répartition des isolats bactériens producteurs d'EPS à Gram+ et à Gram- dans le sol adhérent aux racines du blé dur (*Triticum durum* L.var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

La répartition des isolats producteurs d'EPS dans le sol adhérent en fonction de leur position phylogénétique (Gram+ vs Gram -) montre, de façon générale, une prédominance des bactéries à Gram - : 75 % au niveau racinaire et 61% au niveau du sol adhérent (Fig. 24 et 25). Nous devons toutefois signaler que si les bactéries à Gram- sont les plus fréquentes dans la rhizosphère du blé dur, et cela quelles que soient les conditions pédoclimatiques, il n'en demeure pas moins que les bactéries productrices d'EPS à Gram + représentent un pourcentage qui est loin d'être négligeable, puisqu'elles sont estimées entre 25 % et 39 %. Ainsi, la proximité de la racine semble stimuler la présence des bactéries productrices d'EPS à Gram -.

Cette répartition (Gram+ vs Gram-), à elle seule, n'est pas suffisante pour avoir une idée précise de l' « empreinte » microbiologique du blé dur. En effet, c'est le spectre métabolique des isolats qui déterminera leur importance fonctionnelle dans la rhizosphère (cf. paragraphe suivant).

Parmi les bactéries à Gram- les plus citées dans la littérature, nous pouvons citer les genres *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Burkholderia* (Gouzou *et al.*, 1993 ; 1995 ; Bezzate *et al.*, 2000 ; Amellal *et al.*, 1998 et 2001 ; Hilali *et al.*, 2001 ; Achouak *et al.*, 1999) et *Enterobacter*. Pour les bactéries à Gram+, ce sont les genres *Bacillus* et *Paenibacillus* qui sont les plus fréquemment mentionnés (Bezzate *et al.*, 2000; Guemouri *et al.*, 2000).

2.5. Distribution en fonction de l'étage bioclimatique

Nous avons regroupé les 13 stations étudiées dans deux groupes correspondant à des étages bioclimatiques contrastés (Tableau XV).

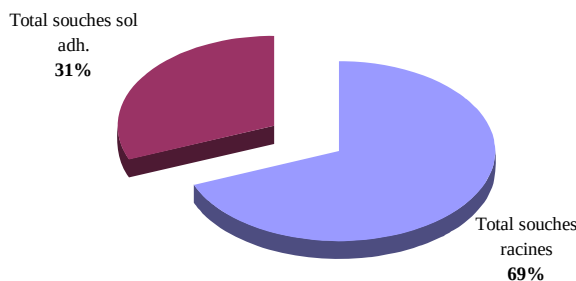


Figure 27. Répartition des isolats producteurs d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de régions semi-arides arides à sahariennes.

- **groupe 1** : étage sub-humide, constitué des stations : El Kseur, Oued Smar, Souk El Thenine et Tiaret. Les sols de ces stations sont relativement riches en matière organique et présentent une texture équilibrée et une structure élaborée.
- **groupe 2** : étage semi-aride, aride à saharien, constitué des stations : Oran, Ain Defla, Ghardaia, Laghouat, Naama, Gassi Touil, Rogassa, Ouargla et El Goléa. A l'exception d'Oran et Ain Defla, les sols de ces stations proviennent essentiellement de régions du sud de l'Algérie. Ils sont caractérisés par des textures sableuses, des structures élémentaires et de très faibles teneurs en matières organiques (C et N).

Dans ce second groupe, le sol de Rogassa représente une exception, puisqu'il est le seul à présenter un caractère particulier, en l'occurrence une forte salinité (20 mS.cm⁻¹).

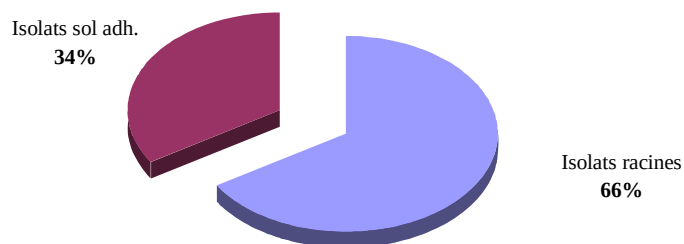


Figure 26. Répartition des isolats producteurs d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de régions humides à sub humides.

Le nombre d'isolats producteurs d'EPS est approximativement identique entre les quatre étages bioclimatiques (sub-humide, semi-aride, aride et saharien) (Fig. 26 et 27). Nous rappelons aussi que, dans ces 4 étages, la nature pédologique des stations est très variable. Ceci renforce l'idée que la pression de sélection du blé dur sur les populations bactériennes

est déterminante, probablement plus importante que celle des conditions pédoclimatiques. Ces populations bactériennes sont aussi nombreuses que diversifiées dans la rhizosphère du blé dur, même sous les climats les plus rudes (semi-arides, arides, ou même sahariens).

2.6. Distribution en fonction de la vitesse de croissance des bactéries

La vitesse de croissance des bactéries telluriques représente un élément important en écologie microbienne. En effet, dans le cas des relations « plante-bactéries », elle détermine l'aptitude qu'ont certaines bactéries dites « à croissance rapide » à proliférer très rapidement dans cet environnement favorable et ainsi coloniser la rhizosphère quand les conditions leur sont favorables. Ces populations bactériennes sont les premières à s'installer dans la rhizosphère, mais leur maintien dans la rhizosphère dépend essentiellement de leur pouvoir de compétition et d'adaptation aux différents facteurs abiotiques. En outre, les bactéries dites « à croissance lente » ne sont pas pour autant moins intéressantes car elles peuvent, dans certains cas, en fonction de leur pouvoir colonisateur, constituer des populations qui peuvent s'installer lentement, progressivement mais surtout durablement.

Dans cette approche, nous considérons les bactéries à croissance rapide, comme étant celles qui se développent sur boîte de Petri après seulement 24 h, contrairement aux bactéries à croissance lente qui apparaissent après 48 h et plus.

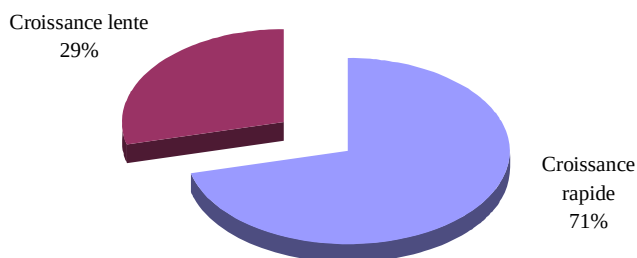


Figure 28. Répartition globale des isolats producteurs d'EPS en fonction de leur vitesse de croissance dans le sol adhérent et au niveau des racines du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

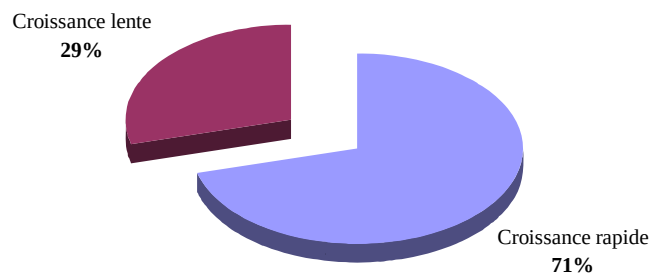


Figure 29. Répartition des isolats producteurs d'EPS en fonction de leur vitesse de croissance dans le sol adhérent aux racines du blé dur (*Triticum durum* L.var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

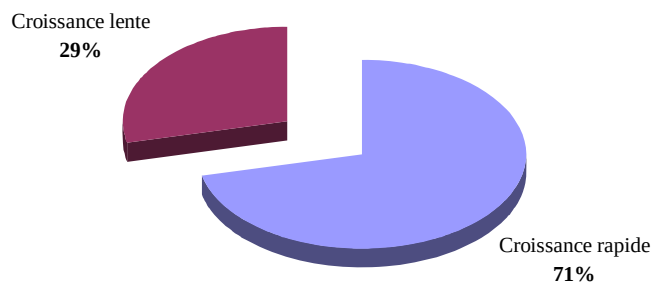


Figure 30. Répartition des isolats producteurs d'EPS en fonction de leur vitesse de croissance au niveau des racines du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.

Les résultats montrent, de façon générale, que les bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur sont en majorité à croissance rapide (Fig. 28). Dans les deux compartiments analysés, racines et sol adhérent, la proportion de bactéries à croissance rapide est identique, environ 71 % des bactéries productrices d'EPS (Fig. 29 et 30).

Si ces bactéries sont aussi fréquentes dans la rhizosphère du blé dur, cela signifie qu'elles rencontrent dans cet environnement des conditions favorables à leur développement et leur

maintien; ceci leur confère un certain « pouvoir colonisateur », particulièrement durant les premiers stades de développement du blé dur (jusqu'au stade montaison).

Pendant cette période, le blé dur exercerait, probablement par le biais de ses exsudats racinaires, une pression de sélection positive sur les bactéries productrices d'EPS à croissance rapide. Cet effet ne se limite pas aux racines du blé dur, mais semble s'étendre au sol adhérent.

Lors de l'expérimentation, l'étape d'isolement de ces bactéries sur milieu solide a porté sur deux semaines d'incubation des boîtes de Petri. Nous avons déjà noté que la majorité des colonies EPS+ apparaissaient dès les premières 24 h d'incubation, ce qui laissait présager que la plupart des bactéries productrices d'EPS étaient à croissance rapide. Cette population bactérienne dite à croissance rapide présenterait donc un fort pouvoir de colonisation de la rhizosphère du blé dur, lui permettant très probablement son maintien à un niveau plus important que les bactéries productrices d'EPS à croissance lente. Dans cet écosystème rhizosphérique, le blé dur semble avoir une influence sur la sélection d'une microflore à croissance rapide.

3. Production d'EPS à partir de différents substrats carbonés

Par cette expérience préliminaire, nous voulions apprécier de façon qualitative, l'influence de la nature de la source de carbone sur la production d'EPS. Pour cela, nous avons tenu à ce que le rapport C/N, déterminant dans toute activité métabolique, soit constant pour tous les essais.

3.1. Production d'EPS sur milieu solide

Nous avons regroupé les isolats bactériens sur la base du substrat carboné induisant le niveau de production d'EPS le plus élevé. La répartition du nombre de souches, par source de carbone, nous fournira des indications sur leurs capacités métaboliques, en relation avec la production d'EPS.

Cette évaluation de la production d'EPS sur milieu solide permet de vérifier la stabilité de ce métabolisme, après des repiquages successifs sur différents milieux et de confirmer ainsi leur capacité à produire des EPS. Elle permet aussi de comparer, de manière semi-quantitative, l'influence de trois substrats carbonés (glucose, mannitol et saccharose). À ce niveau de l'étude, il ne nous a pas semblé nécessaire de réaliser des dosages d'EPS sur l'ensemble des souches isolées, puisque nous pouvons déterminer une différence de production d'EPS sur la base d'une simple observation de la morphologie des colonies bactériennes (aspect muqueux) et d'opérer ainsi une sélection des souches hyperproductrices (Tableau XIV).

Pour connaître l'influence la nature du substrat carboné sur les niveaux de production d'EPS, nous avons choisi trois substrats carbonés différents : le glucose (monosaccharide), mannitol (polyol) et le saccharose (disaccharide de glucose-fructose). Le saccharose et le glucose sont décrits dans la littérature comme étant des glucides abondamment exsudés dans la rhizosphère du blé dur. Il est à noter que les glucides dans la rhizosphère du blé présentent un comportement paradoxal : bien qu'ils soient facilement biodégradables, ils sont

relativement abondants dans le sol et représentent 10 % du C des photosynthétats (Derrien *et al.*, 2004).

Les résultats préliminaires indiquent que la nature du substrat carboné influence de façon notable la production d'EPS (Fig. 31). Nous remarquons que le saccharose représente le substrat carboné induisant en moyenne la production d'EPS la plus abondante, puisque près de la moitié des souches (45 %) sont des « hyperproductrices » d'EPS à partir de cette source

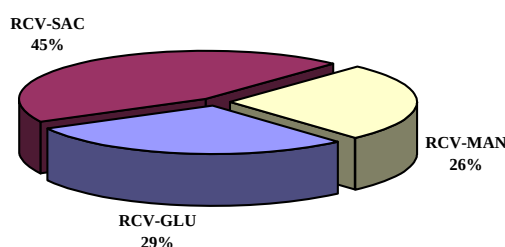


Figure 31. Influence des sources de carbone (saccharose, glucose et mannitol) sur la production d'EPS des souches isolées, sur milieu solide.

de carbone. Les souches testées sont aussi capables de produire des EPS à partir des deux autres substrats carbonés testés, ce qui ne semble pas indiquer l'existence d'une spécificité particulière vis-à-vis de la nature du substrat pour la production d'EPS.

Nous avons ensuite recensé les souches bactériennes hyperproductrices à partir des trois sources de carbone. Nous avons noté un pourcentage d'isolats estimé à 22 % de bactéries capables de produire des EPS en utilisant les 3 substrats carbonés (saccharose, glucose et mannitol). Cela montre que ces bactéries présentent des capacités métaboliques importantes capables d'induire une production d'EPS sur la base de ces sources de carbone. Ces bactéries hyperproductrices sur 3 sources de carbonés (22 %) sont réparties comme suit :

- 86 % ont été isolées à partir des racines de blé dur,
- 14 % isolées à partir du sol adhérent.

Cela nous permet de dire, qu'au niveau racinaire, là où les exsudats racinaires sont les plus abondants, la capacité d'utilisation des substrats carbonés pour la production d'EPS est plus importante. Cela suggère aussi une plus grande production d'EPS *in situ* au voisinage immédiat des racines de blé, situation bénéfique aussi bien pour les bactéries elles-mêmes en condition de stress, que pour les racines et par conséquent pour la plantule de blé dur.

L'analyse des résultats nous permet de dire que, de manière générale, les trois sources de carbone sont métabolisées par l'ensemble des isolats. Au niveau des racines, le pourcentage de souches bactériennes qui produisent des EPS sur RCV-glucose, RCV-saccharose et RCV-mannitol est plus important qu'au niveau du sol adhérent. Il est respectivement d'environ

62%, 85% et 57% (Tableau XVI). Nous remarquons aussi que la majorité des bactéries isolées présentent une meilleure production d'EPS à partir du saccharose, et ceci quel que soit le compartiment analysé (racines ou sol adhérent). Le taux de souches hyperproductrices d'EPS à partir du saccharose est cependant plus important au niveau des racines de blé dur (85 % pour les racines contre 68% pour le sol adhérent).

Cela laisse supposer que le blé favorise préférentiellement cette population bactérienne. En effet, le blé dépose dans la rhizosphère de nombreuses substances (rhizodépôts). En plus de certaines vitamines, acides organiques, acides aminés, le blé dur exsude des glucides. Toutes ces molécules sont produites à partir de la photosynthèse, puis transloquées par la sève dans la partie racinaire, où une partie est exsudée. Parmi ces glucides, le saccharose ainsi que le glucose occupent une place importante chez certaines graminées et plus particulièrement le blé (Derrien *et al.*, 2004).

Tableau XVI. Nombre et pourcentage d'isolats producteurs d'EPS sur les trois sources de C (glucose, saccharose et mannitol) dans les différentes stations étudiées.

Station	RCV-glucose		RCV-saccharose		RCV-mannitol	
	Racines	Sol adhérent	Racines	Sol adhérent	Racines	Sol adhérent
El Kseur	6	3	6	4	6	4
Ain Defla	3	3	4	3	3	2
Rogassa	3	0	4	1	3	1
Tiaret	3	0	4	1	3	1
Ghardaia	8	2	8	2	5	0
Laghouat	8	2	8	2	5	0
Naama	3	2	3	2	2	2
Oran	1	1	1	2	0	2
Gassi Touil	0	1	7	1	7	1
Ouargla	4	4	4	4	3	2
El Goléa	4	0	4	0	4	0
Oued Smar ITGC	7	2	14	4	4	0
Souk El Thenine	2	0	4	2	3	3
Total des souches utilisant glucose, saccharose ou mannitol.	52	20	71	28	48	18
Total des souches	84	41	84	41	84	41
% souches utilisant la source de C*	62 %	49 %	85 %	68 %	57 %	44 %

*** le nombre de souches est déterminé par rapport à la production >=++**

Si les populations bactériennes productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur sont majoritaires, la nature de ces EPS est très variable (taille, couleur, viscosité). Une analyse sommaire portant sur leur aspect, réalisée sur des colonies âgées de 5 jours, montre que la

majorité des EPS se présente sous forme d'un gel plus ou moins visqueux. Une faible proportion de ces bactéries, produit un polysaccharide élastique. Ce caractère « élasticité » est pris en considération, puisque nous pensons qu'il pourrait constituer un critère de sélection pour l'amélioration de la structuration du sol. Celle ci se matérialisant par une modification des propriétés d'agrégation, pouvant contribuer à une stabilité structurale (Alami *et al.*, 2000 ; Amellal *et al.*, 1998 ; Kaci *et al.*, 2005).

4. Analyse de la diversité phénotypique des souches hyperproductrices d'EPS

Sur la base des résultats des tests Biolog, nous avons dressé des arbres phénologiques permettant de positionner les souches sélectionnées par rapport au reste des souches isolées et d'établir ainsi des regroupements en fonction des affinités de celles-ci, exprimées en pourcentage d'homologie (Fig. 32).

Globalement, nous ne pouvons pas distinguer les bactéries productrices d'EPS à Gram+ des bactéries à Gram-, puisqu'il n'existe pas de groupe parfaitement homogène comportant chacun de ces groupes de bactéries (Fig. 32). Nous ne pourrions par conséquent envisager l'analyse de cet arbre qu'en considérant séparément les bactéries productrices d'EPS à Gram+ et les bactéries à Gram-.

C'est ainsi que pour les souches à Gram+, nous pouvons distinguer 2 groupes homogènes :

- **Groupe 1** : constitué des souches KYAD20 et KYG19, avec un taux de similarité de 99 % entre elles.
- **Groupe 2** : constitué des 3 souches KYN4, KYEGB2 et KYOS49. Le taux de similarité entre les souches bactériennes les plus proches (KYEGB2 et KYN4) est de 100 %. Cette proximité phénotypique pourrait trouver probablement des éléments d'explication dans l'étage bioclimatique. Les régions d'El Goléa (souche KYEGB2) et de Naama (pour la souche KYN4) se trouvent dans l'étage bioclimatique aride à hiver frais.

Les différents groupes ainsi définis comportent des souches bactériennes productrices d'EPS provenant de localités différentes, mais aussi de régions différentes d'un point de vue pédoclimatique. Il apparaît également que des souches bactériennes isolées dans la même rhizosphère se trouvent dans des clusters différents. C'est le cas par exemple des souches KYG19 et KYG21, KYST38, KYST55, KYEGB2 et KYEG01.

L'ensemble de ces remarques montre que dans la rhizosphère du blé dur, il existe une grande diversité phénotypique des bactéries productrices d'EPS à Gram+. Nous devons cependant noter qu'il n'y a aucun groupe homogène comportant à la fois des bactéries productrices d'EPS à Gram+ et à Gram-.

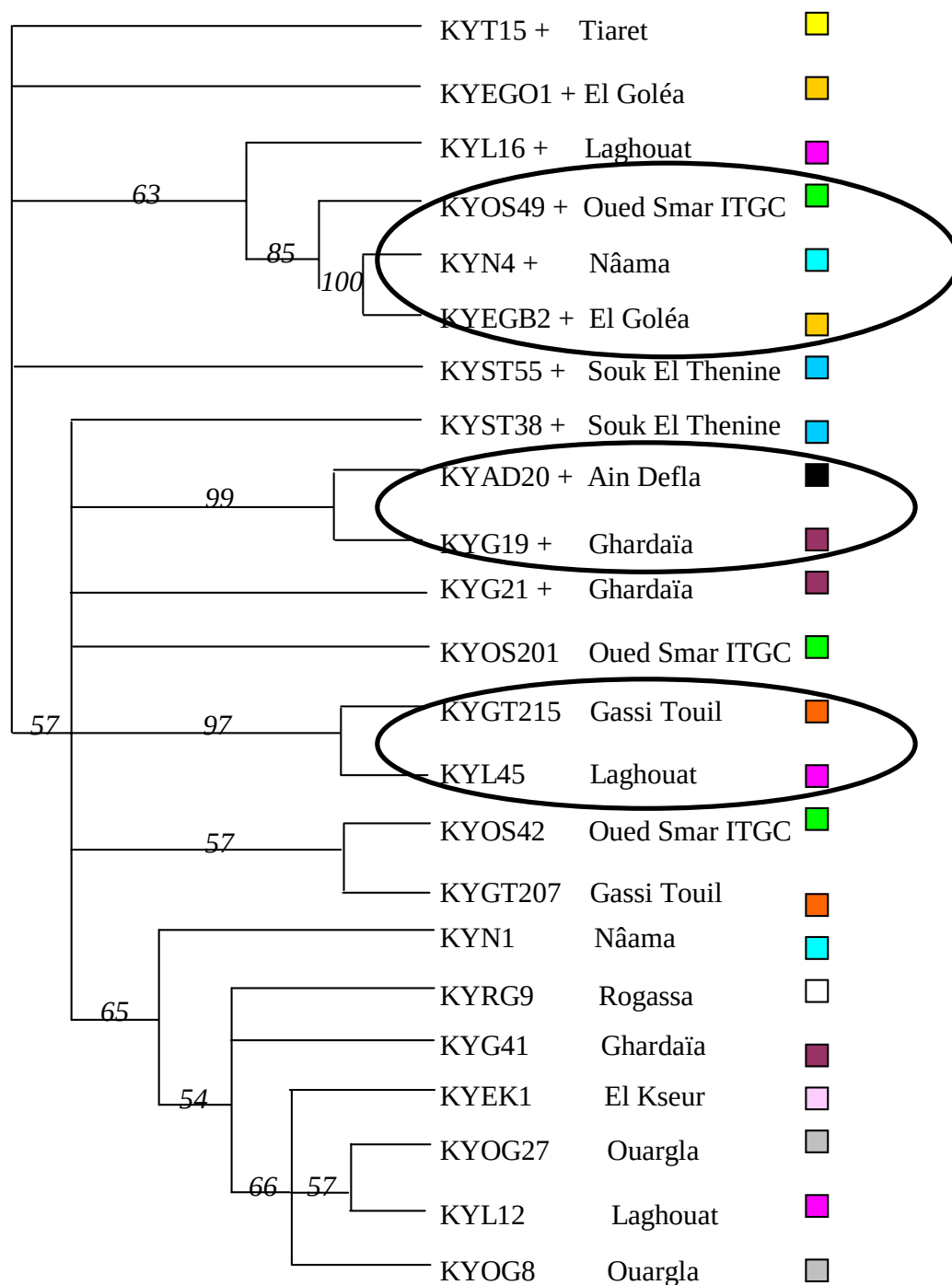


Figure 32. Arbre phénologique des souches bactériennes hyperproductrices d'EPS. Les valeurs mentionnées sur le dendrogramme correspondent aux niveaux de confiance.

Dans le cas des bactéries productrices d'EPS à Gram-, nous avons déterminé trois groupes homogènes :

- **Groupe 1** : constitué des souches KYGT215 et KYL45 avec un niveau de confiance relativement fort (97 %).
- **Groupe 2** : constitué des souches KYOS42 et KYGT207 avec un niveau de confiance plus faible, estimé à 57 %.
- **Groupe 3** : constitué des souches KYN1, KYRG9, KYG41, KYEK1, KYOG27, KYL12 et KYOG8 (65 %).

Une souche bactérienne productrice de polysaccharides ne se retrouve dans aucun des groupes phénotypiques ; il s'agit de la souche KYST55 isolée dans la région de Souk El Thenine, qui est de ce fait, très différente des autres isolats. Cette souche bactérienne n'est pas considérée comme hyperproductrice d'EPS (Tableau XIV). Ce sont surtout les propriétés rhéologiques du polysaccharide qu'elle produit (viscosité, élasticité) qui en font une souche candidate pour la modification des propriétés d'agrégation du sol.

Comme précédemment, nous notons une grande diversité phénotypique des bactéries productrices d'EPS à Gram- dans la rhizosphère du blé dur.

Les groupes ainsi définis, aussi bien pour les bactéries productrices d'EPS à Gram+ que les bactéries à Gram-, ne correspondent pas à des régions pédoclimatiques homogènes. En effet, des bactéries isolées de la même rhizosphère se retrouvent dans des groupes différents (Fig. 32). Ces bactéries présentent donc des activités métaboliques différentes. Ceci montre qu'au niveau de la rhizosphère du blé dur, il existe un potentiel métabolique diversifié pouvant permettre une adaptation aux diverses sources carbonées.

Pour avoir une idée plus précise des activités métaboliques des souches bactériennes productrices d'EPS, il nous a semblé opportun d'analyser les résultats des tests Biolog, en ne considérant que les tests communs (Gram+ et Gram-) au nombre de 53 (Tableau XVII).

4.1. Activités métaboliques

Certains tests de l'analyse Biolog présentent des spécificités vis-à-vis des bactéries à Gram+ et Gram-. Pour cette raison, nous avons retenu et regroupé dans le même tableau exclusivement les résultats des tests phénotypiques communs à ces 2 groupes de bactéries productrices d'EPS. (Tableau XVII)

Tableau XVII. Utilisation des substrats carbonés par les souches hyperproductrices d'EPS.

Bactéries	Gram+										Gram-										% de réactions positives			
	KYT15	KYEG01	KYL16	KYST55	KYOS49	KYST38	KYN4	KYAD20	KYG19	KYG21	KYEGB2	KYOS201	KYGT215	KYL45	KYOS42	KYN1	KYRG9	KYGT207	KYG41	KYEK1		KYOG27	KYL12	KYOG8
α-CYCLODEXTRIN																								13,0
DEXTRIN																								91,3
GLYCOGEN																								56,5
TWEEN 40																								78,3
TWEEN 80																								73,9
N-ACETYL-GLUCOSAMINE																								52,2
L-ARABINOSE																								73,9
D-ARABITOL																								39,1
CELLOBIOSE																								87,0
D-FRUCTOSE																								100,0
L-FUCOSE																								34,8
D-GALACTOSE																								82,6
GENTIOBIOSE																								78,3
α-D-GLUCOSE																								100,0
m-INOSITOL																								60,9
α-D-LACTOSE																								47,8
MALTOSE																								91,3
D-MANNITOL																								73,9
D-MANNOSE																								91,3
D-MELIBIOSE																								69,6
α-METHYL D-GLUCOSIDE																								52,2
D-PSICOSE																								87,0
D-RAFFINOSE																								78,3
L-RHAMNOSE																								43,5
D-SORBITOL																								60,9
SUCROSE																								91,3
D-TREHALOSE																								82,6
FURANOSE																								82,6
XYLITOL																								17,4
α-HYDROXYBUTYRIC ACID																								34,8
β-HYDROXYBUTYRIC ACID																								52,2
γ-HYDROXYBUTYRIC ACID																								13,0
HYDROXYPHENYL ACETIC ACID																								60,9
α-KETO GLUTARIC ACID																								47,8
α-KETO VALERIC ACID																								17,4
L-LACTIC ACID																								65,2

[illegible]

L'analyse de ces résultats montre que les bactéries productrices d'EPS présentent des activités métaboliques variables. Les taux de réponses positives varient globalement entre 19 % pour la souche KYT15 et 96 % pour la souche KYOG8. Les bactéries productrices d'EPS à Gram positif dégradent une gamme de substrats carbonés moins large avec des pourcentages de réponses positives qui varient entre 18 % pour la souche KYT15 et 72 % pour les souches KYG19 et KYG21. Nous notons aussi que la majorité de ces souches bactériennes productrices d'EPS à Gram positif présentent des taux d'utilisation de ces substrats inférieurs à 50 %. Les souches KYG19 et KYG21 constituent de ce fait des cas particuliers.

Nous avons remarqué par ailleurs que les capacités métaboliques affichées par certaines de ces bactéries sont en deçà de la réalité, puisque le nombre important de réponses « intermédiaires » est élevé. Celles-ci, si elles s'avéraient positives, pourraient augmenter

d'avantage la diversité métabolique. C'est pour cette raison que nous avons qualifié cette approche d'analyse par défaut.

Les bactéries productrices d'EPS à Gram négatif sont capables d'utiliser une plus large gamme de substrats carbonés pour leur croissance que les bactéries à Gram positif..

Nous avons ensuite calculé le pourcentage d'utilisation de chacun des substrats carbonés par l'ensemble des souches isolées (Tableau XVII). Dans cette analyse, nous avons considéré uniquement les réactions non ambiguës, positives ou négatives, les autres ayant été écartées.

Nous remarquons que l'ensemble des souches bactériennes testées (Gram+ et Gram-) utilisent une gamme relativement large de substrats carbonés, constituée de sucres simples, d'acides organiques, d'acides aminés, de disaccharides ou de polysaccharides. Nous remarquons également que la majorité des substrats carbonés sont différemment métabolisés par les bactéries testées. Le glucose et le fructose représentent les glucides les plus utilisés par les bactéries testées (100 % des souches testées). Concernant les autres glucides, leur utilisation par les bactéries est variable. Il n'y a cependant pas de règle générale, concernant l'utilisation des glucides par famille structurale. En effet, les glucides simples, les pentoses (arabinose par exemple) sont aussi bien utilisés que les hexoses (glucose, fructose, galactose ou mannose).

Parmi les glucides simples, le glucose, le xylose et l'arabinose sont présents dans la rhizosphère du blé (Derrien *et al.*, 2004). L'évolution des populations bactériennes dans le sol ne peut pas être étudiée sans considérer l'élément végétal et par conséquent le passé cultural. En effet, ce dernier traduit un effet de pression de sélection qui s'opère sur les populations bactériennes rhizosphériques. L'hypothèse d'une adaptation du métabolisme bactérien aux substrats carbonés libérés par la plante est de ce fait hautement vraisemblable.

D'autre part, les disaccharides sont variablement métabolisés. C'est ainsi que 92 % des souches testées utilisent le saccharose et le maltose, contre seulement 48 % d'entre elles pour le lactose. Il nous paraît important de souligner dans ce contexte que le saccharose et le maltose sont des diholosides que l'on peut rencontrer naturellement dans la rhizosphère, alors que le lactose n'est pas détecté dans cet environnement.

Parmi les glucides, le xylitol représente le substrat le moins utilisé par les bactéries productrices d'EPS à Gram- et pas du tout utilisé par les bactéries à Gram+ testées.

De nombreux acides organiques, comme l'acide lactique et l'acide succinique, sont également métabolisés par la majorité des souches testées. Ces deux molécules peuvent constituer une source de carbone pour les bactéries à Gram-, puisque la totalité des souches testées métabolisent ces deux substrats.

Certains acides aminés peuvent aussi constituer des sources de carbone pour les bactéries productrices d'EPS. C'est ainsi que les bactéries à Gram- les utilisent plus fréquemment que les bactéries à Gram+, même si leur teneur dans le sol reste en deçà de celle des glucides. Les acides aminés pourraient par conséquent constituer une source de carbone et d'énergie alternative aux glucides et aux acides organiques.

5. Sélection, caractérisation et identification de trois souches bactériennes productrices d'EPS

5.1. Critères de sélection des souches

L'objectif visé par cette sélection repose sur l'utilisation de ces souches bactériennes dans un contexte d'inoculation du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) *in situ*, afin d'en évaluer les conséquences à la fois sur la structure du sol et sur la croissance de la plante. L'une des contraintes était le nombre de souches pouvant être testé pour leur effet sur la croissance des plantes. Il nous a semblé raisonnable de limiter ce nombre de souches à trois. Les trois souches sélectionnées sont celles qui ont répondu aux critères que nous nous sommes fixés *a priori*.

Ces critères étaient les suivants :

- la production d'EPS,
- la nature de l'EPS (viscosité, élasticité),
- la capacité de rétention d'eau,
- la fréquence d'apparition de la souche dans la rhizosphère,
- la gamme de substrats carbonés utilisés pour la production d'EPS.

Les souches bactériennes répondant à ces critères seront de ce fait de bons candidats pour évaluer l'effet de leur inoculation sur l'agrégation du sol et ses conséquences sur la croissance du blé. La fréquence élevée de ces souches dans la rhizosphère du blé dur constitue aussi un critère de leur adaptation à cet environnement rhizosphérique.

L'importance de la production d'EPS, leur viscosité et la rétention d'eau représentent autant de caractères essentiels, ayant des incidences sur la structuration du sol. Enfin, la diversité des substrats carbonés qui entraînent une production importante d'EPS peut aussi constituer un élément d'appréciation des capacités d'adaptation de ces souches à des écosystèmes variés.

L'analyse de ces différents critères a conduit à la sélection des trois souches bactériennes productrices d'EPS : KYGT207, KYEGB2 et KYT15. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII. Principales caractéristiques des souches sélectionnées.

Bactérie	Origine géographique	Localisation rhizosphérique	Abondance (UFC.g ⁻¹ de matière sèche)*	Texture du sol
KYGT207	Gassi Touil	Racines de blé dur	2,0 10 ⁶	Sableux
KYEGB2	El Goléa	Racines de blé dur	2,0 10 ⁵	Sableux
KYT15	Tiaret	Sol adhérent	4,6 10 ⁵	Limono-sablo-argileux

* Exprimée en UFC.g⁻¹ de matière sèche (sol adhérent ou racines)

Ce nombre est calculé sur la base de la plus forte dilution à partir de laquelle l'isolement a été effectué. De ce fait, il s'agit donc d'une estimation par défaut des bactéries dans ces sols.

Parmi les trois souches bactériennes sélectionnées, deux d'entre elles ont été isolées à partir des racines (KYGT207 et KYEGB2), alors que la troisième (KYT15) a été prélevée du sol adhérent du blé dur. Le tableau XVIII indique que les trois souches sont très fréquentes dans la rhizosphère du blé dur, leur fréquence est évaluée entre 2×10^5 et 2×10^6 UFC.g⁻¹ de matière racinaire sèche. Nous rappellerons que ces valeurs sont estimées par rapport à la dilution dans laquelle ont été isolées les souches bactériennes. De ce fait, l'évaluation de leur fréquence dans le sol est obtenue par défaut.

L'origine géographique de ces trois souches bactériennes fait apparaître clairement que, dans des régions connues traditionnellement pour leur céréaliculture, c'est le cas de Tiaret, il existe un potentiel bactérien producteur d'EPS important, quantitativement et qualitativement (viscosité et élasticité des EPS).

Cette caractéristique n'est pas exclusivement liée à l'ancienneté de la culture de blé dur, puisque, dans des régions arides (cas de Gassi Touil et d'El Goléa), nous avons isolé des bactéries dont l'EPS est nettement plus élastique (KYGT207 par exemple).

5.2. Identification phénotypique.

L'identification des trois souches bactériennes productrices d'EPS sélectionnées dans le cadre de cette étude (KYGT207, KYEGB2 et KYT15) a été réalisée dans un premier temps sur la base de caractères phénotypiques classiques (morphologiques et physiologiques). Ceux-ci sont déterminés grâce à l'utilisation des tests Biolog et des tests API 50 CHB pour les souches à Gram positif. Le système Biolog permet d'analyser l'utilisation de 95 substrats carbonés différents et de donner sur cette base une identification provisoire des souches.

Tableau XIX. Caractères phénotypiques des souches sélectionnées et identification provisoire.

Bactéries	Forme	Gram	Spore (position)	Identification (Biolog)	Identification (API 50 CHB)
KYGT207	Bâtonnet court	-	-	<i>Salmonella subspecies</i> 1G (75 %)	nd
KYEGB2	Bâtonnet long	+	+(subterminale)	Pas d'identification	nd
KYT15	Bâtonnet long	+	+(subterminale)	Pas d'identification	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (97,7 %)

nd : non déterminé.

Le système API 50CHB est un test adapté aux bactéries à Gram positif. Il a permis d'identifier la souche KYT15 à l'espèce *Paenibacillus polymyxa* avec un degré de similitude relativement faible estimé à 97,7 % (Tableau XIX).

Même si l'analyse par le système Biolog permet de proposer une identification de la souche KYGT207 au genre *Salmonella*, ce n'est probablement pas une identification correcte, puisque le degré de similitude est relativement faible (75 %). De ce fait, nous pouvons avancer l'idée que l'ensemble de ces tests, qui reposent essentiellement sur les phénotypes, présente des limites et, par conséquent, ne peuvent pas constituer, à eux seuls, des moyens fiables d'identification des bactéries. En effet, ces méthodes classiques sont efficaces et performantes quand les bactéries appartiennent à des espèces bien connues et répertoriées. C'est le cas par exemple d'un grand nombre de microorganismes pathogènes. Dans d'autres cas, cette identification peut poser un certain nombre de problèmes notamment pour l'identification de quelques représentants de la famille des *Actinobacteria* et *Corynebacteria* (Grimes *et al.*, 1993 ; Kampfner *et al.*, 1993 ; Schofield et Schaal, 1981). Ils peuvent cependant être utilisés comme une première approche pour un regroupement des bactéries en vue d'une identification poussée par des techniques complémentaires et plus fiables telles que celles basées sur les caractères génotypiques.

L'ensemble des caractères phénotypiques et génotypiques mis en œuvre, constituent ce que l'école belge de taxonomie bactérienne appelle « l'approche polyphasique » (Vandamme *et al.*, 1996).

Tableau XX. Caractéristiques biochimiques des souches bactériennes KYGT207, KYEGB2 et KYT15.

Bactéries Substrats	KYT15	KYEGB2	KYGT207
α CYCLODEXTRIN			
DEXTRIN			
GLYCOGEN			
TWEEN 40			
TWEEN 80			
N-ACETYL-GLUCOSAMINE			
L-ARABINOSE			
D-ARABITOL			
CELLOBIOSE			
D-FRUCTOSE			
L-FUCOSE			
D-GALACTOSE			
GENTIOBIOSE			
α -D-GLUCOSE			
m-INOSITOL			
α -D-LACTOSE			
MALTOSE			
D-MANNITOL			
D-MANNOSE			
D-MELIBIOSE			

α -METHYL D-GLUCOSIDE			
D-PSICOSE			
D-RAFFINOSE			
L-RHAMNOSE			
D-SORBITOL			
SUCROSE			
D-TREHALOSE			
FURANOSE			
XYLITOL			
α -HYDROXYBUTYRIC ACID			
β -HYDROXYBUTYRIC ACID			
γ -HYDROXYBUTYRIC ACID			
p-HYDROXYPHENYL ACETIC ACID			
α -KETO GLUTARIC ACID			
α -KETO VALERIC ACID			
L-LACTIC ACID			
SUCCINIC ACID			
ALANINAMIDE			
D-ALANINE			
L-ALANINE			
L-ALANYL-GLYCINE			
L-ASPARAGINE			
L-GLUTAMIC ACID			
GLYCIL- L-GLUTAMIC ACID			
L-PYROGLUTAMIC ACID			
L-SERINE			
GLYCEROL			
INOSINE			
THYMIDINE			
URIDINE			
GLUCOSE-1-PHOSPHATE			
GLUCOSE-6-PHOSPHATE			
D-L- α -GLYCEROL-PHOSPHATE			
GRAM			
% de réponses positives	20,4	46,3	79,6

-  Réaction positive
 Réaction négative
 Réaction indéfinie (+/-)

La souche KYGT207, bactérie à Gram négatif, dégrade une large gamme de substances carbonées, qui représente près de 80 % des substances testées (Tableau XX). Ces substances carbonées sont très diversifiées puisqu'elles comprennent des substances de nature différente : des glucides simples, des polyosides, des acides organiques, des acides aminés et des bases puriques et pyrimidiques. Cette grande diversité métabolique de la souche KYGT207 peut constituer un élément important, puisqu'il laisse envisager une adaptation à une large gamme de source de carbone et d'énergie.

Les trois souches métabolisent le glucose, le galactose et le saccharose. La dégradation de cette dernière source de carbone pourrait s'expliquer par le fait que ces souches ont été isolées à partir de la rhizosphère du blé dur, végétal connu pour exsuder des quantités importantes de saccharose. Il faut également signaler que le milieu utilisé pour son isolement est à base de saccharose (RCV-saccharose), ce qui rend ce résultat assez logique.

Concernant les souches KYT15 et KYEGB2, la gamme des substrats carbonés métabolisés est nettement plus faible. Ces deux souches à Gram positif métabolisent respectivement 20 et 46 % des substrats testés. Nous rappelons que, malgré une activité métabolique plus réduite que celle de la souche KYGT207, les souches KYT15 et KYEGB2 ont été retenues à la fois pour leur production importante d'EPS, mais aussi pour le caractère rhéologique de leur EPS pouvant être déterminant dans l'agrégation des particules de sol, particulièrement leur viscosité et leur élasticité.

5.3. Identification moléculaire par étude phylogénétique du gène *rrs*.

L'identification des microorganismes par des méthodes reposant sur des caractères génotypiques, et notamment la détermination de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S (gène *rrs*), constitue aujourd'hui un moyen d'identification fiable et rapide.

Même si la détermination de la séquence du gène *rrs* est un moyen fiable d'identification des bactéries, il doit être complété par des hybridations ADN /ADN pour la description de nouvelles espèces et par l'analyse phénotypique qui reste indispensable pour la connaissance des propriétés physiologiques des bactéries. Le choix du gène *rrs* parmi les milliers d'autres gènes présents sur un chromosome bactérien est dicté par une considération théorique et une considération pratique. Le but étant de cibler un gène permettant de positionner phylogénétiquement une bactérie, le choix s'est porté sur un gène présent chez toutes les bactéries, n'ayant pas subi de trop nombreuses mutations au cours de l'évolution et pour lequel le transfert latéral est un événement rare. Le gène *rrs* répond à ces trois critères et en particulier alterne, dans sa séquence, des régions très conservées (en particulier au début et à la fin du gène) et des régions plus variables permettant de distinguer les genres voire les espèces bactériennes entre elles. D'un point de vue pratique, une fois le consensus établi au niveau international pour l'utilisation de ce gène *rrs* pour le positionnement phylogénétique des bactéries, nous disposons maintenant d'une base de dizaine de milliers de séquences *rrs* commune au niveau international et disponible en ligne sur internet.

Dans un premier temps, la séquence du gène *rrs* des trois souches sélectionnées a été positionnée dans un arbre phylogénétique.

5.3.1. *Positionnement phylogénétique des souches KYT15 et KYEGB2*

Les séquences partielles des gènes *rrs* des souches bactériennes KYT15 et KYEGB2 ont été alignées avec le logiciel CLUSTAL X. Les régions contenant des « Indel », régions avec des insertions ou des délétions créant des trous (« gaps »), ont été supprimées de l'analyse. Les distances génétiques entre paires de séquences ont été corrigées pour les substitutions multiples de base par la méthode de Jukes et Cantor (1969).

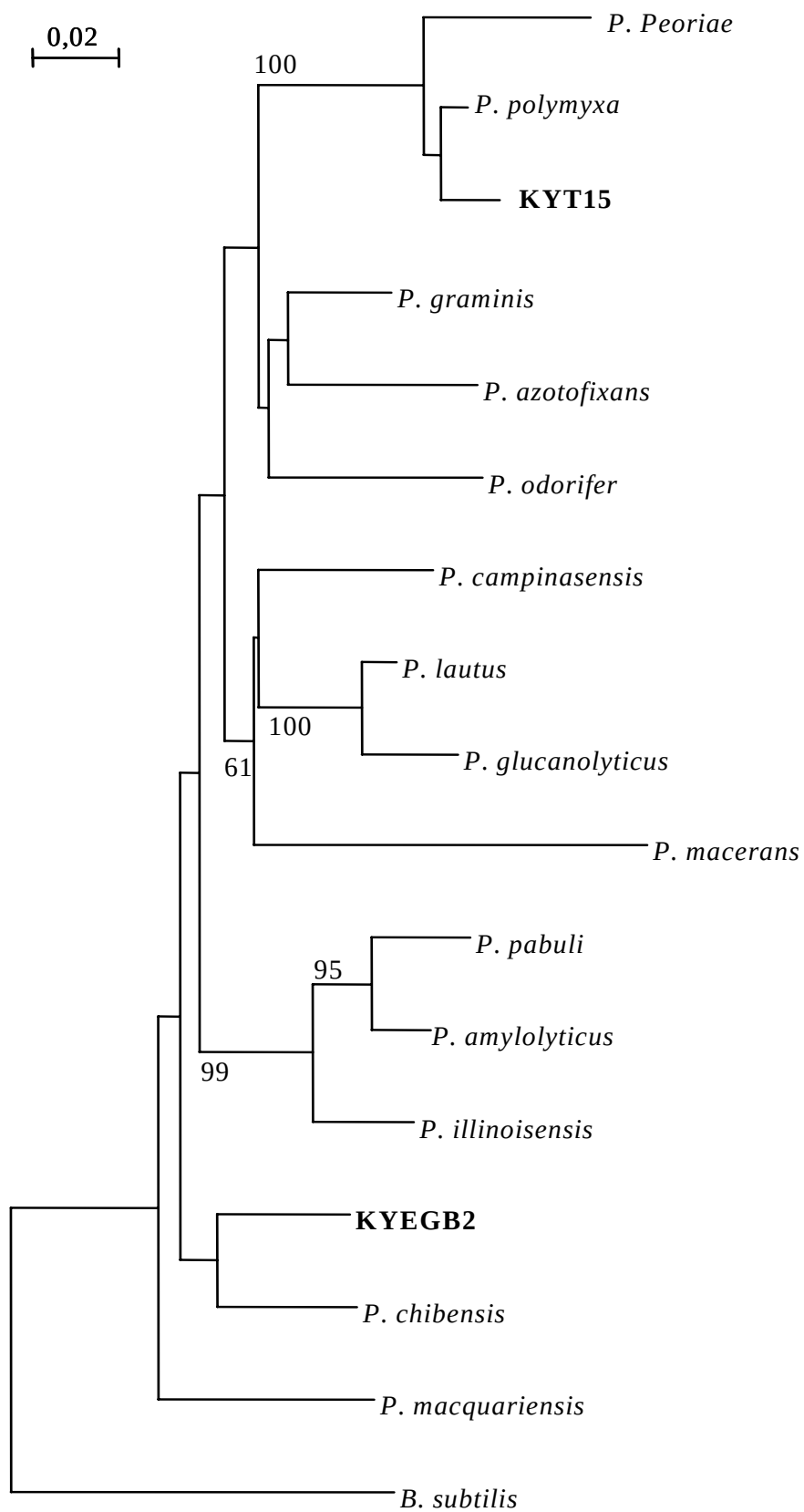


Figure 33. Arbre phylogénétique établi à partir des séquences *rrs*.

L'arbre phylogénétique est construit suivant la méthode de rapprochement des voisins « neighbor-joining » (Saitou et Nei, 1987). Une analyse par sous-échantillonnage de type « bootstrap » a été réalisée sur 1000 répétitions, afin de déterminer le niveau de confiance dans les topologies obtenues (Felsenstein, 1985). La représentation graphique de l'arbre est obtenue par le logiciel NJPlot.

L'analyse phylogénétique de la séquence partielle du gène *rrs* des souches KYT15 et KYEGB2 montre qu'elles appartiennent toutes les deux au genre *Paenibacillus* (Fig. 33).

La Figure 33 montre que la souche KYT15 est proche de l'espèce *Paenibacillus polymyxa* et forme une branche monophylétique avec cette dernière. Cette identification moléculaire est conforme à l'identification phénotypique obtenue avec le test API 50 CHB qui rapprochait la souche KYT15 de l'espèce *P. polymyxa*. Cette identification moléculaire semble cependant indiquer qu'il s'agit d'une espèce nouvelle que l'on nommera *Paenibacillus* sp. KYT15 du fait de la distance génétique vis à vis de l'espèce *P. polymyxa*.

Pour la souche KYEGB2, elle forme une branche monophylétique avec l'espèce *Paenibacillus chibensis*, tout en étant assez éloignée.

En conclusion, ces deux souches appartiennent avec certitude au genre *Paenibacillus*.

5.3.2. Positionnement phylogénétique de la souche KYGT207

L'analyse de la séquence partielle du gène *rrs* de la souche KYGT207 indique clairement que cette souche appartient au genre *Rhizobium* et en particulier à une branche monophylétique incluant la souche *Rhizobium* sp. YAS34 (Fig. 34). Les autres séquences correspondent à des souches identifiées de façon erronée à l'espèce *Rhizobium gallicum*. Il s'agit effectivement d'une erreur d'identification puisque la souche type de *R. gallicum* appartient à une branche monophylétique différente (Fig. 34). À la suite de ce positionnement, nous avons réalisé des comparaisons de la séquence partielle du gène *rrs* de nos souches par BLAST pour rechercher les espèces les plus proches de ces souches.

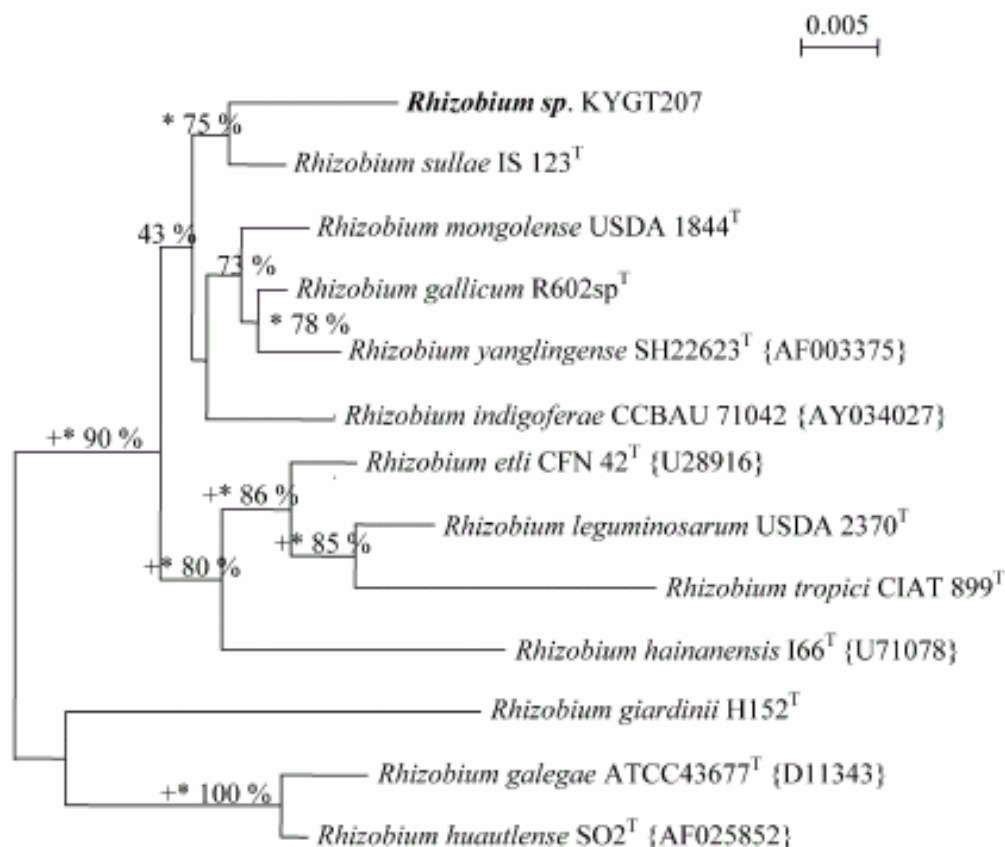


Figure 34. Positionnement de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 dans l'arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S (réalisé par R. Christen ; Annexe III). Les pourcentages sont déterminés par analyse Bionj avec 2 paramètres. Cette analyse a été effectuée après 1000 bootstraps. + après prob. max. * après analyse de parcimonie.

Tableau XXI. Comparaison des séquences du gène *rrs* par BLAST.

Bactérie	Espèce bactérienne la plus proche
KYGT207	<i>Rhizobium</i> sp. YAS34 (98 %)
KYGB2	<i>Paenibacillus</i> sp. (94%)
KYT15	<i>Paenibacillus</i> sp. (97,7%)

Sur la base de cette comparaison des séquences du gène *rrs*, nous confirmons qu'il n'est pas possible d'identifier la souche KYGB2 à une espèce connue. En effet, l'espèce la plus proche est *Paenibacillus pabuli* avec seulement 94 % de similitude (Tableau XXI). Cette identification au genre *Paenibacillus* est cohérente avec l'identification phénotypique (aspect des colonies, taille et forme des cellules ainsi que la présence d'une spore déformante en position subterminale).

C'est en 1993 que Ash et ses collaborateurs ont reclassé 10 espèces du groupe 3, appartenant au genre *Bacillus* dans un nouveau genre appelé *Paenibacillus*. Le genre *Paenibacillus* appartient actuellement à la famille des *Paenibacillaceae*, l'ordre de *Bacillales* et la classe des *Bacilli*.

Cette souche sera donc nommée *Paenibacillus* sp. KYEGB2, dans la suite de ce travail.

6. Discussion

Au sein de l'ensemble des populations bactériennes cultivables, présentes dans la rhizosphère du blé dur cultivé dans différents sols provenant de régions appartenant à des étages bioclimatiques très contrastés, les populations bactériennes productrices d'EPS sont dominantes. Cette dominance est également vraie dans les régions subissant les conditions pédoclimatiques les plus extrêmes (régions du sud algérien).

Dans des régions particulières (zones semi-arides, arides ou même sahariennes), il existerait un potentiel bactérien dit « latent », qui se manifeste de manière intense, dès que les conditions environnementales deviennent favorables, comme c'est le cas par exemple, lors de la mise en culture de ces sols.

Généralement dans les sols rhizosphériques du sud algérien, comme la station de Gassi Touil, le nombre de « bactéries mésophiles totales » passe de 10^5 UFC.g⁻¹ de sol sec pour un sol nu, à 10^8 UFC.g⁻¹ de sol rhizosphérique sec pour un sol cultivé en blé dur (au stade montaison). À ce stade phénologique, la culture de blé dur engendre une amplification des populations bactériennes de l'ordre de 10^3 . Cet écart est relativement important par rapport à celui qui a été observé dans les régions du nord, comme la station expérimentale de l'ITGC où nous avons observé un effet rhizosphérique d'un facteur 100 (rapport entre la taille des populations dans la rhizosphère et celle dans le sol nu). Cette situation s'explique par le fait que les microorganismes rhizosphériques profitent des exsudats racinaires et colonisent les racines des plantes (Azcon et Ocampo, 1981 ; Goddard *et al.*, 2001).

Cet effet de la culture du blé dur sur les populations bactériennes du sol est très important, par comparaison avec ceux qui ont été décrits dans la littérature et qui révèlent des valeurs qui se situent entre 30 et 50, pour des sols beaucoup plus fertiles et mieux structurés (Gochnauer *et al.*, 1989 ; Lynch et Wipps., 1990). L'importance de l'amplitude de l'effet rhizosphérique dans les sols arides, traduit parfaitement le contraste important qui existe entre le sol nu et la rhizosphère du blé dur.

Aussi, cet effet rhizosphérique ou « facteur amplificateur » des populations bactériennes rhizosphériques montre à quel point, la culture du blé dur dans ces régions constitue un processus, qui peut permettre, à moyen ou long terme, la manifestation d'activités microbiennes diversifiées, capables d'insuffler une dynamique de minéralisation, de structuration et par conséquent de fertilisation des sols.

La plante peut ainsi constituer un « starter » pour les populations microbiennes endémiques, en mettant en place des « relations » qui peuvent être d'ordre trophique ou alors relevant de ce que l'on appelle le « quorum-sensing », basé sur la production de molécules

dites « signal » et qui représente un système de communication impliqué dans un mode de régulation de l'expression génétique au sein des populations bactériennes.

De plus, l'action physique du végétal sur le sol, à travers son système racinaire jouant le rôle d'une pompe créant ainsi des situations d'alternance « humidification/dessèchement », consolide davantage la structure du sol, améliorant aussi ses propriétés physiques.

De ce fait, même si les rendements en blé dur sont très faibles dans ces régions arides (autour de 10 quintaux/ha), cette pratique culturale demeure cependant intéressante pour la mise en valeur de ces sols, à condition de sélectionner des cultivars de blé dur sur la base d'une rhizodéposition importante.

D'autre part des observations sur le terrain montrent que les racines de blé dur dans les régions semi-arides ou arides sont entourées d'une importante gaine mucilagineuse, sur laquelle viennent s'adsorber des particules de sable. Il semblerait que ces polymères soient produits par la plante, mais il n'est pas exclu que les bactéries productrices d'EPS aient également une contribution importante dans l'interaction avec les constituants du sol.

Sur les racines de blé dur provenant d'autres régions (Tiarret, Ain Defla, Naama et Oran), nous avons noté la présence d'une gaine de mucilage beaucoup moins importante. Cela nous incite à penser que dans les régions arides, l'interaction entre la rhizodéposition et les activités bactériennes est probablement très importante. La nature et la concentration des molécules constituant les exsudats racinaires sont deux paramètres difficilement accessibles, et qui varient selon les espèces, les cultivars, et le stade phénologique du blé dur.

La fragilité des sols des régions semi-arides, arides et sahariennes liées à une texture meuble et une structure particulière, oblige des pratiques culturales particulières. En effet, l'agriculture traditionnelle est caractérisée par une absence de mécanisation faisant apparaître un travail superficiel des sols pour éviter leur déstructuration. D'autre part, le coût élevé des engrais chimiques, pousse les agriculteurs à utiliser des doses minimales, parfois même quand l'azote constitue un facteur limitant la production de blé dur. Les avantages de telles pratiques peuvent être non seulement d'ordre physique et chimique (préservation de la structure des sols, meilleure rétention d'eau et de cations échangeables, protection des eaux souterraines contre une éventuelle pollution chimique...), mais aussi biologique et particulièrement microbiologique. Ainsi, la diminution de la fréquence des labours entraîne une augmentation de la diversité microbienne, du fait de l'accumulation de la matière organique (Hassink *et al.*, 1991 ; Wander *et al.*, 1995). Par ailleurs, d'autres études ont montré une diminution de la diversité microbienne pendant la période de moissons, phase pendant laquelle la teneur en matière organique est au plus bas niveau (Zelles *et al.*, 1992).

En dépit de leur forte abondance, les bactéries sont localisées dans la porosité et occupent un volume ne représentant que 0,2 à 0,4 % du volume poral du sol (Paul et Clark, 1989). Il apparaît donc que l'espace ne constitue pas un facteur limitant, mais ce dernier reste à chercher dans l'équilibre biologique du sol, très fortement affecté par les exsudats racinaires et les nombreuses interactions qui régissent la rhizosphère.

Le nombre important de bactéries mésophiles totales et de bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur n'est pas surprenant. En effet, l'existence d'une corrélation positive entre la teneur en carbone total hydrosoluble et la taille des populations bactériennes, dans la

rhizosphère du blé a été mentionnée par Semenov *et al.* (1999) ; ils observent une plus grande concentration de ces bactéries au voisinage immédiat de la racine.

Les bilans relatifs aux flux de carbone dans la rhizosphère sont très controversés. C'est ainsi que Whipps et Lynch (1986) ont montré, en utilisant un isotope radioactif du C ($^{14}\text{CO}_2$), que 10 à 40 % des produits de la photosynthèse fixés par les graminées passent des racines à la rhizosphère. Plus récemment, une évaluation du flux de carbone dans la rhizosphère du blé tendre (*Triticum aestivum*), réalisée par Dilkes *et al.* (2004), montre que 3 % seulement du carbone apporté sous forme de $^{14}\text{CO}_2$, se retrouve exsudé par le blé.

Au-delà des différences dans l'estimation des bilans de carbone dans la rhizosphère, c'est la continuité du phénomène d'« exsudation racinaire » qui nous paraît plus important, puisqu'il situe la plante comme étant un « réacteur biologique » pourvoyeur de nutriments pour les populations microbiennes rhizosphériques hétérotrophes, particulièrement durant les premiers stades phénologiques, principalement le pré-tallage, le tallage et la montaison. Cette remarque est confortée par une persistance éphémère des produits de l'exsudation racinaire dans le sol. À titre d'exemple, le temps de demi-vie du glucose et du glutamate dans un sol limono-sableux est de l'ordre de la journée.

Elle est estimée entre 0,6 et 1,1 j pour le glucose et 0,46 à 0,75 j pour le glutamate. De manière générale, les acides aminés présentent une demi-vie très courte, évaluée entre 0,3 à 3j pour un sol argileux, alors que pour un sol sableux elle est de 2,5 j (Swindoll *et al.*, 1988a).

Les EPS bactériens sont rarement utilisés par les bactéries qui les produisent. Dans le sol, ils sont cependant soumis à l'action de nombreuses activités microbiennes, capable de les dégrader. C'est ainsi que le temps de demi-vie d'un EPS produit par une souche *Rhizobium* sp. YAS34, taxonomiquement proche de la souche KYGT207, a été évalué à environ un mois (Cohen *et al.*, 2004).

Il apparaît donc que la persistance des exsudats racinaires dans la rhizosphère dépend directement de la taille des populations bactériennes, de leur diversité et de leur activité. Les populations bactériennes ainsi sélectionnées par le végétal ont des activités métaboliques diversifiées et probablement indispensables à la modification de l'environnement physique et chimique de la plante (fertilité du sol).

Dans le sol, la production d'EPS peut être évaluée de façon indirecte par la détermination de la taille des populations bactériennes productrices d'EPS. Cette dernière peut cependant être modulée par un certain nombre de facteurs abiotiques, dont les plus importants sont de nature climatique et/ou édaphique. Parmi les nombreuses activités microbiennes impliquées dans les interactions avec le sol et la plante, et comme indiqué plus haut, nous avons retenu celle qui consiste, pour une bactérie, à produire des EPS, en particulier en raison des modifications des caractéristiques physiques du sol, induites par ces bactéries. Les propriétés physiques du sol sont déterminantes, non seulement dans la dynamique de l'eau et de l'air, mais aussi dans la capacité de rétention des éléments minéraux dans le sol et par conséquent leur transfert vers la plante.

Dans le domaine agronomique, l'intérêt porté aux EPS bactériens commença dans les années 1940, avec les travaux de Geoghegan et Brian (1946 ; 1948) qui ont été les premiers à utiliser des dextranes et des lévanes (EPS bactériens), pour améliorer la structure du sol et ses

propriétés hydriques. D'autre part, les EPS bactériens sont impliqués dans les interactions plante-bactéries. C'est le cas par exemple du genre *Azospirillum*, producteur d'EPS et qui présente aussi un effet promoteur de croissance racinaire (Skvortsov et Ignatov, 1998). Certaines de ces bactéries productrices d'EPS ont aussi un effet de promotion de croissance racinaire, englobé sous le terme « PGPR » (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Alami *et al.*, 2000).

Dans cette association, le végétal offre une surface d'échange racinaire plus importante, qui contribue à l'augmentation de l'exsudation racinaire et de l'absorption des éléments minéraux. Cette situation permet le maintien de cette population bactérienne (PGPR) dans la rhizosphère, ainsi qu'une meilleure nutrition minérale de la plante, pouvant se traduire par des rendements plus importants.

Les bactéries productrices d'EPS sont maintenant connues pour leur contribution active dans la cohésion des éléments constitutifs du sol et par voie de conséquence pour leur implication dans les échanges entre la plante et le sol (Amellal *et al.*, 1998 ; Alami *et al.*, 2000). Ces interactions bénéfiques peuvent effectivement se traduire par une amélioration de la nutrition et par conséquent de la croissance des plantes (Alami *et al.*, 2000).

L'action combinée de ces deux phénomènes « structuration du sol rhizosphérique » et « effet PGPR » constitue un élément essentiel pour le maintien de la fertilité des sols.

De façon générale, le dénombrement des populations bactériennes rhizosphériques du blé dur, particulièrement celle qui est capable de produire des EPS, correspond ainsi à une « image instantanée » d'une situation biologique. Celle-ci résulte d'une succession d'événements biotiques et abiotiques, parfois même très anciens dans l'historique de l'interface plante/sol/micro-organismes.

Suivant les situations ou les systèmes étudiés, la diversité bactérienne peut être très importante ou au contraire très réduite. Le niveau de diversité n'est pas aléatoire, il s'ajuste sans cesse à l'environnement. Il est vraisemblable que cet ajustement fasse l'objet de régulations sous l'effet du milieu, à différents niveaux, allant de la cellule à l'écosystème en passant par les populations.

Par ailleurs, dans toutes les stations étudiées, nous avons relevé une grande diversité métabolique des bactéries productrices d'EPS et particulièrement les bactéries à Gram-. La large gamme de substrats carbonés utilisée par ces bactéries laisse entrevoir des capacités d'adaptation importantes. Dans les sols sahariens, ces bactéries productrices d'EPS peuvent être des candidates potentielles à l'inoculation, puisqu'en plus de leur diversité métabolique, elles sont caractérisées par leur tolérance à la dessiccation et à la chaleur.

Concernant la caractérisation des souches productrices d'EPS sélectionnées et, conformément à leur positionnement sur les arbres phylogénétiques, les souches KYT15 et KYEGB2 appartiennent bien au genre *Paenibacillus* (Tableau IX), sans pour autant les rapprocher d'une espèce décrite. Elles seront nommées dans la suite de ce travail *Paenibacillus* sp. KYT15 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2.

La présence du genre *Paenibacillus* dans la rhizosphère du blé dur, même à un niveau relativement élevé n'a pas été une surprise, puisque plusieurs auteurs ont décrit des

représentants de ce genre, isolés à partir de la rhizosphère du blé (Gouzou *et al.*, 1993 ; Amellal *et al.*, 1998 ; Guemmouri-Athmani *et al.*, 2000 ; Germida *et al.*, 1998). Ces derniers auteurs ont isolé au niveau du rhizoplan du blé tendre (*Triticum aestivum*) près de 159 souches bactériennes. Celles-ci sont principalement représentées par les genres *Bacillus* (29 % des isolats), *Flavobacterium*, *Micrococcus* (20 %). Dans ce travail, le genre *Rhizobium* n'a pas été décrit dans la rhizosphère du blé, alors que le genre *Agrobacterium* était présent avec une très faible fréquence (1 %).

Par ailleurs, dans un travail antérieur portant sur la fixation biologique de l'azote moléculaire associée au blé dur, nous avons déjà isolé et caractérisé des souches bactériennes fixatrices libres appartenant aux genres *Bacillus* et *Azospirillum* dans la région de Tiaret (Kaci, 1988).

Concernant la souche bactérienne KYGT207, elle appartient avec certitude au genre *Rhizobium* et représente très probablement une nouvelle espèce de *Rhizobium* incluant la souche YAS34 isolée de la rhizosphère du tournesol pour sa production d'EPS (Alami *et al.*, 2000). Cette nouvelle espèce sera décrite en collaboration avec le LEMiRE (CEA, Cadarache). Nous rappelons qu'en utilisant le système Biolog (identification phénotypique), la souche KYGT207 a été rapprochée du genre *Salmonella*. Ces résultats nous permettent de dire que si le système Biolog peut constituer un élément d'approche global de l'identification bactérienne, il ne peut cependant en aucun cas constituer le seul outil d'identification, sur la base de l'utilisation de 95 substrats carbonés. Nous rappellerons que l'identification phénotypique (Biolog) de la souche de *Rhizobium sp.* YAS34 à *Pantoea agglomerans*, confirme le problème d'identification phénotypique des *Rhizobium* en utilisant le système Biolog (Alami *et al.*, 2000).

Ce genre bactérien a longtemps été décrit dans des associations symbiotiques avec des légumineuses. Les espèces appartenant à ce genre sont dites diazotrophes et considérées comme les plus étroitement liées aux plantes supérieures. Elles auraient vraisemblablement co-évolué avec les légumineuses, en raison de la forte spécificité qui existe entre le microsymbiote : le *Rhizobium* et le macrosymbiote : la légumineuse. En effet, un échange de signaux s'établit entre les deux partenaires, se traduisant par la pénétration du *Rhizobium* dans la racine de la plante-hôte avec formation d'un nodule. Cet échange est possible quand le micro et le macro-symbiote sont compatibles (Brewin, 1991 ; Franssen *et al.*, 1992).

Les toutes premières études abordaient essentiellement des aspects physiologiques des systèmes symbiotiques. C'est ainsi que les phénomènes de nodulation avec la fixation d'azote des associations symbiotiques « *Rhizobium*-légumineuse » ont constitué un pôle d'intérêt particulier dans le monde de la recherche, notamment pour l'identification des espèces de *Rhizobium* par le biais des tests de nodulation basés sur la reconnaissance spécifique de la plante et matérialisée par l'apparition de nodosités racinaires (Pieterneel et Vanderleyden, 1995).

Ces études ont, par la suite, été étendues aux polysaccharides extracellulaires, considérés comme médiateurs chimiques dans les premières phases du phénomène de nodulation, essentiellement lors de la reconnaissance du partenaire végétal.

L'importance des travaux consacrés à la symbiose *Rhizobium*-légumineuse peut laisser penser, à tort, que ce genre bactérien ne se retrouve que dans des sols dont le précédent cultural a vu des légumineuses spontanées ou cultivées. L'effet de la plante non-hôte sur les populations de *Rhizobium*, de même que le rôle bénéfique potentiel de ces bactéries du sol et de la rhizosphère sur les plantes non-hôtes sont relativement peu étudiés. Le résultat que nous exposons ici confirme, si cela était nécessaire, que ce genre bactérien peut être considéré comme ubiquiste, puisque *Rhizobium sp.* KYGT207 a été isolé de la région de Gassi Touil, sur des parcelles de blé dur, n'ayant jamais été cultivées avec des légumineuses.

L'isolement de bactéries appartenant au genre *Rhizobium* à partir de la rhizosphère du blé dur n'est cependant pas nouveau dans les sols où la culture en rotation est pratiquée (Hilali, 2001). Ce qui, par contre, nous paraît exceptionnel dans notre cas, c'est l'isolement de la souche *Rhizobium sp.* KYGT207 à Gassi Touil (région saharienne), dans des sols cultivés en blé dur (monoculture) depuis seulement une trentaine d'années.

D'autre part, la souche *Rhizobium sp.* KYGT207 a été isolée directement à partir de la rhizosphère du blé dur, contrairement à la majorité des *Rhizobium* mentionnées dans les bases de données et qui sont isolées à partir de nodosités de légumineuses. Cette remarque nous paraît intéressante puisqu'elle pourrait expliquer la distance génétique entre *Rhizobium sp.* KYGT207 et les autres *Rhizobium*.

Le genre *Pseudomonas* reste le genre bactérien le plus cité dans la littérature concernant la rhizosphère de nombreuses plantes et en particulier celle du blé. Ce genre est surtout connu pour les métabolites secondaires. Certaines souches synthétisent un composé phénolique : le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) qui agit comme fongicide, bactéricide mais aussi contre les helminthes (Haas et Keel, 2003 ; Keel *et al.*, 1992 ; Keel et Défago, 1997 ; Thomashow et Weller, 1995, Bankhead *et al.*, 2004). D'autres molécules peuvent être impliquées dans cette action antibiotique et préserver les cultures de blé contre des agents pathogènes (Morello *et al.*, 2004). Dans notre travail, nous n'avons pas caractérisé l'ensemble des isolats et il n'est de ce fait pas exclu que ce genre bactérien soit présent dans la rhizosphère du blé dur.

Au terme de ce chapitre, nous pouvons dire que l'archétype des bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur est une bactérie Gram-, mobile, produisant un EPS sur saccharose, et appartenant au genre *Rhizobium*.

Par ailleurs, il nous semble impératif et urgent de mener une stratégie de conservation des milieux extrêmes (cas des régions sahariennes) pour caractériser et préserver la diversité microbienne. Ces régions particulières peuvent ainsi constituer des réservoirs de diversité microbienne non encore exploités.

Dans les systèmes agraires, elle pourra permettre le maintien de la fertilité et renforcer le rôle auto-épurateur des sols, stratégie alternative aux effets indésirables des intrants chimiques.

7. Conclusion

Nous retiendrons, au terme de cette étude, que les bactéries productrices d'ESP isolées à partir de la rhizosphère du blé dur présentent des différences métaboliques importantes, ce qui confirme la diversité de ces populations bactériennes.

Si l'on considère les deux grands groupes de bactéries productrices d'EPS définis par rapport au Gram enzymatique, nous constatons que les souches à Gram- présentent des activités métaboliques plus diversifiées que celles des bactéries à Gram+. Elles touchent aussi bien l'utilisation de glucides, de polymères, d'acides organiques ou aminés comme seule source de carbone. Cette remarque laisse entrevoir des applications agronomiques très intéressantes pour les bactéries à Gram-, puisqu'elles pourraient coloniser des environnements très variés grâce à leur diversité métabolique.

Sur la base d'un ensemble de 125 souches productrices d'EPS isolées de la rhizosphère du blé dur (racines et sol adhérent) mis en culture dans 13 sols algériens, il apparaît que ces bactéries productrices d'EPS sont plus fortement stimulées dans la rhizosphère du blé et en particulier à la surface des racines, quel que soit le site étudié. De plus, ces souches sont en majorité des bactéries à Gram négatif, à croissance rapide et possèdent une aptitude à produire de grandes quantités d'EPS à partir du saccharose. Il existe une grande diversité phénotypique et génotypique dans ces populations productrices d'EPS.

À partir de critères qualitatifs et quantitatifs liés à la production d'EPS, trois souches ont été sélectionnées pour la suite de ce travail (*Paenibacillus* sp. KYEGB2, *Paenibacillus* sp. KYT15 et *Rhizobium* sp. KYGT207), à la fois pour approfondir la structure et les propriétés rhéologiques de leur EPS (Chapitre II), l'impact de ces EPS sur les propriétés du sol (Chapitre III) et l'impact de l'inoculation de ces bactéries sur la croissance du blé dur (Chapitre IV).

Chapitre II

Production, structure et propriétés rhéologiques des exopolysaccharides synthétisés par *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207

1. Production des EPS bactériens

1.1. Introduction

La production des exopolysaccharides (EPS) bactériens dépend étroitement des conditions de culture comme la température, le pH, la pression partielle en oxygène (Williams et Wimpenny, 1977 ; Graber *et al.*, 1988 ; Congregado *et al.*, 1985 ; Manresa *et al.*, 1987), la nature du substrat carboné et sa concentration, et surtout le rapport C/N (Graber *et al.*, 1988 ; Congregado *et al.*, 1985).

Dans cette partie de l'étude, nous avons retenu 2 souches bactériennes productrices d'EPS. Il s'agit de *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207. Ces deux souches ont été isolées de la rhizosphère du blé dur respectivement dans la région de Gassi Touil et d'El Goléa, à partir de la rhizosphère du blé dur et produisent des quantités importantes de polysaccharides.

1.2. Influence de la nature de la source de carbone

Une étude préliminaire sur la production des EPS par les deux souches bactériennes sélectionnées (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207) a permis de montrer que la production des EPS sur milieu gélosé est nettement plus importante que celle obtenue sur un milieu liquide.

Dans cette étude, nous avons voulu évaluer l'influence de trois substrats carbonés : glucose, saccharose et mannitol sur la production d'EPS des deux souches retenues : *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207.

1.2.1. Choix des substrats carbonés

La problématique que nous abordons dans cette étude se situe sur un plan écologique. Il est de ce fait important de rapporter le choix des substrats carbonés testés à la nature des sources de carbone, fréquemment retrouvées dans la rhizosphère du blé dur.

De nombreuses graminées libèrent dans leur rhizosphère des molécules de faible poids moléculaire très diverses, entretenant ainsi la croissance de populations microbiennes dites « adaptées ». Le glucose représente le glucide le plus fréquent, il provient soit directement de la plante par exsudation racinaire, soit de l'hydrolyse de polysaccharides, présents dans la rhizosphère (Derrien *et al.*, 2004).

Les glucides utilisés dans cette expérience sont le glucose, le saccharose et le mannitol, respectivement un monosaccharide, un disaccharide et un polyol. Ils ont été choisis sur la base des différences de métabolisme induit et surtout de leur présence, décrite dans la rhizosphère du blé.

Dans cet environnement particulier, siège de nombreuses réactions chimiques, le végétal, les bactéries ainsi que le sol, sont mis à contribution. Le saccharose, dans ces conditions, a une durée de vie limitée, du fait de la présence de l'enzyme (saccharase ou invertase) qui catalyse son hydrolyse en glucose et fructose, pouvant être produite par les plantes et par les microorganismes dans la rhizosphère.

Des travaux comme ceux de Jaeger *et al.* (1999) ont permis de montrer, en utilisant des senseurs bactériens (*Erwinia herbicola* 293R-sucr), que le saccharose et le fructose étaient présents à des teneurs élevées.

Des résultats préliminaires, relatifs à l'influence des substrats carbonés sur la production d'EPS en milieu solide, sont présentés (Tableau XXII). Ils indiquent que les deux souches étudiées utilisent les 3 substrats carbonés (glucose, mannitol et saccharose) comme seule source de carbone et d'énergie. Nous notons aussi, après seulement 5 jours d'incubation à 30 °C, une forte production sur milieu RCV additionné de saccharose ou de mannitol. Cette évaluation repose sur l'aspect muqueux des colonies ainsi que le volume de moût bactérien produit pendant cette durée d'incubation.

Tableau XXII. Effet de la nature des substrats carbonés sur la production d'EPS (RCV solide)

Bactérie	Substrat carboné		
	Glucose	Saccharose	Mannitol
<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2	++	+++	++
<i>Rhizobium</i> sp. KYGT207	++	+++	+++

L'évaluation de la production d'EPS est déterminée par observation des colonies muqueuses.

Les substrats carbonés sont apportés à une concentration de 20 g.l⁻¹

Dans cette expérience, parmi les trois substrats carbonés étudiés, le glucose est le glucide qui induit le plus faible niveau de production d'EPS, même si elle reste à un niveau important.

Nous retiendrons aussi que le saccharose constitue la source de carbone la plus intéressante à utiliser, puisqu'elle induit une meilleure production d'EPS chez les deux souches bactériennes.

1.2.2. Effet des 3 substrats carbonés

Nous avons testé dans ce cas, les 3 sources de carbone (glucose, saccharose et mannitol) en milieu RCV-liquide, à une concentration de 20 g.l⁻¹. Nous avons tenu à comparer les

productions d'EPS au 5^{ème} jour d'incubation, puisque les maxima ont été relevés à cette date (Fig. 35).

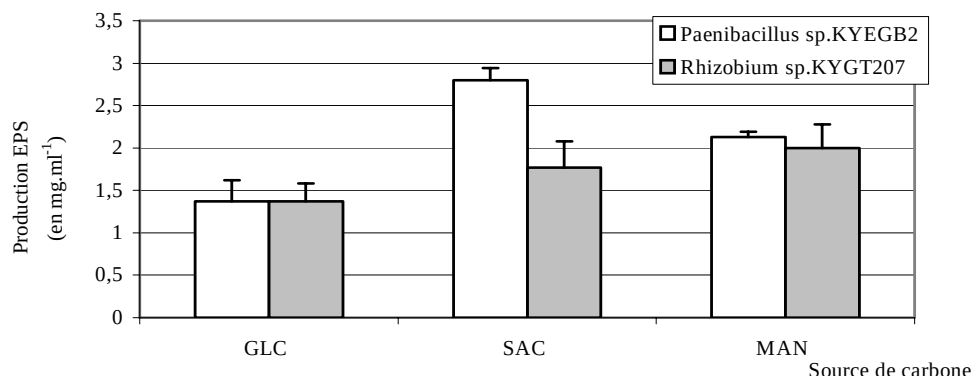


Figure 35. Effet de 3 sources de carbone (glucose, saccharose et mannitol) sur la production d'EPS, après 5 jours d'incubation sur milieu RCV liquide.

Les concentrations initiales en sucres sont de 20 g.l⁻¹.

Nous pouvons noter que, quelque soit la souche utilisée, le glucose est le glucide qui induit la plus faible production d'EPS (1,3 g.l⁻¹) (Fig. 35).

Par contre, les deux souches *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGBB2 se comportent différemment en fonction de la source de carbone utilisée. C'est ainsi que le saccharose permet la production d'EPS la plus élevée en présence de *Paenibacillus* sp. KYEGB2 avec une teneur de (2,8 g EPS.l⁻¹), alors que *Rhizobium* sp. KYGT207 ne présente aucune différence significative de production d'EPS à partir de saccharose et de mannitol. Pour cette bactérie, le niveau moyen de production d'EPS est d'environ 1,7 g EPS.l⁻¹.

Cela peut paraître en contradiction avec ce qui est rapporté dans la littérature, puisqu'il est admis que le genre *Rhizobium* prolifère et produit des EPS préférentiellement sur des milieux à base de mannitol. Cependant, pour cette souche bactérienne en particulier, il n'est pas surprenant qu'elle produise des EPS en utilisant différents substrats, puisque sa diversité métabolique a déjà été relevée dans le chapitre précédent. De plus, la plupart des travaux consacrés aux Rhizobia, présente une optique étroitement liée à la plante hôte : la légumineuse. Dans la presque totalité des cas, ces bactéries sont isolées à partir de nodosités et représentent par conséquent des populations particulières, induisant la formation de nodules chez les légumineuses. De ce fait, la prospection de ces bactéries dans des rhizosphères diversifiées s'en trouve réduite, ce qui limite considérablement la connaissance de ce genre bactérien.

Enfin, la production élevée d'EPS par les souches *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207 est le résultat de l'effet cumulé du carbone et de l'azote dans le milieu de culture, qui se traduit par un rapport C/N élevé. Dans toutes nos expériences, le rapport C/N a été fixé autour de 200, après de nombreuses expériences préliminaires. Cette valeur est moyenne, car les chiffres relatifs au rapport C/N, rapportés dans la littérature sont

controversés et dépendent à la fois de la nature des glucides mais aussi des bactéries utilisées. Ainsi, Congregado et ses collaborateurs (1985), travaillant sur des souches de *Pseudomonas*, montraient qu'un rapport C/N=40 pouvait conduire à une production optimale, alors que les données précédentes donnaient des valeurs de ce rapport bien plus élevées, atteignant jusqu'à 500 (William et Wimpenny, 1977).

1.3. Effet des conditions de milieu (RCV-liquide et solide)

Nous avons évoqué dans les chapitres précédents les contraintes mises en jeu dans le cas de l'utilisation de certaines molécules (particulièrement saccharose et mannitol) à des concentrations élevées. Dans cette partie, nous avons voulu évaluer l'impact des conditions de culture (milieu liquide et milieu solide) sur la production d'EPS (Fig. 36). Les différences de production des deux souches bactériennes au 5^{ème} jour d'incubation entre milieu liquide et solide sont toutes significatives.

La production d'EPS par les deux souches bactériennes, quelque soit la source de carbone (saccharose, glucose et mannitol) est nettement supérieure sur milieu gélosé (RCV-solide) que sur milieu liquide (RCV-liquide).

Sur milieu solide, nous ne notons pas de différence significative entre la production d'EPS à partir de mannitol ou de saccharose pour les deux souches étudiées. Les niveaux de production d'EPS sur ces deux substrats carbonés atteignent des valeurs élevées, estimées à environ 15 g.l⁻¹ de milieu. En revanche, en présence de glucose la production d'EPS est nettement plus faible (vs saccharose et mannitol) mais nettement supérieure à celle obtenue en milieu liquide avec le même substrat (Fig. 36).

En milieu liquide, nous observons la même tendance en présence des substrats carbonés. Même si les niveaux de production d'EPS sont très inférieurs à ceux obtenus sur milieu solide, la production en présence de saccharose et de mannitol, est nettement supérieure à celle permise avec le glucose.

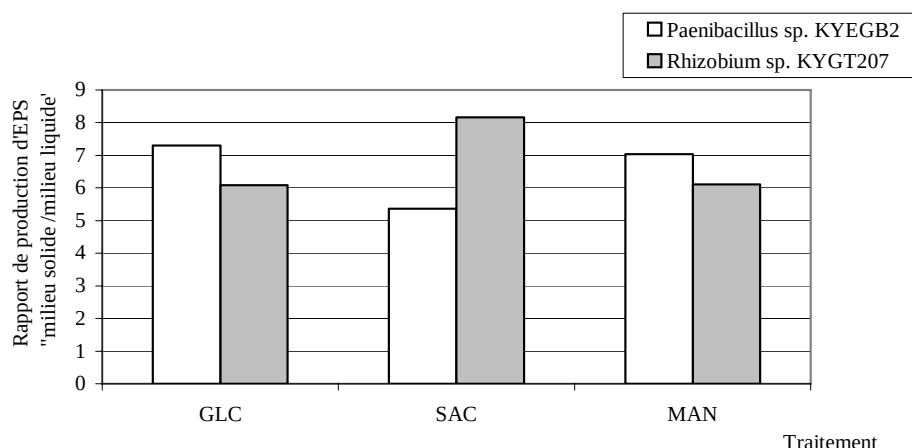


Figure 37. Effet de la nature du substrat carboné et de la nature du milieu de culture (milieu solide et milieu liquide) sur la production d'EPS, au 5^{ème} jour d'incubation de *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207.

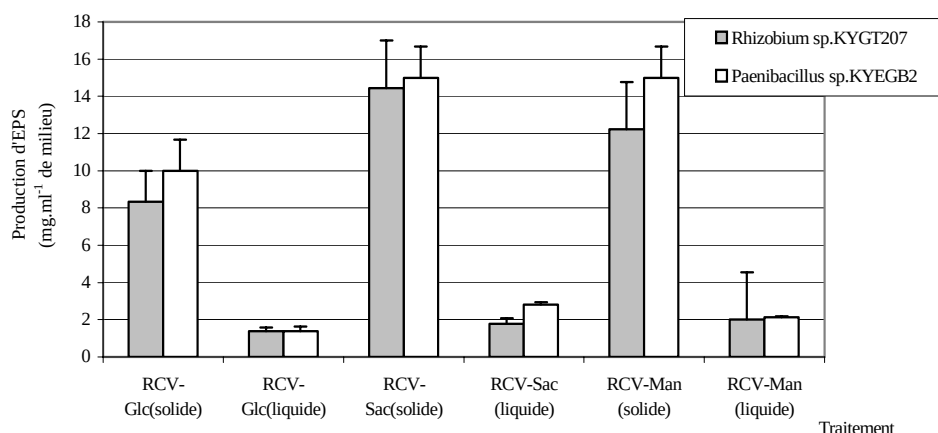


Figure 36. Effet des conditions de culture (milieu RCV-solide et RCV-liquide) sur la production d'EPS des 2 souches bactériennes (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207), en présence de différents substrats carbonés (Glc, Sac et Man.).

L'analyse des rapports de production d'EPS sur milieu gélosé et liquide, par substrat carboné et par souche, montre qu'ils sont compris entre 5 et 8 (Fig. 37). Ces valeurs élevées traduisent une meilleure production sur milieu solide pour les 2 souches étudiées *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2. Ces deux valeurs extrêmes (ratios 5 et 8) sont observées avec le saccharose, soulignant qu'en présence de ce substrat, la production d'EPS par *Rhizobium* sp. KYGT207 est plus fortement stimulée sur milieu solide que *Paenibacillus* sp. KYEGB2.

1.4. Cinétique de production des EPS (RCV-liquide)

Nous avons étudié la production d'EPS des deux souches bactériennes (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207), cultivées en milieu RCV-liquide avec du saccharose (20 g.l⁻¹) comme seule source de carbone, à 30 °C pendant 10 jours.

Lors de la réalisation de cette expérience, nous avons constaté qu'à partir du troisième jour d'incubation, les deux souches bactériennes produisaient des quantités importantes d'EPS, rendant ainsi le milieu de culture très visqueux. Cela nous a conduit à diluer les prélèvements pour en faciliter la séparation par centrifugation des cellules bactériennes et des polysaccharides.

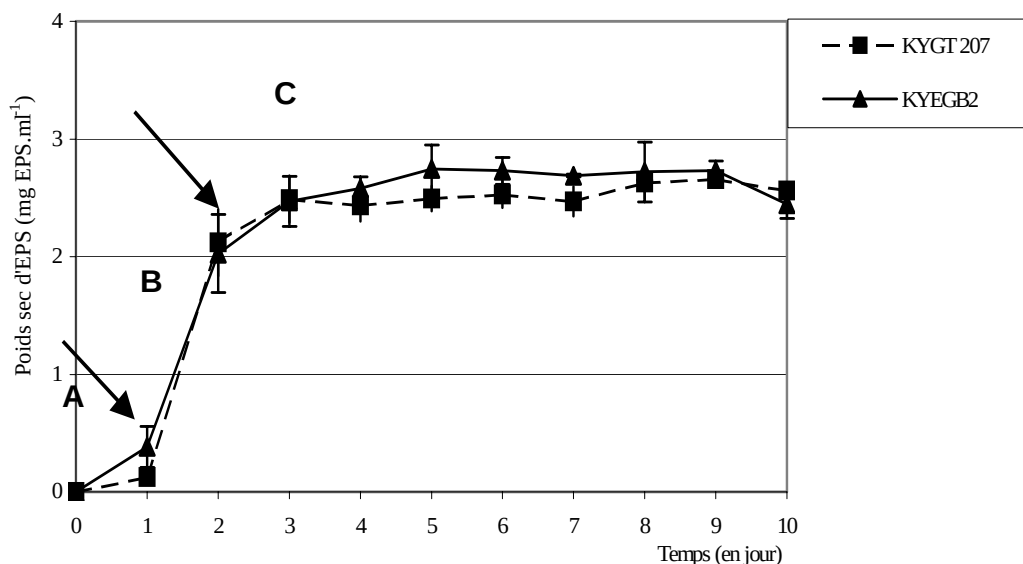


Figure 38. Cinétique de production d'EPS des souches bactériennes *Paenibacillus* sp., KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207.

La production en milieu liquide (RCV-Saccharose, 20 g.l⁻¹) est exprimée en mg de poids sec d'EPS.ml⁻¹ de milieu de culture.

En fonction de la vitesse de production des EPS par les deux souches étudiées, nous pouvons définir 3 phases bien distinctes (Fig. 38) :

- La **phase A**, qui se situe entre 0 et 1 jour, caractérisée par une faible production d'EPS et qui correspondrait probablement à une phase d'adaptation aux nouvelles conditions de culture.
- La **phase B**, entre le 1er et le 2ème jour, phase pendant laquelle nous notons une progression de l'activité productrice d'EPS.
- La **phase C**, à partir du 3ème jour, constituée d'un plateau, où la production d'EPS se stabilise à un niveau relativement élevé, entre 2,3 et 2,7 mg d'EPS.ml⁻¹ de milieu, selon la souche bactérienne considérée et cela durant toute la période d'incubation (10 jours).

Au niveau de la phase A, nous notons une différence de vitesse de production d'EPS entre *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207 évaluée respectivement à 0,1 et 0,4 mg.ml⁻¹.jour⁻¹ (Fig. 38). Cet écart est rapidement comblé durant les phases B et C, pour atteindre des productions d'EPS avoisinant 2,5 mg d'EPS.ml⁻¹.

Il semblerait que durant cette phase, l'azote dans le milieu devient un facteur limitant favorisant ainsi une intense production d'EPS (Duguid et Wilkinson, 1953). La phase C, caractérisée par un plateau montre que les EPS synthétisés ne sont pas consommés par les souches *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207, même après 10 jours d'incubation.

Si l'on tient compte de l'apport initial en saccharose qui est de 20 g.l^{-1} et si l'on considère que la totalité du saccharose est consommée, ces niveaux élevés de production d'EPS en milieu liquide, traduisent des taux de conversion du saccharose au 5^{ème} jour d'incubation, équivalents à 13 % pour *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et 14 % pour *Rhizobium* sp. KYGT207. Il s'agit là d'une estimation par défaut, puisqu'une partie seulement de la source de carbone est consommée. Une quantité de saccharose pourrait être transférée à l'intérieur des cellules bactériennes, surtout durant les premières heures d'incubation (avant le début de la production d'EPS), pour rééquilibrer la pression osmotique entre les deux compartiments intérieur et extérieur. De même que les propriétés rhéologiques des EPS produits, caractérisées par une viscosité élevée, pourraient constituer des conditions favorables à l'adsorption d'une partie du saccharose.

Par ailleurs le saccharose, au même titre que le mannitol, à une concentration de 20 g.l^{-1} engendre un stress osmotique ayant des conséquences sur la production d'EPS. En effet, comme nous l'avons signalé précédemment, la production d'EPS par les bactéries constitue l'une des premières réponses à un stress (osmotique, hydrique ou ionique). D'autres mécanismes de tolérance peuvent être mis en jeu notamment la synthèse de molécules appelées « osmoprotectants ». Le saccharose peut aussi, dans certaines conditions de stress, constituer un osmoprotectant. C'est ainsi qu'en cas de stress hydrique ou osmotique par exemple, une certaine quantité de saccharose contenue dans le milieu de culture peut pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne pour rétablir l'équilibre osmotique.

A ce stade de l'expérimentation, nous ne connaissons pas de manière précise les niveaux de consommation de saccharose par les deux souches bactériennes. Il faut cependant noter que la production d'EPS n'est pas la seule activité métabolique, car la production de biomasse cellulaire ainsi que la respiration nécessitent la consommation de saccharose. C'est pourquoi, dans ce qui suit, nous allons nous intéresser à la production de biomasse et à la consommation de saccharose par les deux souches étudiées.

1.5. Cinétique de production de biomasse cellulaire

Nous avons choisi de suivre la production de biomasse cellulaire dans les cultures sur le même milieu RCV-saccharose (20 g.l^{-1}) liquide.

Les deux souches bactériennes *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207 se développent sur milieu RCV-saccharose et ne semblent pas affectées par une concentration élevée en saccharose (20 g.l^{-1}). Les résultats montrent que la cinétique de production de biomasse des deux souches bactériennes comporte deux phases (Fig. 39) :

- une **phase A** : qui se situe entre 0 et 3 jours et qui correspond à une phase active de production de biomasse cellulaire ; c'est la phase exponentielle de croissance,

- une **phase B** : qui débute à partir du 3^{ème} jour et qui correspond à une phase de stabilisation de la production protéique: c'est la phase stationnaire (Fig. 39).

Ces cinétiques de croissance ne présentent pas de phase de latence, puisque les inoculums de départ étaient en phase exponentielle de croissance (précultures de 12 h). Nous notons également que les deux souches bactériennes présentent des cinétiques de production de biomasse cellulaire ayant la même allure. Cependant, dans ces conditions, *Paenibacillus* sp. KYEGB2 montre une production de biomasse supérieure à celle de *Rhizobium* sp. KYGT207, même si les niveaux de production d'EPS sont équivalents. Cet écart débute à la fin de la phase A pour se poursuivre au cours de la phase B.

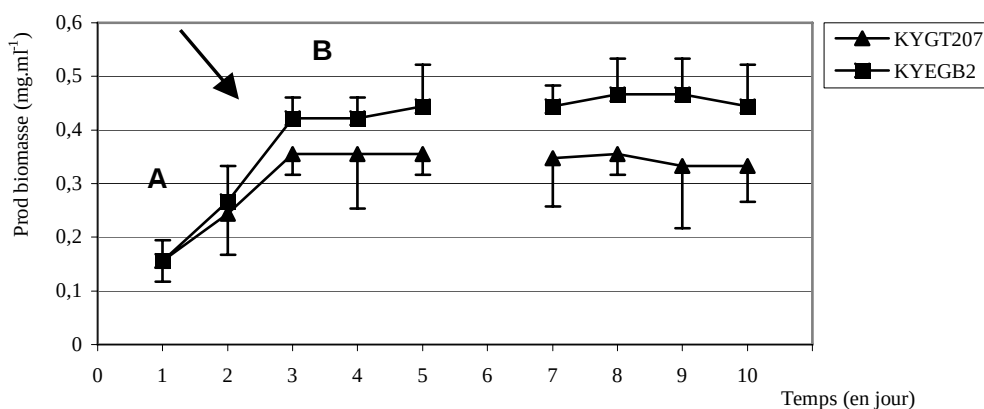


Figure 39. Cinétiques comparées de production de biomasse cellulaire des deux souches bactériennes *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207.

Les cultures sont réalisées en milieu RC-saccharose liquide (20 g.l⁻¹).

Comme pour la production d'EPS, l'essentiel de la production de biomasse est réalisé durant les 3 premiers jours. Durant cette phase A, l'énergie tirée de la consommation de saccharose par les bactéries va être orientée vers la production d'EPS et vers la production de biomasse cellulaire (Fig. 39).

Il faut par ailleurs noter que ces conditions de culture, rapport C/N très élevé (environ 200) en raison de la présence d'une forte concentration en saccharose, favorisent la production d'EPS au détriment de la biomasse cellulaire. Il ne s'agit donc pas d'un milieu favorable à la prolifération cellulaire.

C'est la raison pour laquelle les niveaux de production de biomasse cellulaire sont nettement inférieurs à ceux de la production d'EPS (Fig. 38 et 39).

1.6. Cinétique de consommation du saccharose

Nous rappelons les observations suivantes :

- Une production importante d'EPS, seulement après 3 j d'incubation.
- Un taux de conversion du saccharose en EPS, établi sur la base de l'apport initial (20 g.l^{-1}), relativement faible (13 à 14 %).
- Une cinétique de production d'EPS qui se superpose à celle de la croissance bactérienne et cela pour les deux souches testées.

L'ensemble de ces remarques appelle une question relative à l'évaluation de la consommation de saccharose par les deux souches bactériennes.

Pour cela, dans cette expérience, nous avons dosé le saccharose résiduel à l'aide d'une méthode enzymatique choisie par rapport à sa spécificité vis-à-vis du saccharose. En effet, les autres méthodes de dosage (à l'anthrone ; Dubois *et al.*, 1956 ; celle de Drapron et Guibot, 1962) reposent sur l'addition d'acide concentré qui hydrolyse les polysides, ce qui les rend non spécifiques. Pour éviter les interférences entre le substrat et le produit, nous avons choisi la méthode enzymatique.

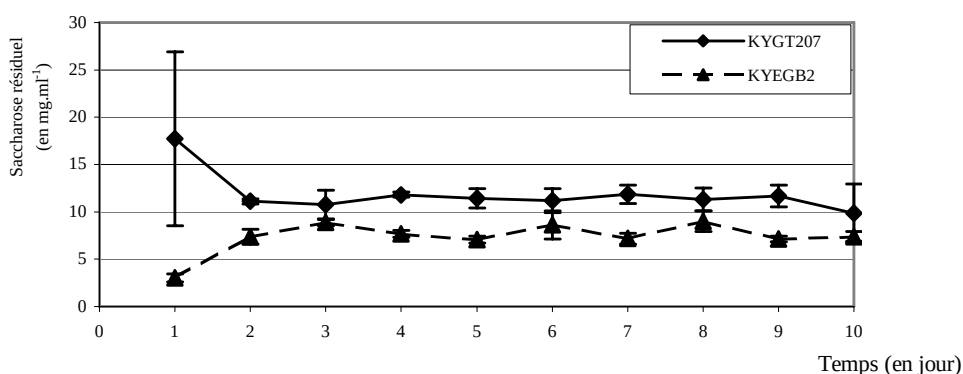


Figure 40. Evolution de la teneur en saccharose résiduel dans le milieu de culture (RCV-saccharose, 20 g.l^{-1}), lors de la production d'EPS par les deux souches bactériennes *Paenibacillus sp. KYEGB2* et *Rhizobium sp. KYGT207*.

La cinétique de consommation du saccharose montre qu'après seulement un jour d'incubation de la souche *Paenibacillus sp. KYEGB2*, la concentration en saccharose du milieu de culture diminue considérablement pour atteindre une valeur avoisinant 3 g.l^{-1} (Fig. 38). Il est très difficile de parler à ce stade de consommation de saccharose par la souche *Paenibacillus sp. KYEGB2* au vu de la grande vitesse de disparition de ce substrat du milieu de culture. C'est pour cette raison que l'on peut penser que, durant les premières heures d'incubation, une partie du saccharose serait transportée dans les cellules bactériennes de manière à réduire le stress osmotique occasionné par la forte concentration du milieu de

culture en saccharose (20 g.l^{-1}). Cette hypothèse ne peut à elle seule expliquer une aussi grande vitesse de disparition du substrat carboné. En effet, nous pensons qu'une partie non négligeable de saccharose est immobilisée par adsorption sur les cellules bactériennes et le polysaccharide synthétisé et échapperait ainsi au dosage enzymatique.

Ce qui nous conforte dans cette hypothèse, c'est que durant le deuxième et troisième jour, la concentration en saccharose dans le milieu augmente (Fig. 40), ce qui correspondrait à une « libération » du saccharose adsorbé sur le polysaccharide.

D'autre part, nous avons aussi remarqué que les deux cinétiques de production de biomasse cellulaire (Fig. 39) et de production d'EPS (Fig. 38) présentent la même allure, ce qui expliquerait ainsi la grande consommation de saccharose en un laps de temps assez court (moins de 3 j). En effet, l'énergie tirée de ce substrat, serait répartie entre la production de biomasse et celle de l'EPS.

Paenibacillus sp. KYEGB2 présente donc un maximum de consommation de saccharose, après 24 h à 17 g.l^{-1} , ce qui correspond à un taux d'utilisation de l'ordre de 84%.

La souche de *Rhizobium sp.* KYGT207, même si elle consomme moins de saccharose que *Paenibacillus sp.* KYEGB2, son taux d'utilisation de saccharose après seulement 2 j demeure élevé (46 %), avec une consommation de $9,3 \text{ g.l}^{-1}$. Nous remarquons aussi qu'avec des taux de consommation aussi différents, les 2 souches bactériennes testées atteignent, après 2 jours d'incubation, des niveaux de production d'EPS avoisinant 2 g d'EPS.l^{-1} (Fig. 38).

Comme pour la souche *Paenibacillus sp.* KYEGB2, l'énergie consommée par *Rhizobium sp.* KYGT207, durant les deux premiers jours, est répartie entre la production d'EPS et de la biomasse cellulaire. Les niveaux de consommation de saccharose par *Paenibacillus sp.* KYEGB2 demeurent bien plus importants que ceux relevés pour *Rhizobium sp.* KYGT207.

Enfin, comme nous l'avons précédemment signalé, l'absence d'utilisation de l'EPS produit comme source de carbone serait probablement liée à la concentration en saccharose résiduel dans le milieu de culture qui reste toujours supérieure à 7 g.l^{-1} entre le 3^{ème} et le 10^{ème} jour.

1.7. Evaluation des teneurs en glucose et en fructose

Dans le milieu de culture RCV-saccharose, le glucose et le fructose proviennent de l'hydrolyse du saccharose. Les variations significatives des teneurs en glucose et en saccharose se situent entre 0 et 4 j d'incubation (Fig. 41). Comme nous l'avons déjà signalé, les variations les plus importantes en termes de production de biomasse cellulaire et d'EPS ou encore la consommation de saccharose, sont observées durant la phase A.

Après seulement 24 h d'incubation, au moment où la consommation en saccharose est maximale pour *Paenibacillus sp.* KYEGB2, la teneur en glucose du milieu est au plus bas niveau (environ $2,5 \text{ g.l}^{-1}$). Celle-ci augmente en fonction du temps pour se stabiliser au troisième jour (environ 6 g.l^{-1}) (Fig. 41). Bien que cela constitue un résultat étonnant, il semblerait que cette souche n'utilise qu'une faible proportion du glucose, libérée par hydrolyse du saccharose.

La libération de fructose dans le milieu ne démarre qu'au 2^{ème} jour pour se stabiliser à une concentration avoisinant 2 g.l^{-1} (Fig. 41). Sa concentration est nettement inférieure à celle du

glucose, ce qui est logique puisque cette souche produit un polymère de fructose (lévane, cf. deuxième partie de ce Chapitre). Après 3 j d'incubation, les différences de concentration en glucose et en fructose traduisent à la fois :

- une intense hydrolyse du saccharose, illustrée par une concentration élevée en glucose (6 g.l^{-1}) dans le milieu de culture et
- une rapide élévation du polymère de fructose, illustrée par une faible concentration en fructose résiduel (2 g.l^{-1}).

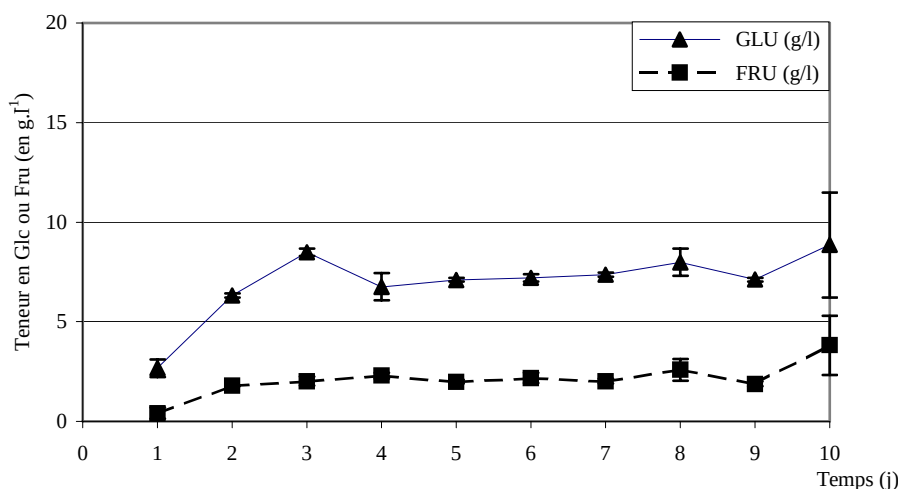


Figure 41. Evolution comparée des teneurs en glucose et fructose dans le milieu de culture, en présence de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2.

L'apport initial en saccharose est de 20 g.l^{-1} .

Ces résultats semblent indiquer qu'après le premier jour d'incubation, lorsque le niveau de consommation de saccharose est à son maximum, la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2 immobiliserait une partie de ce sucre sans toutefois le consommer. En effet, cette hypothèse est corroborée par des teneurs en saccharose qui augmentent au cours du deuxième et troisième jour pour atteindre des valeurs respectives de $7,3 \text{ g.l}^{-1}$ et $8,8 \text{ g.l}^{-1}$. Celui-ci est immédiatement suivi d'une production de glucose dont la cinétique est analogue à celle du saccharose.

Les remarques formulées pour le saccharose semblent aussi valables pour le glucose. En effet, comme pour le saccharose, il semblerait qu'une proportion de glucose, issue de l'hydrolyse du saccharose soit immobilisée par adsorption sur l'EPS.

Une autre façon d'interpréter ces résultats est de considérer que le premier point concernant le dosage du saccharose dans le milieu de culture de *Paenibacillus* sp. KYEGB2 comme un artefact. Dès le deuxième jour, il ne reste plus que 8 g.l^{-1} de saccharose dans le milieu, valeur qui se stabilise jusqu'à la fin de l'expérience (Fig. 40). Tout se passe comme si

l'activité saccharolytique s'arrêtait après 48 h de croissance, après l'hydrolyse de 12 g.l⁻¹ de saccharose (soit théoriquement 6 g.l⁻¹ de glucose et autant de fructose). Le dosage de 6 g.l⁻¹ de glucose restant dans le milieu semble indiquer que le glucose provenant de l'hydrolyse du saccharose, n'a pas été métabolisé : ce résultat est surprenant. Le fructose, provenant lui aussi de l'hydrolyse du saccharose (6 g.l⁻¹), est métabolisé à hauteur de 66 %, puisque environ 2 g.l⁻¹ ont été dosés dans le milieu (non métabolisés), en phase stationnaire de croissance. Le fructose (4 g.l⁻¹) a permis la croissance cellulaire (0,5 g.l⁻¹) et la synthèse de lévane (2,7 g.l⁻¹). Si on considère que le carbone de la respiration bactérienne représente le double de celui de la biomasse bactérienne (Heulin *et al.*, 1987), le bilan est équilibré : (0,5 + 1,0 + 2,7) g.l⁻¹ à

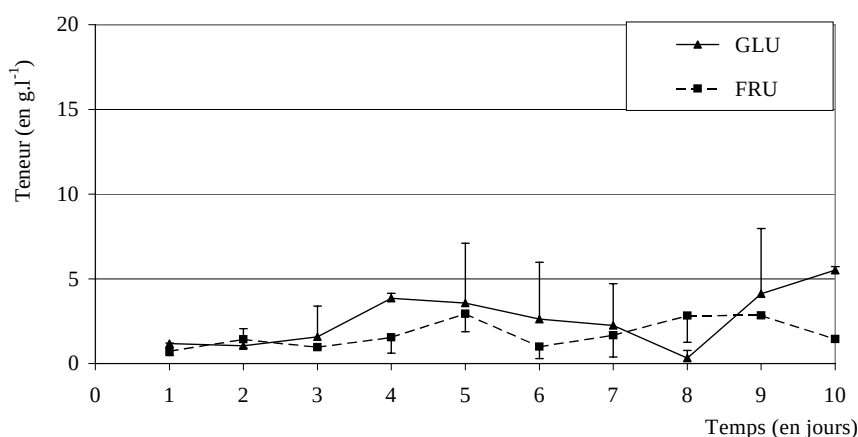


Figure 42. Evolution comparée des teneurs en glucose et fructose, lors de la production d'EPS par *Rhizobium* sp. KYGT207 sur milieu RCV-saccharose liquide (20 g.l⁻¹).

comparer aux 4 g.l⁻¹ de fructose provenant de l'hydrolyse du saccharose.

Les concentrations de glucose et de fructose en présence de *Rhizobium* sp. KYGT207 sont très proches (environ 2 à 3 g.l⁻¹, Fig. 42). Nous avons vu précédemment qu'environ 10 g.l⁻¹ de saccharose avaient été métabolisés par cette souche (Fig. 40).

Les faibles concentrations en glucose et fructose restant dans le milieu indiquent que 60 à 70 % de ces glucides provenant de l'hydrolyse du saccharose, ont été utilisés comme source de carbone et d'énergie pour produire à la fois de la biomasse cellulaire et de l'EPS. Le bilan pour *Rhizobium* sp. KYGT207 est le suivant : biomasse cellulaire (0,35 g.l⁻¹) + carbone de la respiration (0,7 g.l⁻¹) + EPS (2,5 g.l⁻¹) à comparer avec le saccharose hydrolysé (10 g.l⁻¹) – glucose et fructose restant (6,5 g.l⁻¹). Le bilan (3,55 vs 3,5 g.l⁻¹) est également équilibré pour la souche KYGT207.

2. Discussion

La production d'EPS peut être augmentée en appliquant les conditions environnementales stimulant la biosynthèse d'EPS ; il faut cependant qu'il y ait dans le milieu de culture une quantité appréciable de biomasse initiale (Degeest *et al.*, 2001a).

Dans le Chapitre I, nous avons relevé une plus large utilisation de substrats carbonés par la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 par rapport à *Paenibacillus* sp. KYEGB2. Ces deux souches bactériennes produisent des quantités importantes d'EPS à partir du saccharose.

Même si les propriétés rhéologiques des deux EPS produits sont comparables, la nature de ces polymères est très différente. En effet, *Paenibacillus* sp. KYEGB2 synthétise un EPS de type lévane qui est un fructane. L'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose, est catalysée par une enzyme : la lévane-saccharase.

La synthèse des lévanes s'effectue exclusivement par un mécanisme extracellulaire qui ne nécessite pas de transporteur lipidique (Sutherland, 1982). Cet EPS est synthétisé grâce à la sécrétion de l'exoenzyme : la lévane-saccharase, qui est responsable à la fois de l'hydrolyse du saccharose à l'extérieur de la cellule et du transfert du groupement fructose.

Ce mécanisme correspond donc à une élongation du polymère de fructose avec libération de glucose. Le glucose, issu de l'hydrolyse du saccharose lors de la synthèse du lévane, vient enrichir le milieu de culture en substrat carboné.

Il est probable que le glucose et le fructose issus de l'hydrolyse du saccharose, soient utilisés par *Rhizobium* sp. KYGT207 pour produire à la fois des EPS et de la biomasse cellulaire. Par contre, nous avons vu que, de façon surprenante, *Paenibacillus* sp. KYEGB2 semblait utiliser très faiblement le glucose comme source de carbone et d'énergie.

Le rapport C/N élevé du milieu de culture, permis par une forte concentration en saccharose (20 g.l⁻¹) et une faible teneur en azote dans le milieu, permet d'augmenter la pression osmotique du milieu de culture. En réponse à ces conditions environnementales stressantes, les bactéries se protègent en produisant des quantités d'EPS plus importantes, constituant ainsi une barrière physique et chimique. Dans ces conditions de culture particulières, concentration élevée en substrat carboné et déficit en azote combiné, les bactéries réagissent en produisant des quantités importantes d'EPS qui servent de zone tampon contre les changements extérieurs de potentiel hydrique (Roberson et Firestone, 1992 ; Cerning *et al.* 1992; Cerning *et al.* 1994; Gamar *et al.* 1997, Graber *et al.*, 1998). Il s'agit donc d'une réponse physiologique qui constitue l'un des moyens de défense contre certaines contraintes du milieu extérieur, comme la variation du potentiel hydrique par exemple.

Ce mode de protection n'est pas le seul mis en action par les bactéries. En effet, diverses molécules sont accumulées dans le compartiment intracellulaire par de nombreux microorganismes pour lutter contre les contraintes du milieu extérieur. Ces molécules, appelées « solutés compatibles » ou « osmorégulateurs », sont de nature diverse :

- des acides aminés (glycine bêtaïne, proline, glutamate, ectoine...),
- des hydrates de carbone (saccharose, tréhalose...),
- des sucre-alcools (glycérol, mannitol ...).

Par ailleurs, le stress osmotique ne constitue pas la seule contrainte engendrée par de fortes concentrations en glucides. En effet, le mannitol, et le saccharose permettent de diminuer l'activité de l'eau (a_w), limitant ainsi considérablement l'eau libre dans le milieu de culture. Il s'agit donc d'un stress hydrique qui permet aussi d'augmenter la synthèse d'EPS. Cette hypothèse est confortée par une meilleure production d'EPS en milieu solide, en moyenne 5 fois à 8 fois supérieure à celle obtenue en milieu liquide pour les deux bactéries étudiées. Dans ces conditions particulières, en plus d'une concentration élevée en saccharose (20 g.l⁻¹), la gélose à 15 g.l⁻¹, permet de diminuer davantage l'activité de l'eau et donc son accessibilité par les bactéries, augmentant le déficit hydrique.

Toutes ces observations liées aux contraintes que subissent les bactéries productrices d'EPS ont mené Cerning et *al.*, (1994) à proposer l'hypothèse selon laquelle, un stress environnemental stimulerait la synthèse d'un « gel » protecteur. La production d'EPS, métabolite secondaire bactérien, semble pourtant être associée à la survie des bactéries dans les milieux naturels, généralement caractérisés par la coexistence de nombreux facteurs limitants.

En dehors de la concentration de la source de carbone et surtout du rapport C/N, il apparaît aussi que la nature du substrat carboné détermine le niveau de production d'EPS.

Une production d'EPS importante est assurée dans des conditions de prolifération sous-optimale. En effet, suivant les conditions environnementales, le substrat énergétique est orienté soit pour la production de biomasse cellulaire soit pour la production d'EPS. C'est la raison pour laquelle une abondante production d'EPS est subordonnée à un inoculum de départ dense et physiologiquement actif, prélevé donc en phase exponentielle de croissance.

La production d'EPS des deux souches bactériennes étudiées (KYGT207 et KYEGB2) est associée à la croissance, leur biosynthèse commençant en fin de phase exponentielle de croissance. Cette caractéristique n'est pas spécifique aux genres *Rhizobium* et *Paenibacillus*, puisque les mêmes observations ont été faites pour des bactéries productrices d'EPS appartenant au genre *Lactobacillus*, très utilisées dans le domaine des industries laitières (Gamar et *al.*, 1997).

Le saccharose, ne semble pas constituer un substrat spécifique au genre *Paenibacillus*, puisque dans nos expériences, nous avons montré qu'il permettait également une forte production d'EPS chez la souche *Rhizobium* sp. KYGT207. De même, cette source de carbone est également utilisée pour la production d'EPS chez *Lactobacillus casei* (Cerning et *al.*, 1994).

Par ailleurs, la persistance de ces substrats carbonés dans le sol est un élément à prendre en considération. Celle-ci varie en fonction de l'origine et de la nature de ces molécules, de quelques jours pour les sucres simples par exemple à plusieurs années pour des molécules plus récalcitrantes (Jenkinson, 1990). Il semblerait que dans la rhizosphère du blé dur, la persistance des glucides issus essentiellement de la rhizodéposition serait réduite, du fait de l'abondance des microorganismes et de leur grande diversité.

La grande vitesse de biodégradation de ces molécules ne semble pas limiter leur disponibilité dans la rhizosphère, puisque l'exsudation racinaire est un phénomène continu,

tout au moins durant les premiers stades phénologiques du blé dur (jusqu'au tallage-montaison).

3. Conclusion

En présence des 3 sources de carbone (saccharose, glucose et mannitol), nous avons relevé des niveaux de productions d'EPS élevés pour les deux souches bactériennes étudiées (*Paenibacillus*. sp. KYEGB2 et *Rhizobium*. sp. KYGT207). L'effet le plus remarquable étant obtenu en présence de saccharose à une concentration de 20 g.l⁻¹.

L'analyse des résultats relatifs à l'impact de la nature des sucres sur la production d'EPS en milieu liquide ou solide, donne le classement suivant : saccharose > mannitol > glucose.

Nous avons aussi montré que les conditions culturales des bactéries testées (milieu solide ou liquide) avaient des conséquences sur le niveau de production d'EPS. C'est ainsi que le milieu RCV solide, contenant du saccharose (20 g.l⁻¹), permet d'obtenir des quantités d'EPS 5 à 8 fois supérieures à celles obtenues en milieu liquide.

4. Étude structurale des exopolysaccharides KYT15, KYEGB2 et KYGT207 et mesure de leur viscosité

4.1. Étude structurale

La détermination de la structure constitue la première étape de l'étude des EPS. Elle revêt une importance capitale, puisqu'elle donne des informations sur la composition, la forme de la molécule (structure linéaire ou ramifiée), la présence de charges (caractère polyélectrolyte ou non), soit tout un ensemble d'éléments qui vont déterminer les propriétés rhéologiques de ces polymères.

En plus des 2 EPS bactériens KYEGB2 et KYGT207, nous avons inclus dans cette partie de l'étude l'EPS KYT15, synthétisé par une souche identifiée comme un *Paenibacillus* sp. Nous rappelons que cette souche bactérienne a été isolée dans la rhizosphère du blé dur dans la région de Tiaret.

L'analyse de la structure des polysaccharides se fait en deux grandes étapes :

- la première permet la détermination qualitative et quantitative des unités osidiques composant la macromolécule,
- la seconde permet de déterminer le mode d'enchaînement des unités de base, c'est-à-dire l'anométrie des liaisons glycosidique, la position des carbones engagés dans ces liaisons, ainsi que la présence éventuelle de substituants.

Dans ce contexte, nous avons utilisé les techniques complémentaires suivantes :

- la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC),
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG),

- la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN ^1H et ^{13}C), faisant appel à des analyses de spectres en deux dimensions, homonucléaires (COSY et TOCSY) et hétéronucléaire (HMQC et HMBC).

4.1.1. Analyse qualitative et quantitative des EPS par HPLC et CPG.

La nomenclature adoptée pour la désignation des EPS sera la suivante :

Souche bactérienne	Désignation des EPS
<i>Paenibacillus</i> sp. KYGT15	KYT15
<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2	KYEGB2
<i>Rhizobium</i> sp. KYGT207	KYGT207

Après purification des polysaccharides, la détermination des unités osidiques est réalisée par chromatographie après hydrolyse totale en milieu acide. Les hydrolyses sont effectuées dans l'acide trifluoroacétique (TFA 2N), pendant 3 h à 100 °C, en présence d'un étalon interne, l'inositol.

4.1.1.1. Analyse des EPS KYT15 et KYEGB2

L'analyse de l'hydrolysats de l'EPS KYT15 sur colonne échangeuse de cations (Fig. 43) montre la présence de deux pics dans un ratio proche de 1 qui, sur la base de leur temps de rétention, peut être attribué au glucose ($t_r=15,9$ min) et, soit au mannose, soit au fructose ($t_r=21,33$ min). Il est intéressant de remarquer que le rapport de ces deux sucres avec le standard inositol ($t_r=33,6$ min) est considérable, ce qui sous-entend une très forte dégradation des monosaccharides formés au cours de l'hydrolyse ou, un taux de sucre initial très faible. La forte coloration brunâtre des hydrolysats laisse plutôt penser à une dégradation.

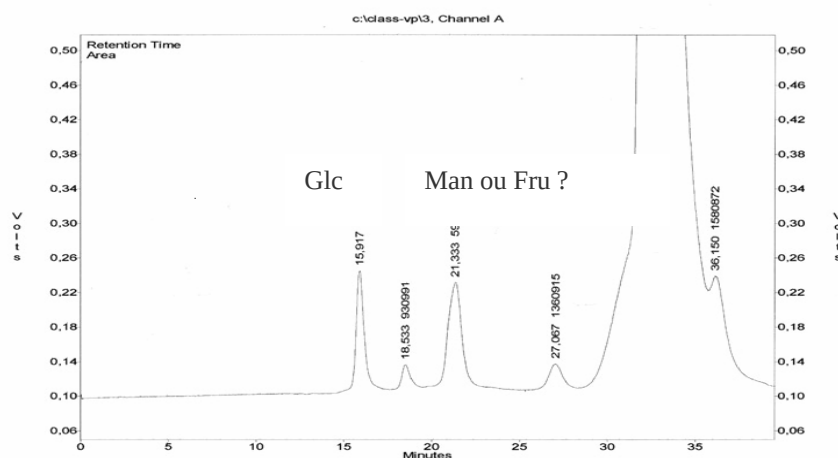


Figure 43. Analyse de l'hydrolysats de l'EPS KYT15 sur colonne échangeuse de cations. Acide trifluoroacétique (TFA 2N), pendant 3 h à 100 °C

L'étude de l'EPS KYEGB2 conduit à des résultats comparables et, de fait, au même type de remarques.

Une nouvelle hydrolyse dans des conditions plus douces (TFA 2N, 1 h, 100 °C) conduit au chromatogramme de la Figure 44. À côté de l'inositol, toujours excédentaire, nous n'obtenons plus qu'un seul monosaccharide ($t_r = 21,46$ min) que nous attribuerons au fructose, sachant que ce sucre est relativement fragile et se dégrade facilement à chaud en milieu acide pour donner des composés de type furfuraldéhyde.

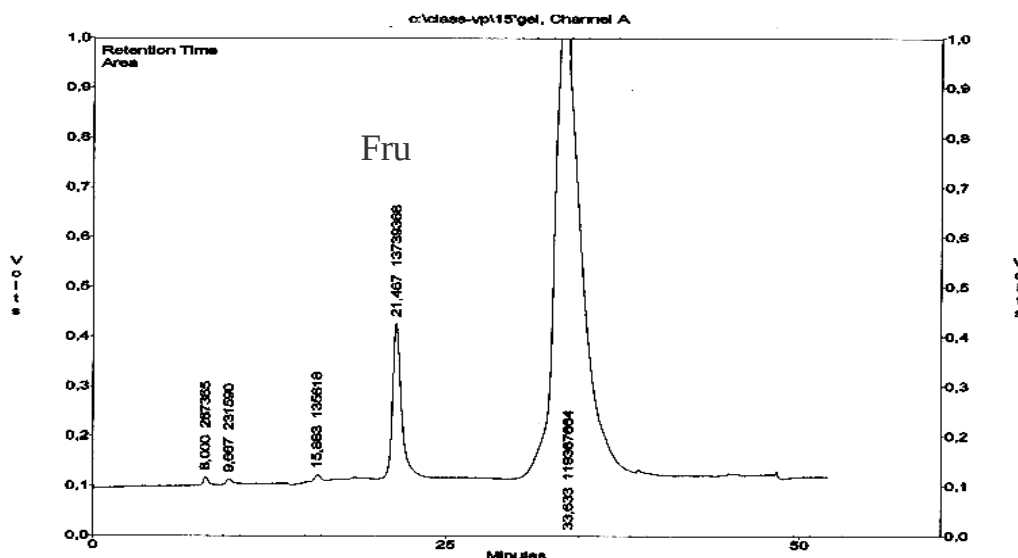


Figure 44. Analyse de l'hydrolysate de l'EPS KYT15 sur colonne échangeuse de cations.
Acide trifluoroacétique (TFA 2N), pendant 1 h à 100 °C

Ceci est confirmé par l'analyse en CPG. Après réduction et acétylation des sucres présents dans cet hydrolysate pour obtenir des composés volatils, l'analyse du chromatogramme obtenu en CPG fait apparaître deux pics correspondant au mannose et au glucose, les deux épimères du fructose formés lors de la réduction du fructose (Fig. 45).

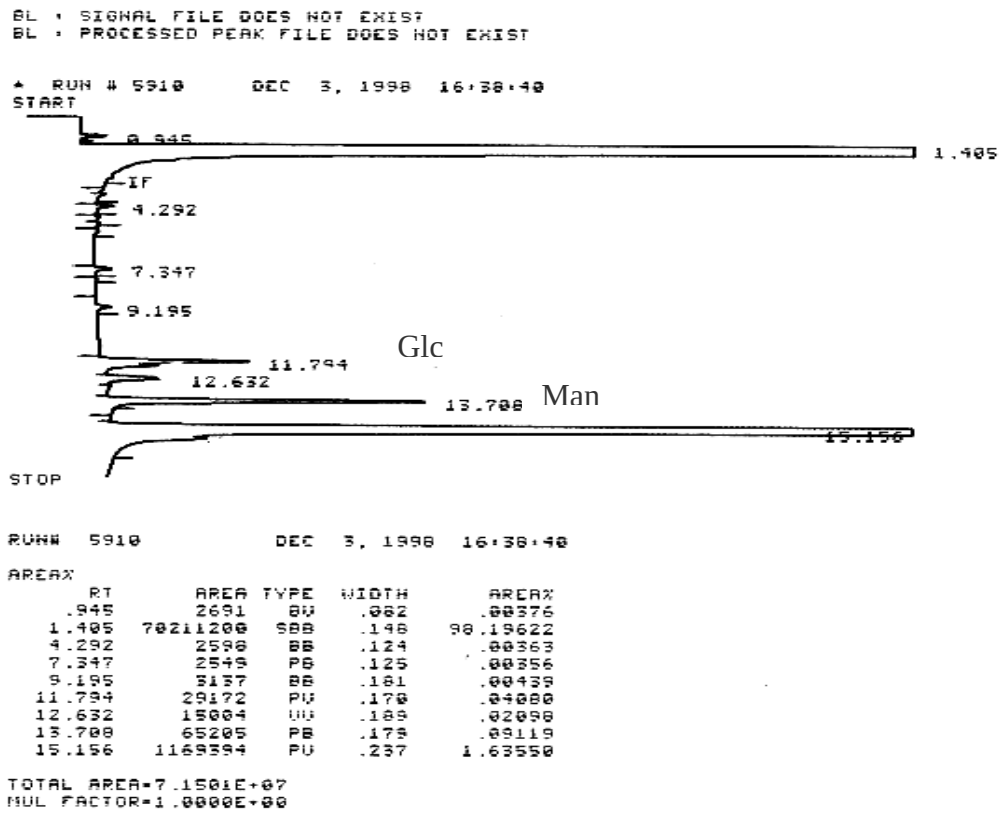


Figure 45. Chromatogramme obtenu en CPG de l'EPS KYT15

Considérant les données de la littérature qui montrent que de nombreuses souches bactériennes du genre *Paenibacillus* synthétisent un EPS de type lévane, homopolysaccharide du fructose, nous pouvons raisonnablement envisager que les EPS KYT15 et KYEGB2 sont, eux aussi, des lévanes. Ceci demande toutefois une vérification faisant appel à une technique plus précise, comme la résonance magnétique nucléaire.

4.1.1.2. Analyse de l'EPS KYGT207

Dans le cas de l'EPS KYGT207, après hydrolyse acide en conditions douces (TFA 2N, 1 h, 100 °C), l'analyse du chromatogramme obtenu en HPLC, montre la présence de deux pics majoritaires pouvant correspondre au glucose (t_r =15,9 min) et au galactose (t_r =18,5 min) (Fig. 46). Le rapport Glc/Gal, calculé sur la base des surfaces des pics correspondants, est égal à 2,5. À noter ici aussi un rapport inositol/sucres neutres qui n'est pas en rapport avec les quantités initiales de l'EPS et du standard, ainsi que la présence sur le chromatogramme de pics minoritaire à 13,9 et 21,1 min, pouvant correspondre respectivement à un oligosaccharide et à un monosaccharide (mannose ou fructose).

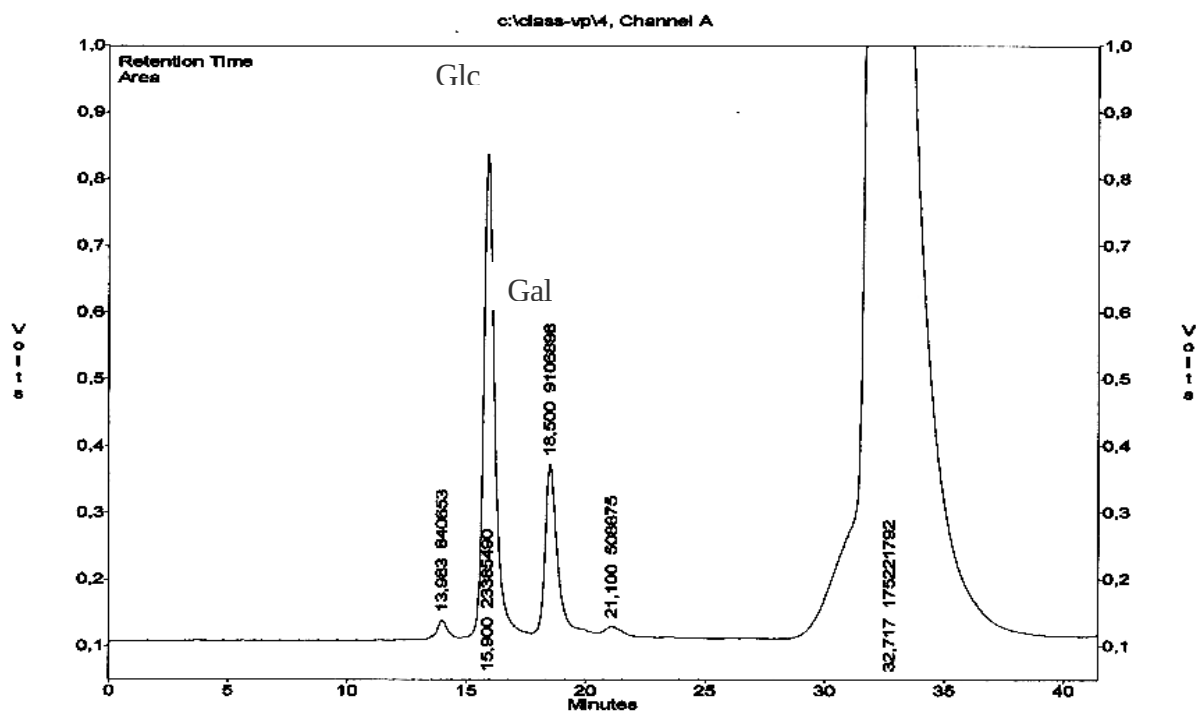


Figure 46. Analyse de l'hydrolysate de l'EPS KYGT207 sur colonne échangeuse de cations.
Acide trifluoroacétique (TFA 2N), pendant 1 h à 100 °C

Une analyse qualitative des sucres acides, effectuée en chromatographie d'échange d'anions (HPAEC) avec une détection par ampérométrie pulsée (PAD), met en évidence la présence d'un acide mannuronique dans l'hydrolysate.

Les résultats obtenus en CPG confirment la présence de deux monosaccharides majoritaires, le glucose et le galactose, et fait apparaître clairement le mannose (Fig. 47).

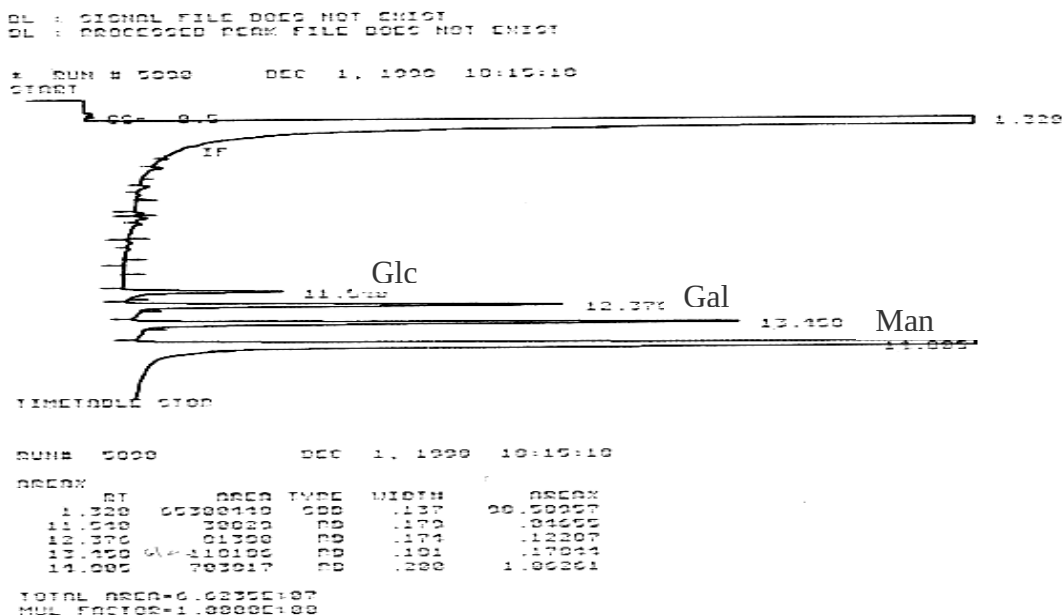


Figure 47. Chromatogramme obtenu en CPG de l'EPS KYGT207

Comme pour les deux EPS précédents, ces résultats, qui ne suffisent pas pour se faire une idée précise de la structure du polysaccharide, seront complétés par une étude en RMN du proton et du carbone.

À ce stade de l'étude, il est bon de préciser que sans connaissance préalable, il est difficile de trouver les bonnes conditions d'hydrolyse acide d'un polysaccharide. Le protocole d'hydrolyse des EPS n'obéit pas à des conditions standard et doit, de ce fait, être ajusté en fonction de la nature du polymère à analyser. C'est ainsi que différents acides sont utilisés en fonction de leur force (TFA, H₂SO₄, HCl), à différentes concentrations et différentes températures, différents temps d'incubation, voire différentes pressions. Ce sont des études relatives à l'efficacité des traitements, faisant appel à des cinétiques et à des calculs de rendement (Roger, 2002), qui vont permettre de définir des conditions et qui vont garantir l'hydrolyse la plus complète possible, avec le minimum de dégradation des sucres libérés pour conduire à une analyse à la fois qualitative et quantitative.

4.1.2. Détermination de la structure des EPS par RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) constitue une méthode d'analyse puissante pour l'étude des molécules organiques en solution. Elle fait appel à l'absorption moléculaire dans le domaine des fréquences radio (de l'ordre du mégahertz).

Dans le domaine de l'analyse structurale des EPS, c'est un outil de choix par excellence. À partir des déplacements chimiques (δ) des différents protons et carbones et des constantes de couplage $^1J_{C,H}$ et $^3J_{H,H}$, il est possible de déterminer la nature de l'unité osidique, sa forme

(pyranose ou furanose), la nature de la liaison glycosidique (α ou β), les carbones engagés dans des liaisons et même la séquence d'enchaînement.

Cette technique présentant en plus l'avantage de ne pas dégrader, ni même de modifier la nature de la molécule, permet de mettre facilement en évidence la présence de groupes substituants (acétate, pyruvate, succinate...).

Les spectres RMN ^1H ont été réalisés sur un spectromètre Unity 400 Varian (400MHz) et les spectres ^{13}C à 75 MHz sur un spectromètre AC Bruker. Pour s'affranchir des problèmes de relaxation liés généralement à la forte viscosité de solution des polysaccharides, les expériences ont été réalisées à 85°C sur des échantillons préalablement dépolymérisés par un traitement aux ultrasons.

Dans le cas de l'EPS KYGT207, compte tenu de la complexité de la structure, des fragments oligosaccharidiques, isolés par chromatographie d'exclusion stérique après hydrolyse acide partielle, ont aussi été utilisés. L'attribution des différents protons de chaque résidu est obtenue à partir d'analyses à haut champ en mode homonucléaire TOCSY (Total Observed Correlation Spectroscopy) et COSY (Correlation Observed Spectroscopy). L'attribution des déplacements chimiques des carbones découle des spectres enregistrés en mode hétéronucléaire HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) ou HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence). La configuration des liaisons glycosidiques est définie par la valeur des déplacements chimiques des carbones et protons anomériques. L'analyse en mode hétéronucléaire HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permet de déterminer l'enchaînement des résidus de l'unité répétitive.

4.1.2.1. *Étude structurale des EPS KYT15 et KYEGB2*

L'analyse globale des spectres RMN ^1H et ^{13}C montre pour les deux EPS KYT15 et KYEGB2 des structures comparables.

Les spectres ^1H s'étendent sur une gamme de 3,4 à 4,1 ppm (Fig. 48 et 49) et il est intéressant de noter qu'aucun signal n'apparaît dans la zone 4,2 – 5,5 ppm où se trouvent normalement les protons anomériques.

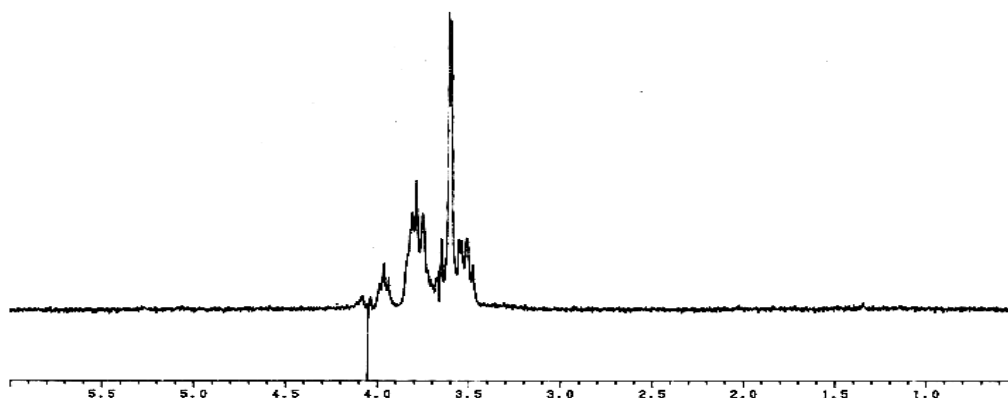


Figure 48. Spectre RMN ^1H de l'EPS KYT15

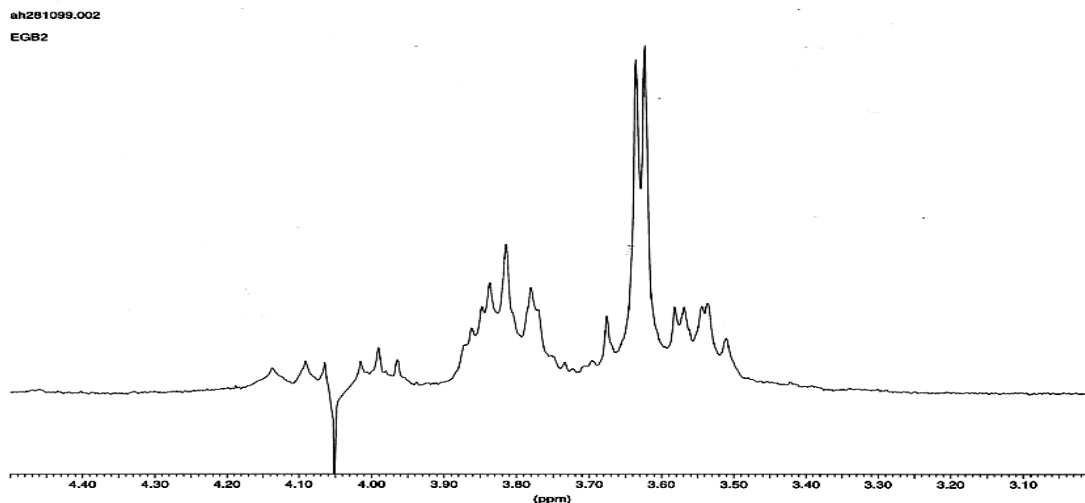


Figure 49. Spectre RMN ^1H de l'EPS KYEGB2

Les spectres ^{13}C sont beaucoup plus explicites avec seulement six signaux correspondant aux six carbones d'un hexose (Fig. 50 et 51). Ces résultats montrent que nous sommes en présence d'un homopolysaccharide constitué par d'un enchaînement d'un hexose sous forme furanose qui ne peut être que le fructose, confirmant ainsi les observations des études chromatographiques après hydrolyse totale.

Sur la base des valeurs des déplacements chimiques des six carbones, le polysaccharide sécrété par les deux souches de *Paenibacillus* est un **lévane de type β 2,6**.

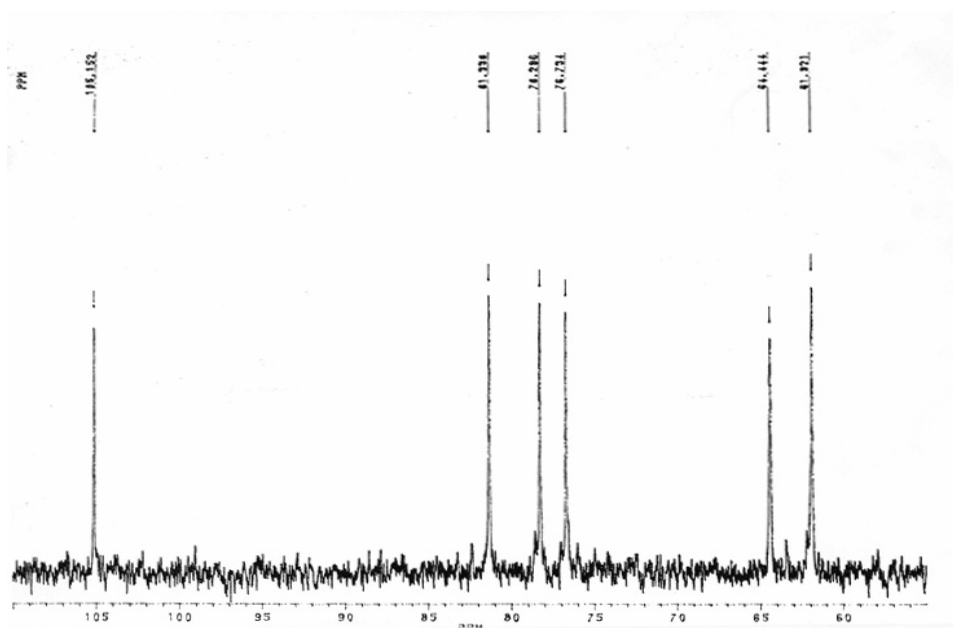


Figure 50. Spectre RMN ^{13}C de l'EPS KYT15

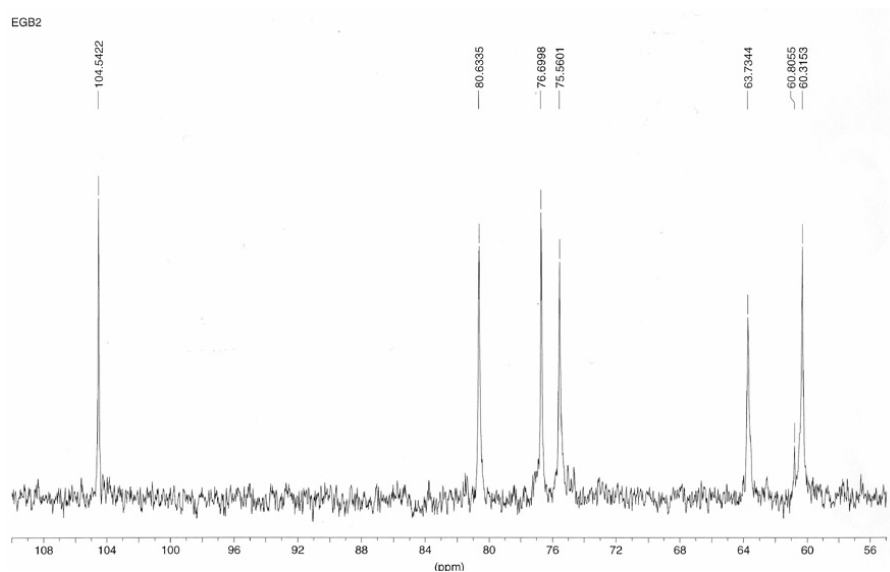


Figure 51. Spectre RMN ^{13}C de l'EPS KYEGB2

À noter que les spectres RMN ne permettent pas de mettre en évidence la présence de contaminant, or, il faut souligner la forte viscosité des solutions de l'EPS KYEGB2, viscosité qui ne peut pas être induite par le lévane seul. Nous ne pouvons donc pas exclure la présence, en très faible proportion (de l'ordre du %), d'un autre polysaccharide.

4.1.2.2. Étude structurale de l'EPS KYGT207

Nous rappelons que l'analyse des oses neutres constitutifs de l'EPS KYGT207 par chromatographie a montré la présence de deux hexoses majoritaires, le glucose et le galactose, dans un rapport compris entre 1,5 et 2,5. Un acide uronique, l'acide mannuronique, est aussi présent dans la structure.

Considérons maintenant le spectre RMN ^1H de l'EPS KYGT207 (Fig. 52). Nous obtenons un ensemble de signaux traduisant la présence d'un polysaccharide, mais d'une complexité extrême liée à un taux de substitution important par des groupements acétyles comme le montre le pic à 2,0 ppm correspondant aux protons du méthyle.

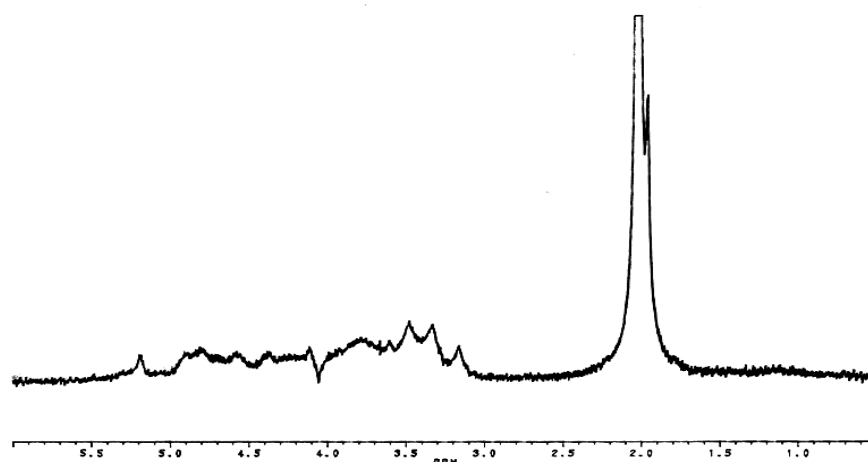


Figure 52. Spectre RMN ^1H de l'EPS KYGT207

Après déacétylation par addition de NaOD directement dans le tube de RMN, le spectre se simplifie (Fig. 53), laissant apparaître cinq signaux bien définis dans la zone des protons anomériques (entre 4,2 et 4,8 ppm). Compte tenu de la faible valeur de la constante de couplage pour le pic à $\delta = 4,2$ ppm (< 5 Hz), nous ne l'attribuerons pas à un proton H-1, ce qui nous laisse une unité répétitive constituée de quatre sucres, notés arbitrairement de A à C ; la numérotation des protons anomériques se faisant du proton le plus déblindé ($\delta = 4,75$ ppm) au proton le moins déblindé ($\delta = 4,42$ ppm) (Tableau XXIII).

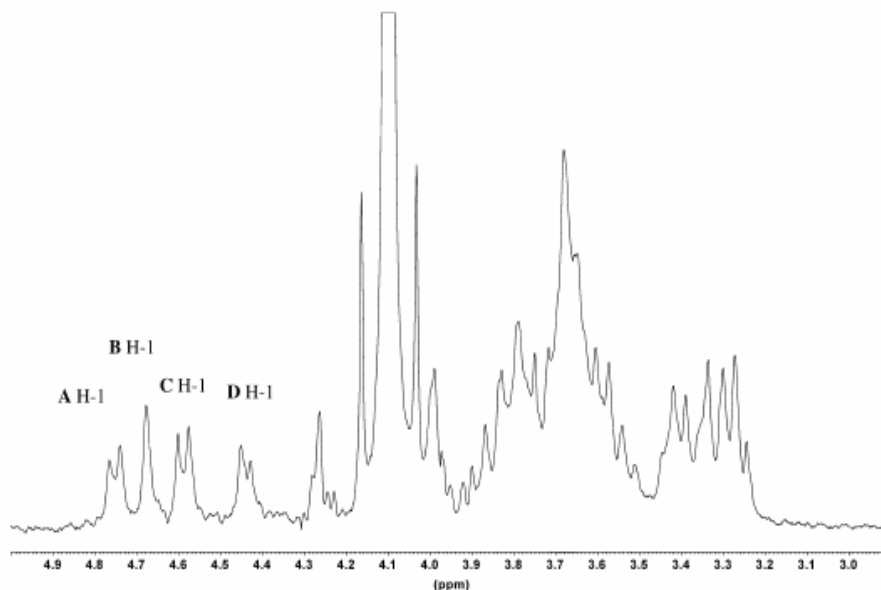


Figure 53. Spectre RMN ^1H de l'EPS KYGT207 après déacétylation par addition de NaOD

Tableau XXIII. Déplacements chimiques des quatre protons H-1 de l'unité de répétition de l'EPS KYGT207.

<i>Molécule</i>	<i>$\delta(\text{H-1})$ ppm</i>
A	4,75
B	4,68
C	4,53
D	4,42

Les deux spectres RMN du ^{13}C (normal, Fig. 54) et ^{13}C obtenu par DEPT (distortionless enhancement by polarisation transfer 135° , Fig. 55) sont en accord avec l'hypothèse d'une unité tétrasaccharidique, puisque quatre signaux sont observés dans la région du carbone anomérique, que trois signaux correspondent avec le C-6 des six unités hexose non-substitués et qu'un signal à δ 175.7 ppm correspond au carbone du groupe carboxyle de l'acide mannuronique (Fig. 56).

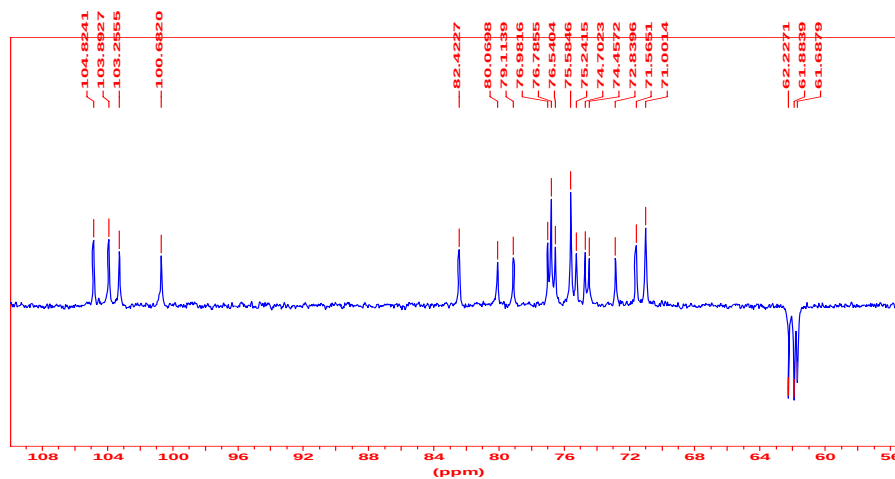


Figure 54. Spectre RMN ^{13}C normal de l'EPS KYGT207

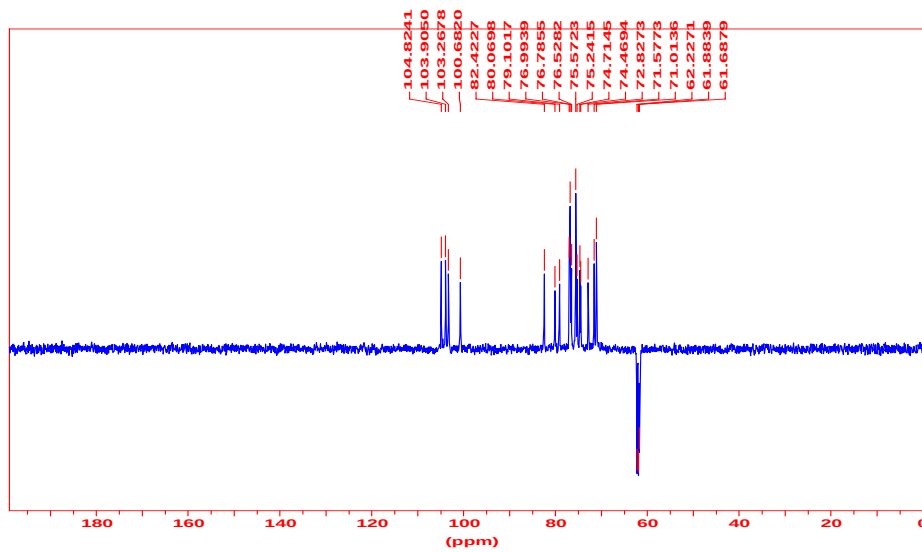


Figure 55. Spectre RMN ^{13}C selon la technique DEPT* de l'EPS KYGT207 déacétylé (300 MHz à 50 °C dans de l'eau lourde D_2O)

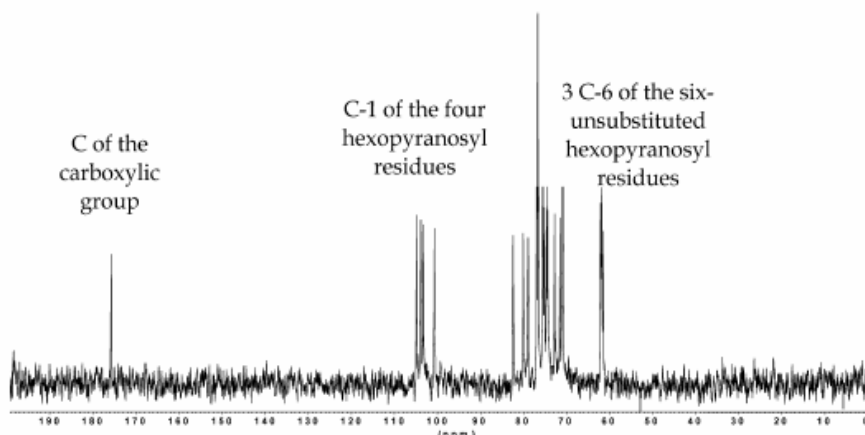


Figure 56. Spectre RMN ^{13}C (333 K, 75 MHz) de l'EPS KYGT207 désacétylé.

Sur le spectre 1-D ^1H (Fig. 53), basé sur sa constante de faible couplage, le signal anomérique à δ 4.68 ppm ($^3J_{1,2} < 2$ Hz) a été attribué au H-1 de l'unité ManA, notée **B**. Les trois autres attributions de H-1 reposent sur le résultat des expériences 1-D TOCSY et COSY. Les protons à δ 4.75 ppm (**A**) et δ 4.53 ppm (**C**) correspondent aux deux unités glucose, le proton à δ 4.42 ppm à l'unité galactose (**D**). Une expérience HMQC (Fig. 57) a permis d'attribuer les déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C des quatre résidus (Tableau XXIV).

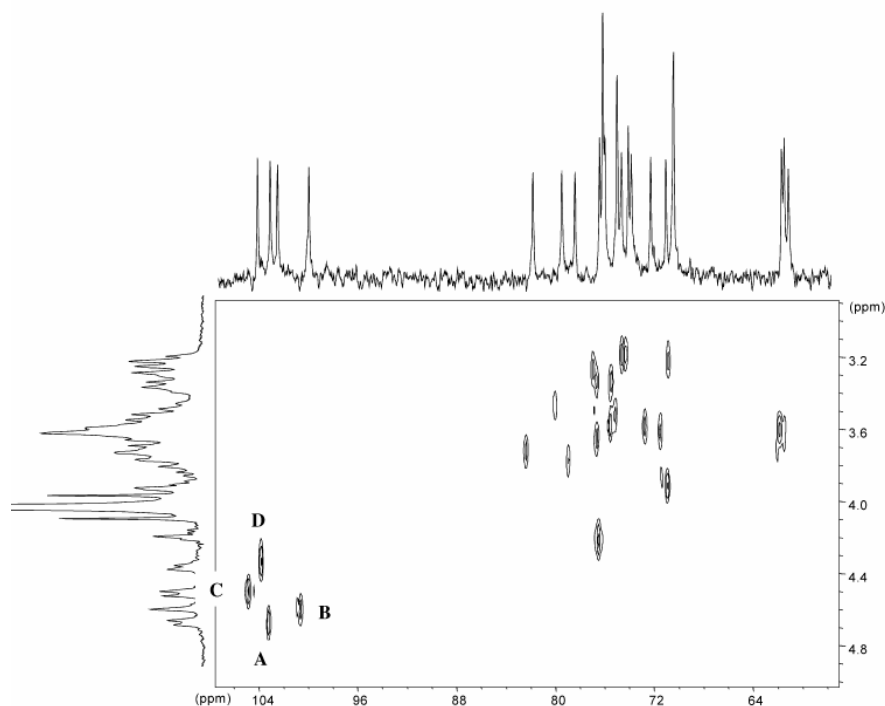


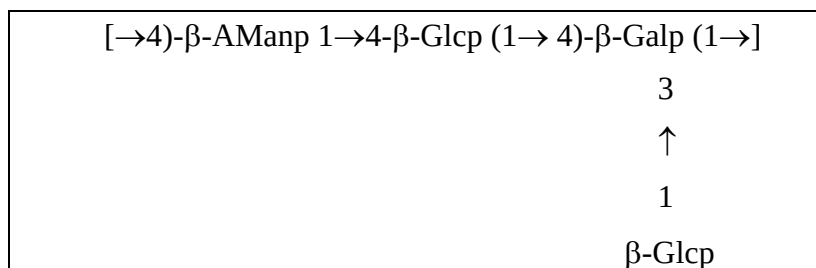
Figure 57. Spectre HMQC* $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ à 400 MHz à 50 °C dans de l'eau lourde (D_2O) de l'EPS produit par *Rhizobium* sp. KYGT207.

Tableau XXIV. Attribution des déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C pour les quatre résidus osidiques constituant l'unité de répétition de l'EPS KYGT207

Résidus osidiques	Déplacements chimiques (δ , ppm)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6
4 β Glc (A)	103.27 4.75	74.47 3.28	75.24 3.60	80.08 3.53	75.58 3.43	61.88 3.78-3.90
4 β ManpA (B)	100.68 4.68	71.03 3.98	72.84 3.66	79.11 3.85	76.54 3.75	175.69
β Glc (C)	104.80 4.53	74.71 3.78	76.80 3.43	71.03 3.40	76.80 3.33	61.70 3.70-3.89
3,4 β Galp (D)	103.90 4.42	71.58 3.70	82.43 3.79	76.99 4.28	75.58 3.66	62.23 3.68

Les déplacements chimiques du carbone et du proton sont en accord avec l'existence d'unités hexopyranose. Les faibles constantes de couplage $^1J_{\text{C-1, H-1}}$ observées dans l'expérience HMQC (< 165 Hz), sans découplage ^{13}C , indiquent une configuration β anomérique pour les quatre résidus.

Sur le spectre 2-D ^{13}C - ^1H obtenu par HMBC (Heteronuclear MultiBond Correlation) de l'EPS KYGT207 déacétylé, on observe des couplages ^{13}C - ^1H intra-résiduels de doubles ou triples liaisons, ainsi que des connectivités inter résiduelles de triples liaisons au-dessus de la liaison glycosidique. Les liaisons β -ManpA-(1 $\rightarrow$ 4)- β -Glc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -Galp-(1 $\rightarrow$) sont déterminées par un pic croisé entre le H 1 du ManA (δ 4.68 ppm) et le C-4 du Glc (δ 80.08 ppm) et un pic croisé entre le H 1 de 4 du Glc (δ 4.75 ppm) et le C-4 du Gal (δ 76.54 ppm). Il existe une connectivité entre le H 1 du Gal (δ 4.42 ppm) et le C-4 du ManA (δ 79.11 ppm) suggérant une unité répétée de trois résidus sur la chaîne principale et d'un glucose sur la chaîne latérale. La présence de pic croisé entre le H 1 du second Glc (δ 4.53 ppm) et le C-3 du Gal (δ 82.43 ppm), indique que ce glucose de la chaîne latérale est branché sur la chaîne principale en position C-3 du résidu Gal. Sachant qu'il manque encore le positionnement des groupes O-acétylés, la structure proposée de l'EPS produit par *Rhizobium* sp. KYGT207 est la suivante :



5. Propriétés rhéologiques des EPS en solution

Les EPS microbiens présentent une grande diversité de structure et donc de propriétés. À l'état solide, nombre d'entre eux adoptent une structure secondaire en relation avec la structure primaire.

En solution, quand la conformation ordonnée est stabilisée, des propriétés rhéologiques intéressantes peuvent être observées. Celles-ci proviennent d'une rigidité importante des chaînes (caractère épaississant) et/ou de la possibilité de création d'un réseau tridimensionnel par connections interchaînes de zones ordonnées (propriétés gélifiantes).

Du fait que les EPS KYEGB2 et KYT15 sont tous deux des lévanes, nous avons décidé de n'en garder qu'un seul : il s'agit de l'EPS KYEGB2 sélectionné pour sa forte viscosité. L'EPS KYGT207 a été également retenu en raison de son originalité structurale, de son aspect de gel et de sa limpidité et transparence, caractères appréciés en milieu solide sur le moût bactérien et qui suggèrent une pureté de l'EPS. Ces deux caractéristiques font de ce polymère un bon candidat pour les études sur l'agrégation des sols (§ chapitres III et IV).

Dans le paragraphe qui suit, nous allons comparer les viscosités relatives (η_{rel}) des EPS KYGT207 et KYEGB2, à de faibles concentrations dans l'eau, en fonction du gradient de cisaillement (γ).

5.1. Détermination de la viscosité relative des EPS

La viscosité relative demeure l'une des propriétés rhéologiques les plus intéressantes pour caractériser les polysaccharides, pour des applications diverses. Elle permet aussi de connaître le comportement de ces polymères en solution. Cette propriété est liée à un certain nombre de paramètres, comme la concentration, la masse molaire du polymère, la structure, le gradient de vitesse, l'agrégation des macromolécules, la flexibilité des chaînes, la température ainsi que les interactions avec le solvant.

La relation qui définit la viscosité est représentée par le rapport entre la contrainte de cisaillement (τ) et la vitesse de cisaillement (γ) :

$$\eta = \tau / \gamma$$

L'unité est en Pa.s = 10 Poise (Po).

Si la viscosité d'un fluide est indépendante des forces de cisaillement, ce qui signifie qu'une application progressive de la vitesse de cisaillement (γ) provoque une augmentation linéaire de la tension de cisaillement (τ), ce fluide a un **comportement newtonien**.

Dans notre cas, nous avons mesuré la viscosité relative des EPS par rapport à celle du solvant.

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_o \quad \begin{array}{l} \eta_{rel} : \text{viscosité relative du polymère} \\ \eta_o : \text{viscosité du solvant} \end{array}$$

5.1.1. Comparaison des viscosités relatives des deux polymères dans l'eau

En régime newtonien, la viscosité étant indépendante des forces de cisaillement, une augmentation progressive de la vitesse de cisaillement (γ) provoque une augmentation linéaire de la tension de cisaillement (τ), ce qui se traduit par un plateau sur la courbe $\log(\eta_{\text{rel}}) = f \log(\gamma)$.

La Figure 58 montre qu'en général, la viscosité est indépendante des forces de cisaillement. De ce fait, une augmentation progressive de la vitesse de cisaillement (γ) provoque une augmentation linéaire de la tension de cisaillement (τ). Il s'agit donc d'un

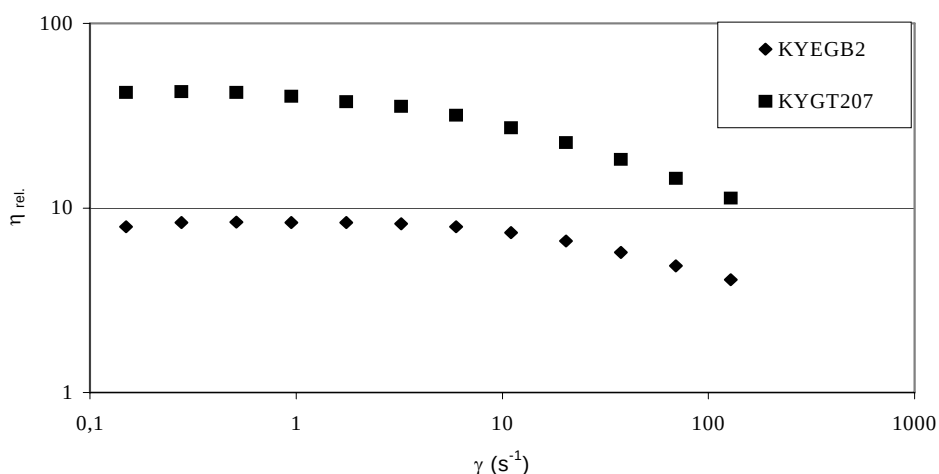


Figure 58. Viscosités relatives à l'eau des EPS KYEGB2 et KYGT207 .

Température 25 °C, concentration en EPS : 0,5 g.l⁻¹ .

comportement newtonien, matérialisé pour chacune des solutions par un plateau.

Les viscosités relatives des EPS KYGT207 et KYEGB2, à faible concentration (0,5 g.l⁻¹) dans l'eau, sont toutes les deux élevées. Il est cependant important de noter que l'EPS KYGT207 se démarque par une viscosité relative plus importante que celle de KYEGB2. C'est un résultat attendu car l'EPS KYEGB2 est un lévane dont la viscosité est connue pour être faible.

5.1.2. Effet de la température sur la viscosité

La température peut avoir un effet important sur la conformation moléculaire des EPS. C'est ainsi que, pour un polysaccharide présentant une structure ordonnée avec une température de transition T_m , un traitement thermique au-dessus du T_m induit un changement

de conformation pour l'EPS avec passage d'un état ordonné (simple ou multi hélice) à un état désordonné. Ce comportement étant généralement réversible.

Dans cette partie du travail, nous nous sommes seulement intéressés à l'effet de deux températures (50 °C et 105 °C) sur la viscosité relative des EPS KYGT207 et KYEGB2 dans l'eau. Le témoin étant représenté par la viscosité relative à 25 °C.

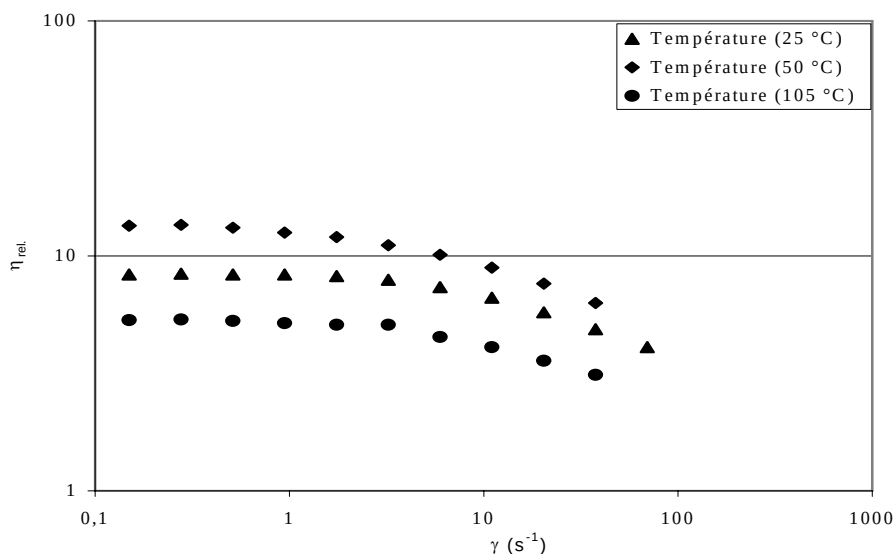


Figure 59. Influence de différentes températures (25, 50 et 105 °C) sur la viscosité relative à l'eau de l'EPS KYEGB2.

Concentration en EPS : 0,5 g.l⁻¹.

Sur le plateau newtonien, les solutions d'EPS chauffées pendant une heure (à 50°C et 105°C) montrent des différences de viscosité relative en fonction de la température de traitement (Fig. 59 et 60). La variation entre 25 et 50 °C peut laisser supposer un changement de conformation. L'écart enregistré entre 50 et 105 °C n'est quant à lui pas vraiment significatif et la remontée de viscosité n'est sans doute due qu'à une concentration de la solution par évaporation.

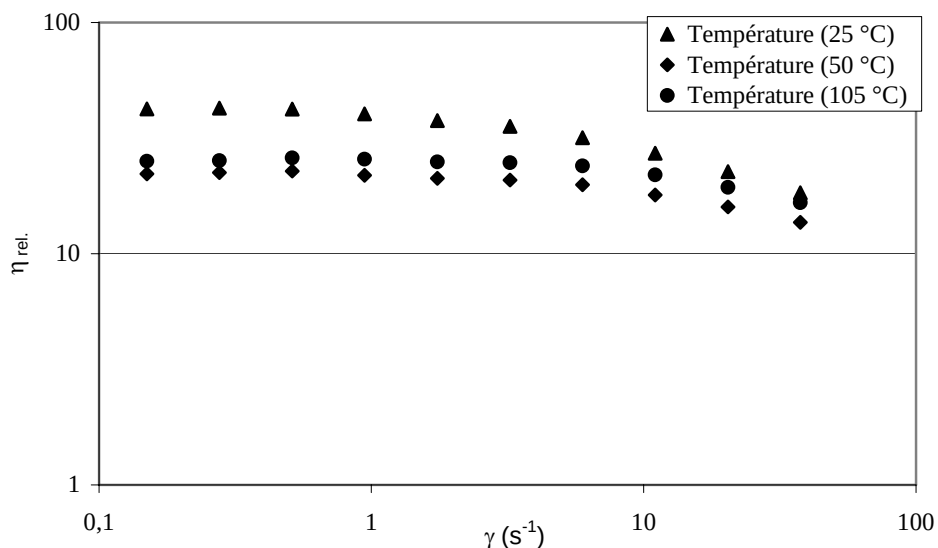


Figure 60. Influence de différentes températures (25 °C, 50°C et 100 °C) sur la viscosité relative à l'eau de l'EPS KYGT207.

Concentration en EPS : 0,5 g.l⁻¹.

L'effet de la température (50 °C ou même 105 °C) diminue légèrement la viscosité relative de l'EPS KYGT207 par rapport au témoin. Celle-ci reste toujours supérieure à celle de l'EPS KYEGB2. En effet, après un traitement à 105 °C pendant 1h, la viscosité relative de l'EPS KYGT207 se situe à un niveau supérieur à celle de l'EPS KYEGB2 à température de 25 °C (témoin).

Par ailleurs, la résistance de ces EPS à des températures aussi élevées laisse entrevoir des applications intéressantes dans le domaine de la structuration des sols sahariens.

5.1.3. Effet de différents polyélectrolytes sur la viscosité relative

Lors de la solubilisation d'un polymère, l'existence d'une conformation ordonnée va dépendre des conditions de milieu. En règle générale, de la température et de la nature du solvant et pour les EPS chargés (polyélectrolytes), de la force ionique, du pH et de la nature des ions compensateurs. Dans le cas des polyélectrolytes, les propriétés en solution dépendent aussi étroitement du paramètre de charge qui impose la distribution des ions compensateurs (Rinaudo et Milas, 1987; Gravanis *et al.*, 1990). À ce stade de notre travail, nous avons retenu l'EPS KYGT207 pour son caractère épaississant et la présence dans sa structure de l'acide mannuronique qui en fait un polyélectrolyte.

Nous nous sommes intéressés à la détermination de la viscosité relative de l'EPS KYGT207, dans différents électrolytes : NaCl (0,1 M), HCl (0,1 M), CaCl₂ (0,1 M) (Fig. 61).

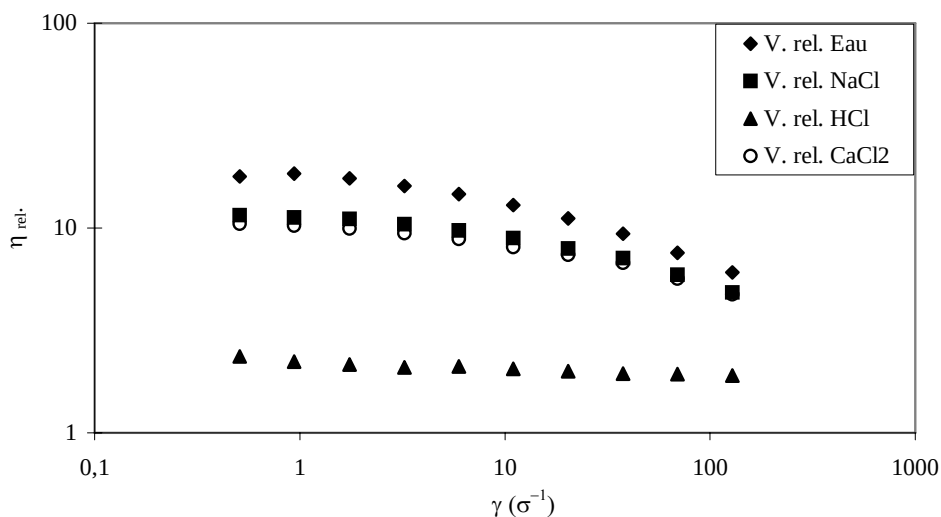


Figure 61. Viscosité relative en fonction du gradient de cisaillement dans l'eau, le NaCl, le CaCl₂ et l'HCl de l'EPS KYGT207 à 25 °C.

La concentration EPS = 0.5 g.l⁻¹, en sels = 0,1 M.

Dans tous les cas, un plateau newtonien n'est observé que pour les faibles forces de cisaillement ($< 1 \text{ s}^{-1}$). La diminution de viscosité observée en présence de sels (NaCl et CaCl₂) est normale, compte tenu du caractère polyélectrolyte du polymère, elle correspond à un phénomène "d'écrantage" qui conduit à une diminution de la rigidité de la chaîne. Par contre, il y a peu de différence entre l'effet d'un cation monovalent (Na⁺) et celui d'un divalent (Ca⁺⁺).

En revanche, l'acide chlorhydrique à 0,1 M induit une réduction très importante de la viscosité relative, probablement liée à la faible dissociation de la fonction carboxylique de l'acide mannuronique en milieu acide fort.

L'utilisation de logiciel de simulation CS chem 3D appartenant au chemoffice ultra 6.0 implémenté du MOPAC (Molecular Orbital Pack) et du GAMESS (General Atomic Molecular Electronic Structure System), nous permet d'apprécier le comportement du polymère KYGT207 en présence de polyélectrolytes, en particulier l'ion bivalent Ca⁺⁺. En effet, les méthodes de simulation utilisant des banques de données puissantes permettent de visualiser les modifications structurales du polymère KYGT207 générées dans notre cas par la présence d'ions Ca⁺⁺.

Par comparaison à la structure de l'EPS natif KYGT207 dans l'eau (Fig. 62), en présence d'ions Ca⁺⁺, nous observons de nombreuses liaisons hydrogènes (mentionnées en violet) qui s'établissent entre d'une part « les ions Ca⁺⁺ » et « **B** » d'autre part. Ceci conduit à des modifications structurales de l'EPS KYGT207, laissant apparaître un réseau plus dense du polymère. Les nombreuses liaisons hydrogènes (représentées en violet) correspondent à des zones de forte hydrophobicité (Fig. 63). Celle ci peut être liée à la capacité d'adhésion des bactéries à des supports solides, qui est proportionnelle à l'hydrophobicité (Sanin *et al.*,

2003). Nous pouvons conclure que l'action des cations Ca^{++} , engendre un phénomène « d'écrantage », déjà évoqué pour expliquer la légère diminution de la viscosité relative.

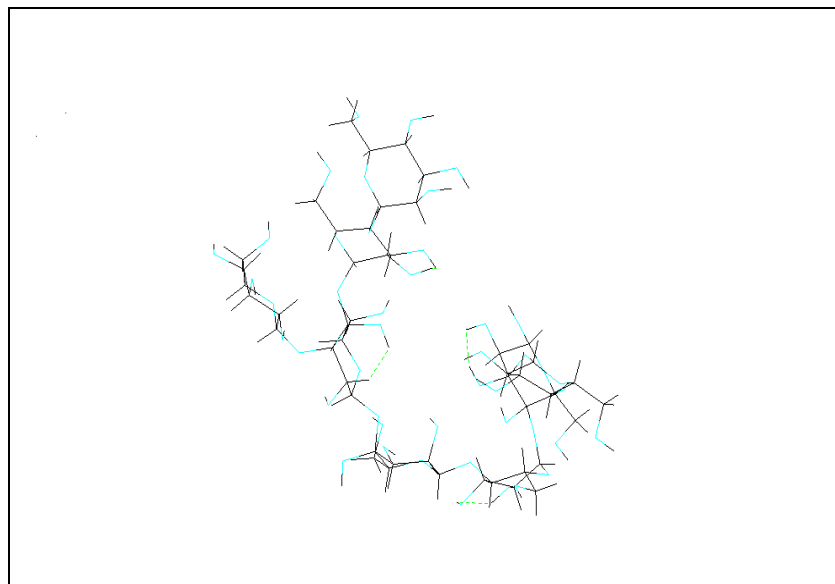


Figure 62. Structure 3D de l'EPS KYGT207 dans l'eau

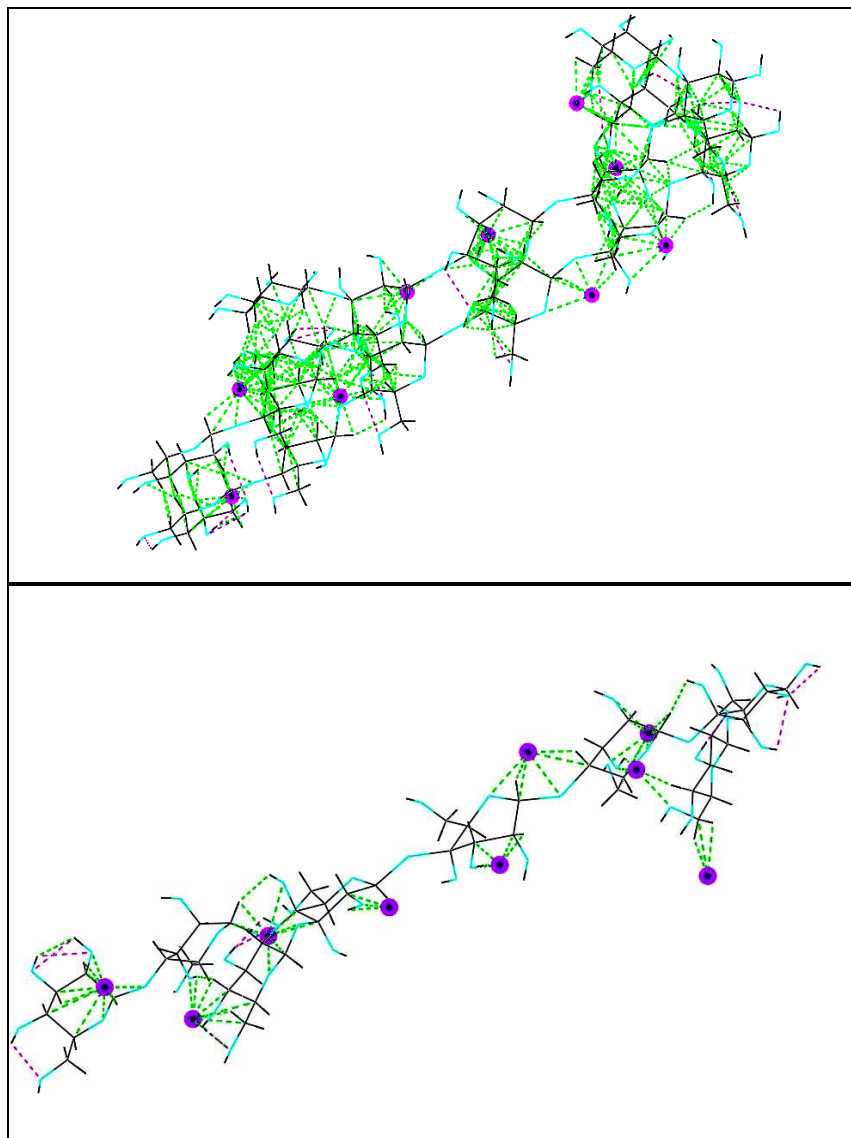


Figure 63: Représentation 3D de la simulation de l'effet des cations bivalents (Ca^{++}) sur la structure de l'EPS KYGT207.
Ces images sont obtenues en utilisant le logiciel de simulation (CS chem 3D).

6. Discussion

De nombreuses bactéries sont maintenant connues pour produire des exopolysaccharides avec une gamme très large de structure moléculaire (Hebbar *et al.*, 1992 ; et une référence plus récente). Le monde bactérien constitue ainsi un réservoir de bactéries productrices d'EPS, dont la diversité peut avoir des applications dans de nombreux domaines : agronomique, alimentaire, pharmaceutique etc...

Les polysaccharides extracellulaires produits par les microorganismes, constituent une classe à part en raison de leur mode de biosynthèse et leur structure chimique souvent complexe et originale.

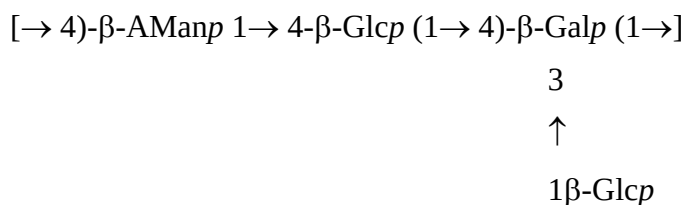
Les techniques d'analyse comme la CPG ou l'HPLC constituent des outils complémentaires intéressants, qui apportent des renseignements sur les monomères entrant dans la composition de l'unité de répétition.

Les EPS KYEGB2 et KYT15 sont constitués d'une unité de répétition avec un seul type d'unité osidique (fructose). Ils appartiennent donc à la classe des homopolysaccharides et sont définis comme étant des fructanes (lévanes).

Cette structure n'est pas surprenante, puisque la majorité des EPS produits par les bactéries appartenant aux genres *Paenibacillus* et *Bacillus* produisent ce type d'EPS. Le lévane n'est pas spécifique des genres bactériens *Paenibacillus* et *Bacillus* (Meng et Futterer, 2003), et a été décrit chez d'autres espèces bactériennes *Aerobacter levanicum* (Leibovici *et al.*, 1980 ; Stark et Leibovici, 1986), *Zymomonas mobilis* (Calazans *et al.*, 2000 ; Yoo *et al.*, 2004) et des souches appartenant aux genres *Erwinia* (Bennett et Billing, 1980) et *Pseudomonas* (Fett *et al.*, 1989). Les lévanes sont produits essentiellement à partir de saccharose, leur synthèse nécessite la présence d'une enzyme, la lévane sucrase (Gross *et al.*, 1989), sécrétée à l'extérieur de la cellule : la synthèse du lévane est donc extracellulaire.

Les industriels accordent peu d'intérêt à cette famille de polysaccharides. En effet, la majorité de ces polymères ne présentent pas d'intérêt particulier, puisqu'ils ne sont pas connus pour être dotés de propriétés viscosifiantes ou gélifiantes. De ce point de vue, l'EPS KYEGB2 est particulier, en raison de sa viscosité élevée. C'est ce qui a motivé le choix de ce polymère pour la suite du travail. La détermination de sa structure n'est pas totalement résolue. Nous avons émis l'hypothèse que l'EPS KYEGB2 était en réalité composé de deux polymères : l'un majoritaire et identifié comme un lévane et un autre minoritaire, dont la structure n'a pas été résolue et qui serait responsable de la viscosité relative élevée de l'EPS KYEGB2.

La structure de l'EPS KYGT207 est plus complexe. L'apport de la RMN haute résolution, technique essentielle pour l'étude de structures complexes, nous permet de proposer pour l'EPS KYGT207 une unité de répétition ramifiée constituée de 4 monomères (1 acide mannuronique, 2 glucoses et 1 galactose). Les différentes méthodes d'analyse ont abouti à la structure suivante :



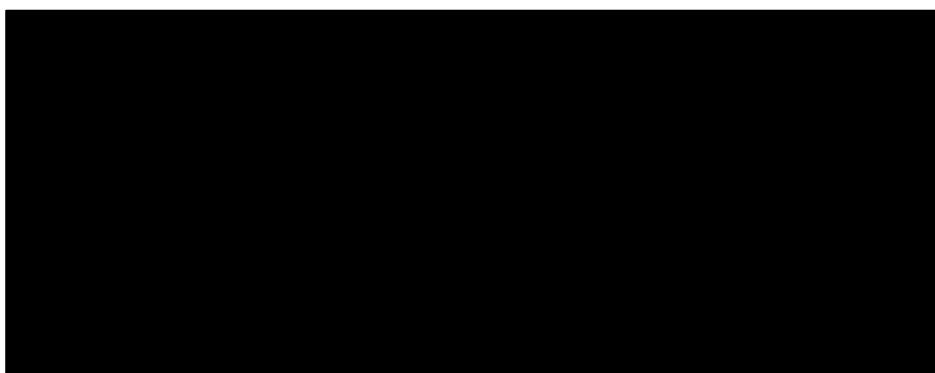
L'EPS KYGT207 natif est acétylé et sa forte viscosité relative est due à la présence de groupements O-acétyls que nous avons mis en évidence grâce à la RMN ^1H . De nombreux substituants, tels que le groupement pyruvyl ou les O-acétyls, présents dans le xanthane par exemple, contribuent aux propriétés texturantes de ce polysaccharide. Par ailleurs, sa désacétylation provoque une diminution de 30 % de sa viscosité (Rougeaux *et al.*, 1998).

À notre connaissance, cette structure n'a pas été décrite dans la littérature et les banques de données consultées. L'une des particularités de cette structure réside dans la présence de l'acide mannuronique.

L'originalité de sa structure et sa viscosité élevée à faible concentration ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$) font de l'EPS KYGT207 une molécule particulièrement intéressante pour l'agrégation du sol rhizosphérique.

Par ailleurs, la proximité génétique des espèces productrices d'exopolysaccharides n'est pas un critère pouvant définir la nature des exopolysaccharides synthétisés.

Dans la famille des *Rhizobiaceae* par exemple, même si la majorité des EPS produits sont des hétéropolysaccharides, en particulier des succinoglucanes (Aman *et al.*, 1981 ; Jansson *et al.*, 1977) certaines espèces synthétisent des homopolysaccharides. Les EPS synthétisés par les souches *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Rhizobium* sp. YAS34 (Alami *et al.*, 2000), très proches génétiquement, présentent des structures très différentes. En effet, *Rhizobium* sp. YAS34 produit un EPS dont l'unité de répétition est constituée de glucose et de galactose dans un rapport de 4/3, avec des substitutions dont un pyruvate et de nombreux acétates. Sa structure est la suivante :



Lors de la solubilisation d'un polysaccharide, sa conformation ordonnée peut être préservée, déterminant ainsi sa stabilité. Celle-ci dépend étroitement des conditions environnementales comme la température la nature du solvant, sa force ionique ou son pH, avec des incidences sur les propriétés rhéologiques.

Le comportement des polymères en solution représente donc une caractéristique importante que l'on peut évaluer grâce à des mesures rhéologiques (Gravanis *et al.*, 1990 ; Milas et Rinaudo, 1997).

L'EPS KYGT207, à faible concentration (0,5 g.l⁻¹), présente un niveau de viscosité relativement élevé, dans des conditions électrolytiques différentes (eau, NaCl, NaCl₂ et HCl). Sa viscosité est comparable à celle du xanthane, considéré comme un polymère très visqueux en solution aqueuse et en solutions d'électrolytes (Milas et Rinaudo, 1990).

La stabilité de la viscosité dans ces conditions représente une caractéristique rhéologique intéressante qui laisse envisager pour l'EPS KYGT207, une grande diversité d'applications avec un potentiel dans le domaine agronomique. De plus, sa remarquable limpidité observée sur milieu solide, représente une caractéristique intéressante qui relève de la pureté de cet EPS.

La viscosité élevée de l'EPS KYGT207 laisse entrevoir une importante capacité de rétention d'eau. De plus son caractère électronégatif peut retenir des cations tels que Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Na⁺ et K⁺. Rapportés à la rhizosphère du blé dur, ces résultats peuvent avoir des incidences physiologiques intéressantes, notamment l'amélioration de la rétention d'eau ainsi qu'une augmentation de la capacité d'échange cationique du sol. En effet, ces deux paramètres représentent des éléments essentiels à la nutrition des plantes et des bactéries.

Il est intéressant de noter que les deux souches produisant les deux EPS retenus, un *Rhizobium* sp. pour l'EPS KYGT207 et un *Paenibacillus* sp. pour l'EPS KYEGB2 proviennent toutes deux de régions sahariennes, respectivement de Gassi Touil et d'El Goléa. Aussi, l'analyse de ces résultats, nous conduit à nous poser cette question : les EPS KYGT207 et KYEGB2 ne présentent-ils pas des caractéristiques induites par les conditions pédoclimatiques extrêmes de cet environnement, pouvant avoir des propriétés complémentaires ?

Comme nous l'avons déjà évoqué, les EPS bactériens présentent diverses fonctions, dont la protection contre différents stress, qu'ils soient hydriques, osmotiques ou ioniques. Dans ces régions arides, les bactéries sont souvent soumises à des contraintes hydriques liées aux conditions climatiques, et parfois même ioniques, dans le cas des sols salés, mais aussi à des amplitudes thermiques importantes. De ce fait, les bactéries développeraient des mécanismes de protections dont la production d'EPS. La nature même de ces EPS pourrait subir des modifications liées à leur adaptation au contexte pédo-climatique local. De plus, la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 isolée dans la région de Gassi Touil (étage bioclimatique aride moyen à hiver tempéré) présente deux particularités : l'une taxonomique (cf. Chapitre I), l'autre liée à la structure originale de l'EPS qu'elle produit.

7. Conclusion

En résumé, la combinaison de techniques chromatographiques (HPLC, CPG) et de la résonance magnétique nucléaire (RMN) nous ont permis de conclure que les deux EPS KYT15 et KYEGB2, appartiennent à une même famille de polysaccharides, les lévanes. Ce résultat nous a conduit à la sélection d'un seul polymère KYEGB2 qui présente le meilleur niveau de viscosité.

Les lévanes ou **fructanes** sont constitués d'unités de fructose enchaînées par des liaisons β-2,6, le saccharose servant d'amorce.

L'originalité de la structure de l'EPS KYGT207, ainsi que sa forte viscosité relative voisine de celle du xanthane, même à des températures élevées (100°C), en font un bon candidat pour l'amélioration de l'agrégation du sol rhizosphérique.

La souche bactérienne *Rhizobium* sp. KYGT207 qui synthétise ce polymère, présente une autre particularité. Sa présence relativement abondante dans la rhizosphère du blé dur dans la région de Gassi Touil, laisse supposer un caractère endémique de cette souche.

Par ailleurs, la majorité des EPS produits par les souches de *Rhizobium* et constituant les banques de données, sont isolés à partir de nodosités de légumineuses. La souche *Rhizobium* sp. KYGT207 isolée directement à partir de sol rhizosphérique peut expliquer non seulement la distance génétique entre cette souche et les autres *Rhizobium* (cf. Chapitre I), mais aussi l'originalité de la structure chimique et les propriétés rhéologiques remarquables de l'EPS qu'elle produit.

Chapitre III

Effets des EPS bactériens (KYEGB2 et KYGT207) sur les propriétés physiques du sol

La matière organique est intimement impliquée dans les phénomènes d'agrégation ; elle sert de ciment entre les particules minérales (argiles, limons et sables) et entre les agrégats eux-mêmes pour constituer la structure du sol. La formation des agrégats dans le sol dépend également de nombreux facteurs physico-chimiques, de la granulométrie, de la nature des argiles et de l'état de saturation du complexe colloïdal.

Le fractionnement de la matière organique conduit à distinguer principalement des molécules comme les polysaccharides, les acides fulviques, les acides humiques, l'humine et la lignine. Ces fractions sont caractérisées par leur nature et surtout par leur poids moléculaire, déterminant le degré de polymérisation.

Les polysaccharides sont responsables en grande partie de la stabilité des jeunes agrégats, alors que les acides humiques, l'humine et la lignine renforcent la stabilité structurale d'agrégats plus vieux. Les polysaccharides microbiens contribuent donc à organiser et stabiliser les agrégats. La mise en évidence de l'implication des polysaccharides microbiens dans le phénomène d'agrégation du sol remonte aux années 1940 (Geoghegan et Brian, 1946). Plus tard, Guckert *et al.* (1975) ont établi une corrélation positive entre la teneur en polysaccharides et la stabilité structurale des sols, sans préciser l'origine de ces polymères (origine microbienne ou végétale).

Les exopolysaccharides (EPS) sont produits aussi bien par des bactéries à Gram+ que par les Gram-, cependant leur mode de synthèse diffère. De nombreuses bactéries sont concernées par cette synthèse ; nous citerons à titre d'exemple les genres *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Xanthomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium* (Hebbar *et al.*, 1992)

Parmi les bactéries productrices d'EPS c'est le genre *Rhizobium* qui a été le plus étudié, probablement en raison de l'intérêt accordé par de nombreux auteurs à l'association symbiotique qu'il entretient avec les légumineuses.

1. Détermination de la rétention d'eau des moûts bactériens

La détermination de la rétention d'eau des moûts bactériens produit sur milieu solide, en boîte de Petri, nous renseigne sur la capacité de rétention d'eau d'une culture bactérienne composée essentiellement des EPS et les corps cellulaires. Cette approche obéit à une logique d'inoculation au champ des bactéries productrices d'EPS et traduirait avec une certaine fidélité, ce qui se passe dans la rhizosphère.

1.1. Composition relative (biomasse cellulaire-EPS)

Avant d'entamer l'évaluation de la capacité de rétention en eau des moûts bactériens, il nous paraît primordial d'en déterminer la composition relative en biomasse cellulaire et en polysaccharides bactériens.

Les moûts bactériens produits par deux souches sélectionnées : *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207 sont obtenus sur milieu RCV-saccharose solide, après 8 j d'incubation. Contrairement au milieu de « croissance » ou de prolifération, le milieu de « production d'EPS » RCV-Sac est caractérisé par une teneur élevée en saccharose (20 g.l⁻¹) et une concentration en extrait de levure relativement faible (100 mg.l⁻¹) afin d'atteindre un rapport C/N élevé.

Les résultats relatifs aux rapports « EPS/Biomasse » sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau XXV. Détermination du rapport EPS/biomasse des moûts bactériens. Production des EPS pendant 8 j à 30 °C sur milieu solide contenant du saccharose (20 g.l⁻¹).

Souche bactérienne	EPS /Biomasse
<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2	9.1 ± 0.9
<i>Rhizobium</i> sp. KYGT207	14.4 ± 2.5

Ce rapport montre que globalement, après 8 j d'incubation à 30 °C sur milieu RCV-Sac solide, la teneur en EPS des moûts bactériens KYEGB2 et KYGT207 est nettement plus importante que celle de la biomasse. C'est ainsi que le moût KYGT207 est composé d'une quantité d'EPS équivalente à plus de 14 fois celle de sa biomasse cellulaire, alors que le moût KYEGB2 n'en contient que 9 fois plus (Tableau XXV).

À titre de comparaison, les mêmes rapports obtenus en milieu liquide (Cf. Chapitre II) montrent des valeurs plus faibles (5,8 pour KYEGB2 et 8 pour KYGT207).

Il semblerait donc que le milieu liquide favorise moins la production d'EPS, par rapport au milieu solide, même si dans les deux expériences le flux d'énergie, constitué par le substrat carboné (saccharose, 20 g.l⁻¹), est orienté essentiellement vers la production d'EPS.

1.2. Détermination de l'humidité des moûts bactériens

La détermination de l'humidité des moûts bactériens KYEGB2 et KYGT207 constitue une première approche, nous permettant de comparer leur capacité de rétention d'eau.

Cette partie du travail est aussi justifiée par le fait que, dans l'environnement naturel, comme la rhizosphère du blé dur dans le cas présent, ce sont les bactéries entourées de leur EPS (association bactéries - EPS) qui interviennent dans la modification des propriétés physiques du sol, même si l'on considère que l'EPS constitue l'élément essentiel de la rétention d'eau.

Les moûts testés ont été récupérés directement sur les boîtes de Petri contenant du saccharose (20 g.l^{-1}) et incubées pendant 8 j. Ils n'ont subi aucun traitement particulier : pas de purification des EPS, ni de dessiccation avant leur utilisation, d'où le terme de "moût brut".

Dans ces conditions expérimentales, les EPS bactériens produits en milieu solide ne sont pas à leur maximum de rétention d'eau, vu que l'eau disponible dans le milieu de culture (solide) constitue un facteur limitant. Cette approche permet donc une évaluation de la rétention d'eau des moûts bactériens KYEGB2 et KYGT207, d'un point de vue purement comparatif.

L'eau retenue par les moûts bactériens KYEGB2 et KYGT207 représente une proportion très importante des masses de matière fraîche (Fig. 64), estimée respectivement à 95,9 % et 97,3 %. À titre de comparaison, et dans les mêmes conditions, l'EPS YAS34 (Alami *et al.*, 2000) présente une capacité de rétention d'eau inférieure, estimée à 93,4 % de la masse du moût bactérien frais.

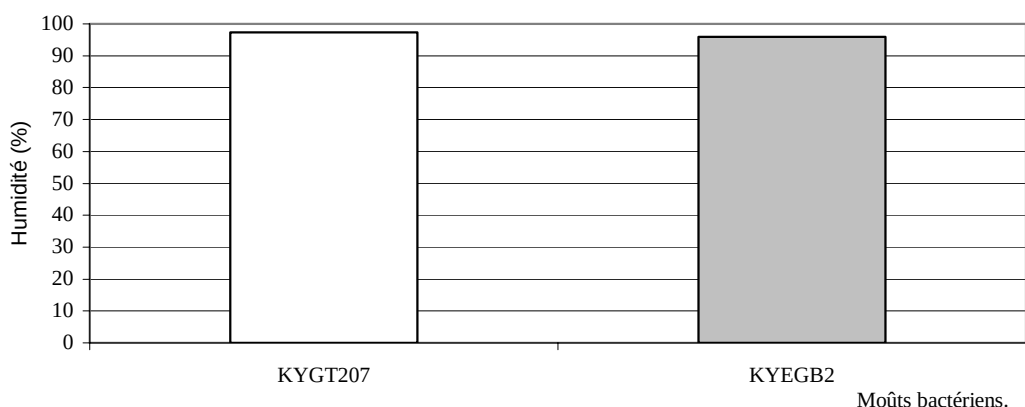


Figure 64. Humidité relative des moûts bactériens *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2.
Les pourcentages d'humidité sont exprimés par rapport aux poids frais des moûts.

Un deuxième mode d'expression des résultats, par rapport aux masses de matière sèche des moûts bactériens, nous permet une meilleure matérialisation des capacités de rétention d'eau. C'est ainsi que le moût produit par *Rhizobium* sp. KYGT207 se démarque de celui produit par *Paenibacillus* sp. KYEGB2 par un taux d'humidité plus important (Fig. 65).

Celui-ci, à l'état natif, retient une quantité d'eau représentant environ 36 fois sa masse de matière sèche, alors que le moût produit par *Paenibacillus* sp. KYEGB2 n'en retient que 24 fois sa masse de matière sèche. La teneur en eau dans le milieu de culture ne permettant pas un état de saturation des moûts, celle-ci ne peut traduire une capacité de rétention d'eau optimale.

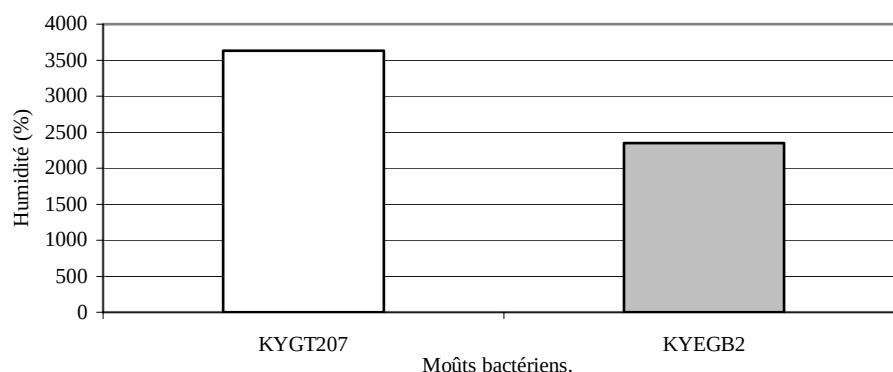


Figure 65. Humidité relative des moûts bactériens *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2. Les pourcentages sont exprimés par rapport aux poids secs des moûts. Les moûts sont obtenus sur RCV-sac solide après 8 jours d'incubation à 30 °C.

C'est donc à titre comparatif que nous pouvons dire qu'il est intéressant de noter que le moût produit par *Rhizobium* sp. KYGT207 permet une rétention d'eau 1,5 supérieure à celle permise par le moût KYEGB2.

2. Les polysaccharides purifiés

Les EPS produits par les souches *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207, sont purifiés (Cf. Matériel et Méthodes) pour en évaluer la capacité de rétention d'eau.

2.1. Détermination de la capacité de rétention en eau

Si la détermination de l'humidité des moûts bactériens ne traduit pas exactement la capacité de rétention d'eau des EPS, elle constitue cependant un élément d'appréciation rapide pour un "screening" des EPS bactériens. De plus, elle peut constituer un élément d'appréciation important, mettant en évidence l'impact des EPS bactériens, lors de l'inoculation de ces bactéries dans la rhizosphère du blé dur (Cf. Chapitre IV).

Dans cette expérience, nous avons utilisé les **EPS purifiés** que nous avons saturés en eau. Nous avons tenu à maintenir une viscosité apparente des EPS. Après une nuit d'incubation, les échantillons, au demeurant très visqueux, sont prélevés puis séchés à 100°C.

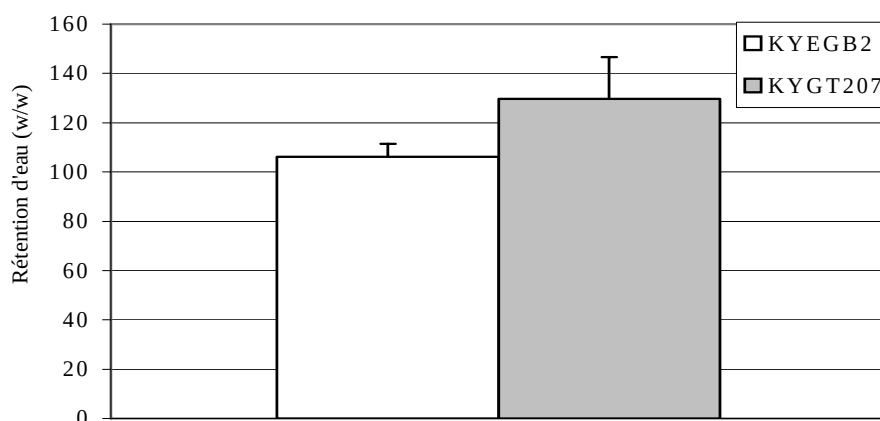


Figure 66. Evaluation de la capacité de rétention d'eau des EPS **purifiés** KYGT207 et KYEGB2.

Les deux **EPS purifiés** possèdent une capacité de rétention en d'eau importante (exprimée en masse d'eau par unité de masse de matière sèche de l'EPS) (Fig. 66). Nous notons que ces deux EPS retiennent des masses d'eau 100 fois supérieures à celle de leur masse de matière sèche. L'EPS KYGT207 se distingue par une capacité de rétention d'eau plus importante, équivalente à environ 130 fois sa masse de matière sèche (Fig. 66).

Nous rappelons que, même si l'évaluation de l'humidité des moûts bactériens ne traduit pas fidèlement la capacité de rétention d'eau des EPS, cette approche demeure cependant intéressante, puisque le classement établi en utilisant les moûts bactériens est identique à celui que nous venons de déterminer avec les EPS purifiés. D'autre part, si nous comparons les rapports de la capacité de rétention d'eau des deux EPS, dans les deux conditions (moûts bactériens et EPS purifiés) produits par les deux souches : *Rhizobium sp.* KYGT207 et *Paenibacillus sp.* KYEGB2, nous remarquons qu'ils sont très proches : 1,5 pour les moûts (Fig. 65) et 1,3 pour les EPS purifiés (Fig. 66). Cette observation montre que l'essentiel de la rétention d'eau dans les moûts bactériens est donc le fait essentiellement des EPS.

2.2. Cinétique de perte en eau à 105 °C

Nous avons montré précédemment que les EPS utilisés présentaient un pouvoir de rétention d'eau très important. Il nous a semblé intéressant, dans cette partie du travail, de suivre la cinétique d'évaporation des EPS remis en solution, dans les mêmes conditions expérimentales. C'est ce que nous appellerons, dans la suite du document, la **perte en eau**.

Pour réaliser une telle expérience, il est très important de laisser séjourner l'EPS en contact de l'eau toute une nuit, pour faciliter sa remise en solution, de manière à ce que l'EPS réagisse avec le maximum de molécules d'eau. La concentration des EPS est fixée arbitrairement à 1%.

Le « témoin » est ici représenté par une masse d'eau équivalente à la masse des échantillons « EPS en solution ».

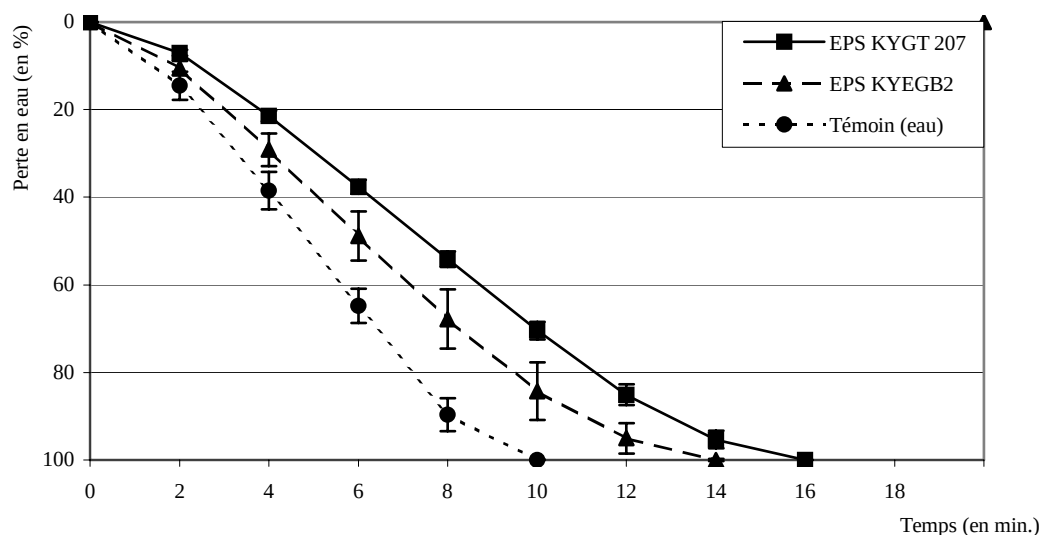


Figure 67. Cinétiques de dessiccation à 105°C des EPS KYGT207 et KYEGB2 .

Les EPS sont préparés dans de l'eau distillée à une concentration de 1 %

Les courbes de dessiccation des deux EPS remis en solution présentent la même allure (Fig. 67). Nous pouvons ainsi distinguer 3 phases :

- Une **première phase** de dessiccation lente : comprise entre 0 et 2 min et qui correspond au réchauffement progressif des EPS. En effet, lors de cette étape, la température des échantillons traités passe de la température ambiante (en moyenne 25 °C) à une température de 105 °C (température de dessiccation). Lors de cette phase, la lenteur du phénomène d'évaporation ne traduit en aucun cas des forces de liaison importantes des molécules d'eau, mais elle est surtout liée à une lenteur de réchauffement des échantillons. Ces derniers atteignent donc la température de 105 °C après un temps inférieur ou égal à 2 min. La quantité d'eau perdue durant cette phase ne représente qu'environ 10 % et correspond probablement à une eau dont les forces de liaisons ne sont pas élevées.
- Une **deuxième phase** de dessiccation rapide : elle est comprise entre 2 et 10 min pour les 2 EPS. Elle correspond à une évaporation intense. Les quantités d'eau perdues durant cette phase sont variables selon l'EPS considéré. Elle varie entre 70 % pour l'EPS KYGT207 à 85 % pour l'EPS KYEGB2. Il semblerait que cette eau, relativement facile à extraire à une température de 105 °C, présente des forces de liaison plus faibles, par rapport à celles de la troisième phase, mais plus fortes que celles de la première phase.
- Une **troisième phase** de dessiccation lente : elle est comprise entre 10 et 16 min pour l'EPS KYGT207 et entre 10 et 14 min pour l'EPS KYEGB2. Elle traduit une légère réduction de l'évaporation de l'eau contenue dans les deux EPS. Il s'agirait donc de l'eau fortement liée aux polysaccharides.

Toutes ces variations de vitesses de dessiccation suggèrent donc des énergies de rétention d'eau différentes. C'est ainsi que dans la troisième phase, contrairement à la première, la réduction de l'évaporation traduit des forces de liaisons importantes entre les molécules d'eau et les EPS.

Nous noterons que cette dernière phase de dessiccation ne concerne qu'une faible proportion en eau, moins de 30 % de la totalité de l'eau retenue par les échantillons. (Fig. 67)

D'autre part, il est intéressant de rapporter ces forces de rétention des EPS sur un plan physiologique, matérialisé par les forces de succion des racines des plantes. En effet, dans cette troisième phase, l'énergie d'extraction de l'eau est supérieure aux forces de succion racinaire. L'eau retenue par les EPS (< 30%) est de ce fait probablement inutilisable par les plantes.

C'est pour l'ensemble de ces raisons que l'analyse des courbes portera essentiellement sur la portion correspondant à la deuxième phase (linéaire), où nous comparerons les pentes des différentes courbes. Il est aussi à remarquer que c'est à ce niveau que les écarts par rapport au « témoin » sont les plus importants. Ainsi, quand le témoin (eau) a perdu 80 % de sa masse, les EPS KYEGB2 et KYGT207 n'en ont perdu respectivement que seulement 60 % et 45 % (points indiqués par la flèche, Fig. 67). Ceci implique un retard important dans l'évaporation de l'eau pour les 2 EPS étudiés.

Il apparaît donc que les forces de rétention mises en jeux par l'EPS KYGT207 semblent plus importantes que celle de l'EPS KYEGB2. Celles-ci sont exprimées par la valeur des pentes des différentes courbes. La réduction de l'évaporation de l'eau inhérente à la présence de l'EPS KYGT207 est de l'ordre de 35 %, alors qu'elle représente environ 20 % pour l'EPS KYEGB2. Quand il n'y a plus d'eau dans l'échantillon témoin ($T_0 + 10$ min), il reste 15 % et 30 % d'eau respectivement dans l'EPS KYEGB2 et KYGT207 (Fig. 67).

Comme nous le verrons plus loin, cela pourrait se traduire sur le terrain, par des économies d'eau appréciables, notamment dans les régions caractérisées par une rareté des ressources hydriques, une forte évaporation ou encore un lessivage intense dû à la texture sableuse. Cette somme de paramètres limite considérablement la rétention d'eau. Cette situation se retrouve dans les sols sahariens qui représentent près de 80 % des sols algériens.

3. Les EPS en association avec les sols

Après avoir montré que les EPS KYEGB2 et KYGT207 présentent des capacités de rétention d'eau « intrinsèques » importantes, nous nous proposons dans la suite du document, d'évaluer l'impact de ces EPS **en association avec des sols** sur la rétention d'eau.

Pour la réalisation de cette expérience, nous avons retenu trois sols : un sol argileux provenant de la station agronomique de Oued Smar, ainsi que deux sols sableux provenant des régions d'El Goléa et de Tamanrasset.

Les critères que nous avons utilisé pour sélectionner ces sols, reposent sur leurs propriétés physiques et chimiques très contrastées. En effet, le sol de la station agronomique de Oued Smar est utilisé pour des essais d'introduction de semences de céréales notamment blé dur (*Triticum durum* L.) et blé tendre (*Triticum aestivum* L.), dans le cadre d'un programme initié par le ministère de l'agriculture. C'est un sol argileux présentant une structure élaborée et une stabilité structurale importante. Pour les deux autres sols, nous avons jugé utile de nous situer dans des conditions extrêmes, en utilisant des sols à texture sableuse, n'ayant aucune structure apparente (El Goléa et Tamanrasset) et ne se différenciant que par la granulométrie des sables (Tableau XXVI). Dans ces deux contextes contrastés, nous avons voulu évaluer les effets des EPS bactériens sur la rétention d'eau et la stabilité structurale.

Tableau XXVI. Principales caractéristiques pédologiques des sols étudiés.

Analyses	Tamanrasset	El Goléa	ITGC
Texture	S	S	A
Structure	Particulaire	Particulaire	Massive polyédrique
pH (eau)	8	8,1	7,7
Carbone (%)	Traces	0,07	0,9
Matière organique (%)	/	0,12	1,5
Azote total (%)	Traces	0,001	0,05
Rapport C/N	/	70	18
C.E.C. (méq./100 g de sol sec)	nd	nd	12

S : texture sableuse

A : texture argileuse

nd : non déterminé

Le sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC) se caractérise par une teneur en argile relativement élevée, lui conférant une texture argileuse (triangle de texture USDA). Les taux de carbone organique et d'azote combiné sont faibles, même s'ils restent supérieurs à ceux observés dans les sols d'El Goléa et de Tamanrasset. Son pH est proche de la neutralité et sa structure élaborée.

Par contre, les sols d'El Goléa et de Tamanrasset sont constitués essentiellement de particules sableuses, avec des teneurs en carbone organique et en azote total extrêmement faibles. Le pH est légèrement basique.

Tous ces résultats concordent avec la structure particulaire qui caractérise les sols d'El Goléa et de Tamanrasset sur le plan physique.

Tableau XXVII. Granulométrie des sols de la station agronomique de Oued Smar ITGC, de Tamanrasset et d'El Goléa.

Fraction granulométrique	Taille des particules	ITGC	Tamanrasset	El Goléa
Argiles (%)	< 2 μm	51,5	/	/
Limons (%)	2 - 50 μm	29,1	0,2	1.1
Sables (%)	50 - 2000 μm	19,4	99 ,8	98,9
Sables fins (%)	50 - 200 μm		91,1	74
Sables grossiers (%)	200 - 2000 μm		8,9	26

La composition granulométrique des sols des stations ITGC, El Goléa et Tamanrasset est différente. En effet, le sol de la station ITGC se caractérise par une teneur en argile élevée et un taux de sable relativement faible. Si les deux échantillons de sol (Tamanrasset et El Goléa) présentent une texture sableuse, ils diffèrent cependant par leurs teneurs en sables fins et sables grossiers. C'est ainsi que le sable de Tamanrasset présente une granulométrie beaucoup plus fine que celle d'El Goléa. (Tableau XXVII).

3.1. Cas d'un sol à texture argileuse et à structure élaborée (ITGC)

Le sol de la station ITGC de Oued Smar est utilisé comme sol de référence en raison de son utilisation pour des essais d'introduction de variétés de blé dur, de blé tendre et de fourrage.

3.1.1. Effet de différentes concentrations en EPS sur la rétention en eau (pF 2,7)

La rétention d'eau par les sols est étroitement liée à sa porosité. En fonction de l'état hydrique (aéré ou saturé), celle-ci peut être partiellement ou entièrement remplie par l'eau.

L'état énergétique de l'eau dans le sol est défini par son potentiel hydrique Ψ , représenté par la résultante de deux composantes :

- Ψ_g , le potentiel gravitaire qui permet l'infiltration des eaux de pluie par gravité,
- Ψ_m , le potentiel matriciel représentant la force de rétention de l'eau dans le sol par capillarité.

Le potentiel hydrique représente de ce fait la force de succion qu'exerce le sol sur l'eau par un effet capillaire.

À faible potentiel hydrique, la rétention d'eau par les macromolécules est surtout attribuée à l'adsorption d'eau par des liaisons hydrogène ou des interactions électrostatiques. À l'inverse, quand le potentiel hydrique est élevé, la rétention d'eau est le fait de forces capillaires existant dans de grandes structures tridimensionnelles.

Dans le cadre de l'étude de l'effet des EPS, nous avons soumis les échantillons de sol, préalablement saturés d'eau, à une surpression de 800 mbar, ce qui équivaut au pF 2,7 défini par Heller et coll. (1989) et qui correspond à l'eau retenue par un sol soumis à une centrifugation de 500 x g. Le pF représente l'expression logarithmique d'une pression ($\log_{10}500 = 2,7$). Nous noterons enfin que sur le plan physiologique, cette valeur représente la limite supérieure de la réserve utile en eau d'un sol, dont la limite inférieure est matérialisée par le pF 4,2 (point de flétrissement).

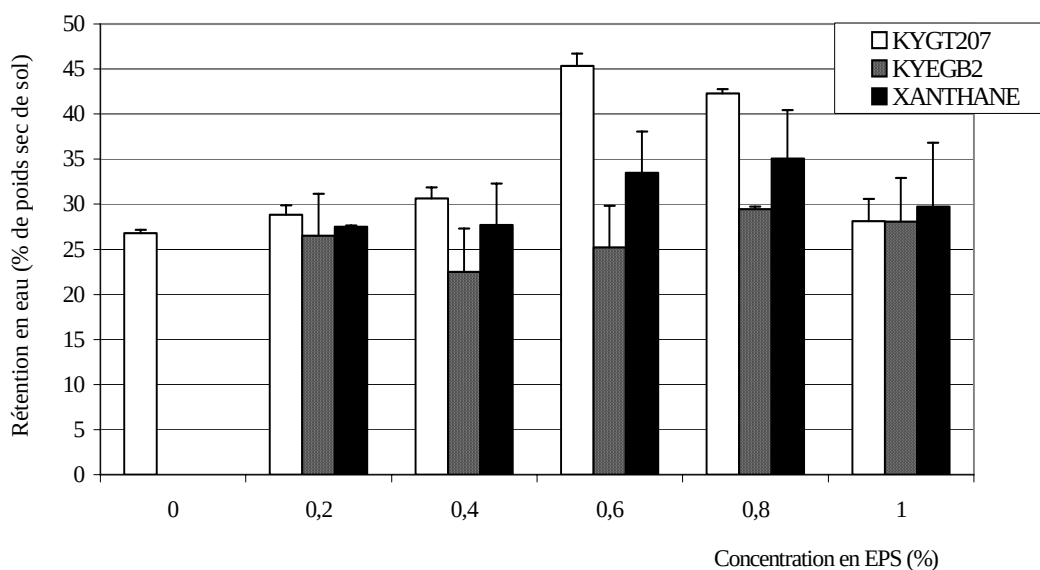


Figure 68, Effet de différentes concentrations en EPS sur la rétention d'eau du sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC), soumis à une pression de 800 mBars (pF 2,7).

L'analyse de l'effet des différentes concentrations en EPS bactériens montre que l'EPS KYEGB2 ne présente aucun effet significatif sur la rétention d'eau (en moyenne 25 % d'eau retenue, Fig. 68). Nous rappelons que ce polymère a été identifié comme un lévane. Ce type de polysaccharide est connu pour ses propriétés rhéologiques peu intéressantes, notamment celles concernant la viscosité et l'élasticité. Il semblerait que lors de la saturation des mélanges "sol-EPS", qu'une partie importante du lévane KYEGB2 ait été solubilisée dans l'eau et qu'il n'a de ce fait pas participé à la modification de la rétention d'eau du sol de la station agronomique ITGC.

La souche *Rhizobium sp.* KYGT207 produit un polymère qui apparaît très intéressant, puisqu'il augmente, de manière significative, la rétention d'eau, en particulier pour les concentrations en EPS comprises entre 0,6 % et 0,8 % (Fig. 68). Il est important de signaler que l'optimum de rétention d'eau se situe dans cette fourchette 0,6% – 0,8%. Au-delà de ces concentrations (1 %), l'effet de l'EPS disparaît (Fig. 68). Il semblerait donc qu'il y ait une concentration optimale qui permette une réorganisation des éléments constitutifs du sol et améliore ainsi le comportement hydrique du sol. À la concentration de 0,6 %, l'EPS KYGT207 permet une rétention d'eau de 45 % (soit + 70 % par rapport au témoin).

Le xanthane, polysaccharide bactérien de référence et couramment utilisé dans l'industrie, présente le même type d'effet que l'EPS KYGT207. C'est ainsi que nous notons un optimum de rétention d'eau qui correspond à une concentration qui se situe à partir de 0,6 % en EPS (Fig. 68). À cette concentration, le xanthane permet d'améliorer la capacité de rétention d'eau d'environ + 25 %.

L'augmentation de la concentration en xanthane jusqu'à 1 % ne permet pas pour autant une amélioration de la rétention d'eau de sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC). L'effet de l'EPS KYGT207 sur la rétention en eau d'un sol structuré est très nettement supérieur à celui du xanthane (Fig. 68).

Nous rappelons que le sol de la station agronomique de Oued Smar présente une texture argileuse et que de ce fait, la porosité est relativement faible. Ceci constituerait un frein à la manifestation de l'effet des EPS pour des concentrations élevées. En effet, très vite la faible porosité de ce sol est saturée (probablement à des concentrations de l'ordre de 0,6 %) et ainsi le gonflement des EPS contribuerait à l'occupation des porosités libres.

3.1.2. Effet sur la réserve en eau utile

L'addition de différentes concentrations en EPS bactériens n'a pas permis d'améliorer de manière significative la teneur en humidité à pF 4,2 (données non présentées). Celle-ci est de l'ordre de 18 % pour le sol de la station ITGC de Oued Smar, soumis ou non aux mêmes concentrations en EPS bactériens. Cette valeur correspond au point de flétrissement qui représente la valeur limite de l'eau liée.

Nous pouvons de ce fait analyser l'effet des EPS bactériens KYGT207 et KYEGB2 ainsi que le xanthane, pris dans ce cas comme référence, sur la réserve utile, appelée aussi eau utile. Cette dernière correspond à l'eau utilisable par la plante, qui est représentée par la différence des taux d'humidité aux pF 2,7 et 4,2 (Fig. 69).

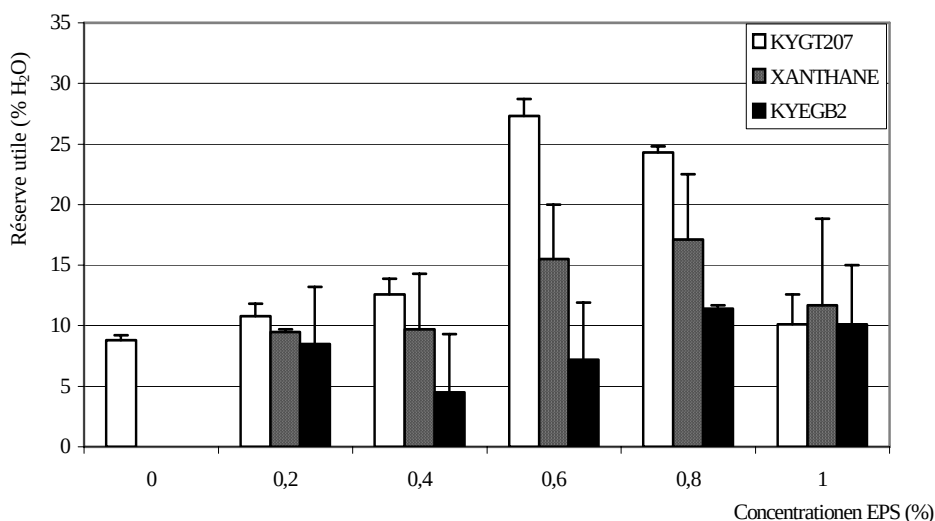


Figure 69. Effet des EPS bactériens KYGT207, KYEGB2 et xanthane sur la réserve utile du sol de la station ITGC de Oued Smar.

Parmi les 3 polymères testés, c'est l'EPS KYGT207 qui génère la plus grande amélioration de la réserve utile du sol de l'ITGC (Fig. 69). C'est ainsi qu'à faible concentration (2 mg EPS g⁻¹ de sol sec), on note une augmentation de la réserve utile. Celle-ci augmente graduellement pour atteindre une valeur de 27 % pour une concentration en EPS de 6 mg EPS g⁻¹ de sol sec. À cette concentration, l'EPS KYGT207 améliore la réserve utile en la multipliant par un facteur supérieur à 3 (Fig. 69).

Au-delà d'une concentration en EPS égale à 0,8 %, nous ne notons aucune différence significative avec le témoin. Nous pouvons dire de ce fait, que le maximum de la réserve utile est atteint à une concentration en EPS KYGT207 qui se situe entre 6 et 8 mg EPS g⁻¹ de sol sec (environ 3 fois celle du témoin).

Il est aussi important de noter la concentration minimale en EPS qui permet la meilleure amélioration de la réserve utile est 6 mg EPS KYGT207 g⁻¹ de sol sec (0,6 %).

Pour le xanthane, l'amélioration la réserve utile est moins marquée que celle observée en présence de l'EPS KYGT207. À la concentration de 6 et de 8 mg de xanthane g⁻¹ de sol sec, elle est presque doublée (1,7 et 1,9 fois celle du témoin, respectivement pour les concentration de 0,6 % et 0,8 %). Si ces deux polymères (KYGT207 et xanthane) n'engendrent pas les mêmes niveaux d'amélioration, nous pouvons cependant noter que l'évolution de la réserve utile du sol de la station agronomique ITGC, en présence des différentes concentrations, montre la même évolution. À une concentration en EPS de 0,8 %, celle-ci est presque doublée. De la même manière que pour KYGT207, le xanthane à une concentration de 1 % ne permet pas d'améliorer la réserve utile du sol de l'ITGC.

L'EPS KYEGB2 ne présente aucune amélioration de la réserve utile, et ceci quelle que soit la concentration utilisée. Comme nous l'avons déjà expliqué dans le chapitre précédent ce polymère est un lévane très hydrosoluble et nous avons constaté, lors des diverses expériences, notamment celles sur la mesure de la stabilité structurale du sol, que les sols additionnés de l'EPS KYEGB2 étaient beaucoup plus sensibles à l'action déstructurante de l'eau.

3.1.3. Effet des EPS sur la rétention en eau du sol après ressuyage (humidité équivalente à la capacité au champ)

Il est aussi important de savoir comment se comporte le mélange sol-EPS dans des conditions environnementales naturelles, sous pression atmosphérique. Pour cela nous avons, dans un premier temps, saturé les échantillons « sol-EPS » en eau, puis nous les avons soumis à la pression atmosphérique pour leur ressuyage. De ce fait, les forces de rétentions développées par le sol par phénomène capillaires et d'absorption ainsi que les forces de gravité s'équilibrent. L'humidité retenue par le sol dans ces conditions est équivalente à la capacité au champ.

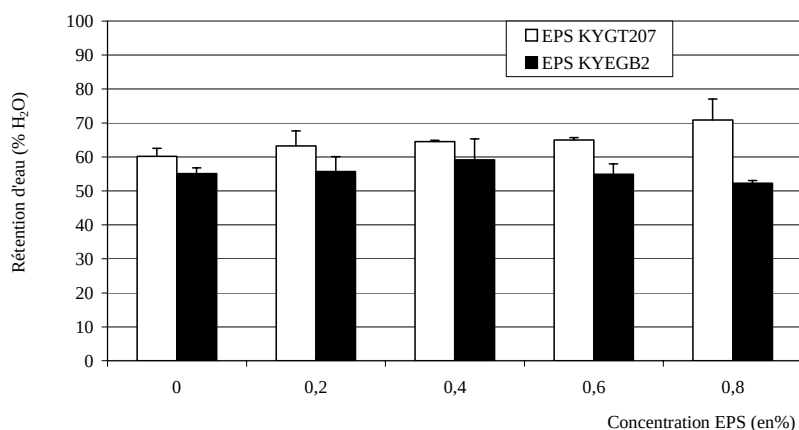


Figure 70. Effet de différentes concentrations en EPS KYGT207 et KYEGB2 sur la capacité de rétention en eau du sol de la station agronomique, ITGC sous pression atmosphérique .
Le sol est d'abord saturé en eau puis ressuyé.

Nous remarquons aussi que le sol de Oued Smar, non amendé en EPS (témoin), présente une capacité de rétention d'eau relativement élevée se situant entre 55 et 60 %. Cette grande capacité de rétention d'eau est liée à la nature argileuse du sol de la station agronomique de Oued Smar.

Dans ces conditions, l'effet de l'EPS KYGT207 est nettement moins marqué que dans l'expérience menée à pF 2,7 (Fig. 70). Nous pouvons tout de même remarquer un effet significatif de l'EPS KYGT207 à la concentration de 0,8 %. Cette augmentation permet d'atteindre des teneurs en rétention d'eau de l'ordre de 70 %, situation hydrique proche de la saturation et qui équivaut à un taux d'amélioration de 16 % par rapport au témoin.

De ces deux expériences (Fig. 69 et 70), nous pouvons retenir qu'après saturation et ressuyage, le sol de la station agronomique de Oued Smar, additionné de l'EPS bactérien KYGT207, présente un comportement hydrique intéressant. Dans des conditions plus proches de la situation moyenne du sol (pF 2,7), les différences entre le témoin et les essais sont plus marquées, en particulier pour l'EPS KYGT207 (Fig. 69), ce qui suggère des forces de rétention d'eau plus élevées.

Nous rappelons que l'EPS produit par *Peanibacillus sp.* KYEGB2 est un lévane. Lors de la saturation en eau des échantillons de sol par capillarité, nous pensons qu'une fraction importante de cet EPS hydrosoluble est passée en solution et que de ce fait, aucun effet n'a été relevé (Fig. 70). Nous avons déjà, dans l'expérience précédente relative à la détermination de la capacité au champ, noté la même tendance, avec cependant un léger effet à une concentration de 0,8 %.

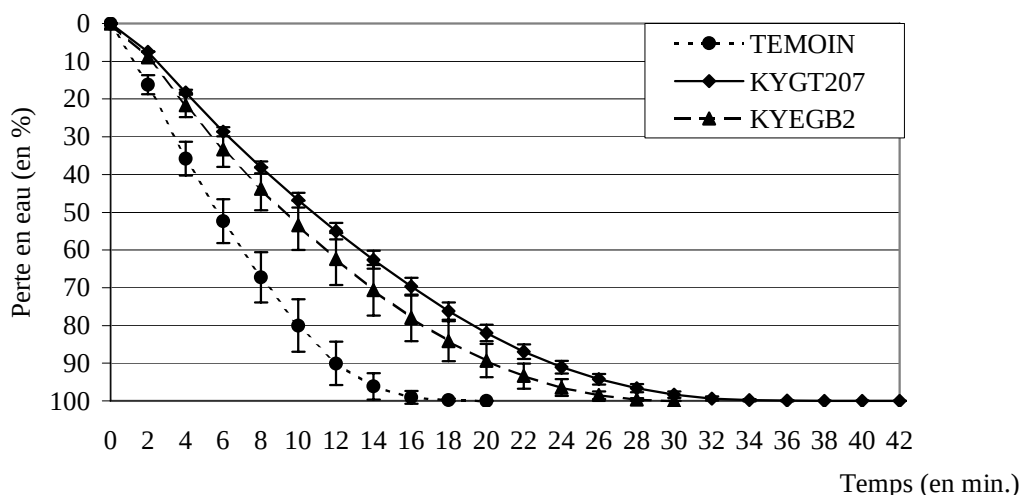


Figure 71. Cinétique de dessiccation à 105°C du sol de la station agronomique ITGC, mélangé aux EPS bactériens KYEGB2 et KYGT207.

*La teneur en EPS du sol est de 0,6 %, le taux d'humidité de 30%
Les moyennes sont calculées sur la base de 3 répétitions,*

3.1.4. Cinétique de perte en eau par dessiccation (105 °C)

Après avoir classé les EPS en fonction de leurs forces de rétention d'eau et de leur impact sur les propriétés hydriques du sol, nous nous sommes proposés d'étudier l'influence de ces EPS sur la perte en eau du sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC), par une technique de dessiccation progressive des échantillons « EPS-sol » dans une thermobalance à une température de 105 °C. De la même manière que précédemment lors de la mesure de la rétention d'eau, il est important à ce niveau, de bien préparer les échantillons. Ainsi, les EPS doivent être finement broyés et intimement mélangés au sol sec pour l'obtention d'un échantillon homogène. Ces mélanges sont ensuite humidifiés (30 % d'eau, représentant environ 50 % de la CAC). Cette précaution est nécessaire pour que les EPS puissent pénétrer dans la porosité du sol.

L'analyse des cinétiques de dessiccation du sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC), en présence ou non d'EPS bactériens (KYGT207 et KYEGB2) montre, comme dans l'expérience relative à la dessiccation des EPS purs, que l'ensemble des courbes suivent la même allure. Nous constatons également que très tôt, après seulement 2 min à 105 °C, un décalage s'installe entre le témoin et les essais, traduisant une plus grande rétention d'eau dans les sols associés aux EPS (Fig. 71).

Les deux EPS étudiés (KYGT207 et KYEGB2) induisent donc un retard de la perte en eau à 105 °C, matérialisé par un décalage des courbes par rapport au témoin.

Après une nuit de contact avec le sol, l'EPS produit par la souche KYGT207 a provoqué le retard de dessiccation le plus important. C'est ainsi que le témoin et les essais KYEGB2 et KYGT207 mettent respectivement 20, 30 et 42 min pour perdre la totalité de l'eau par dessiccation à 105 °C. Pour une même durée de dessiccation (10 min), le témoin a perdu 80 % de sa teneur initiale en eau, alors qu'en présence des EPS KYEGB2 et KYGT207 les échantillons de sols n'ont perdu que 55 % et 45 % d'eau respectivement (Fig. 71).

Ce décalage entre le témoin et les essais en présence d'EPS est la manifestation de forces de liaison plus importantes que procurent les EPS au sol, provoquant ainsi une meilleure rétention d'eau. C'est ainsi que les EPS KYEGB2 et KYGT207 procurent au sol de la station ITGC une économie d'eau équivalant respectivement à 25 % et 35 %. Ces gains en capacité de rétention d'eau par addition d'EPS bactériens seraient la résultante de 2 facteurs : l'un lié à la capacité de rétention d'eau intrinsèque des EPS, l'autre à une réorganisation des éléments constitutifs du sol entraînant une augmentation du volume poral (Alami *et al.*,2000).

3.1.5. Évaluation de la stabilité structurale

Les échantillons de sol additionnés de 0,6 % d'EPS sont séchés à l'air libre pendant 1 semaine. Cette étape de séchage est indispensable pour permettre l'attachement des polysaccharides à la surface des argiles pour former un « manteau » protégeant ainsi les agrégats.

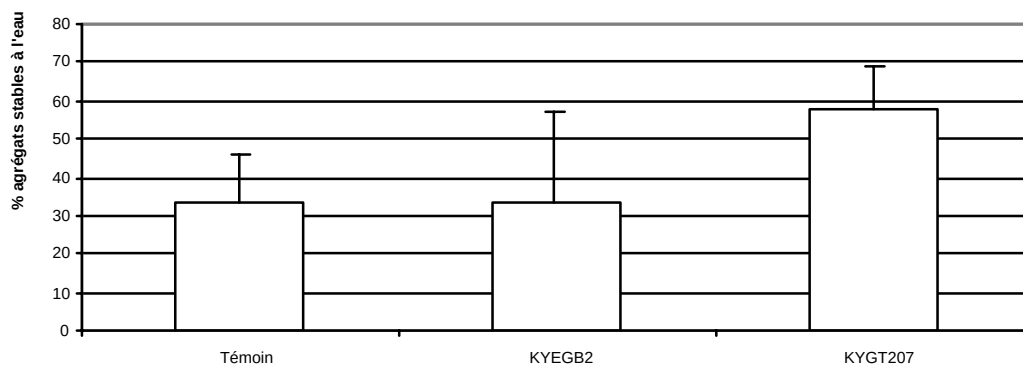


Figure 70. Effet des EPS bactériens KYGT207 et KYEGB2 sur le taux d'agrégats stables à l'eau du sol de la station aronomique d'Oued Smar (ITGC).

La stabilité structurale est évaluée par détermination du taux d'agrégats stables à l'eau. Cette technique tient compte du fait qu'une immersion brutale et répétée conduit à la disparition de la structure d'un sol. La capacité de résistance du sol à un tel traitement permet de situer sa stabilité structurale, liée aux forces de cohésion des particules entre elles.

L'addition de l'EPS KYGT207 au sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC) provoque, à de faibles concentrations (6 mg g^{-1} de sol sec), une amélioration significative du taux d'agrégats stables à l'eau, qui passe d'une valeur de 33,7 % (témoin) à 57,5 % (Fig. 72). Cette augmentation due à la présence de l'EPS KYGT207 est évaluée à + 70 % (valeur comparée au témoin). Cette importante amélioration des taux d'agrégats stables à l'eau traduit des forces de cohésion beaucoup plus grandes en présence de l'EPS KYGT207. Il semblerait qu'après séchage des échantillons de sol l'EPS KYGT207 s'attacherait à la surface des particules d'argile, grâce à des liaisons de type Van Der Waals pour former un « manteau » protégeant ainsi la stabilité des agrégats nouvellement formés.

Pour l'EPS KYEGB2, nous ne notons aucun effet stabilisateur de la structure du sol. Nous rappellerons que lors de la détermination de la rétention en eau de l'EPS KYEGB2 en association avec le sol ITGC, nous avons attribué l'inefficacité de cet EPS à sa forte solubilité lors des tests. Cette explication a été confirmée par la détermination des cinétiques de perte en eau.

En effet, dans cette expérience, contrairement aux pF, les échantillons ne sont pas immergés dans l'eau, mais simplement humidifiés. Dans ce cas, un effet significatif a été observé avec l'EPS KYEGB2.

D'autre part, le test d'évaluation de la stabilité structurale repose sur l'estimation des agrégats stables, après des immersions brutales et répétées des échantillons « EPS-sol ». De ce fait, l'EPS KYEGB2, très hydrosoluble ne pourrait constituer un élément stabilisateur de la structure du sol.

3.2. Cas des sols sableux

Les sols sableux utilisés ne présentent aucune structure apparente, ce qui nous place dans des conditions extrêmes permettant ainsi de mettre en évidence d'éventuels effets des EPS testés sur la structure des sols.

3.2.1. Effet sur la rétention d'eau (pF 2,7)

Sur la base des résultats obtenus dans le paragraphe sur le sol argileux de Oued Smar, nous avons décidé de ne tester qu'une seule teneur en EPS (0,6 %). Il nous paraît important d'utiliser dans ce cas la plus faible concentration d'EPS ayant induit une augmentation significative de la rétention d'eau.

3.2.1.1. Sol d'El Goléa

Le sol d'El Goléa présente une rétention d'eau très faible, dont la capacité au champ est estimée à 10 % (Fig. 73).

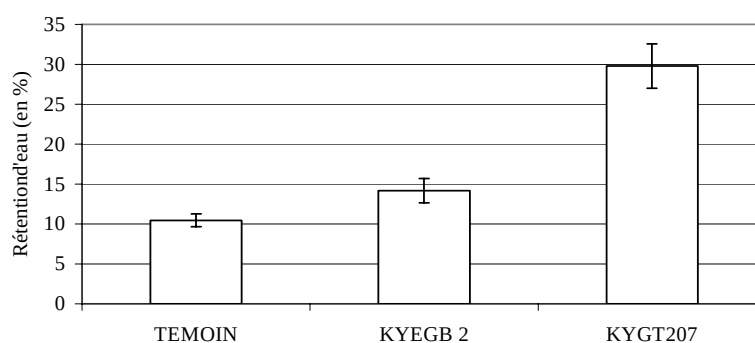


Figure 73. Effet des polysaccharides bactériens (KYGT207, KYEGB2) sur la capacité de rétention en eau du sable d'El Goléa.

(pF 2,7 ; concentration en EPS: 0,6 %)

En présence des EPS KYEGB2 et KYGT207, nous notons une augmentation significative de cette capacité au champ. Le sable d'El Goléa ne permet pas une rétention d'eau importante (10 % pour le témoin). Cette capacité au champ est triplée (30 %) en présence de seulement 0,6 % d'EPS KYGT207 (Fig. 73).

Ce résultat constitue une donnée fondamentale, puisque la problématique de l'eau dans les sols sahariens est une réalité liée à la nature sableuse des sols dans ces régions. Nous reviendrons plus loin sur l'intérêt de ces EPS et leur implication dans les propriétés hydriques des sols, en particulier les sols sahariens.

3.2.1.2. Sol de Tamanrasset

Le sol de Tamanrasset, malgré une granulométrie légèrement plus fine que celle d'El Goléa (Tableau XXVII) présente une capacité au champ encore plus faible, puisqu'elle est estimée à moins de 5 % (Fig. 74).

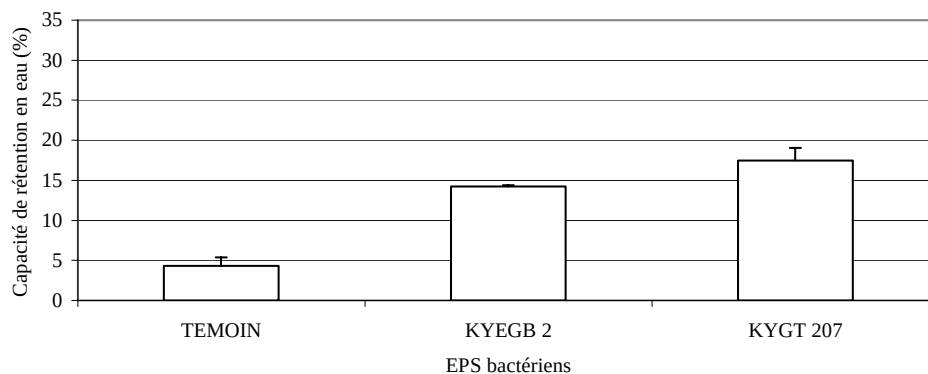


Figure 74. Effet de polysaccharides bactériens (KYGT207, KYEGB2) sur la capacité de rétention en eau du sable de Tamanrasset. (pF 2,7 ; concentration en EPS: 0,6 %).

Dans ce sol sableux, les deux EPS étudiés permettent une augmentation significative de la capacité de rétention d'eau. C'est ainsi que les EPS KYEGB2 et KYGT207, apportés à une concentration de 0,6 % dans le sol de Tamanrasset, accroissent la rétention d'eau par rapport au témoin d'un facteur respectif de 2,3 et 3 (Fig. 74). En revanche, même si ces effets semblent élevés, la capacité de rétention d'eau du sable de Tamanrasset additionné de l'EPS KYGT207 ne dépasse pas la valeur 17,5 %, alors que pour le sol d'El Goléa, elle avoisine les 30 % (Fig. 73).

Ce résultat montre que la réorganisation des éléments grossiers (sables grossiers d'El Goléa) occasionnée par l'addition d'EPS bactériens, notamment l'EPS KYGT207, permet une meilleure rétention d'eau que celle d'éléments beaucoup plus fins (sable de Tamanrasset). Cette situation est probablement due à une augmentation du volume poral beaucoup plus important dans le cas du sable d'El Goléa.

Ces gains en rétention d'eau permis par les EPS bactériens, constituent une économie d'eau très importante, notamment dans des écosystèmes steppiques ou désertiques. En effet, dans certaines régions du sud algérien, dont les sols sont caractérisés par une texture sableuse et une salinité importante, l'irrigation intensive induit très souvent des remontées de sels. Cette problématique laisse entrevoir une possibilité d'utilisation des EPS bactériens pour lutter contre ce phénomène.

3.2.2. Effet sur la stabilité structural

L'évaluation de la stabilité structurale du sol ne peut constituer qu'un élément d'appréciation des forces de cohésion qui existent entre les différents éléments constitutifs du sol, en particulier les matières organiques et minérales.

Elle permet de caractériser la structure d'un sol et de situer les forces de cohésion des particules, sur un plan purement comparatif.

De la même manière que précédemment, dans cette expérience nous avons mélangé les sables et les EPS à raison de 0,6 % (m/m). Ces mélanges sont ensuite humidifiés à l'aide de 30 % d'eau (v/v) et laissés à sécher pendant une semaine à l'air libre.

Nous avons testé l'effet des EPS bactériens sur 2 sols sableux provenant de régions sahariennes (El Goléa et Tamanrasset).

3.2.2.1. Sol d'El Goléa

Avant d'entamer l'analyse des résultats relatifs à la stabilité structurale, évaluée d'après le taux d'agrégats stables à l'eau, dont la taille est supérieure à 200 μm (Fig. 75), il nous a semblé important de rapporter un certain nombre d'observations qualitatives.

Celles-ci portent essentiellement sur le fait que l'addition d'EPS bactériens (KYEGB2 et KYGT207) au sable d'El Goléa a permis de constituer une structure qui était inexistante dans les échantillons de sable, en agglomérant les particules de sable (Photos 6, 7, 8 et 9). Cette structure est plus ou moins friable en fonction de l'EPS utilisé.



Photos 6 et 7. Sable d'El Goléa mélangé à l'EPS KYGT207



Photos 8 et 9. Sable d'El Goléa mélangé à l'EPS KYEGB2

Les échantillons ainsi constitués sont ensuite calibrés par tamisage à 2 mm (mailles carrées) pour l'évaluation de la stabilité structurale.

Lors de cette opération de tamisage, nous avons noté que le sable contenant l'EPS KYGT207 offrait une résistance plus importante, alors que celui traité avec l'EPS KYEGB2 était beaucoup plus friable.

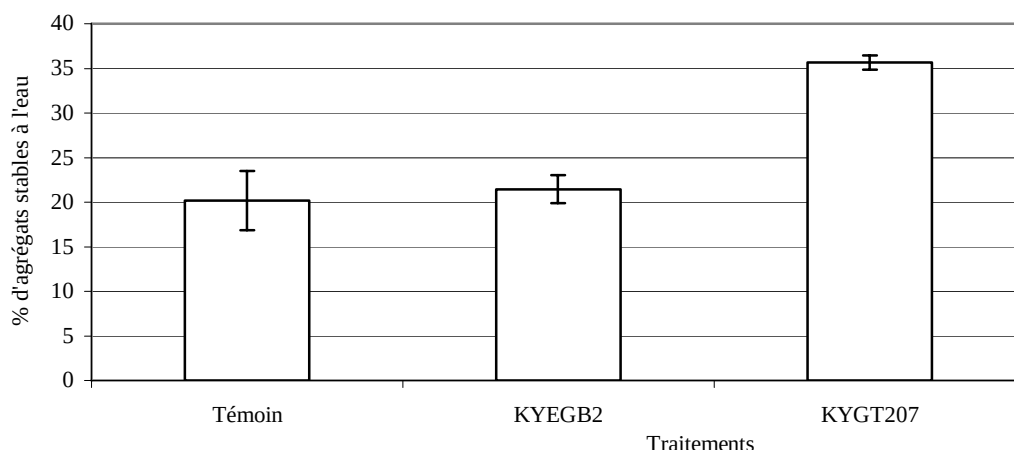


Figure 75. Influence de 2 EPS bactériens (KYGT207, KYEGB2) sur le taux d'agrégats stables à l'eau d'un sol sableux d'El Goléa

Dans le cas du sable d'El Goléa, le taux d'agrégats stables à l'eau n'est pas amélioré en présence de l'EPS KYEGB2 (20 % d'agrégats stables à l'eau) (Fig. 75). Ce qui permet de dire que l'EPS KYEGB2 n'a aucun effet sur la stabilisation de la structure du sable d'El Goléa.

Contrairement au traitement KYEGB2, l'EPS KYGT207 augmente de manière significative le taux d'agrégats stables à l'eau (+ 80 %), ce qui se traduit par une forte cohésion des agrégats (Fig. 75). Nous rappelons que le sable d'El Goléa ne présente aucune structure apparente. Par conséquent, les agrégats dont on a mesuré la stabilité, sont le résultat de l'action structurante de l'EPS KYGT207. De plus une bonne partie des agrégats formés présente une stabilité à l'eau (35 %).

Dans le cas du traitement avec l'EPS KYEGB2, nous avons observé une agrégation des particules de sables dont la fragilité a déjà été signalée et qui est matérialisée par un éclatement de cette structure lors du tamisage dans l'eau. Ceci se traduit par un taux d'agrégats stables à l'eau très proche de celui du témoin. Dans ces deux cas (témoin et EPS KYEGB2), il n'y a pas en fait d'agrégats stables à l'eau, mais simplement des sables dont la granulométrie est supérieure à 200 μm (Fig. 75).

3.2.2.2. Sol de Tamanrasset

Si pour le sol d'El Goléa, nous n'avons pas mis en évidence une amélioration de la stabilité des agrégats à l'eau en présence de l'EPS KYEGB2, ce n'est pas le cas du sol de Tamanrasset soumis aux mêmes conditions expérimentales (Fig. 76). En effet, les EPS KYEGB2 et KYGT207 permettent d'augmenter de manière significative le taux d'agrégats stables à l'eau, respectivement d'un facteur 2,3 et 3 (Fig. 76).

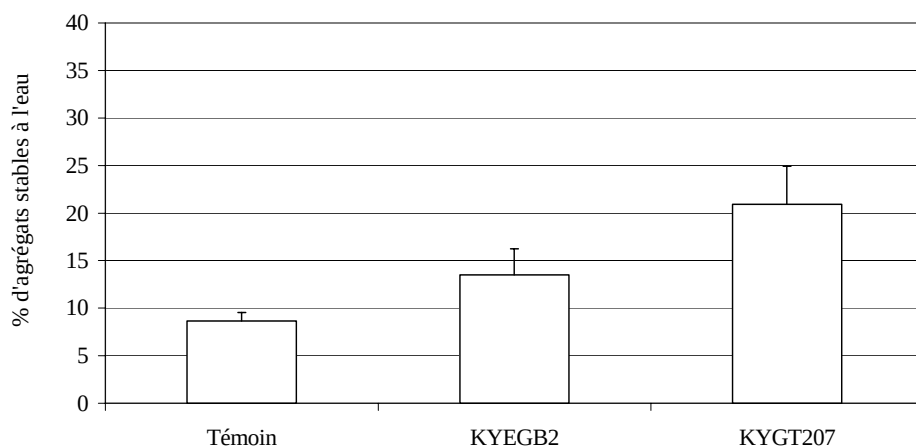


Figure 76. Influence de 2 EPS bactériens (KYGT207, KYEGB2) sur le taux d'agrégats stables à l'eau du sable de Tamanrasset.

Cette expérience montre que, partant d'un sable sans aucune structure, nous avons constitué une agrégation de particules de sable fins, en utilisant des EPS bactériens à faible concentration (0,6 %). De plus, cette structure présente une stabilité à l'eau relativement importante.

Si nous comparons les sols d'El Goléa et de Tamanrasset à granulométrie sableuse, l'effet des EPS, en particulier l'EPS KYGT207, est légèrement plus important avec le sable de Tamanrasset (2 à 3 fois supérieur au témoin), probablement en relation avec la finesse de son sable.

Des deux expériences relatives à la rétention d'eau des mélanges sables-EPS (Fig. 75 et Fig. 76), nous pouvons conclure que les EPS bactériens, à faible concentration (0,6 %), participent à la structuration de sols sableux. Alors que l'EPS de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2 ne contribue qu'à la structuration des particules fines (sol de Tamanrasset, Fig. 75), l'EPS produit par la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 permet la formation d'agrégats stables quel que soit le type de sables :

- sable à particules fines (Tamanrasset, Fig. 76),
- sable à particules un peu plus grossières (El Goléa, Fig. 75).

3.2.3. Cinétiques de perte en eau à 105°C

Les molécules d'eau sous la forme liquide sont liées en partie entre elles par des liaisons hydrogène. L'énergie nécessaire pour rompre ces ponts hydrogène est cependant faible. L'énergie de rétention de l'eau par les particules du sol est beaucoup plus importante, du fait que les éléments solides du sol, présentant en général des charges négatives, se comportent comme des ions. La force qui lie les molécules d'eau adhérant directement à la surface des particules du sol a presque la valeur d'une liaison chimique forte.

Nous avons précédemment réalisé les cinétiques de perte en eau à 105 °C des EPS seuls, pour en évaluer dans un premier temps et sur un plan purement comparatif, leurs forces de rétention vis-à-vis de l'eau. C'est ainsi que nous avons noté qu'à 105 °C, l'EPS KYGT207 retient l'eau plus longtemps que l'EPS KYEGB2, traduisant ainsi des forces intrinsèques de rétention d'eau plus fortes.

D'autre part, comme nous l'avons fait pour la détermination de la capacité de rétention d'eau de mélanges « sable-EPS », nous avons soumis ces mêmes échantillons à une température de 105 °C pour évaluer leur vitesse de perte en eau.

3.2.3.1. Sable d'El Goléa

Le sol d'El Goléa, à texture sableuse, est mélangé à chacun des EPS bactériens KYGT207 et KYEGB2, puis humidifiés (30 %) pendant une nuit, pour permettre une remise en solution des EPS.

Les cinétiques de perte en eau à 105 °C du sable d'El Goléa, en présence des EPS KYEG2 et KYGT207 (0,6 %, m/m), montrent que les deux EPS induisent un retard d'évaporation par rapport au « témoin ». Ce décalage, faible au début, s'accroît avec le temps d'incubation à 105°C, ce qui laisse supposer que les forces de liaisons entre l'eau et les échantillons de sol sont différentes (Fig. 77).

Le sable d'El Goléa « témoin » met environ 16 min pour perdre 100% de l'humidité initiale (30 %), alors que dans les mêmes conditions, les traitements avec les EPS KYGT207 et KYEGB2 n'en ont perdu que respectivement 65 et 70 % (points indiqués par la flèche, Fig. 77). Les différences entre les EPS KYEGB2 et KYGT207 ne sont pas significatives.

3.2.3.2. Sable de Tamanrasset

La même expérience, réalisée en utilisant le sable de Tamanrasset, montre de nouveau un retard de dessiccation à 105 °C en présence des EPS (Fig. 78).

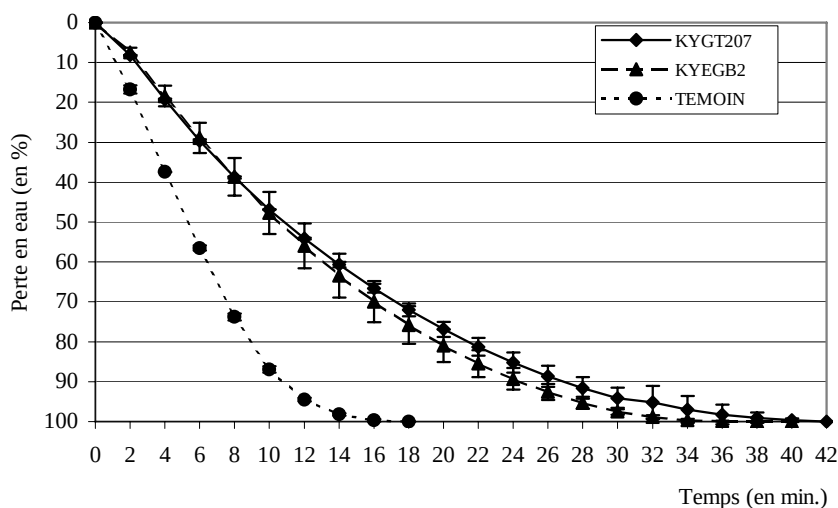


Figure 77. Cinétique de dessiccation à 105 °C du sol d'El Goléa mélangé aux EPS bactériens (KYEGB2 et KYGT207).

La teneur en EPS du sol est de 0,6 %, le taux d'humidité de 30%.

Les moyennes sont calculées sur la base de 3 répétitions.

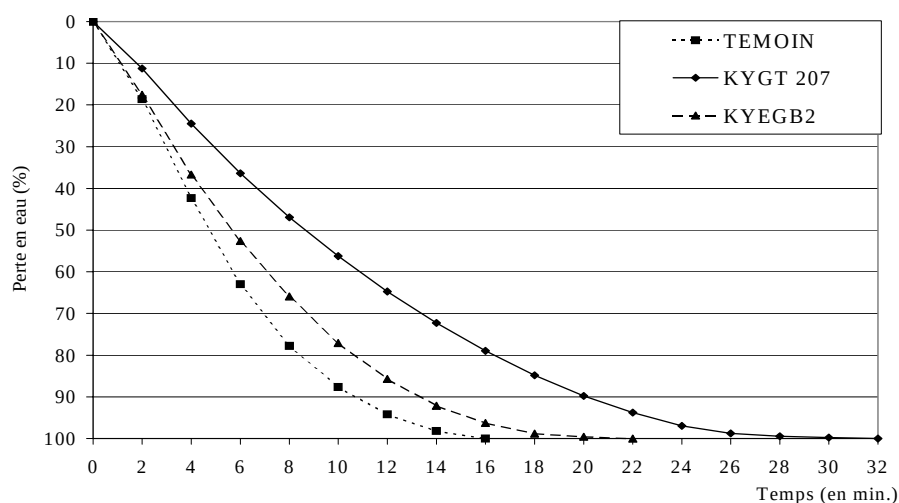


Figure 78. Cinétique de dessiccation à 105 °C du sol de Tamanrasset mélangé aux EPS bactériens (KYEGB2 et KYGT207).

La teneur en EPS du sol est de 0,6 % , le taux d'humidité de 30%.

Contrairement au résultat précédent, l'EPS KYGT207 en association avec le sable de Tamanrasset, occasionne un retard de perte en eau nettement plus important que celui observé avec l'EPS KYEGB2 (Fig. 78). En effet, alors que 100 % de l'eau du « témoin » s'évapore totalement après seulement 16 min d'incubation à 105 °C, l'addition des EPS KYEGB2 et KYGT207 induisent des retards de perte en eau respectifs de 2 et 12 min. Lorsque toute l'eau du témoin s'est évaporée, il reste 20 % d'eau dans le traitement KYGT207 (points indiqués par la flèche, Fig. 78).

Des travaux préliminaires sur des sols à texture sableuse, provenant de la région de Gassi Touil et utilisant un EPS produit par une autre souche de *Rhizobium* (souche YAS34) ont permis de montrer une augmentation significative de la rétention d'eau qui se manifeste à une concentration de 1 % en EPS et évaluée à 16 % (Alami *et al.*, 1998).

L'ensemble des résultats obtenus sur les sables d'El Goléa et de Tamanrasset montrent à quel point les EPS bactériens peuvent jouer un rôle important dans la modification de la rétention d'eau de ces sols « extrêmes ». En effet, nous avons structuré des sables en les agrégeant avec des EPS bactériens, notamment l'EPS produit par la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 qui induit la formation d'agrégats stables à l'eau, traduisant ainsi une bonne cohésion des particules.

4. Discussion

Dans le sol, on distingue classiquement 3 types d'eau dans les milieux poreux :

- l'eau gravitaire (libre, mobile) qui circule dans la macroporosité, soumise à l'action de la pesanteur. Son écoulement peut être lent ou rapide en fonction de la texture et de la structure du sol. La nature de la matière organique est aussi impliquée.
- L'eau de rétention, qui reste dans le sol après drainage de l'eau gravitaire, phénomène aussi appelé : ressuyage du sol. C'est cette humidité du sol qui nous intéresse, puisqu'elle est physiologiquement impliquée dans la nutrition et l'hydratation des plantes.
- L'eau de constitution qui rentre dans la composition chimique de la matrice « sol » et qui n'est ni échangeable ni mobilisable.

Le choix des EPS bactériens repose essentiellement sur 3 critères : (i) leur viscosité, (ii) leur élasticité et (iii) leur capacité de rétention d'eau.

Les souches bactériennes retenues dans le cadre de cette étude (*Rhizobium sp.* KYGT207 et *Paenibacillus sp.* KYEGB2), cultivées sur milieu RCV-saccharose, se présentent sous forme de colonies muqueuses, après seulement 3 j d'incubation. Cet aspect muqueux, lié à la production d'EPS, répond à un besoin de protection de la part des bactéries. C'est ainsi qu'une concentration du milieu de culture en saccharose de 2 % occasionne un stress hydrique et osmotique. En effet, en réponse à cette situation, les bactéries produisent des EPS pour dresser une zone tampon entre les cellules bactériennes et le milieu environnant (Roberson et Firestone, 1992). Par ailleurs, d'autres auteurs considèrent que le stress osmotique engendré par une concentration élevée en NaCl ou en saccharose dans le milieu de culture, induit une augmentation de la production d'EPS chez les espèces *Sinorhizobium meliloti* ou *Pseudomonas fluorescens* (Zevenhuzen et Faleschini, 1991 ; Singh et Fett, 1995).

Dans le sol, ces facteurs limitant la croissance et la prolifération des bactéries (salinité, pH, microaérophilie, etc...) sont présents et parfois même très fréquents en Algérie. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les populations bactériennes productrices d'EPS sont nombreuses dans la rhizosphère du blé dur. Cette situation laisse penser que, dans cet environnement, toutes les conditions sont réunies pour assurer une production d'EPS.

Cette partie du travail nous a permis de montrer qu'à la fois les moûts bactériens (KYGT207 et KYEGB2) et leurs EPS purifiés respectifs ont une capacité de rétention d'eau importante. C'est ainsi que les deux EPS étudiés retiennent des quantités d'eau représentant entre 100 et 130 fois leur masse de matière sèche respective. Ces valeurs semblent élevées, mais comparables à celles observées par d'autres auteurs.

À titre d'exemple, le xanthane, EPS considéré comme un polymère des plus visqueux et le plus utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour ses propriétés rhéologiques particulières, peut retenir près de 180 fois son poids en eau (Robert et Schmit, 1982). Un autre polysaccharide produit par une souche de *Rhizobium sp.* YAS34 retient une quantité d'eau équivalente à environ 125 fois son poids de matière sèche (Alami *et al.*, 2000). D'autre part Chenu (1993), travaillant sur des mélanges « EPS bactériens-argiles », montre que ces polymères retiennent environ 50 g d'eau g⁻¹ d'EPS bactériens, ce qui représente 50 fois le poids sec des EPS.

La quantité d'eau retenue par un polysaccharide est étroitement liée à sa structure. C'est ainsi que du point de vue du comportement hydrique, le polysaccharide KYGT207 se rapproche beaucoup de l'EPS YAS34, même s'ils sont très différents sur le plan structural (Cf. Chapitre II).

La plus grande proportion de l'eau retenue se trouve confinée à l'intérieur du polymère, structuré sous forme de réseau. Celui-ci peut être « lâche » ou au contraire « séré », déterminant ainsi des propriétés hydriques différentes. L'eau ainsi retenue dans l'EPS dans son « maillage » est dite « eau libre », contrairement à l'eau qui entretient des liaisons hydrogène « eau liée ».

L'eau libre, confinée dans l'EPS, peut être mise à la disposition de la plante, puisque les forces de rétentions sont inférieures à la force de succion exercée par les racines de la plante. Nous pouvons donc considérer le polymère hydraté comme un hydrogel, caractérisé par :

- une eau liée par des liaisons hydrogène avec le polysaccharide,
- une eau libre qui occupe le maillage du réseau du polymère et qui représente la plus grande proportion d'eau.

Martin (1945, 1946) a mis en évidence que les produits bactériens qui permettaient d'agréger des mélanges « sable-argile » étaient des polysaccharides. Au même moment, Geoghegan et Brian (1946, 1948) utilisaient des polysaccharides bactériens (dextrane et lévane) pour améliorer les propriétés physiques du sol, notamment l'agrégation et la capacité de rétention d'eau.

L'étude de la rétention d'eau des sols étudiés (Oued Smar, El Goléa et Tamanrasset), mélangés aux EPS bactériens, a été évaluée en utilisant deux types d'énergies d'extraction de l'eau :

- La pression, à travers la détermination de la capacité au champ et la mesure des pF, le pF 2,7 (humidité correspondant à la limite physiologique supérieure) et le pF 4,2 (humidité correspondant à la limite physiologique supérieure représentée par l'eau liée et donc non utilisable par la plante), qui correspond au point de flétrissement. La différence entre ces deux humidités correspondant à la réserve utile (eau disponible pour la plante).
- Une énergie thermique (température de 105 °C), après humectation des échantillons de sol (cinétiques de dessiccation).

Dans le sol, l'eau occupe l'espace poral, constitué par la microporosité, la mésoporosité et la macroporosité. L'intensité de l'énergie appliquée aux échantillons pour en extraire l'eau, déterminera donc sa localisation. En effet, pour extraire l'eau de la microporosité, il faudra une énergie d'extraction plus élevée que celle nécessaire pour l'extraire de la macroporosité. Il apparaît donc que l'intensité de cette énergie reflète les forces de liaisons qui existent entre l'eau et le sol et permet aussi sa localisation dans le sol.

Le sol de Oued Smar, sans ajout d'EPS (témoin), présente une capacité de rétention d'eau plus importante (27 %) que celle des sols d'El Goléa (10 %) ou Tamanrasset (inférieure à 5%) dans les mêmes conditions. Cette rétention d'eau est inhérente à la différence de texture des sols, argileuse pour Oued Smar et sableuse pour El Goléa et Tamanrasset. Cette différence de texture détermine ainsi des structures particulières, respectivement élaborée pour le sol ITGC et particulière pour les sols d'El Goléa et Tamanrasset. Il apparaît aussi que les niveaux d'agrégation et les stabilités structurales (appréciées par observation) sont différents en fonction de la texture des sols étudiés.

L'humidité retenue à pF 2,7 est contenue essentiellement dans les pores dont le diamètre est inférieur à 10 µm. Elle concerne principalement « la réserve utile », eau utilisable par les plantes (celle qui occupe les pores de diamètre de 0.2 µm à 10 µm) et « l'eau liée » qui nécessite une énergie d'extraction supérieure aux forces de succion des systèmes racinaires et qui est déterminée au pF 4,2 (eau contenue dans les pores de diamètre < 0.2 µm).

L'addition de différentes concentrations en EPS (entre 0 et 1 %) a permis de choisir la concentration minimale permettant d'induire une amélioration de la capacité de rétention en eau. Nous avons opté pour l'utilisation, dans tous les essais, de la concentration en EPS de 6 mg g⁻¹ de sol sec, car sous une pression de 800 mbars (pF 2,7), l'EPS KYGT207 additionné au sol de la station ITGC a amélioré significativement sa capacité de rétention d'eau (+ 70 % par rapport au témoin).

Ce résultat, exprimé en humidité disponible pour la plante (réserve utile), permet de montrer que l'ajout de l'EPS KYGT207 au sol de la station agronomique de Oued Smar, améliore de manière considérable la réserve utile d'un facteur > 3. Le xanthane, polysaccharide très répandu dans le domaine de l'industrie alimentaire, en raison de ses propriétés rhéologiques particulières, n'atteint pas le même niveau d'amélioration de la

réserve utile. En effet celle-ci permet une augmentation d'un facteur 1,8. L'EPS KYEGB2 (type lévane) n'induit quant à lui aucune amélioration de la réserve utile du sol de la station agronomique ITGC de Oued Smar.

L'ensemble de ces remarques montre que la viscosité des EPS à elle seule ne peut pas constituer un indicateur de l'amélioration de la réserve utile d'un sol. En effet, les EPS KYGT207 et KYEGB2 présentent des viscosités relatives voisines, mais n'induisent pas les mêmes effets, quand ils sont mélangés au sol de la station agronomique ITGC de Oued Smar.

Cela nous permet d'appuyer l'hypothèse que l'amélioration de la réserve utile d'un sol mélangé aux EPS, dépend beaucoup plus d'une réorganisation structurale du sol, que d'une rétention d'eau par l'EPS testé.

D'autres arguments peuvent être avancés pour conforter cette hypothèse. En effet, les faibles quantités d'EPS ajoutées aux sols (6 mg EPS g⁻¹ de sol sec), ne peuvent expliquer l'amélioration de la rétention d'eau au pF 2,7 par exemple en présence de l'EPS KYGT207, simplement par un effet « éponge » de cet EPS, même si celui-ci retient une quantité d'eau importante, équivalente à 130 fois sa masse de matière sèche. En effet, en augmentant la quantité d'EPS (1 % m/m), la rétention d'eau diminue. C'est donc surtout la réorganisation structurale du sol qui permet une meilleure rétention d'eau, à travers l'augmentation du volume poral total (Alami *et al.*, 2000).

Les mêmes observations ont été rapportées dans la littérature ; travaillant sur l'effet des EPS sur des minéraux argileux, Chenu (1993) a montré une amélioration de la rétention d'eau en conditions d'amendement en EPS, particulièrement à des potentiels hydriques élevés. Ces augmentations étaient différentes pour les EPS étudiés avec la tendance suivante : xanthane > EPS rhizobia > scléroglycane et presque pas de changement avec le dextrane.

Dans le cas des EPS mélangés aux sols de la station agronomique ITGC ou de Tamanrasset ou encore d'EL Goléa, nous pouvons considérer leur action à trois niveaux : (i) l'eau retenue de manière intrinsèque par l'EPS lui-même (comme nous venons de le voir); (ii) l'eau retenue par le sol, par suite d'une réorganisation structurale : phénomène d'agrégation du sol (Amellal *et al.*, 2001) et (iii) comme pour les EPS, les minéraux argileux, peuvent être considérés comme une réserve d'eau à faible potentiel hydrique (Peña-Cabriales et Alexander, 1979), pour ralentir la vitesse de séchage (Osa-Affiana et Alexander, 1982) ou pour éviter une dessiccation irréversible des cellules bactériennes (Bushby et Marshall, 1977b). C'est donc la conjonction de ces trois phénomènes qui peut expliquer l'amélioration de la réserve utile.

Cette agrégation du sol suite à l'addition du polymère KYGT207, résulte du confinement du polysaccharide bactérien et son emprisonnement entre deux interfaces (polymère/substrat édaphique), laissant apparaître une nouvelle structure, caractérisée par un volume poral plus important. L'EPS KYGT207 se comporterait donc comme un « biofilm », capable d'entretenir des liaisons relativement fortes avec les éléments constitutifs du sol, particulièrement en présence du sol de la station ITGC (texture argileuse).

L'hypothèse retenue dans ce cas consiste donc en une réorganisation architecturale des constituants physiques du sol autour des polysaccharides, entraînant une augmentation du volume poral du sol (Fig. 79).

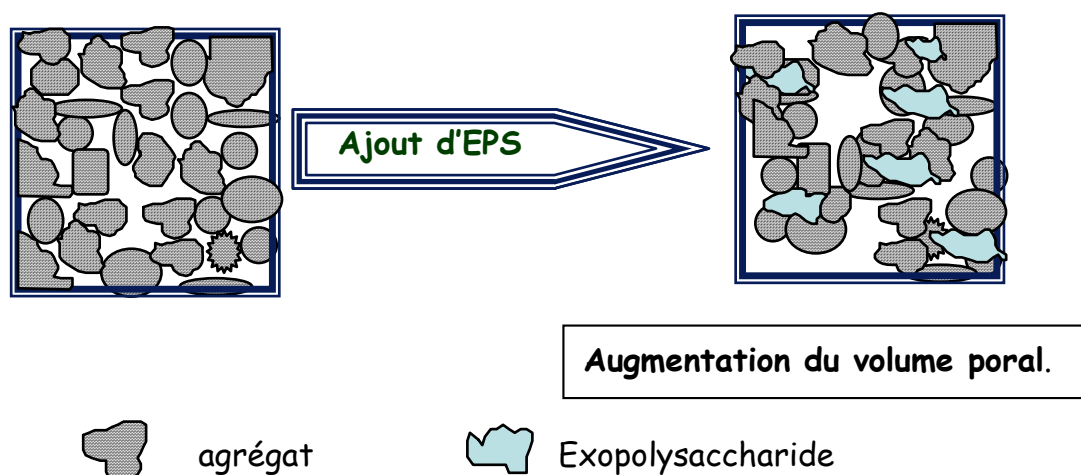


Figure 79. Représentation hypothétique de l'effet de l'addition de l'EPS produit par la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 sur la structure poral du sol de la station ITGC de Oued Smar.

Ces résultats corroborent ceux obtenus par d'autres auteurs. En effet, des expériences menées avec des solutions de polysaccharides pulvérisées sur du sol argileux ont permis d'observer une réorganisation de l'agrégation du sol (Chenu *et al.*, 1994). D'autres auteurs rapportent que l'addition dans le sol d'EPS, extraits de cultures microbiennes, induit une amélioration de la structure (Channey et Swift, 1986). Ils mettent aussi en évidence l'effet positif de polymères de type polysaccharide sur la rétention d'eau et la conductivité hydraulique d'un sol (Shannuganathan et Oades, 1982). De telles propriétés peuvent être intéressantes pour la plante en situation de stress hydrique, puisqu'elles permettent d'augmenter « la réserve utile ».

La structure du sol dépend de la manière dont les particules de sable, de limon et d'argile s'organisent avec la matière organique, pour former des agrégats. Les pores du sol, situés entre les agrégats et à l'intérieur de ceux-ci, contiennent de l'air et de l'eau et fournissent ainsi des réseaux, par lesquels les racines peuvent se développer et puiser les éléments minéraux, pour assurer les besoins nutritifs de la plante (Dakora *et al.*, 2002). L'oxygénation du système racinaire et des bactéries aérobies ou microaérophiles qui s'y développent est une exigence pour assurer les activités métaboliques, à la fois pour la plante et les microorganismes. Cette phase gazeuse est donc importante à plus d'un titre. En effet, le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau est dix mille fois plus faible que dans l'air (Bishop, 1997).

Cela laisse penser qu'un équilibre entre les deux phases, liquide et gazeuse, est nécessaire pour assurer des activités biologiques, indispensables au bon fonctionnement de la rhizosphère. C'est ainsi que les populations microbiennes jouent un rôle important, en assurant des activités métaboliques aussi intenses que diversifiées, favorisant ainsi la fertilité des sols.

Si à pF 2,7 l'EPS KYEGB2 apporté à une concentration de 6 mg g^{-1} de sol sec de la station ITGC de Oued Smar ne montre aucun effet significatif, ce n'est pas le cas lors de la détermination des cinétiques de perte en eau. Cette différence de comportement serait liée à la grande hydrosolubilité de cet EPS. En effet, lors de la préparation des échantillons pour la mesure des pF, ceux-ci sont préalablement saturés d'eau, par phénomène de capillarité pendant une nuit. Il semblerait que durant ce traitement, une partie de l'EPS KYEGB2 se

solubiliserait dans l'eau. Par ailleurs, il est également possible qu'une partie de ce polymère hydrosoluble ait été extraite avec l'eau, lors de la mesure des pF, sous l'effet de la pression. Cette fraction de l'EPS KYEGB2 ainsi éliminée, avant ou pendant cette expérience, échapperait donc à une quelconque contribution à l'amélioration de la rétention d'eau des sols étudiés.

Par contre lors de la détermination des cinétiques de dessiccation, les mélanges « sol-EPS » sont humidifiés directement, par apport d'une quantité d'eau équivalente au pF 2,7. De ce fait, la proportion d'EPS KYEGB2 ne diminue pas dans le mélange « sol-EPS » durant l'expérimentation ; nous observons alors un effet significatif de l'EPS KYEGB2 sur la rétention d'eau des sols étudiés.

Cette remarque nous semble importante à relever, puisque dans un environnement naturel, l'action de l'eau de pluie par exemple, peut avoir une incidence négative vis-à-vis de l'EPS KYEGB2. En effet, sa forte solubilité le rend particulièrement vulnérable et pourrait atténuer, voire même annuler l'effet bénéfique, observé lors de l'expérimentation de la perte en eau par dessiccation.

Concernant l'EPS KYGT207, les mêmes observations sont notées, en utilisant des sables sans aucune structure apparente (El Goléa et Tamanrasset). Même si les niveaux de rétention d'eau demeurent relativement faibles en comparaison avec ceux obtenus dans le cas du sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC), leurs effets sont beaucoup plus marqués.

Ainsi, l'addition d'une faible quantité d'EPS KYGT207 (0,6 %) à un sol à texture sableuse (El Goléa) permet d'améliorer sa rétention d'eau, au point de la hisser à un niveau équivalent à celle d'un sol à texture argileuse et structure élaborée sans amendement (sol de Oued Smar, témoin).

Cette observation montre l'intensité avec laquelle les EPS bactériens peuvent améliorer la capacité de rétention d'eau, dans des conditions pédoclimatiques extrêmes (texture sableuse et absence de matière organique), en agrégeant le sol. En effet, nous avons observé une agrégation des particules de sable (El Goléa et Tamanrasset), particulièrement en présence de l'EPS KYGT207. L'évaluation de leur stabilité structurale, à travers la détermination des taux d'agrégats stables à l'eau, montre une amélioration de la stabilité structurale, ce qui signifie que les forces de cohésion ont été consolidées et qu'une nouvelle structure est née. Cette dernière, fait suite à la réorganisation des éléments constitutifs du sol, essentiellement les sables dans ce cas particulier.

Les phénomènes d'édification de la structure du sol ont été étudiés par de nombreux auteurs. Guckert *et al.* (1975) ont déterminé une corrélation positive étroite, entre la teneur en polysaccharides du sol et la stabilité structurale. Haynes et Swift (1990) ont défini deux phases aboutissant à la formation d'agrégats stables :

- la première dite « d'agrégation » due à l'effet des polysaccharides,
- la seconde dite « de stabilisation » impliquant les composés humiques, qui confèrent aux agrégats des propriétés hydrophobes, les protégeant ainsi contre l'effet destructurant de l'eau : phénomène de stabilisation (Tarchitzky *et al.*, 2000 ; Chenu *et al.*, 2000).

L'EPS KYEGB2 ne permet pas d'améliorer le taux d'agrégats stables à l'eau des sols d'El Goléa et de Tamanrasset. Comme nous l'avons déjà expliqué précédemment, il semblerait que la forte hydrosolubilité de ce polymère ne permette pas l'amélioration de la stabilité structurale. En effet, ce polysaccharide présente une structure de type « lévane » et il est connu que cette famille moléculaire n'améliore pas la cohésion des particules de sol. C'est

ainsi que Chenu *et al.* (1994) travaillant sur de la kaolinite ont montré que le même type de polysaccharide que KYEGB2 (lévane) n'avait pas d'effet sur la stabilité des agrégats de diamètre supérieur à 2 mm. Par contre, l'addition d'autres EPS bactériens comme le xanthane ou le scléroglycane avait montré un effet stabilisant la structure de cette argile.

Les EPS bactériens libérés dans le sol ont une durée de vie limitée. Ils sont eux-mêmes soumis à l'action d'une microflore tellurique, les utilisant, dans certaines conditions, comme source de carbone et d'énergie. La continuité de la production d'EPS bactériens dans la rhizosphère, liée à la disponibilité des molécules carbonées, assurée par la rhizodéposition, peut constituer un palliatif à cette dégradation. De plus, dans le milieu naturel, les agrégats sont en continuel réarrangement par des phénomènes successifs d'édification et de destruction liée à de nombreux facteurs biotiques, comme nous venons de le signaler, mais également abiotiques (Puget *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces considérations montre à quel point l'agrégation du sol est un phénomène dynamique, mais aussi très fragile, particulièrement dans les écosystèmes sahariens.

5. Conclusion

Cette partie du travail a consisté à montrer les effets bénéfiques de l'utilisation des EPS bactériens sur le plan structural, particulièrement l'EPS KYGT207.

Pour une utilisation rationnelle des ressources hydriques, il est indispensable de maintenir un niveau adéquat de matière organique dans le sol, pour conserver une bonne structure et ainsi éviter des problèmes de compaction et de durcissement de la surface du sol, rôle qui est peut être joué en partie par les EPS bactériens.

Enfin le phénomène d'agrégation du sol permet donc l'amélioration du statut hydrique des cultures, particulièrement dans les régions semi-arides et arides, caractérisées par un lessivage important, dû à une structure particulière et une texture très souvent sableuse.

C'est ainsi que dans les régions sahariennes, agrosystèmes fragiles, caractérisés principalement par un climat aride et des sols meubles et pauvres en matière organique, l'eau n'est que très faiblement retenue. Par conséquent, lors de l'arrosage des cultures, la proportion la plus importante de l'eau apportée est perdue par lessivage, entraînant au passage les engrais chimiques.

Il s'agit donc d'une situation qui présente au moins 2 inconvénients : (i) une utilisation abusive des ressources hydriques et (ii) une pollution chimique des nappes phréatiques.

L'utilisation des EPS bactériens dans de telles conditions permettrait donc une économie d'eau et d'engrais chimiques, par le biais de l'amélioration des capacités de rétention d'eau et d'échange cationique.

Il est par ailleurs difficile de concevoir sur le plan agronomique, un épandage de ces EPS directement sur les sols, en raison des quantités importantes qu'il faille produire. En effet, un amendement en EPS à une concentration de 0,6 % coûterait très cher, même si des efforts de recherche de sous-produits capables de réduire considérablement ces coûts sont envisageables. De plus, cette pratique aurait un effet éphémère et non reproductible dans le temps, puisque les EPS dans le sol ont une durée de vie limitée.

Une autre voie que nous pensons plus intéressante, probablement plus efficace et surtout moins coûteuse, consisterait à stimuler ces bactéries productrices en cultivant du blé dur et, dans certains cas, inoculer ces bactéries au blé dur.

Pour cela, dans le chapitre suivant, nous nous proposons de tester les souches bactériennes *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2 dans un sol argileux structuré (ITGC Oued Smar) cultivé en blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha), afin d'évaluer :

- leur pouvoir colonisateur dans la rhizosphère du blé dur,
- leur activité en relation avec la structure du sol rhizosphérique et
- les éventuels bénéfices que la plante pourrait en tirer.

Chapitre IV

Effet de l'inoculation de deux souches bactériennes (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207) sur une culture de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha)

La compréhension des interactions réciproques entre les microorganismes et les plantes, ainsi que les transformations géochimiques contribuant en retour à la modification des propriétés physiques des sols, est au cœur de la maîtrise du fonctionnement des sols.

Concernant les bactéries telluriques dites bénéfiques, le processus de colonisation racinaire peut être apprécié par rapport à plusieurs concepts comme : le biocontrôle de maladies des plantes, la biofertilisation, la bioremédiation ainsi que la phytostimulation (Campbell et Greaves, 1990). Certains microorganismes peuvent traverser les parois cellulaires et entrer à l'intérieur des cellules (Sturz et Novak, 2000) ; parfois ils peuvent même induire la formation de nodosités racinaires, comme c'est le cas des symbioses *Rhizobium*-légumineuses (Brewin, 1991 ; Franssen *et al.*, 1992).

Dans l'environnement racinaire, le volume de sol adhérent aux racines est particulièrement important à la fois pour la plante et pour la microflore rhizosphérique. Cet environnement a été décrit pour la première fois par Hiltner (1904) comme étant la fraction de sol autour des racines physiquement, chimiquement et biologiquement modifiée par les racines d'une plante en croissance. Les mots clés les plus importants de cette définition sont :

- le sol, car la rhizosphère est effectivement une fraction du sol soumise à l'activité racinaire et ne peut pas être mimée par des racines en croissance dans une solution nutritive,
- les racines d'une plante en croissance, pour différencier cette influence des racines sous forme de rhizodépôts (incluant l'exsudation) de celle de la minéralisation des racines, autre étape du cycle du carbone, mais qui a lieu hors de la rhizosphère.

De très nombreuses espèces bactériennes vivent dans la rhizosphère et contribuent à structurer le sol. Cet effet rhizosphérique est le résultat de l'activité microbienne issue de l'utilisation des exsudats racinaires et de la lyse des cellules de la racine (Linch et Whipps, 1991). Les microorganismes impliqués dans ces interactions ont des activités très diversifiées. Campbell et Greaves (1990) ont isolé 150 souches appartenant au genre *Pseudomonas* à partir de la rhizosphère du blé. Après réinoculation de ces souches à des graines de blé, ces auteurs ont montré que 40 % d'entre elles avaient un effet PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), 40 % étaient inhibitrices de la croissance racinaire et enfin 20 % sans aucun effet. Cette étude montre à quel point les bactéries, peuvent présenter des incidences très diversifiées dans la rhizosphère, même quand elles appartiennent à un même groupe taxonomique.

L'un des multiples rôles attribués aux exopolysaccharides (EPS) bactériens et qui nous intéresse particulièrement dans cette étude est celui permettant l'adhésion des cellules bactériennes aux racines et aux particules de sol (Sutherland, 1983).

Elles constituent de ce fait, un pontage entre différentes particules dont la taille est de l'ordre de la dizaine de microns, déterminant ainsi une réorganisation de la structure du sol (Alami *et al.*, 2000).

En retour, l'attachement de cellules bactériennes à des surfaces solides stimule la production d'EPS (Bengtson, 1991), car l'immobilisation des bactéries favorise de façon générale les activités métaboliques, autres que celles liées au déplacement.

1. Colonisation bactérienne de la rhizosphère

L'installation et la persistance des bactéries productrices d'EPS inoculées, dans l'environnement rhizosphérique du blé dur, dépendent d'un certain nombre de facteurs intervenant dans les interactions plante-bactéries. Nous devons à ce titre considérer ses trois principales composantes : la bactérie, la plante et le sol.

1.1. Les bactéries inoculées

Les deux souches bactériennes utilisées dans cette partie du travail sont :

- *Rhizobium sp.* KYGT207
- *Paenibacillus sp.* KYEGB2

Les critères ayant déterminé le choix de ces souches bactériennes reposent principalement sur les niveaux de productions élevés en EPS, ainsi que leurs propriétés rhéologiques intéressantes : viscosité et élasticité des EPS (Cf. Chapitre II), mais également leurs effets sur l'agrégation et l'amélioration de la rétention d'eau des sols (Cf. Chapitre III).

La fréquence d'apparition de ces souches dans la rhizosphère du blé dur est respectivement de 2×10^6 UFC.g⁻¹ matière sèche racinaire et 2×10^5 UFC.g⁻¹ matière sèche racinaire (Cf. Chapitre I) ; elle constitue également un élément important à prendre en compte, car elle suggère que ces bactéries possèdent un ensemble de caractères d'adaptation à leur plante hôte.

1.1.1. Morphologie des colonies

La morphologie des colonies des deux bactéries choisies pour l'inoculation du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) est assez particulière sur milieu RCV additionné de 20 g l⁻¹ de saccharose. En effet, elles sont translucides avec une production d'EPS appréciable, conférant ainsi aux colonies un aspect muqueux prononcé (Photos 10 et 11).



Photo 10. Morphologie des colonies de *Rhizobium sp.* KYGT207, cultivées sur RCV-saccharose pendant 8 j à 30 °C.



Photo 11. Morphologie des colonies de *Paenibacillus sp.* KYEGB2 cultivées sur RCV-saccharose pendant 8 j à 30 °C.

1.1.2. Morphologie des cellules bactériennes

Les cellules de la souche *Rhizobium sp.* KYGT207, cultivées sur milieu RCV-Saccharose solide, se présentent sous la forme de petits bâtonnets (2 µm x 1 µm), Gram négatif, noyés dans une masse polysaccharidique (Photo 12).

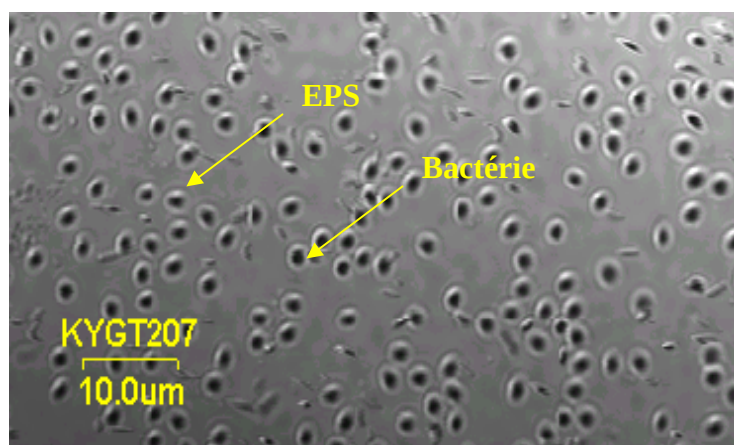


Photo 12. Morphologie cellulaire de *Rhizobium sp.* KYGT207.

*La culture est obtenue sur RCV-Saccharose solide après 5 jours d'incubation à 30°C.
La photographie montre un EPS diffus, autour des cellules bactériennes.*

Les cellules de la souche *Paenibacillus sp.* KYEGB2 forment de longs bâtonnets (5 µm x 1 µm) avec une spore centrale déformante (Photo 13). Il est important de signaler la présence d'un halo autour des cellules correspondant aux polysaccharides bactériens. Nous pouvons donc, sur simple observation, estimer l'importance de la productivité des cellules bactériennes.

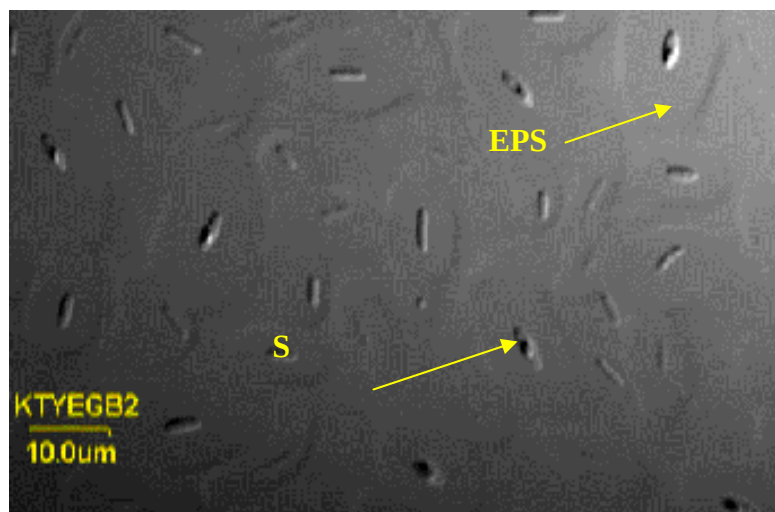


Photo 13. Morphologie cellulaire de *Paenibacillus* sp. KYEGB2.
S : Spore ; EPS : Exopolysaccharide. La culture est obtenue sur RCV-saccharose solide, après 5 jours d'incubation à 30°C.
La photographie montre un EPS localisé autour des cellules bactériennes.

1.2. Dénombrement des bactéries inoculées

Parmi les nombreuses techniques pouvant être utilisées pour suivre le devenir d'une bactérie inoculée, nous avons opté pour une méthode basée sur la résistance naturelle d'une bactérie à plusieurs antibiotiques. Cette méthode, employée seule, présente des limites, car nous ne pouvons pas exclure que d'autres bactéries possèdent le même spectre de résistance aux antibiotiques que la souche inoculée. C'est la raison pour laquelle nous avons associé ce critère de sélection à la morphologie des colonies, sur un milieu contenant une forte concentration en saccharose ($20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Un antibiogramme des deux souches a donc été réalisé pour rechercher les antibiotiques à utiliser afin de dénombrement des souches inoculées dans la rhizosphère du blé dur (Tableau XXVIII).

Tableau XXVIII. Antibiogramme des souches *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2

Antibiotique*	Souche KYGT207	Souche KYEGB2
Ac. nalidixique	Résistante	Sensible
Kanamycine	Résistante	Sensible
Ampicilline	Résistante	Résistante
Streptomycine	Sensible	Résistante
Rifampicine	Résistante	Sensible
Carbénicilline	Résistante	Résistante
Tétracycline	Sensible	Sensible
Gentamycine	Sensible	Sensible

* Les antibiotiques sont ajoutés à une concentration de $50 \mu\text{g/ml}$ de milieu de culture.

Sur la base du résultat des antibiogrammes, pour le dénombrement de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207, nous avons utilisé un milieu RCV-saccharose additionné de l'acide nalidixique, de la kanamycine et la rifampicine. Pour la détection de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2, nous avons utilisé la streptomycine et l'ampicilline.

L'ampicilline n'est utilisée que pour limiter les erreurs dues au dénombrement de populations bactériennes productrices d'EPS dont le phénotype des colonies serait proche de celui de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2.

Par ailleurs, et au-delà de ces considérations techniques, utilisant un mélange d'antibiotiques pour contre-sélectionner les bactéries inoculées, nous remarquons un plus large spectre de résistance de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 par rapport à *Paenibacillus* sp. KYEGB2 (Tableau XXVIII). Même si le nombre d'antibiotiques testés est restreint, *Rhizobium* sp. KYGT207 semble moins sensible à l'action des antibiotiques naturellement présents dans le sol et présenterait de ce fait plus de possibilités d'adaptation à des environnements diversifiés.

1.2.1. La plante

Dans cette partie du travail, nous avons utilisé du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) (Cf. Matériel et Méthodes)

1.2.2. Le sol

Les expériences relatives à l'inoculation des souches bactériennes productrices d'EPS (*Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2) sur le blé dur cultivé en pots ont été réalisées sur un sol provenant de la station agronomique de Oued Smar (ITGC). Nous rappelons que cette station expérimentale effectue des essais d'évaluation de performances de nouvelles semences, en particulier de blé dur et de blé tendre.

Tableau XXIX. Caractéristiques pédologiques du sol de la station Oued Smar (ITGC)

Paramètres mesurés	Teneurs
Carbone organique	0,9 %
Azote total	0,04 %
Argiles (< 2 µm)	51,5 %
Limons (2-50 µm)	29,1 %
Sables (50-2000 µm)	19,4 %

Le sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC) se caractérise par une teneur en argile relativement élevée, lui conférant une texture argileuse (triangle de texture USDA) (Tableau XXIX). Les taux de carbone organique et d'azote combiné sont faibles, avec un rapport C/N de 22. Son pH est proche de la neutralité (pH_{eau} 7,8) et sa structure est élaborée.

1.3. Colonisation racinaire par les bactéries inoculées

Pour étudier l'influence de l'inoculation de bactéries, il est important de savoir si ces populations bactériennes inoculées ont réellement colonisé de manière durable la rhizosphère. Pour dénombrer les bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur après

inoculation, nous nous sommes basés sur l'utilisation de marqueurs de résistance aux antibiotiques.

Le phénotype caractéristique des colonies sur milieu RCV-saccharose a aussi facilité leur comptage (Photos 11 et 12).



Photo 14. Aspect des colonies de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2 dénombrée sur milieu RCV-saccharose, après 5 j d'incubation à 30°C.



Photo 15. Aspect des colonies de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 dénombrée sur milieu RCV-saccharose, après 5 j d'incubation à 30°C.

1.3.1. Colonisation après deux semaines de culture

Les colonies dénombrées dans le traitement « témoin » sur milieu « saccharose » (sans antibiotique) correspondent aux différentes espèces bactériennes cultivables et productrices d'EPS (Fig. 78). Dans les deux traitements « souches inoculées », les colonies dénombrées sur milieu « saccharose + antibiotiques » sont formées par les souches inoculées *Rhizobium* sp. KYGT207 ou *Paenibacillus* sp. KYEGB2, selon les antibiotiques utilisés comme facteurs contre sélectifs.

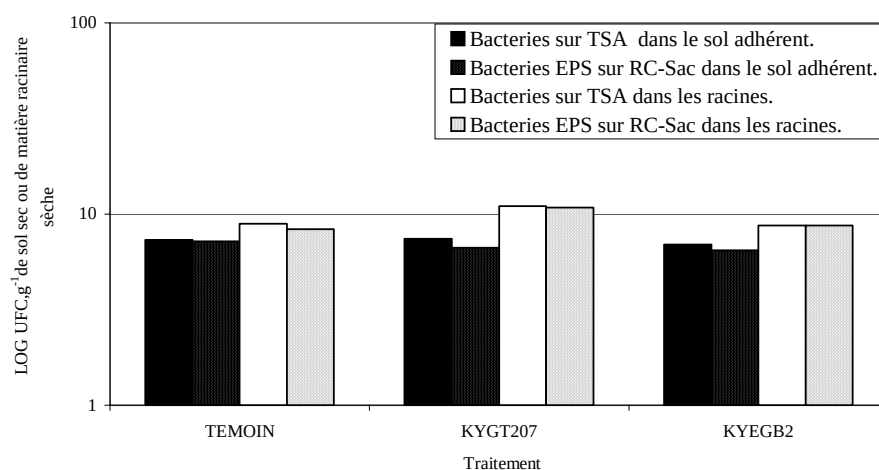


Figure 80. Taille des populations bactériennes "totales" et de chacune des souches inoculées (KYEGB2 et KYGT207) au niveau des racines de blé dur (*Triticum durum* var. Waha) et du sol adhérent, après 2 semaines de culture sur le sol de la station ITGC.

Dans le témoin, nous notons toujours une prédominance des bactéries au niveau du rhizoplan par rapport au sol adhérent, aussi bien pour les « bactéries mésophiles totales » que les bactéries productrices d'EPS (Fig. 80). Si nous analysons le rapport R/S (fréquence dans la rhizosphère / celle dans le sol nu) pour ces deux populations bactériennes, nous remarquons qu'il est de 36 et 14, respectivement pour les bactéries mésophiles totales (sur milieu TSA/10) et les bactéries productrices d'EPS (milieu RCV-saccharose). Ces rapports élevés traduisent un « effet rhizosphérique » important.

Dans le compartiment « **sol adhérent** », l'inoculation de chacune des deux souches n'induit aucune modification significative de la taille de la population des « bactéries mésophiles totales » (comptées sur milieu TSA/10). Les deux souches inoculées atteignent dans ce compartiment, une taille d'environ 5×10^6 UFC g⁻¹ de sol sec, ce qui représente un nombre légèrement supérieur à celui de l'inoculum de départ (10^6 UFC plante⁻¹). Il apparaît donc, qu'après seulement deux semaines de culture, les deux souches bactériennes testées (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207) s'installent et se maintiennent à un niveau légèrement supérieur à celui des populations naturelles dans la rhizosphère du blé dur. Elles sont donc stimulées par la présence du blé dur, tout au moins, durant les premiers stades de développement du blé dur et qui correspondent à une phase active du point de vue de la rhizodéposition.

La taille des populations bactériennes inoculées est comparable à celle relevée dans le témoin (environ 10^7 UFC g⁻¹ de sol), qui est constituée de différentes espèces productrices d'EPS (Fig. 80). Il semblerait donc, que les deux souches bactériennes inoculées se soient installées dans la rhizosphère du blé dur, à la place d'autres populations bactériennes productrices d'EPS.

Des analyses génotypiques, telles que des analyses REP-PCR (Amellal *et al.*, 1998 ; Alami *et al.*, 2000), pourraient être utilisées pour confirmer que les colonies comptées sur milieu « saccharose + antibiotiques » sont réellement formées par les souches inoculées.

Par ailleurs, des travaux réalisés dans des conditions expérimentales analogues, en utilisant une souche de *Rhizobium* sp. YAS34 inoculée à *Arabidopsis thaliana*, ont montré que cette technique d'évaluation présentait une erreur estimée à environ 15 % (Cohen, 2002). Cette limite reste acceptable et rend la technique applicable au dénombrement des inoculums dans la rhizosphère.

Dans le compartiment « **racines** », la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 semble avoir un pouvoir de colonisation très important, puisque sa population dépasse 10^{10} UFC g⁻¹ de matière

sèche racinaire (traitement « témoin », Fig. 78). La forte augmentation de la population des « bactéries mésophiles totales », après inoculation par la souche *Rhizobium* sp. KYGT207, demande également à être vérifiée, car elle est très inattendue. La seule explication serait que cette souche de *Rhizobium* sp. KYGT207 modifierait des fonctions de la plante (exsudation par exemple) qui, en retour, stimulerait d'autres populations bactériennes capables de coloniser les racines de blé.

En ce qui concerne la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2, son comportement sur les racines est le même que dans le sol rhizosphérique : la souche est présente à un niveau comparable à celui des populations productrices d'EPS du témoin (environ 10^8 UFC.g⁻¹ de matière sèche racinaire), sans modification de la taille de la population des « bactéries totales », contrairement à ce que nous venons de voir avec la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 (Fig. 80).

1.3.2. Colonisation après quatre semaines de culture

Dans cette expérience, nous avons voulu savoir si la prolifération des souches *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207 dans la rhizosphère du blé dur après 2 semaines de croissance du blé, pouvait se maintenir plus longtemps. Pour cela une deuxième expérience a été réalisée, dans les mêmes conditions de culture que précédemment, sur une durée de 4 semaines. Cette expérience est indépendante de la précédente.

Tableau XXX. Dénombrement des bactéries inoculées dans la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha), après 4 semaines de culture, sur milieu « RCV-saccharose » avec antibiotiques (traitements *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207) ou sans antibiotiques (témoin)

Traitement	Compartiment	UFC . g ⁻¹ de sec	log UFC.g ⁻¹ sol sec	Moyenne
Témoin plante	SA	5,00E+07	7,70	7,43 ± 0,2
	SR ₁	2,33E+07	7,37	
	SR ₂	1,66E+07	7,22	
KYGT207	SA	2,33E+07	7,37	7,74 ± 0,7
	SR ₁	3,33E+08	8,52	
	SR ₂	2,19E+07	7,37	
KYEGB2	SA	3,30E+07	7,52	7,32 ± 0,3
	SR ₁	1,33E+07	7,12	
	SR ₂	nd	nd	

SA : sol adhérent aux racines de blé dur. SR₁ : sol qui tombe des racines lors de l'agitation des plantules, SR₂ : sol restant dans le pot après extraction de la plantule.
nd : non déterminé (contamination par des champignons).

Dans cette expérience, nous avons fractionné le sol rhizosphérique en :

- sol adhérent (SA) et intimement lié aux racines,
- sol rhizosphérique libéré lors de l'agitation mécanique des racines, faiblement adhérent aux racines (SR₁) et
- sol rhizosphérique restant dans le pot de culture du blé (SR₂).

Ces différentes fractions de sol sont classées par rapport à leur proximité de la racine comme suit : SA, SR₁ et SR₂.

Après 4 semaines de culture, la comparaison des populations de bactéries inoculées (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207) et des populations bactériennes productrices d'EPS, naturellement présentes dans le témoin, indique qu'elles ont approximativement la même taille (entre 10⁷ et 10⁸ UFC g⁻¹ de sol sec, Tableau XXX). Cela signifie que ces deux souches inoculées s'installent dans la rhizosphère, jusqu'à représenter la **population productrice d'EPS dominante**.

D'autre part, ces résultats indiquent que la zone d'influence des racines du blé dur, principalement sur un plan trophique, par le biais de son exsudation racinaire, ne s'arrête pas seulement au sol adhérent aux racines (SA), mais s'étend jusqu'au sol rhizosphérique plus éloigné (SR₂). Nous pouvons de ce fait, et dans ce cas précis, en tenant compte des dimensions des pots, considérer l'ensemble du sol d'un même pot comme étant du sol rhizosphérique.

Des travaux portant sur l'inoculation du blé par deux bactéries productrices d'EPS, *Pantoea* sp. NAS206 et *Agrobacterium radiobacter* NAT200 ont montré qu'il suffisait d'inoculer 5 x 10³ bactéries semence⁻¹ pour assurer une bonne colonisation de la rhizosphère (Amellal *et al.*, 1998). Ces mêmes auteurs ont également signalé que, quelle que soit la taille de l'inoculum, les deux bactéries atteignent, dans la rhizosphère du blé dur, un seuil maximal, probablement limité par la quantité d'énergie disponible sous forme d'exsudats racinaires.

En d'autres termes, la sélection d'un cultivar de blé dur, sur la base de sa capacité à exsuder de grandes quantités de glucides, pourrait constituer une voie de prospection intéressante, capable de fournir en permanence une source d'énergie.

2. Effet de l'inoculation de deux souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur l'agrégation du sol rhizosphérique

Après avoir vérifié que les deux souches étudiées (*Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2) étaient capables de coloniser la rhizosphère du blé dur après inoculation, nous avons voulu savoir, si elles pouvaient être suivies d'effets sur la plante, sur la masse de sol adhérent aux racines de blé dur et sur sa stabilité structurale.

2.1. Effet sur la masse de sol adhérent

Comme déjà signalé précédemment, le sol adhérent aux racines du blé dur constitue une interface par le biais de laquelle transitent l'eau et les éléments minéraux, indispensables à la nutrition de la plante. Elle présente aussi un rôle protecteur du système racinaire. C'est pour l'ensemble de ces raisons que nous nous intéressons particulièrement à ce volume de sol ainsi qu'à ses caractéristiques physiques.

Les deux souches bactériennes productrices d'EPS inoculées (KYEGB2 et KYGT207) s'installent et colonisent la rhizosphère du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) et elles induisent les mêmes effets sur la masse de sol adhérent.

Tableau XXXI. Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur la masse de sol adhérent aux racines du blé dur (*Triticum durum* L. var Waha), après 4 semaines de culture.

Traitement	Masse de sol adhérent (mg.plante ⁻¹)	LSD (95 %)
Témoin non inoculé	762	
<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2	3350	490
<i>Rhizobium</i> sp. KYGT207	3582	527

L'inoculation de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2 par exemple se traduit par une augmentation de la masse de sol adhérent aux racines de blé dur (Tableau XXXI). Celle-ci est importante, puisqu'elle est augmentée de 430 %.

L'inoculation de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 provoque également une augmentation significative de la masse de sol adhérent. En effet, celle-ci passe de 762 mg.plante⁻¹ pour le témoin à une valeur de 3582 mg.plante⁻¹ en présence de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 (Tableau XXXI). La masse de sol adhérent est ainsi approximativement 5 fois plus importante que dans le témoin.

L'augmentation de la masse de sol adhérent, suite à l'inoculation des souches *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207, peut être le résultat d'une production de substances agrégeantes dans la rhizosphère du blé dur, particulièrement à proximité des racines. La production d'EPS bactériens *in situ* pourrait en effet constituer un élément d'explication à l'agrégation du sol autour des racines.

Il nous paraît cependant important de signaler que certaines bactéries peuvent avoir un effet PGPR et que de ce fait, les quantités de mucilage et d'exsudats racinaires produites par le blé dur s'en trouvent accrues.

Même si l'on ne peut pas apporter d'explication précise pour cette augmentation de sol adhérent, elle demeure cependant le résultat de la présence des souches *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207 dans l'environnement racinaire.

2.2. Effet sur la biomasse racinaire

Malgré sa prolifération, sa persistance dans la rhizosphère du blé dur et son effet sur la masse de sol adhérent après 4 semaines de culture, la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2 n'engendre aucune augmentation de la biomasse racinaire (Tableau XXXII). Elle ne semble pas avoir de ce fait d'effet promoteur de la croissance racinaire (PGPR) .

Tableau XXXII. Effet de l'inoculation des 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur la biomasse racinaire du blé dur (*Triticum durum* L. var Waha), après 4 semaines de culture.

Traitement	Masse des racines (mg.plante ⁻¹)	LSD (95 %)
Témoin non inoculé	46,4	
<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2	52,0	10,3
<i>Rhizobium</i> sp. KYGT207	72,3	13,4

Contrairement à la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2, la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 présente quant à elle un effet PGPR relativement important, puisque sa présence dans la rhizosphère du blé dur permet une augmentation significative de la biomasse racinaire (+85%,

$P < 0.001$; Tableau XXXII). Cette souche pourrait avoir une incidence qualitative, mais surtout quantitative, sur les exsudats racinaires.

2.3. Effet sur le rapport SA/RA

Pour normaliser l'effet sur la masse de sol adhérent aux racines, il nous paraît indispensable de rapporter la masse de sol adhérent à l'unité de poids sec racinaire (RA). C'est ce que l'on appellera dans la suite du travail : le rapport SA/RA.

L'influence de l'inoculation des deux souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207), indique que le rapport SA/RA suit la même évolution que celle de la masse de sol adhérent exprimée par plante (Tableau XXXIII).

Tableau XXXIII. Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur le rapport SA/RA, après 4 semaines de culture.

Traitement	Rapport SA/RA	LSD (95 %)
Témoin non inoculé	15.4	
<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2	30.0	9.2
<i>Rhizobium</i> sp. KYGT207	36.6	8.7

L'augmentation significative du rapport SA/RA par les souches *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207 est respectivement de l'ordre de 95 et 137 % ($P < 0.001$)

Ces résultats sont concordants avec ceux relevés dans la littérature, puisque dans des conditions expérimentales proches de celles que nous avons employées, l'inoculation d'une culture de blé par la souche *Paenibacillus polymyxa* CF43, produisant un EPS type lévane, a permis d'augmenter la masse de sol adhérent aux racines (Gouzou *et al.*, 1993). Nous rappelons que la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2 synthétise également un EPS de type lévane et se maintient dans la rhizosphère (environ 2×10^7 UFC g⁻¹ sol rhizosphérique).

L'agrégation du sol autour des racines des plantules de blé dur ne semble donc pas dépendre directement de la spécificité des bactéries rhizosphériques. C'est surtout la nature des polymères qu'elles produisent qui détermine l'adhérence du sol sur les racines. En effet, les propriétés rhéologiques de l'EPS KYEGB2 sont caractérisées par une viscosité importante et une bonne élasticité (Cf. Chapitre II). Ces deux paramètres sont déterminants dans les phénomènes d'agrégation du sol.

D'autre part, et comme nous l'avons montré précédemment (Cf. Chapitre III), l'EPS KYGT207 améliore considérablement la rétention d'eau du sol de la station agronomique de Oued Smar. Il apparaît donc important de signaler les conséquences positives d'une telle production *in situ*. En effet, l'agrégation des particules de sol autour des racines du blé dur (+ 95 % pour *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et + 137 % pour *Rhizobium* sp. KYGT207), pourrait apporter une meilleure protection du système racinaire des plantules de blé dur vis-à-vis des effets du déficit hydrique, particulièrement durant les premiers stades de développement du végétal. Cela permettrait un meilleur état physiologique des plantules et générerait aussi une économie d'eau, particulièrement dans les zones semi-arides et arides. Ces régions sont caractérisées par une pluviométrie très faible, limitant la disponibilité de l'eau et par une grande perméabilité des sols liée à leur texture sableuse.

2.4. Effet sur la biomasse aérienne

L'estimation des masses sèches des parties aériennes a permis de montrer que l'inoculation des 2 souches testées induit une augmentation significative de la biomasse aérienne (Tableau

XXXIV). C'est ainsi que la présence de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2 dans la rhizosphère du blé dur provoque une augmentation de la biomasse aérienne, même si celle-ci n'a pas d'effet sur la croissance des racines. Paradoxalement, l'inoculation de cette souche bactérienne dans la rhizosphère du blé dur, sans effet sur les racines, engendre une augmentation de la biomasse aérienne 2 fois plus importante que celle observée avec l'inoculation de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207, qui, elle, a un effet positif sur la croissance racinaire. Nous avons ici la preuve que l'augmentation de la masse de sol adhérent et plus précisément celle du rapport SA/RA, relevées précédemment suite à l'inoculation de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2, peut engendrer des modifications positives de la production végétale, en l'absence d'effet sur la croissance racinaire.

Tableau XXXIV. Effet de l'inoculation des 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur la biomasse aérienne du blé dur (*Triticum durum* L. var Waha), après 4 semaines de culture.

Traitement	Masse des feuilles (mg.plante ⁻¹)	LSD (95.0 %)
Témoin non inoculé	60.9	
<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2	224.0	23.0
<i>Rhizobium</i> sp. KYGT207	113.2	10.8

L'inoculation de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 provoque également une augmentation de la biomasse aérienne (Tableau XXXIV). Après 4 semaines de culture, celle-ci est évaluée à + 85%, ($P < 0.001$). Cette augmentation de la biomasse aérienne est équivalente à celle observée au niveau racinaire. Elle serait donc le résultat, non seulement d'une bonne prospection du sol rhizosphérique avec un meilleur ancrage, mais aussi d'une augmentation de la masse de sol adhérent. Une telle situation permettrait des prélèvements d'eau et d'éléments minéraux plus importants, améliorant ainsi l'état physiologique des plantules de blé dur.

La complexité des interactions « bactéries-plante », matérialisée dans le cas de l'inoculation de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 par de nombreuses incidences, à des niveaux différents (masse de sol adhérent et racinaire) ne nous permet pas d'apporter des explications précises, quant aux modifications observées au niveau de la biomasse aérienne. En effet, une question relative à la compartimentation de ces effets s'impose :

« Quelle est la part qui revient à l'agrégation du sol rhizosphérique dans ces modifications ? »

Les diverses activités métaboliques des bactéries et leurs incidences multiples sur la physiologie des plantes, rendent la réponse à une telle question très difficile. La seule évidence que l'on peut avancer à ce stade du travail, c'est que l'ensemble des modifications observées au niveau de la plante, que ce soit dans sa partie aérienne ou racinaire, est bien liée à une inoculation bactérienne.

Ces effets bénéfiques observés durant les premiers stades de développement du blé dur laissent entrevoir des perspectives de production intéressantes.

Il est connu que l'état physiologique des plantules de blé dur durant les premiers stades est déterminant pour une bonne production végétale.

Il apparaît de ce fait que le blé dur, tout au moins durant les premiers stades végétatifs, investirait de grandes quantités de photosynthétats dans la croissance racinaire : la biomasse racinaire des témoins représente 75 % de celle des feuilles dans le traitement « témoin » (46,4 mg vs 60,9 mg par plante ; Tableaux XXXII et XXXIV).

Sous l'effet de l'inoculation des deux souches bactériennes testées, un déséquilibre de cette allocation s'opère au profit de la biomasse aérienne. On ne peut pas exclure qu'elle est le résultat d'une meilleure nutrition, particulièrement azotée, entretenue par un chevelu racinaire dense (surtout dans le cas de l'inoculation de *Rhizobium* sp. KYGT207).

3. Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes (KYGB2 et KYGT207) sur la stabilité structurale du sol rhizosphérique

L'analyse des résultats précédents nous a permis de mettre en évidence un effet significatif de l'inoculation sur la masse de sol adhérent et sur le rapport SA/RA dans les traitements *Paenibacillus* sp. KYGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207, traduisant ainsi un effet quantitatif sur l'agrégation du sol autour des racines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha).

3.1. Effet global

Dans cette partie du travail, nous avons cherché à savoir si cet effet quantitatif s'accompagne ou non d'un effet qualitatif en évaluant la stabilité structurale du sol adhérent aux racines du blé dur, par l'estimation du taux d'agrégats (> 200 µm) stables à l'eau. Il s'agit là d'une technique indirecte qui permet d'évaluer les forces de cohésion des agrégats.

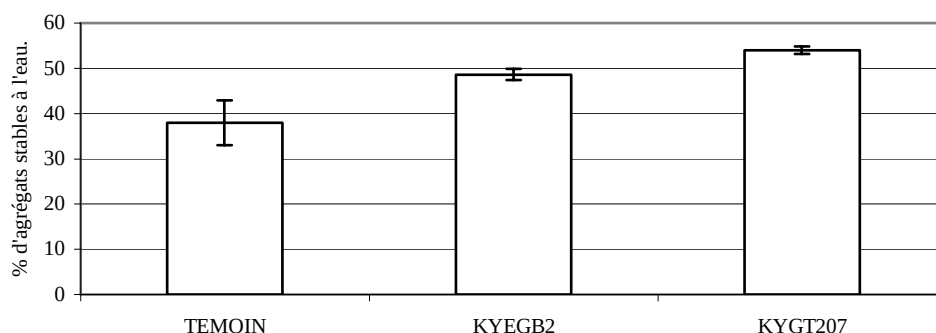


Figure 81. Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes productrices d'EPS (KYGB2 et KYGT207) sur la stabilité structurale du sol adhérent aux racines du blé dur *Triticum durum* var. Waha.

Le taux d'agrégats stables à l'eau de la fraction de sol la plus proche des racines de blé dur, celle que l'on appelle sol adhérent, montre que les deux souches bactériennes *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYGB2 ont un effet significatif sur la stabilité structurale ainsi définie (Fig. 81). Cette augmentation de la cohésion des agrégats au voisinage des racines de blé dur (*Triticum durum* var. Waha) se traduit par plus de 50 % d'agrégats stables à l'eau, sous l'effet de l'inoculation de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207, alors que la valeur du témoin est inférieure à 40 % (Fig. 81). La valeur relevée en présence de la souche *Paenibacillus* sp. KYGB2 est légèrement inférieure (48,5 % d'agrégats stables à l'eau).

Ces résultats montrent que l'inoculation de bactéries productrices d'EPS provoque dans nos conditions expérimentales, une modification de la cohésion du sol rhizosphérique, exprimée par une augmentation de la stabilité des agrégats.

Si l'effet de l'inoculation de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 sur la stabilité structurale du sol rhizosphérique était prévisible, en raison des propriétés rhéologiques remarquables de l'EPS qu'elle produit (forte viscosité et élasticité), il n'en est pas de même pour la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2. En effet, nous pensions que son incidence serait relativement faible sur la stabilité structurale en raison des résultats antérieurs sur sa forte solubilité dans l'eau. En situation « réelle » (sol et plante), cette souche a des propriétés proches de celles de la souche KYGT207 sur la stabilité structurale.

Après avoir montré que les souches *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Paenibacillus* sp. KYEGB2 étaient capables d'augmenter quantitativement la masse de sol adhérant aux racines (par unité de masse racinaire), nous mettons ici en évidence un effet **qualitatif** de ces souches sur la stabilité du sol adhérent.

3.2. Effet sur différentes tailles d'agrégats

Dans un deuxième temps, nous avons fractionné les agrégats de sol rhizosphérique, définissant ainsi quatre classes de taille d'agrégats, ainsi définies :

0,2 à 0,8 / 0,8 à 1,0 / 1,0 à 1,6 et 1,6 à 2,0 mm de diamètre.

Nous avons ensuite déterminé la stabilité structurale de chacune des fractions ci-dessus décrites.

La comparaison du témoin (sol sans plante) et du témoin (plante) nous indique que la plante modifie la stabilité d'une seule classe d'agrégats, celle dont la taille est comprise entre

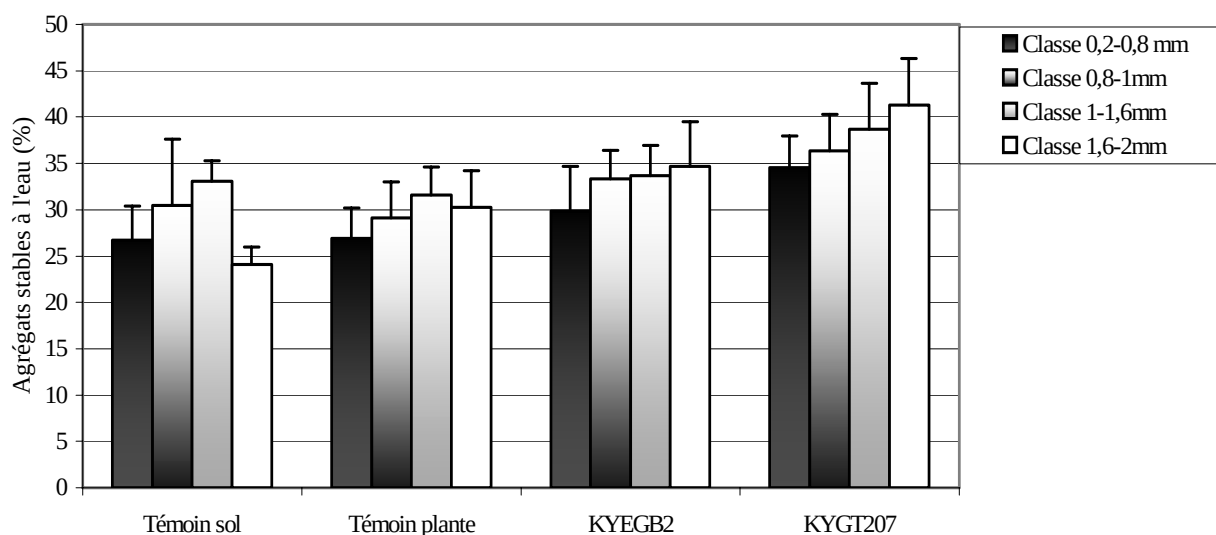


Figure 82. Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes sur la stabilité structurale des différentes tailles d'agrégats du sol rhizosphérique de Oued Smar (ITGC).

1,6 et 2 mm de diamètre (Fig. 82).

Ce résultat semble indiquer que les exsudats racinaires et l'absorption d'eau par les racines modifient la structure du sol adhérent, en particulier en augmentant de façon significative la stabilité des macro-agrégats de la classe 1,6-2,0 mm.

L'effet mécanique qu'exercent les racines des plantules de blé dur sur le sol rhizosphérique, en modifiant en permanence son état hydrique et en le soumettant à des situations alternées de dessiccation-humectation, conduit à un renforcement de la stabilité structurale (effet « rhizosphère »). Cet état de dessiccation fait suite à l'absorption d'eau par les racines de blé dur, alors que l'état d'humectation du sol est le résultat de l'arrosage. Ces conditions hydriques du sol rhizosphérique sont donc cycliques et contribuent ainsi à un réarrangement permanent des agrégats de sol autour des racines. L'ensemble de ces observations nous incite à appréhender la structure du sol d'un point de vue dynamique.

L'effet de l'inoculation de la souche *Paenibacillus* sp. KYEGB2 sur le taux d'agrégats stables à l'eau ressemble à celui du « témoin plante », puisque cette souche ne modifie, de manière significative, que la fraction structurale comprise entre 1,6 et 2 mm et correspondant aux macro-agrégats (Fig. 82). L'inoculation de cette souche au blé dur agirait donc comme un amplificateur de l'effet « rhizosphère » de la plante à travers son système racinaire.

Nous remarquons également que l'inoculation de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 entraîne une augmentation significative de la stabilité structurale du sol et ceci quelle que soit la classe de taille d'agrégats considérée (Fig. 82). Nous noterons cependant que son effet est beaucoup plus marqué sur les agrégats dont la taille est comprise entre 1,6-2,0 mm, puisque le taux d'agrégats stables à l'eau passe de 30 ± 4 % pour le témoin à 42 ± 5 % pour le traitement inoculé.

Enfin, toutes ces observations laissent penser que la production d'EPS, ainsi que leurs caractéristiques rhéologiques mises en cause dans cette cohésion, constituent des facteurs importants dans la structuration du sol (Cf. Chapitre III).

Il faut toutefois moduler ces affirmations, puisque l'inoculation d'une bactérie dans un environnement aussi complexe que la rhizosphère présente une grande diversité d'action sur la structure du sol. Comme nous venons de le voir dans le Chapitre III, cet effet peut être direct et concerne l'implication des EPS bactériens dans la structuration du sol, mais aussi indirect par le biais d'un effet sur l'environnement biologique (plante, microorganismes etc...).

4. Discussion

Dans des conditions de laboratoire (culture des plantules en pots) et au cours des premiers stades de développement du blé dur, nous constatons que les souches bactériennes inoculées, en l'occurrence *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207, s'installent très rapidement (après seulement 2 semaines) dans la rhizosphère du blé dur, à la surface des racines et dans le sol adhérent. L'étude de la colonisation du sol rhizosphérique du blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha) par ces deux souches bactériennes productrices d'EPS nous permet de conclure que les phénomènes de compétition entre populations microbiennes ne constituent pas un obstacle à l'installation et au maintien de ces bactéries dans la rhizosphère, même après un mois de culture.

En effet, après 4 semaines de culture, les souches *Rhizobium sp.* KYGT207 et *Paenibacillus sp.* KYEGB2 occupent une place importante parmi les bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur. L'apport d'une souche bactérienne dans un environnement, quand celle-ci vient à s'installer durablement, peut modifier l'équilibre biologique initial. C'est ainsi que Gilbert *et al.* (1996) ont observé une baisse de la diversité microbienne, suite à l'inoculation d'une souche de *Bacillus cereus* UW85nl à du soja.

La réduction de la diversité biologique ne semble pas constituer une règle générale, puisqu'elle est liée essentiellement au pouvoir antagoniste de la souche bactérienne inoculée.

Cette question n'a pas été abordée dans le cadre de cette étude, mais il semblerait que l'inoculation de la souche *Rhizobium sp.* KYGT207 ne modifie pas la taille des communautés bactériennes productrices d'EPS (Cf. Chapitre I). D'autre part, les souches étudiées proviennent à l'origine de la rhizosphère du blé dur et, par conséquent, il n'est pas surprenant de les voir s'installer durablement (un mois) dans cet environnement.

Les bactéries inoculées atteignent donc des tailles de populations beaucoup plus importantes au niveau des racines que dans le sol adhérent, probablement en raison de la disponibilité de nutriments fournis par la plante par exsudation racinaire. En effet, le facteur de dilution des exsudats racinaires qui s'opère au fur et à mesure que l'on s'éloigne du site de production (la racine) limite ainsi la réserve nutritive des microorganismes. Dans la rhizosphère, ces bactéries sont souvent maintenues fixées à un support solide, en l'occurrence des particules d'argile ou même directement sur la surface racinaire. Cette approche de l'adhésion des microorganismes sur les surfaces solides est basée sur la physico-chimie des interfaces.

Celle-ci prend en considération essentiellement les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals. Lorsque deux surfaces portent des charges de signe contraire, il y a toujours attraction, alors que dans le cas contraire, et il semblerait que ce soit le cas de l'expérience menée avec le sol de la station ITGC (sol argileux), tout dépend de la force ionique du milieu environnant (Bos *et al.*, 1999).

- À faible concentration en électrolytes dans le milieu, une barrière de répulsion importante s'installe, empêchant ainsi les bactéries de s'immobiliser aux abords de la surface.
- À concentration intermédiaire en électrolytes entre 10^{-4} et 10^{-1} moles.L⁻¹, dans le milieu, les bactéries s'immobilisent aux abords de la surface dans une zone appelée minimum secondaire, la barrière de répulsion étant plus faible. Dans cette zone, l'adhésion est réversible, les bactéries ne pouvant pas entrer en contact intime avec la surface. Une adhésion irréversible peut néanmoins se produire grâce aux *pili* ou par la sécrétion de molécules de petite taille pouvant franchir cette barrière de répulsion.
- À une forte concentration en électrolytes, les microorganismes peuvent s'immobiliser dans la zone nommée minimum primaire, zone plus proche de la surface et ainsi adhérer irréversiblement (Garry, 1997).

Toutes ces considérations, portant sur les mécanismes d'adhésion des bactéries sur des surfaces solides montrent que les situations ne sont pas irréversibles et qu'elles sont sous la dépendance de nombreux facteurs.

La colonisation rhizosphérique du blé dur par les 2 souches bactériennes testées s'est accompagnée d'un effet positif sur la masse de sol adhérent. Ainsi, l'augmentation de la masse de sol adhérent aux racines de blé dur, en présence de la souche *Paenibacillus sp.*

KYEGB2 mentionnée précédemment, pourrait être attribuée à une activité de production d'EPS par les bactéries rhizosphériques, sans effet direct sur la croissance des racines.

Concernant la souche *Rhizobium sp.* KYGT207, cette hypothèse ne serait pas la seule explication à un tel effet, puisque l'augmentation de la biomasse racinaire du blé dur pourrait aussi avoir pour conséquence une stimulation de la rhizodéposition, particulièrement le mucilage, ce qui pourrait expliquer en partie l'augmentation de la masse de sol adhérent. Globalement, les substances rhizodéposées, particulièrement les glucides peuvent être divisés en 2 groupes en fonction de leur degré de polymérisation :

- les glucides simples, très rapidement métabolisables par la microflore rhizosphérique et pouvant donc servir de substrat aux inoculums,
- les polysaccharides (mucilage) permettant l'agrégation du sol et donc l'augmentation de la masse de sol adhérent.

Cette relation entre le sol adhérent et la biomasse racinaire peut aussi être appréciée à 2 niveaux :

- **physique** : l'augmentation du volume racinaire (augmentation de la surface racinaire) engendre une augmentation de la masse de sol adhérent,
- **fonctionnel** : par le biais de la stimulation de l'exsudation racinaire.

Après avoir apporté ces informations relatives au fonctionnement de la rhizosphère, nous pouvons nous poser la question suivante :

« Dans le phénomène d'agrégation, quelle est la part qui revient directement à l'effet des EPS ? »

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la complexité de l'environnement rhizosphérique avec ses nombreuses interactions entre les différents facteurs biotiques et abiotiques, rend difficile la réponse à une telle question, qui reviendrait en partie à compartimenter le carbone dans le sol. En effet, des approches de modélisation de ces systèmes biologiques en utilisant des isotopes du C (^{13}C et ^{14}C) n'ont pu permettre d'appréhender ce genre de problématique, du fait de la grande diffusion du carbone dans les différents compartiments biologiques de la rhizosphère.

L'effet de l'inoculation sur le rapport SA/RA est estimé à + 95 % et + 137 %, respectivement après inoculation des souches *Paenibacillus sp.* KYEGB2 et *Rhizobium sp.* KYGT207. Ces valeurs de SA/RA sont considérées comme très élevées, si on les compare avec celles obtenues par Amellal *et al.* (1998, 1999) sur un vertisol marocain, cultivé avec du blé dur. En effet, ces auteurs observent une augmentation ne dépassant pas 50 % de la valeur SA/RA du témoin, après inoculation avec une souche de *Pantoea agglomerans* produisant un EPS acide dont l'unité de répétition est composée de glucose et galactose avec des fonctions acides dues à la présence de succinate et pyruvate (Amellal *et al.*, 1999). Dans leurs conditions expérimentales, ils obtiennent un rapport SA/RA pour le témoin (120) bien plus élevé que celui mesuré dans nos expériences (15). Cette faible valeur du rapport SA/RA du témoin, dans nos conditions expérimentales et avec le sol de Oued Smar, peut expliquer que l'effet de l'inoculation avec nos deux souches soit nettement supérieur à celui observé avec le vertisol marocain. Plus la valeur du témoin est faible, plus l'effet attendu a une chance d'être important. De façon générale, les travaux concernant l'effet de l'inoculation bactérienne sur l'agrégation rhizosphérique concluent à un effet maximum de l'ordre de 50 % du rapport SA/RA (Amellal *et al.*, 1999 ; Bezzate *et al.*, 2000 ; Alami *et al.*, 2000).

L'hypothèse d'une modification de la structure du sol après inoculation de ces bactéries est vérifiée, en particulier pour la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 qui augmente, de façon significative, quantitativement la masse de sol adhérent (par unité de biomasse racinaire). Cette modification du sol adhérent s'opère aussi sur le plan qualitatif, en augmentant la stabilité des agrégats. Nous avons donc ici la preuve que cette bactérie, non seulement se maintient dans la rhizosphère du blé dur pendant au moins un mois, mais qu'elle présente aussi une activité conduisant à l'augmentation de la masse de sol adhérent autour des racines et à la modification des propriétés physiques de ce sol.

L'explication de tels phénomènes structuraux du sol rhizosphérique reposerait sur le fait que les polysaccharides induisent la formation d'un revêtement autour des agrégats et sa stabilisation par adsorption et pontage (Chenu *et al.*, 1994). Ces auteurs ont montré que la pulvérisation de polysaccharides microbiens sur des argiles augmentait leur résistance au micro-fractionnement et à la brisure mécanique, c'est-à-dire l'abrasion mécanique. D'autre part, Tisdall and Oades (1982) expliquent l'action des polysaccharides à l'échelle de la macroagrégation, par les ponts qu'ils sont capables d'établir entre les particules d'argile, permettant ainsi de construire des matrices plurimoléculaires.

Pour établir un lien entre cette modification de l'environnement racinaire et la capacité de cette bactérie à produire un EPS, nous n'avons pour l'instant que des évidences indirectes (rapport SA/RA, pourcentage d'agrégats stables) et les résultats acquis dans le Chapitre III, montrant que l'EPS de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 modifie la dynamique de l'eau dans différents sols. Un moyen plus direct permettant de visualiser la production d'EPS, sur les racines et dans la rhizosphère, serait de réaliser une co-localisation de la bactérie par marquage avec une « Green Fluorescent Protein, GFP » et de son EPS marqué avec une lectine fluorescente (Santaella *et al.*, soumis).

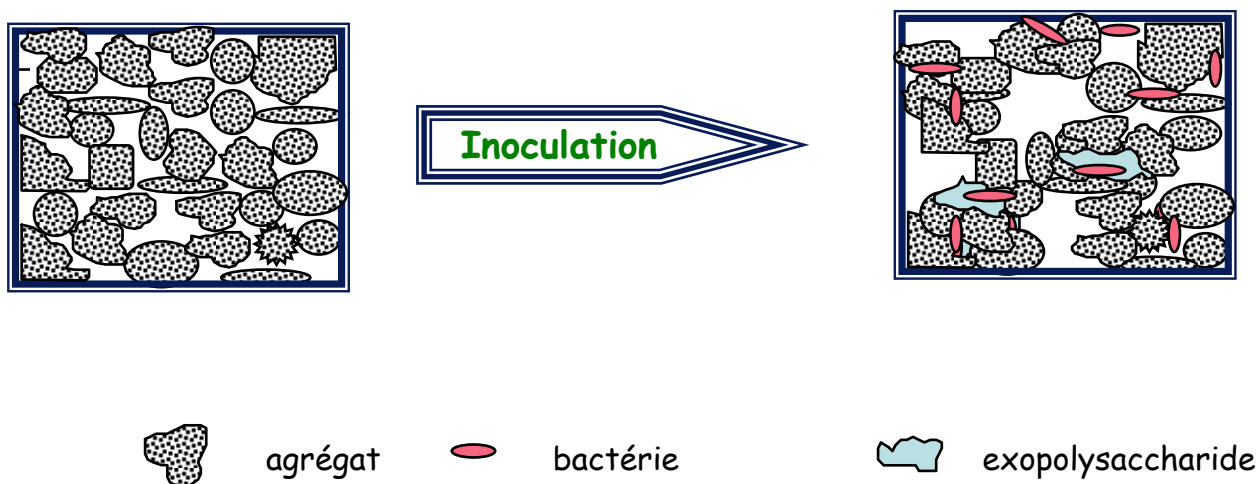


Figure 83. Représentation hypothétique de l'effet de l'inoculation par la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 sur la structure porale du sol adhérent aux racines de blé dur (*Triticum durum* L. var. Waha).

Dans le Chapitre III, nous avons proposé une hypothétique action des EPS bactériens qui restructurent le sol, en augmentant le volume poral. Ce même schéma reste valable dans le cas de l'inoculation de bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé (Fig. 83).

Par ailleurs, cette activité bactérienne, qui s'est traduite par une modification de la structure du sol adhérent, s'accompagne d'un effet sur la croissance des racines des plantules de blé dur. Dans leur travail sur le tournesol inoculé par une souche de *Rhizobium* sp. (YAS34), Alami *et al.* (2000) avaient également observé à la fois un effet de cette souche sur le sol adhérent (augmentation de la masse de sol adhérent, augmentation de la macroporosité) et un effet sur la croissance des plantes, beaucoup moins marqué (racines et feuilles, + 25 %). Ces auteurs n'ont cependant pas apporté de réponse concernant les raisons d'une telle augmentation de biomasse végétale.

D'autre part, Hilali *et al.* (2001) ont montré que des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* isolées à partir de la rhizosphère du blé avaient un effet bénéfique comme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR). Certaines d'entre elles, comme la souche CIAT168, pouvaient même améliorer le rendement en grains de + 24 %, ce qui représente un gain très important.

Dans notre cas, la durée de l'expérimentation (4 semaines) n'a pas permis de montrer de tels effets. Le choix d'une durée aussi courte a été retenu par rapport aux objectifs fixés :

- amélioration du rapport SA/RA,
- amélioration de certaines propriétés physiques (rétention d'eau et stabilité structurale,
- colonisation des souches bactériennes.

En effet, l'étude de ces différents paramètres est liée surtout au phénomène d'exsudation racinaire du blé dur. Or, cette propriété qu'a la plante à libérer dans la rhizosphère des molécules se manifeste très fortement durant les premiers stades de développement de la plante.

Sur le plan qualitatif, l'inoculation des deux souches retenues (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207) au blé dur a permis d'améliorer la stabilité structurale des agrégats rhizosphériques. Cet effet est beaucoup plus marqué pour les agrégats dont la taille est comprise entre 1,6 et 2,0 mm.

Dans une étude menée sur les stocks de carbone, provenant essentiellement de l'activité métabolique microbienne et des végétaux, des chercheurs ont montré que les agrégats stables à l'eau sont enrichis en carbone « jeune ». Cette fraction de la matière organique du sol est considérée comme un agent agrégeant ; elle est essentiellement constituée de métabolites d'origine microbienne (Puget *et al.* 2000).

Nous avons aussi montré que la plante, à travers son système racinaire, pouvait à elle seule améliorer la stabilité structurale des agrégats de même taille (1,6 - 2,0 mm) avec une intensité moindre que celle que procure l'inoculation des deux bactéries testées (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207). C'est ainsi que les racines des plantes exercent des effets multiples sur le sol, potentiellement favorables à l'agrégation du sol quantitativement et qualitativement:

- un double effet mécanique dû à la croissance des racines et au prélèvement de l'eau, provoquant une alternance de phases « dessiccation-humectation » dans la rhizosphère après arrosage,
- un effet dû à l'exsudation sur la production d'agents de liaison.

Ce dernier point est souvent le fait de microorganismes, qui sont dans la plupart des cas, entourés d'une capsule de nature polysaccharidique, hautement hydrophile, capable de former des ponts « hydrogène » avec des molécules d'eau. Ceci leur confère un pouvoir de rétention d'eau, indispensable à leur survie, en limitant la déshydratation et en ralentissant le dessèchement du sol environnant. (Dudman, 1977 ; Amellal *et al.*, 1998).

Paradoxalement, malgré leur persistance qui peut être de l'ordre du mois, ces substances engendrent des modifications structurales importantes dans la rhizosphère. Ces remarques nous poussent à observer une approche dynamique de la structure d'un sol. En effet, cette dernière, particulièrement les méso-agrégats et les macro-agrégats ne sont pas physiquement stables dans le temps. Ils subissent des changements permanents, sous la dépendance de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, les uns déstructurant les autres agrégeant. L'alternance permanente de ces deux effets antagonistes permet une meilleure organisation de la structure du sol et une cohésion plus forte, assurant au sol plus de stabilité.

L'inoculation des 2 souches bactériennes retenues, particulièrement *Rhizobium sp.* KYGT207, a permis la mise en place chez la plantule de blé dur après 4 semaines de culture, un ensemble d'éléments (rapport SA/RA élevé et effet sur la croissance racinaire) laissant entrevoir une meilleure prospection du sol rhizosphérique. À ce stade de développement, l'une des répercussions favorables se matérialise par l'augmentation de la biomasse aérienne. Celle-ci peut trouver une explication non seulement dans une meilleure nutrition minérale, en particulier azotée, assurée par un chevelu racinaire devenu plus important après inoculation bactérienne, mais également une allocation de carbone plus importante dans le système racinaire. Dans la littérature, le terme allocation carbonée est défini sur le plan physiologique et correspond à la distribution des assimilats permis par la photosynthèse entre différents organes de la plante et recouvre des mécanismes aussi divers que le transport à plus ou moins longue distance, l'accumulation et l'utilisation des assimilats (Touraine *et al.*, 1994). Il apparaît donc qu'un équilibre fonctionnel établi entre les parties aériennes et racinaires est important et constitue ainsi les bases d'une bonne production végétale.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'inoculation de bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur pouvait avoir des incidences positives à la fois sur le support édaphique et sur la plantule de blé elle-même.

Les répercussions bénéfiques pour la plante se sont matérialisées par une augmentation de la biomasse végétale. Celle-ci est probablement à la fois le résultat d'un effet direct sur la plante (effet PGPR), mais aussi la manifestation de modifications opérées dans le sol (agrégation, meilleure stabilité structurale, amélioration de la rétention d'eau...).

Dans ce travail, ce sont les modifications apportées au sol qui nous intéressent particulièrement. En effet, si l'inoculum venait à se maintenir de manière durable, il pourrait apporter une contribution considérable dans le processus d'agrégation du sol, particulièrement dans les régions semi-arides et arides caractérisées par des sols meubles sans structure apparente et pauvres en matière organique. Pour qu'une telle action des bactéries se manifeste, il suffirait de maintenir des conditions de prolifération microbienne adéquates, conditions qui pourraient être mises à profit lors l'installation de culture de blé dur par exemple. Il faudrait toutefois sélectionner une variété, non sur la base du rendement en grain, mais surtout sur sa capacité à exsuder dans la rhizosphère des quantités importantes de molécules carbonées.

Conclusion générale

L'agriculture moderne, particulièrement celle qui touche les régions arides ou semi-arides, est tributaire de l'utilisation de systèmes d'irrigation performants et correctement adaptés au contexte pédoclimatique. En effet, les sols de ces régions sont caractérisés par une faible teneur en matière organique ainsi que d'une texture meuble. Ces deux paramètres impriment à ces sols, une structure particulière, très perméable avec une capacité de rétention d'eau et de cations pratiquement nulle. Ceci engendre des pertes en eau très importantes, lors de l'irrigation entraînant les engrais chimiques et les produits phytosanitaires par lessivage. De graves problèmes de pollution des sols et des eaux souterraines s'en suivent.

Le potentiel bactérien producteur d'EPS est important dans la rhizosphère du blé dur. Il représente une population bactérienne abondante et diversifiée. En moyenne, le nombre de souches bactériennes isolées à partir des racines du blé dur (*Triticum durum* var. Waha) est deux fois plus important que celui du sol adhérent. Ceci montre que le blé dur, grâce à la rhizodéposition, permet d'augmenter la diversité bactérienne.

Ces bactéries sont considérées comme hyperproductrices, en particulier celles isolées des régions arides ou semi-arides, comme c'est le cas de Gassi Touil et d'El Goléa. En effet, dans les sols de ces régions, nous avons isolé deux bactéries, que nous avons identifiées grâce au séquençage de l'ADN 16S :

- *Rhizobium* sp. KYGT207 et
- *Paenibacillus* sp. KYEGB2).

Ces deux souches bactériennes se sont révélées productrices de grandes quantités d'EPS. Elles ont été sélectionnées sur la base des caractéristiques rhéologiques particulières des EPS qu'elles produisent, très proches de celles du xanthane, polysaccharide très connu pour sa grande viscosité. Elles semblent appartenir à de nouvelles espèces, puisque leur identification par séquençage de l'ADN 16S n'a pu les rapprocher des espèces déjà décrites dans la littérature. Par ailleurs, la grande diversité métabolique de ces deux souches bactériennes constitue un caractère intéressant, puisqu'il leur confère une capacité d'adaptabilité à des environnements différents (rhizosphère de différentes plantes par exemple).

L'étude structurale de ces EPS montre qu'ils appartiennent à des classes différentes : un homopolysaccharide majoritaire, identifié comme un lévane pour l'EPS KYEGB2 et un hétéropolysaccharide pour KYGT207. Si les lévanes sont habituellement décrits dans la littérature comme des EPS ne présentant pas des propriétés viscosantes intéressantes, ce n'est pas le cas de l'EPS KYEGB2. Nous avons attribué la grande viscosité de ce polymère à la présence d'un EPS minoritaire, que nous avons mis en évidence, sans l'identifier.

L'EPS KYGT207 est caractérisé par une structure originale, puisqu'elle n'a pas été rapportée dans les banques de données. Il se distingue par la présence de glucose, de galactose et d'acide mannuronique dans un rapport : 2/1/1 ; un des deux résidus glucose est branché latéralement. C'est la présence d'acide mannuronique dans l'EPS KYGT207 qui détermine son originalité.

La caractérisation rhéologique montre qu'à faible concentration (0,5 g.l⁻¹), les deux EPS KYEGB2 et KYGT207 présentent des viscosités relatives élevées, proches de celle du xanthane. De plus, un traitement thermique de ces EPS, même à des températures élevées (1 h à 100 °C) ne semble pas affecter leur viscosité, donc probablement leur structure. Ce caractère intéressant peut être mis à profit dans un contexte écologique, notamment dans les sols sahariens.

L'étude des propriétés hydriques des EPS purifiés KYEGB2 et KYGT207 montre que ces deux polymères ont une capacité de rétention d'eau importante ; elle représente entre 105 et 130 fois leurs poids de matière sèche respectifs. Cette rétention d'eau est proche de celle du xanthane qui permet de retenir des quantités d'eau équivalentes à 180 fois son poids de matière sèche (Robert et Schmit, 1982).

L'effet de ces deux EPS (KYEGB2 et KYGT207) sur la dynamique de l'eau du sol a permis de montrer que l'EPS KYGT207 en particulier, présente des possibilités d'amélioration de la rétention d'eau intéressantes. Pour donner un sens physiologique à la rétention d'eau d'un sol, nous l'avons exprimée en humidité disponible pour la plante : **réserve utile**. Nous avons montré que l'ajout de l'EPS KYGT207 à un sol argileux de la station agronomique de Oued Smar, améliore de manière considérable la réserve utile d'un facteur (> 3), alors que le xanthane, à la même concentration, ne l'améliore que d'un facteur 1,8.

Les mêmes observations sont notées, en utilisant des sables sans aucune structure apparente. Ainsi, l'addition d'une faible quantité d'EPS KYGT207 (0,6%) à un sol à texture sableuse (El Goléa), permet d'améliorer sa rétention d'eau au point de la hisser à un niveau équivalent à celle d'un sol à texture argileuse et à structure élaborée sans amendement (sol de Oued Smar, témoin).

Cette expérience montre l'intensité avec laquelle les EPS bactériens peuvent améliorer la capacité de rétention d'eau, dans des conditions pédoclimatiques extrêmes (texture sableuse et absence de matière organique), en agrégeant le sol. En effet, nous avons observé une agrégation des particules de sable (El Goléa et Tamanrasset), particulièrement en présence de l'EPS KYGT207.

Après avoir montré que les 2 EPS KYEGB2 et KYGT207 étaient capables d'améliorer la rétention d'eau des sols et de sables, nous avons procédé à l'inoculation des 2 souches bactériennes (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207) dans la rhizosphère du blé dur, sur un sol argileux de Oued Smar. Les deux souches bactériennes testées présentent un pouvoir colonisateur important, puisqu'elles prolifèrent et se maintiennent dans la rhizosphère après 4 semaines de culture.

Les effets d'une telle inoculation se sont traduits par des modifications à deux niveaux de la rhizosphère :

- sol rhizosphérique : augmentation de la masse de sol adhérent, de rétention d'eau et de la stabilité structurale,
- plante : augmentation de la biomasse végétale (aérienne et racinaire).

La complexité des interactions régissant le fonctionnement de la rhizosphère rend de telles études difficiles: les acteurs de cet environnement particulier sont en effet multiples et interactifs.

C'est ainsi que l'amélioration de la structure du sol rhizosphérique, suite à l'inoculation de chacune des deux souches bactériennes productrices d'EPS, implique une augmentation de la capacité de rétention d'eau et de la capacité d'échange cationique.

Ces deux propriétés du sol supposent de meilleurs prélèvements d'eau et de cations échangeables par la plante, ce qui a pour conséquence une augmentation de la biomasse végétale. En retour, celle-ci produit plus d'exsudats racinaires qui permettent une plus grande prolifération de microorganismes rhizosphériques. D'autres part, ces rhizodépôts, comme les EPS bactériens, contribuent à une réorganisation structurale du sol.

Il apparaît donc que les modifications de la structure du sol rhizosphérique, suite à l'inoculation de bactéries productrices d'EPS sont le résultat du concours d'une somme de phénomènes qui ont pour résultat final un meilleur aspect physiologique de la plantule de blé dur et très probablement une meilleure productivité.

L'effet de l'inoculation des souches *Paenibacillus* sp. KYEGB2 et particulièrement *Rhizobium* sp. KYGT207, s'est traduit, sur le plan quantitatif, par une augmentation de la masse de sol adhérent. Du point de vue qualitatif, elle a induit une amélioration conséquente de la stabilité structurale du sol rhizosphérique, notamment en ce qui concerne la fraction d'agrégats dont la taille est comprise entre 1,6 et 2 mm. L'amélioration de la stabilité structurale de cette fraction de sol, exprime une plus grande cohésion des agrégats, laissant apparaître une plus forte résistance à l'érosion hydrique.

Une augmentation de la rétention d'eau a été également mise en évidence, après inoculation de chacune des deux souches bactériennes productrices d'EPS (*Paenibacillus* sp. KYEGB2 et *Rhizobium* sp. KYGT207) au sol de la station ITGC ; elle est probablement la conséquence de leurs multiples incidences sur le plan de la structure du sol. En effet, l'amélioration de la rétention d'eau ne peut être le résultat d'une simple rétention intrinsèque par l'EPS. Nous avons en effet émis une hypothèse à ce sujet et qui concerne la réorganisation structurale des sols en présence d'EPS, laissant apparaître un volume poral plus important.

Au-delà des économies d'eau non négligeables que pourrait engendrer l'utilisation des EPS bactériens, c'est donc l'implication de ces polymères dans les phénomènes d'agrégation du sol qui nous semble capitale, puisqu'elle peut à moyen ou long terme structurer un sol.

Nous avons également montré que l'inoculation des 2 souches bactériennes retenues, particulièrement *R. sp.* KYGT207 a permis la mise en place chez la plantule de blé dur (*Triticum durum* L. var. waha) après 4 semaines de culture, d'un ensemble d'éléments : rapport SARA élevé et effet PGPR. Ces incidences positives, à la fois sur le sol et le végétal, laissent entrevoir une meilleure prospection du sol rhizosphérique. L'une des répercussions favorables est matérialisée par l'augmentation de la biomasse végétale. Celle-ci est la conséquence conjuguée d'une meilleure nutrition minérale (azote, phosphate), assurée par un chevelu racinaire devenu plus important, après inoculation bactérienne : effet PGPR et d'une plus grande allocation des hydrates de carbone dans la plantule, suite à une intense activité photosynthétique. Ces incidences positives, à la fois sur le sol rhizosphérique et sur la plante elle-même, constituent une somme d'observations liées à l'inoculation bactérienne.

Par soucis d'amélioration des rendements, les transferts d'éléments sont souvent perçus par les agronomes dans le sens sol-plante. A ce titre, le sol est souvent appelé « support édaphique » et n'est considéré que comme source d'éléments nutritifs pour la plante. Cette conception répond à une demande sans cesse croissante d'amélioration des rendements, parfois même au détriment du sol.

Afin de pérenniser la céréaliculture dans les régions semi-arides et arides, tout en préservant ces agrosystèmes fragiles, nous tenons à prendre en considération les transferts de matière dans le sens plante-sol : **la rhizodéposition** et principalement le carbone organique. Cette fraction de la rhizodéposition assure une fonction biologique importante en entretenant des populations microbiennes rhizosphériques, mais également un rôle agrégeant le sol.

La sélection de variétés de blé dur adaptées au contexte bioclimatique, capables d'exsuder de grandes quantités de carbone organique, pourrait constituer l'élément central autour duquel, les bactéries productrices d'EPS joueraient le rôle d'agents structurant le sol.

L'évaluation de la masse de sol adhérent aux racines de blé dur constituerait à ce titre un moyen indirect, rapide et efficace pour une telle sélection, puisqu'elle est la conséquence à la fois la rhizodéposition et des activités métaboliques (plante et microorganismes) dans la rhizosphère.

La masse de sol adhérent peut de ce fait être utilisée comme moyen de sélection de variétés de blé dur, capables d'enrichir le sol en rhizodépôts. Cet apport de carbone organique entretiendrait une activité microbienne pouvant améliorer les propriétés physiques du sol.

L'inoculation au champ de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207, couplée au résultat d'une telle sélection variétale, pourrait à la fois limiter les pertes d'eau par lessivage en assurant ainsi une gestion rationnelle des ressources hydriques, particulièrement dans les zones arides et semi-arides et améliorer la cohésion des agrégats du sol.

A

Achouak W., Christen R., Barakat M., Martel M.H. et Heulin T. (1999)- *Burkholderia caribensis* sp. Nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from certisol microaggregates in Martinique. *International Journal of Systemic Bacteriology*. **49**: 757-794.

Alami Y., Achouak W., Marol C. et Heulin T. (2000)- Rhizosphere soil aggregation and plant-growth promotion of sunflower by an EPS-producing *Rhizobium* sp. Strain isolated from sunflowers roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3393-3398.

Alami Y., DeBaynast R., Heulin T., Heyraud A., Milas M. et Vilain A. (1998)- Polysaccharide, microorganism and method for obtaining same, composition containing it and application. *European patent*. N° 98/00269.

Albersheim P., Nevins D.J., English P.D. et Karr A. (1967)- A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharide by gas liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* **5**: 340-345.

Alexander K.G. et Miller M.H. (1991)- The effect of soil aggregate size on early growth and shoot-root ration on maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*. **138**: 189-194.

Aman P., McNeil M., Franzen L. Darvill A.G. et Albersheim P. (1981)- Structural elucidation, using HPLC-MS and GLC-MS, of the acidic polysaccharide secreted by *Rhizobium meliloti* strain 1021. *Carbohydr. Res.* **95**: 263-282.

Amann R.I., Ludwig W. et Schleifer K.H.. (1995)- Phylogenetic identification an *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.

Amellal N., Bartoli F., Villemain G., Talouizte A. et Heulin T. (1999)- Effect of an inoculation of EPS-producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. *Plant and Soil*. **211**: 93-101.

Amellal N., Burtin G., Bartoli F. et Heulin T. (1998)- Colonisation of wheat rhizosphere by EPS-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on soil aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3470-3747.

Amellal N., Portal J.M., Vogel T. et Berthelin J. (2001)- Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation*. **12**: 49-57.

Ames G.F.L. (1986)- Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 397-425.

Angers D.A. (1998)- Water-Stable Aggregation of Québec Silty Clay Soils: Some Factors Controlling its Dynamics. *Soil Till. Res.* **47**: 91-96.

Anne P. (1945)- Sur le dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Ann. Agron.* **2**: 161-172.

Ash C., Priest F.G. et Collins M.D. (1993)- Molecular identification of RNAr group 3 Bacilli using PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **64**: 253-260.

Ashtaputre A.A. et Shah A.K. (1995)- Studies on a Viscous, Gel-Forming Exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1159-1162.

Atlas R.M. et Bartha R. (1987)- Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Benjamin. Cummins Publ. Menlo Park CA.

Azcon R. et Ocampo J.A. (1981)- Factors Affecting the Vesicular-Arbuscular Infection and Mycorrhizal Dependency of 13 Wheat Cultivars. *New Phytologist*. **87**: 677-685.

B

Balesdent J. et Arrouays D. (1999)- Usage des terres et stockage de carbone dans les sols du territoire français. Une estimation des flux nets annuels pour la période 1900-1999. *Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*. **85**: 265-277.

Balesdent J. et Balane M. (1992)- Maize root-derived soil organic carbon estimated by natural ¹³C abundance. *Soil Biol. and Biochem.* **24**: 97-101.

Ball B.C., Cheschire M.V., Robertson E.A.G. et Hinter E.A. (1996)- Carbohydrate composition in relation to structural stability, compactibility and plasticity of two soils in a long-term experiment. *Soil and Tillage Research*. **39**: 143-160.

Balnois E., Stoll S., Wilkinson K.J. et Buffle J. (2000)- Conformation of Succinoglycan as observed by atomic force microscopy. *Macromolecules*. **33**: 7440-7447.

Bankhead S.B., Landa B.B., Lutton E., Weller D.M. et Brian Gardener B.M.S. (2004)- Minimal changes in rhizobacterial population structure following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**: 307-318.

Beatty P.H. et Jensen S.E. (2002)-*Paenibacillus polymyxa* produces Fusaricidin-type antifungal antibiotic active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of Canola. *Can. J. Microbiol.* **48** (2): 159-169.

Bengtson G. (1991)- Bacterial exopolymer and PHB production in fluctuating ground water habitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**: 15.

Bennett R.A. et Billing E. (1980)- Origin of the polysaccharide ooze from plants infected with *Erwinia amylovora*. *J. Gen. Microbiol.* **116**: 341-349.

Bethlenfalvay G.J., Cantrell I.C., Mihara K.L. et Shreiner R.P. (1999)- Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biol. Fertil. Soils*. **28**: 356-363.

Bezzate S., Aymerich S., Chambert R., Czames S., Berge O. et Heulin T. (2000)- Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene decreases soil aggregation in the wheat rhizosphere. *Environ. Microbiol.* **2**: 333-342.

Bishop P.L. (1997)- Biofilm structure and kinetics. *Wat. Sci. Tech.* **36**: 287-294.

Born K., Langendorff. et Boulenguer P. (2002)- Xanthane. In “*Biopolymers. Polysaccharides 1: Polysaccharides from prokaryotes*”. Vol. **5**. Vandamme E.J., De Baets S., and Steinbuchel A. Ed.: 542.

Bos R., Van der Mei H.C. et Busscher H.J. (1999)- Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 179-230.

Breedveld M.W. et Miller K.J. (1994)- Cyclic beta-glucan of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol. Molecular. Biol. Rev.* **58**: 145-161.

Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P.T.M., Canter-Cremers H.C.J. et Zehnder A.J.B. (1993)- Influence of growth conditions on production of capsular and extracellular polysaccharides by *Rhizobium leguminosarum*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **64**: 1-8.

Brewin N.J. (1991)- Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**: 191-226.

Brimecombe M.J., De Leij F.A. et Lynch J.M. (2000)- The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: “*The rhizosphere*”. Pinton R., Varanini Z. et Nanipieri P., Ed. New York, Basel, Marcel Decker Inc.: 95-140.

Bushby H.V.A. et Marshall K.C. (1977b)- Water status of Rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. *J. Gen. Microbiol.* **99**: 19-27.

C

Calazans G.M.T., Lima R.C., de Franca F.P. et Lopes C.E. (2000)- Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int. J. Biol. Macromol.* **27**: 245-247.

Camesano T.A. et Wilkinson K.J. (2001)- Single molecule of xanthan conformation using atomic force microscopy. *Biomacromolecules.* **2**: 1184-1191.

Campbell R. et Greaves M.P. (1990)- Anatomy and community structure of the rhizosphere. In “*The Rhizosphere*”. Lynch J.M. Ed., Wiley & Sons, Chichester: 11-34.

Caravaca F., Alguacil M.M., Figueroa D., Barea J.M. et Roldan A. (2003)- Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in semi-arid Mediterranean area. *Forest Ecol. Manage.* **182**: 49-58.

Carlson R.W. (1982)- Surface chemistry. In “*Nitrogene fixation, Vol 2: Rhizobium*”, BROUGHTON W.J. Ed., Clarendon Press, Oxford: 199-234.

Cerning J. (1990)- Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* **87**: 113-130.

Cerning J., Bouillanne M., Landon M. et Desmazeaud M.J. (1992)- Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **75**: 692-699.

Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M. et Topisirovic L. (1994)- Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3914-3919.

Channey K. et Swift R.S. (1984)- Studies on aggregate stability. I. Re-formation of soil aggregates. *Journal of soil Science.* **37**: 329-335.

Channey K. et Swift R.S. (1986)- Studies on aggregate stability. II. The effect of humic substances on the stability of re-formed soil aggregates. *J. Soil Sci.* **37**: 337-343.

Cheng W., Coleman D.C., Carroll C.R., Hoffman C.A. (1993)- In situ measurement of root respiration and soluble C concentrations in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1189-1196.

Chenu C. (1993)- Clay-or-sand-polysaccharide association as models for the interface between microorganisms and soil: water related properties and microstructures. *Geoderma.* **56**: 143-156.

Chenu C. (1995)- Extracellular polysaccharides: An interface between microorganisms and soil constituents. In "*Environmental impact of soil component interactions.*" Lewis Publishers. Eds. P. M. Hung, J. Berthelin, J. M. Bollaag, W. B. Mc Gimm and A. L. Page. **Vol. I**: 217-233.

Chenu C. et Roberson E.B. (1996)- Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharides as affected by water potential. *Soil. Biol. Biochem.* **28**: 877-884.

Chenu C., Bissonais Le Y. et Arrouays (2000)- Organic matter influence on clay wettability and soil aggregate stability. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **64**: 1479-1486.

Chenu C., Guérif J. et Jaunet A.M. (1994)- Polymer bridging: a mechanism of clay and soil structure stabilization by polysaccharides. *Trans. World Congr. Soil Sci.* **15th**, 3a: 403-410.

Chenu C. et Guérif J. (1991)- Mechanical strength of clay minerals as influenced by an adsorbed polysaccharide. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **55**: 1076-1080.

Chet I. et Huttermann A. (1980)- Chemical composition of hyphal walls of *Fomes annosus*. *Environ. J. Forest. Pathol.* **10**: 65-70.

Christensen B.T. (1992)- Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle-size and density separates. In: "*Advances in Soil Science.*" Steward B.A., Ed. Springer Verlag. **20**: 2-99.

Clarkson D.T. (1985)- Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annual Review of Plant Physiol.* **36**: 77-115.

Cohen M.F., Han X.Y., et Mazzola M. (2004)- Molecular and physiological comparison of *Azospirillum* spp. isolated from *Rhizoctonia solani* mycelia, wheat rhizosphere, and human skin wounds. *Can. J. Microbiol.* **50**: 291-297.

Cohen V. (2002)- Dynamique et rôle d'un exopolysaccharide bactérien produit par la souche *Rhizobium* sp. YAS34 dans le sol et la rhizosphère de Brassicacées. *Thèse de Doctorat*. Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Université Aix-Marseille I : 191.

Congregado F., Estanol I., Espuny M.J., Fusté M.C., Manresa M.A., Marqués A.M., Guinea J. et Simon-Pujol M.D. (1985)- Preliminary studies on the Production and Composition of Polysaccharide Synthesized by *Pseudomonas* sp. EPS-5028. *Biotechnol. Letters.* **7**: 883-888.

Coplin D.L. et Cooke D. (1990)- Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **3**: 271-279.

Corman, A., Crozat Y. et Cleyet-Marel J.C. (1987)- Modeling of survival kinetics of some *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils. *Biol. Fertil. Soils.* **4**: 79-84.

Costerton J.W. et Irvin R.T. (1981)- The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324.

Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I. et Nickel J.C. (1987)- Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 435-464.

Crawford J.W. (1994)- The relationship between structure and hydraulic conductivity of soil. *Euro. J. of soil Sci.* **45**: 493-502.

Curl E.A. et Truelove B. (1986)- The Rhizosphere. *Advanced Series in Agriculture Sciences.* **15**. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

D

Dakora F.D. et Phillips D.A. (2002)- Root exudates as mediators acquisition in low nutrient environments. *Plant and Soil.* **245**: 35-47.

Darbyshire J.F., Chapman S.J., Cheshire M.W., Gauld J.H., McHardy W.J., Paterson E. et Vaughan D. (1993)- Methods for the study of interrelationships between microorganisms and soil structure. *Geoderma.* **56**: 3-23.

Darrah P.R. (1991)- Models of the rhizosphere .1 Microbial Population Dynamics around a Root releasing Soluble and Insoluble Carbon. *Plant and Soil.* **133**: 187-199.

Darrah P.R. (1993)- The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil.* **155**: 1-20.

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

Degeest B., Vaningelgem F. et de Vuyst L. (2001a)- Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* **11**: 747-757.

Derrien D., Marol C. et Balesdent J. (2004)-The dynamics of neutral sugars in the rhizosphere of wheat. An approach by ^{13}C pulse-labeling and GC/C/IRMS. *Plant Soil.* **267**: 243-253.

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

Dhingra O.D., Mizubuti E.S.G. et Santana F.M. (2003)- *Chaetomium globosum* for reducing primary inoculum of *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* in soil-surface soybean stubble in field conditions. *Biol. Control.* **26**: 302–310.

Dilkes N.B., Jones D.L. et Farrar J. (2004)-Temporal dynamics of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiol.* **134**: 706-715.

Dominguez J., Negrin M.A. et Rodriguez, C.M. (2001)- Aggregate water-stability, particle-size and soil solution properties in conducive and suppressive soils to Fusarium wilt of banana from Canary Islands (Spain). *Soil Biol. Biochem.* **33**: 449-455.

Drapron R. et Guilbot A. (1962)- Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés. *Annales de Technologie Agricole.* **11**: 175-218.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. et Smith F. (1956)- Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry.* **28**: 350-356.

Dudman W.F. (1977)- The role of surface polysaccharides in natural environments. In "Surface Carbohydrate of the prokaryotic cell" (I. Sutherland, Ed.): 357- 414.

Duguid J.P. et Wilkinson J.F. (1953)- The Influence of Cultural Conditions on Polysaccharide Production by *Aerobacter aerogenes*. *J. of Gen. Microbiol.* **9**: 174-189.

E

Emberger L., (1952)- Sur le quotient pluviothermique. *C.R. Acad. Sci.* **234**: 2508-2510

F

Feller C. et Beare M.H. (1997)- Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. *Geoderma.* **79**: 69-116.

Felsenstein J. (1985)- Confidens limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783-791.

Feodoroff A. (1960)- *Ann. Agron.* **11**: 651-659.

Fett W.F., Osman S.F. et Dunn M.F. (1989)- Characterization of exopolysaccharides produced by plant-associated fluorescent *Pseudomonads*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 579-583.

Fisher M.J., Rao I.M., Ayarza C.E., Lascano C.E., Sanz J.I., Thomas R.J. et Vera R.R. (1994)- Carbon storage by introduced deep-rooted grasses in South American savannas. *Nature*. **371**: 236-238.

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

Forgarty W.M. et Griffin P.J. (1973)- Physiochemical properties of native zinc and manganese prepared metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **25**: 229-238.

Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C. et Bisselng T. (1992)- Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molec. Biol.* **19**: 89-107.

G

Gamar L., Blondeau K. et Simonet J.M. (1997)- Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 281-287.

Garry P. (1997)- Propriétés physico-chimiques de surfaces en polyuréthane et conséquences sur l'encrassement et l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. *Thèse de doctorat de l'université Claude Bernard-Lyon I* : Lyon. 124.

Geesey G.G. (1982)- Microbial exopolymers : ecological and economic considerations. *Amer. Soc. Microbiol. News*. **48**: 9-14.

Geoghegan M.J. et Brian R.C. (1946)- Influence of bacterial polysaccharides on aggregate formation in soils. *Nature*. **158**: 837.

Geoghegan M.J. et Brian R.C. (1948)- Aggregate formation in soil. I. Influence of some bacterial polysaccharides on the binding soil particles. *Biochem. J.* **43**: 5-13.

Germida J.J., Siciliano S.D., De Freitas J.R. et Seib A.M. (1998)- Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**: 43-50.

Gilbert G.S., Clayton. M.K., Handman J. et Parke J.L. (1996)- Use of cluster and discriminate analyses to compare rhizosphere bacterial communities following biological perturbation. *Microb. Ecol.* **37**: 123-147.

Gill R.A. et Jakson R.B. (2000)- Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytologist*. 147: 13-31.

Gobat J.M., Aragno M. et Matthey W. (2004)- The Living Soil. Fundamentals of Soil Science and Soil Biology. *Science Publishers, Inc.*, USA, Lausanne, Suisse.

Gochnauer M.B., McCully M.E. et Labbé H. (1989)- Different populations of bacteria associated with sheathed and bare regions of roots of field-grown maize. *Plant and Soil*. **114**: 107-120.

Goddard J.M., Bailey M.J., Darrah P., Lilley A.K. et Thompson I.P. (2001)- Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: A community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria. *Plant and Soil*. **232**: 181-193.

Gouzou L., Burtin G., Philippy R., Bartoli F. et Heulin T. (1993)- Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. *Geoderma*, **56**: 479-491.

Gouzou L., Cheneby O., Nicolardot B. et Heulin T. (1995)- Dynamic of diazotrophic *Bacillus polymyxa* in the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.) after inoculation and its effect on uptake of ¹⁵N-labelled fertilizer. *Eur. J. Agro.* **4**: 47-54.

Goven J.R.W. et Deretic V. (1996)- Microbial pathogenesis of cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Micrbiol. Rev.*: 539-574.

Graber M., Morin A., Duchiron F. et Monsan P.F. (1988)- Microbial Polysaccharides Containing 6-Deoxysugars. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 197-260.

Gravanis G., Milas M., Rinaudo M. et Clarke-Sturman A.J. (1990)- Conformational transition and polyelectrolyte behaviour of a succinoglucan polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**: 195-200.

Grayston S.J., Vaughan D. et Jones D. (1996)- Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* **5**: 29-56.

Grimes D.J., Jacobs D., Swartz P.R., Brayton P.R. et Colwell R. (1993)- Numerical taxonomy of gram-negative, oxydase positive rods from carcharhinid sharks. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 88-98.

Groleau-Renaud V., Plantureux S. et Guckert A. (1998)- Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions. *Plant and Soil*. **201**: 231-239.

Gross M., Geier G., Geider K. et Rudolf K. (1989)- Levan and levansucrase from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Proc. 7th Int. Conf. on Plant Pathogenic bacteria*, Budapest: 81-84.

Guckert A. (1973)- Contribution à l'étude des Polysaccharides dans les sols et de leur rôle dans les mécanismes d'agrégation. *Thèse Doct. Etat*, Université de Nancy 1, 124.

Guckert A., Chone T. et Jacquin F. (1975)- Microflore et stabilité structurale des sols. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*. **12**: 211-223.

Guemouri-Athmani S., Berge O., Bourain M., Mavingui P., Thiéry J.M., Bhatnagar T. et Heulin T. (2000)- Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eur. J. Soil Biol.* **36**: 149-159.

H

Haas D. et Keel C. (2003)- Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 117-153.

Hanlon G.W., Denyer S.P., Olliff C.J. et Ibrahim L.J. (2001)- Reduction in exopolysaccharides viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2746-2753.

Hassink J. (1997)- The capacity of soils to physically protect organic C and N. *Plant and Soil*. **191**: 77-87.

Hassink J., Oude Voshaar J.H., Nijhuis E.H. et Van Veen J.A. (1991)- Dynamics of the microbial populations of a reclaimed-polder soil under a conventional and reduced-input farming system. *Soil Biol. and Biochem.* **23**: 515-524.

Haynes R.J. et Swift R.S. (1990)- Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. *J. of Soil Sci.* **41**: 73-83.

Hebbar K.P., Gueniot B., Heyraud A., Colin Morel P., Heulin T., Balandreau J. et Rinaudo M. (1992)- Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 248-253.

Helal H.M. et Sauerbeck D. (1989)- Carbon turnover in the rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. **152**: 211-216.

Helal H.M. et Sauerbeck D. (1991)- Short-term determination of the actual respiration rate of intact plant roots. In: "*Plant Roots and Their Environment*". Mc Michal B.L., Person H. Eds., Elsevier, Amsterdam: 88-92.

Hamlen R.A., Luzeckic F.L. et Bloom J.R. (1972)- Influence of clipping height on the neutral carbohydrate levels of root exudates of alfalfa plants grown under gnotobiotic conditions. *Canad. J. Plant. Sci.* **52**: 633-642.

Henin S. (1958)- Méthode pour l'étude de la stabilité structurale des sols. *Ann. Agron.* **I**: 71-90.

Henin S. (1977)- Cours de physique du sol. Tome II, *ORSTOM Ed.* : 222.

Hess D., Heinrich D., Kemner J. et Jekel S. (1985)- Secretion and cleavage of sucrose by wheat. A system of chemotactic attraction and nitrogenase induction in *Azospirillum lipoferum*. In "Azospirillum III :Genetics, Physiology, Ecology." Klingmuller, W. Ed., Berlin : Springer-Verlag.: 147-162.

Heulin T., Berge O., Mavingui P., Gouzou L., Hebbar P. et Balandreau J. (1994)- *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N₂-fixing bacteria associated with wheat roots in French soils. *Eur. J. Soil Biol.* **30**: 35-42.

Heulin T., Guckert A. et Balandreau J. (1987)- Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. *Biol. Fertil. Soils.* **4**: 9-14.

Hilali A., Prévost D., Broughton W.J. et Antoun H. (2001)- Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Can. J. Microbiol.* **47**: 590-593.

Hiltner L. (1904)- Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brachte. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft.* **98**: 59-78.

Hinsinger P. (1998)- How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.* **24**: 225-265.

Hodge A., Grayston S.J. et Ord B.G. (1996)- A novel method for characterization and quantification of plant root exudates. *Plant and Soil* **184**: 97-104.

Huang P.M., Berthelin J. Bollag J.M. McGill W.B. et Page A.L. (1995)- Environmental Impact of Soil Component Interactions. *Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press Inc.*

J

Jaeger C.H., Lindow S.E., Miller W., Clark E. et Firestone M.K. (1999)- Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2685-2690.

Jang K., Song K., Kim C., Chung B.H., Ah Kang S., Chun U., Choue R.W. et Rhee S. (2001)- Composition of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **23**: 339-344.

Janos D.P. (1988)- Mycorrhioza applications in tropical forestry: are temperate-zone approaches appropriate? S.P. Ng Ed., Tress and Mycorrhiza. Forest Research Institute, Kuala Lumpur, Malaysia: 133-188.

Jansson P., Kenne L., Lindberg B., Ljunngren H. et Lonngren J. (1977)- Demonstration of an octasaccharide repeating unit in the extracellular polysaccharide of *Rhizobium meliloti* by sequential degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 3812-3815.

Jenkinson D.S. (1990)-The turnover of organic-carbon and nitrogen in soil. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B-Biological Sciences*. **329**: 361-368.

Jukes T.H. et Cantor C.R. (1969)- Evolution of protein molecules. In “*Mammalian Protein Metabolism*”, N.H. Munro Ed., New York, Academic Press. **3**: 21-132.

K

Kaci Y. (1987)- Isolement de bactéries diazotrophes de la rhizosphère du blé dur : évaluation de leur activité nitrogénasique *in vitro*. *Thèse de Magister en Biologie des sols, Option Microbiologie du sol*. ISN/USTHB: 84.

Kaci Y., Heyraud A., Barakat M. et Heulin T. (2005)- Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Research in Microbiology*. **156**: 522-531.

Kämpfer P., Seilier H. et Dott W. (1993)- Numerical classification of coryneform bacteria and related taxa. *J.Gen. Appl. Microbiol.* **39**: 135-214.

Kay B.D. et Angers D.A. (1999)- Soil Structure. In “*Handbook of Soil Science*.” M.E. Summer. CRC Press Inc., Boca Raton Fl.: 229-276.

Keel C. et De´fago G. (1997)- Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In “*Multitrophic interactions in terrestrial systems*.” A.C. Gange and V. K. Brown Ed., Blackwell Science, London, England.: 27-46.

Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D. et De´fago G. (1992)- Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 4-13.

Kemper W.D., et Rosenau R.C. (1986)- Aggregates stability and size distribution. In “*Methods of soil analysis, Part 1: Physical and Mineralogical Methods*.” Agronomy **9**. 2nd Ed. A. Klute. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, Wi.: 425-441.

Kennedy E.P. et Rumley M.K. (1988)- Osmotic regulation of biosynthesis of membrane derived oligosaccharides in *E. coli*. *J. Bact.* **170**: 2457-2461.

Kloepper J.W. et Beauchamp C.J. (1992)- Issues related to measuring of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **38**: 1219-1232.

Kouakoua E., Larré-Larrouy M.C., Barthès B., De Freitas P.L., Neves C., Sala G.H. et Feller C. (1999)- Relations entre stabilité de l’agrégation et matière organique totale et soluble à l’eau chaude dans des sols ferrallitiques argileux (Congo, Brésil). *Can. J. of Soil Sci.* **79**: 561-569.

Kuzyakov Y. et Domanski G. (2000)- Carbon input by plants into the soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **163**: 421-431.

Kuzyakov Y., Kreyzschmar A. et Stahr K. (1999)- Contribution of *Lolium perenne* rhizodeposition to carbon turnover of pasture soil. *Plant and Soil*. **213**: 127-136.

L

Lambers H. (1987)- Growth, respiration, exudation and symbiotic associations: The fate of carbon translocated to roots. In “*Root development and Function.*” P.J. Gregory, J.V. Lake and D.A. Rose Ed.. Cambridge University Press. Cambridge: 125-145.

Lazarovits G. (2001)- Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. *Can. J. Plant Pathol.* **23**: 1-7.

Leibovici J., Susskind-Brudner G. et Wolman M. (1980)- Direct antitumor effect of high-molecular-weight levan on Lewis lung carcinoma cells in mice. *J. Nat. Cancer Inst.* **65** : 391–6.

Lemanceau P. et Heulin T. (1998)- La rhizosphère. In “*Sol : interface fragile.*” Paris, Inra: 93-106.

Lespinat P.A. et Berlier Y. (1975)- Les facteurs externes agissant sur l’excrétion racinaire. *Soc. Bot. Fr., Colloque Rhizosphère* : 21-30.

Liljeroth V., Bath E., Mathiasson I. et Lundborg T. (1990)- Root exudation and rhizoplane bacterial abundance of barley (*Hordeum vulgare* L.) in relation to nitrogen fertilization and root growth. *Plant and Soil*. **127**: 81-89.

Lindberg T., Granhall U. et Tomenius K. (1985)- Infectivity and acetylene reduction of diazotrophic bacteria in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under gnotobiotic conditions. *Biol. Fert. Soils*. **1**: 123-129.

Looijesteijin P.J., Boels I.C., Kleerebezem M. et Hugenholtz J. (1999)- Regulation of exopolysaccharides production by *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* by the sugar source. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5003-5008.

Lowendorf H.S. (1980)- Factors affecting survival of *Rhizobium* in soils. *Adv. Microbiol. Ecol.* **4**: 87-124.

Lynch J.M. et Wipps J.M. (1990)- Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*. **129**: 1-10.

M

Manresa A., Espuny M.J., Guinea J. et Comelles F. (1987)- Characterization and Production of a new Extracellular Polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910. *Appl. Microbiol.* **26**: 347-351.

Marschner H. (1995)- Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed. Academic Press, London: 889.

Martens D.A. et Frankenberger Jr W.T. (1992)- Decomposition of bacterial polymers in soil and their influence on soil structure. *Biology and Fertility of Soil*. **13**: 65-73.

Martin J.K. (1977)- Factors influencing the loss of organic from wheat roots. *Soil Biol. Biochem.* **9**: 1-7.

Martin J.P. (1945)- Microorganisms and soil aggregation: I. origin and nature of some of the aggregating substances. *Soil Sci.* **59**: 163-174.

Martin J.P. (1946)- Microorganisms and soil aggregation: I. influence of bacterial polysaccharides on soil structure. *Soil Sci.* **61**: 157-166.

Martin J.P., Martin W.P., Page J.B., Raney W.A. et De Ment J.D. (1955)- Soil aggregation. *Adv. Agron.* **7**: 1-37.

Materechera S.A., Dexter A.R. et Alston A.M. (1992)- Formation of aggregates by plant roots in homogenized soils. *Plant and Soil*. **142**: 69-79.

Mavingui P., Laguerre G., Berge O. et Heulin T. (1992)- Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1894-1903.

Meek B.D., DeTar W.R., Rolph D., Rechel E.R. et Carter L.M. (1990)- Infiltration rate as affected by an alfalfa and no-till cotton cropping system. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**: 505-508.

Meharg A. (1994)- A critical review of labeling techniques used to quantify rhizosphere carbon flow. *Plant and Soil*. **166**: 55-62.

Meharg A. et Killham K. (1995)- Loss of exudates from roots of perennial ryegrass inoculated with a range of micro-organisms. *Plant and Soil*. **170**: 345-349.

Meng G. et Futterer K. (2003)- Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 935-41.

Merckx R., Den Hartog A. et Van Veen J.A. (1985)- Turnover of root-derived material and related microbial biomass formation in soils of different texture. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 565-569.

Metzger L., Levanon D. et Mingelgrin U. (1987)- The effect of sewage sludge on soil structural stability: Microbiological aspects. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **51**: 346-351.

Milas M. et Rinaudo M. (1990)- Flow and Viscoelastic Properties of Xanthan Gum Solutions. *Macromolecules*. **23**: 2506-2511.

Milas M. et Rinaudo M. (1997)- On the electrostatic interactions of ionic polysaccharides in solution. *Current Trends in Polymer Science*, **2**: 47-67.

Moes T., Elgsaeter A., Skajk-Braek G. et Smidsrod O. (1993)- A new approach for estimating the cross link density of covalently cross linked ionic polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, **30**: 243-252.

Morello J.E., Pierson E.A., et Pierson L.S. (2004)- Negative Cross-Communication among Wheat Rhizosphere Bacteria: Effect on Antibiotic Production by the Biological Control Bacterium *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3103-3109.

Morra M.J. et Kirkegaard J.A. (2002)- Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biol. Biochem.* **34**: 1683-1690.

Munch J.C. (1991) - Nitrous oxide emission from soil as determined by the composition of denitrifying microbial population. In “*Diversity of environmental biogeochemistry.*” Bertngelin J. Elsevier Ed., Amsterdam: 309-316.

N

Nagel C.W. et Vaughn R.H. (1961)- The degradation of oligogalacturonides by the polygalacturonase of *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Bio. Physio.* **94**: 328-332

Neumann G. et Römheld V. (2001)- Release of root exudates. In “*The rhizosphere.*” Pinton R., Varanini Z. et Nanipieri P., Ed. New York Basel, Marcel Decker Inc.: 95-140.

O

Ophir T. et Gutnick D. L. (1994)- A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 740-745.

Osa-Affiana L.O. et Alexander M. (1982)- Clays and the survival of *Rhizobium* in soil during dessication. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **46**: 285-288.

P

Pankhurst C.E., McDonald H.J., Hawke B.G. et Kirkby C.A. (2002)- Effect of tillage and stubble management on chemical and microbiological properties and the development of suppression towards cereal root disease in soils from two sites in NSW, Australia. *Soil Biol.Biochem.* **34**: 833-840.

Paul E.A. et Clark F.E. (1989)- Soil microbiology and biochemistry. *Academic Press, San Diego, Calif.*: 340.

Peña-Cabriaes J.J. et Alexander M. (1979)- Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **43**: 962-966.

Perry D.A., Molina R. et Amaranthus M.P. (1987)- Mycorrhizae, mycorrhizospheres and reforestation: current knowledge and research needs. *Can. Journ. For. Res.* **17**: 929-940.

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

Pieterneel V.R. et Vanderleyden J. (1995)- The Rhizobium plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**: 124-142.

Puget P., Chenu C et Balesdent J. (2000)- Dynamics of soil organic matter associated with particle-size Fractions of water stable aggregates. *Europ. J. Soil Sci.* **51**: 595-605.

Q

Quintero E.J. et Weiner R.M. (1995)- Evidence for the adhesive function of the exopolysaccharides of *Hyphomonas* strain MHS-3 in its attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1897-1903.

R

Raffaelli D., van der Putten W.H., Persson L., Wardle D.A., Petchey O.L., Koricheva J., van der Heiden M., Mikola J. et Kennedy T. (2002)- Multitrophic dynamics and ecosystem processes. In “*Biodiversity and Ecosystem Functioning Synthesis and Perspectives.*” Loreau M, Naeem S., Inchausti P. Ed., University Press Oxford: 147-154.

Raj S.N., Deepak S.A., Basavaraju P., Shetty H.S., Reddy M.S. et Kloepper J.W. (2003)- Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Protection*. **22**: 579-588.

Rasmussen P.H., Knudsen I.M.B., Elmholt S. et Jensen D.F. (2002)- Relationship between soil cellulolytic activity and suppression of seedling blight of barley in arable soils. *Appl. Soil Ecol.* **19**: 91-96.

Reinhold B.B., Chan S.Y., Reuber T.L., Marra A., Walker G.C. et Reinhold V.N. (1994)- Detail structural characterization of Succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J. Microbiol.* **176**: 1997-2002.

Rinaudo M. et Milas M. (1987)- On the properties of polysaccharides: Relation between chemical structure and physical properties. In “*Industrial polysaccharides.*” Yalpani, Elsevier Ed., Amsterdam: 217-223.

Rittenhouse R.L. et Hale M.G. (1971)- Loss of organic compounds from roots. II: Effect of O₂ and CO₂ tension on release of sugars from peanut roots under axenic conditions. *Plant and Soil*. **35**: 311-321.

Roberson E.B. et Fireston M.K. (1992)- Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1284-1291.

Robert M. et Schmit J. (1982)- Rôle d'un exopolysaccharide (le xanthane) dans les associations organominérales. *Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris*. **294**: 1031-1036.

Roger O. (2002)- Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens: obtention, caractérisation et relation structure/fonction. *Thèse de Doctorat, Chimie, Université Paris 13*: 195.

Rougeaux H., Talaga P., Carlson R.W. et Guezennec J. (1998)- Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* originating from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.* **312**: 53-59.

Rovira A.D. et Davey C.B. (1971)- Biology of rhizosphere. In: "*The Plant Root and its Environment*." University Press of Virginia, Charlottesville: 158-216.

Rovira A.D., Foster R.C. et Martin J.K. (1979)- Note on terminology: origin, nature and nomenclature of organic materials in the rhizosphere. "*The soil-root interface*". Harley J.L. et Scott Russell R., London, New York, San Francisco, Academic Press: 1-4.

Rowell D.L. (1994)- Soil Sciences. *Methods and Applications*. Longman.

S

Saitou N. et Nei M. (1987)- The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

Sanin S.L., Sanin F.D. et Bryers J.D. (2003)- Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry*. **38**: 909-914.

Santaella C., Brutesco C., Brandelet G., Berge O. et Heulin T. (2001)- Co-localisation de bactéries et de leur exopolysaccharide dans la rhizosphère par microscopie confocale à balayage laser. *Colloque Rhizosphère*, Dijon, France.

Sattar M.A. et Gaur A.C. (1987)- Production of auxine and gibberellins by phosphate-dissolving microorganisms. *Zentralbl. Mikrobiol.* **142**: 393-395.

Schofield G.M. et Schaal K.P. (1981)- A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **127**: 237-259.

Semenov A.M., van Bruggen A.H.C. et Zelenev V.V. (1999)- Moving Waves of Bacterial Populations and Total Organic Carbon along Roots of Wheat. *Microb Ecol.* **37** (2): 116-128.

Semmel H., Horn R., Hell U., Dexter A.R. et Schulz E.D. (1990)- The dynamics of soil aggregate formation and the effect on soil physical properties. *Soil Technol.* **3**: 113-129.

Severian D. (1997)- Les hydrogels polyioniques multifonctionnels en médecine. Communication présentée au 65^{ème} Congrès Acfas.

Shannuganathan R.T. et Oades J.M. (1982)- Effect of dispersible clay on the physical properties of the B horizon of red-brown earth. *Aust. J. Soil Res.* **20**: 315-324.

Shreiner R.P., Mihara K.L., McDaniel H. et Bethlenfalvay G.J. (1997)- Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant Soil.* **188**: 199-209.

Singh S. et Fett W.F. (1995)- Stimulation of exopolysaccharides production by fluorescent *Pseudomonads* in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity. *FEMS Microbiology Letters.* **130**: 301-306.

Six J., Feller C., Denef K., Ogle S.M., de Moraes Sa J. C. et Albrecht A. (2002)- Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils - Effects of no-tillage. *Agronomie.* **22**: 755-775.

Skvortsov I.M. et Ignatov V.V. (1998)- Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiology Letters.* **165**: 223-229.

Sorensen L.H. (1971)- Stabilization of newly formed amino acid metabolites in soil by clay minerals. *Soil Sci.* **114**: 5-11.

Stark Y. et Leibovici J. (1986)- Different effects of the polysaccharide levan on the oncogenicity of cells of two variants of Lewis lung carcinoma. *Br. J. Exp. Pathol.* **67**: 141-147.

Stern M.J., Ames G.F.L., Smith N.H., Robinson E.C. et Higgins C.F. (1984)- Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of bacterial genomes. *Cell.* **37**: 1015-1026.

Stingle F., Neeser J.R. et Mollet B. (1996)- Identification and characterization of the EPS (exopolysaccharides) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacterio.* **178**: 1680-1690.

Sturz A.V. et Nowak J. (2000)- Endophytic communities of rhizobacteria band the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl. Soil Ecol.* **15**:183-190.

Suslow T.V. (1982)- Role of root- colonizing bacteria in plant growth. In “*Phytopathogenic prokaryotes.*” M.S. Mount et G.H. Lacy Vol. **1.**, Academic Press New York: 187-222.

Sutherland I.W. (1982)- Biosynthesis of microbial EPS. *Adv. Microbiol. Physiol.* **23**: 161-172.

Sutherland I.W. (1983)- Microbial exopolysaccharides-Their role in bacterial adhesion in aqueous systems. *CRC. Crit. Rev. Microbiol.* **10**: 173-219.

Sutherland I.W. (1972)- Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.* **8**: 143-213.

Sutherland I.W. (1985)- Biosynthesis and composition of Gram negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**: 243-270.

Sutherland I.W. (1988)- Bacterial surface polysaccharides structure and function. *Int. Rev. Cytol.* **113**: 187-231.

Sutherland I.W. (1994)- Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances.* **12**: 393-448.

Sutherland I.W. (1998)- Novel and established of microbial polysaccharides. *Trends. Biotechnol.*: 41-46.

Swindoll C.M., Aelion C.M. et Pfaender F.K. (1988a)- Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* **54**: 212-217.

T

Tarchitzky J., Hatcher P.G. et Chen Y. (2000)- Properties and distribution of humic substances and inorganic structure-stabilizing components in particle-size fractions of cultivated Mediterranean soils. *Soil Science.* **165**: 328-342.

Thibault M. et Coronna M. (1986)- Propriétés fonctionnelles des polysaccharides. APRIA Ed., Paris: 112.

Thomashow L.S. et Weller D.M. (1995)- Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control. In “*Plant-microbe interactions.*” vol. **1**. G. Stacey and N. Keen Ed., Chapman and Hall, NewYork, N.Y.: 187-235.

Tisdall J.M. (1991)- Fungal hyphae and structural stability of soil. *Australian Journal of soil Research.* **29**: 729-743.

Tisdall J.M. (1994)- Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil.* **159**: 115-121.

Tisdall J.M. et Odes J.M. (1979)- Stabilization of soil aggregates by the root system of ryegrass. *Aust. J. Soil Res.* **17**: 429-441.

Tisdall J.M. et Odes J.M. (1982)- Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* **33**: 141-163.

Touraine B., Clarkson D.T. et Muller B. (1994)- Regulation of nitrate uptake at the whole plant level. In “*A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions, coupling of nitrogen and carbon metabolisms for resource acquisition and use.*” Garnier R.J. Ed., SPB Academic Publishing: 11-31.

Trappe J.M. (1962)- Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.* **28**: 538-602.

V

Van Casteren W.H.M., Dijkema C., Schols H.A., Beldman G. et Voragen A.G.J. (1998)- Characterization and modification of the exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* B40. *Carbohydr. Polym.* **37**: 123-130.

Vancura V. (1967)- Root exudates of plants. III : Effect of temperature and “cold shock” on the exudations of various compounds from seeds and seedling of maize and cucumber. *Plant and Soil.* **27**: 319-328.

Van Elsas J.D., Garbeva P. et Salles J. (2002)- Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation.* **13**: 29-40.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. and Swings J. (1996)- Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**: 407-438.

Versalovic J., Koeuth T. et Lupski, J.R. (1991)- Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research.* **19**: 6823-6831.

W

Wander M.M., Hedrick D.S., Kaufman D. Traina S.J., Stinner B.R., Kehrmeier S.R. et White D.C. (1995)- The functional significance of the microbial biomass in organic and conventionally managed soils. *Plant and Soil.* **170**: 87-97.

Wardle D.A. et Van Der Putten W.H. (2002)- Biodiversity, ecosystem functioning and above-ground-below-ground linkages. In “*Biodiversity and Ecosystem Functioning Synthesis and Perspectives*”. Loreau M., Naeem S., Inchausti P. Ed. Oxford University Press: 155-168.

Weaver P.K., Wall J.D. et Gest H. (1975)- Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbio.* **105**: 205-216.

Weill A.N., DeKimpe C.R. et McKyes (1988)- Effect of tillage reduction and fertilizer on soil macro- and microaggregation. *Can. J. Soil Sci.* **68**: 489-500.

Weiner R., Langilles S. et Quintero E. (1995)- Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. *J. Indust. Microbiol.* **15**: 339-346.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. et Lane D.J. (1991)- 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.

Weller D.M. (1988)- Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**: 379-407.

West T.O. et Marland G. (2002)- A synthesis of carbon sequestration, carbon emissions, and net carbon flux in agriculture: comparing tillage practices in the United States. *Agric. Ecosyst. Environ.* : 217-232.

Whipps J.M. (1984)- Environmental factors affecting the loss of carbon from the roots of wheat and barley seedlings. *J. Exp. Bot.* **35**: 767-773.

Whipps J.M. (1990)- Carbon Economy. In “*The Rhizosphere*.” J.M. Lynch. Wiley, Ed. Chichester: 59–97.

Whipps J.M. et Lynch J.M. (1986)- The influence of the rhizosphere on crop productivity. *Adv. Microb. Ecol.* **9**: 187-244.

Whitfield C. (1988)- Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* **34**: 415-420.

Whitfield C. et Valvano M.A. (1993)- Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **35**: 135-246.

Williams A.G. et Wimpenny J.W.T. (1977)- Exopolysaccharide Production by *Pseudomonas* NCIB11264 Growth in batch Culture. *J. of Gen. Microbiol.* **102**: 13-21.

Woyczikowska B., Pass L., Girdwoyn M. et Raczynska-Bojanowska K. (1973)- Proteolytic degradation of polymyxins by the enzymes of *Bacillus polymyxa*. *Acta. Biochem. Polon.* **20**: 285-296.

Wright S.F. et Anderson R.L. (2000)- Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. *Biol. Fert. Soil.* **31**: 249-253.

Y

Yancey P.H. (1994)- Compatible and contracting solutes. In “*Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*”. STRANGE. K. Ed., CRC Press, Boca Raton: 81-109.

Yap S.F. et Lim S.T. (1983)- Response of *Rhizobium* sp. UMKL 20 to sodium chloride stress. *Arch. Microbiol.* **135**: 224-228.

Yoo S.H., Yoon E.J., Cha J. et Lee H.G. (2004)- Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* **34**: 37-41.

Z

Zelles L., Bai Q.Y., Beck T. et Besse F. (1992)- Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. and Biochem.* **24**: 317-323.

Zevenhuizen L.P.T.M. (1990)- Recent development in *Rhizobium* polysaccharides. In “*Novel biodegradable microbial polymers*”. DAWES E.A. Ed., Kluwers Academic Publishers, Amsterdam: 387-402.

Zevenhuizen L.P.T.M. et Faleschini P. (1991)- Effect of the concentration of sodium chloride in the medium on the relative proportions of poly- and oligosaccharides excreted by *Rhizobium meliloti* strain YE-2SL. *Carbohydrate Research*. **209**: 203-209.

Zhang Y.M., Wang X.Q., Wang W.K., Yang W.K. et Zhang D.Y. (2006)- The microstructure of microbiotic crust and its influence on wind erosion for a sandy soil surface in the Gurbantunggut Desert of Northwestern China. *Geoderma*. **132**: 441-449.

Annexe I

Produits utilisés en biologie moléculaire

TAE 50x (solution stock)

- Tris base 242 g
- Acide acétique glacial 57.1 ml
- EDTA 0.5 M, pH 8 100 ml
- H₂O qsp 1000 ml

TAE 0.75x (pour électrophorèse)

- TAE 50x 15 ml
- H₂O qsp 1000 ml

Préparation du marqueur de poids moléculaire

- Marqueur « X » 20 µl
- LB-TAE saccharose 20 µl
- H₂O (qsp) 100 µl

Solution de Bromure d'éthidium (BET)

- BET (10 mg/ml) 50 µl
- H₂O 50 µl

Taq DNA polymérase Goldstar (Eurogentec)

- Tampon 10x
- Tris-HCl (pH 9,0) 50 mM
 - (NH₄)₂SO₄ 200 mM
 - Tween 20 (p/v) 0,1 %
 - MgCl₂ 25 mM

Marqueur de poids moléculaire

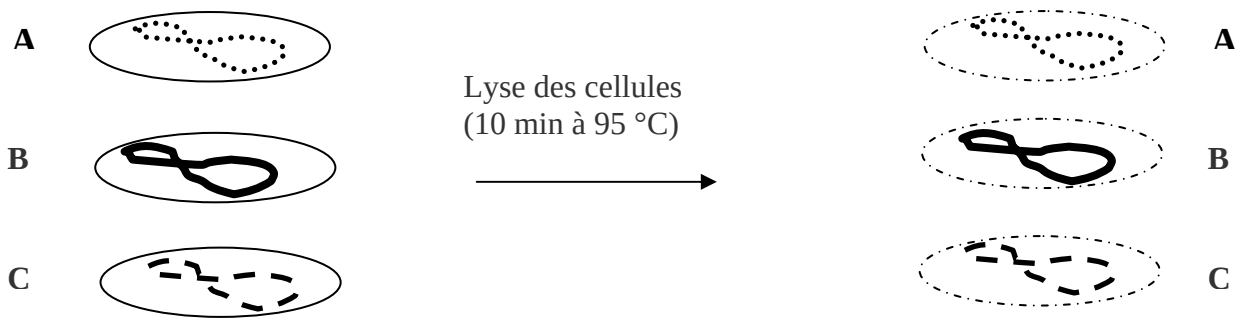
DNA Molecular Weight Marker (0,075-12,21 kb)

Bleu de Bromophénol

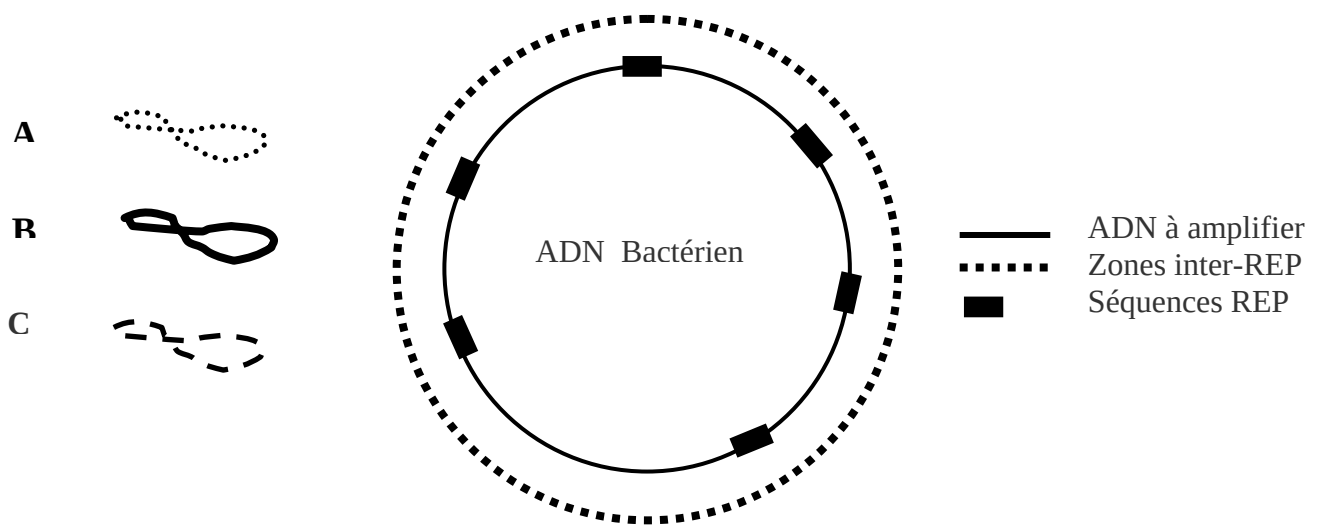
- Saccharose 4 g
- Bleu de Bromophénol 25 mg
- Tampon TAE 0,75X qsp 10ml

Annexe II

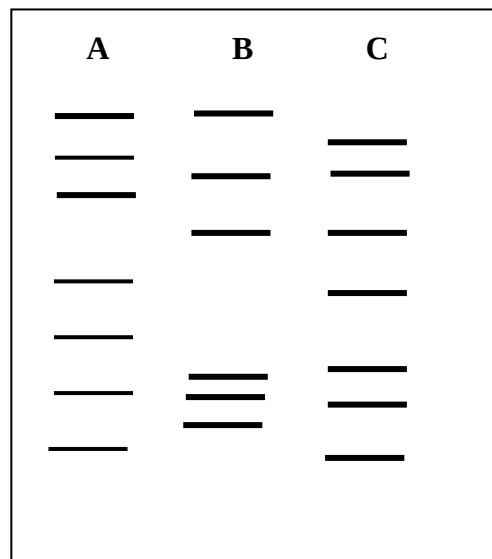
Principe de la méthode REP-PCR



Amplification par PCR des régions inter-REP

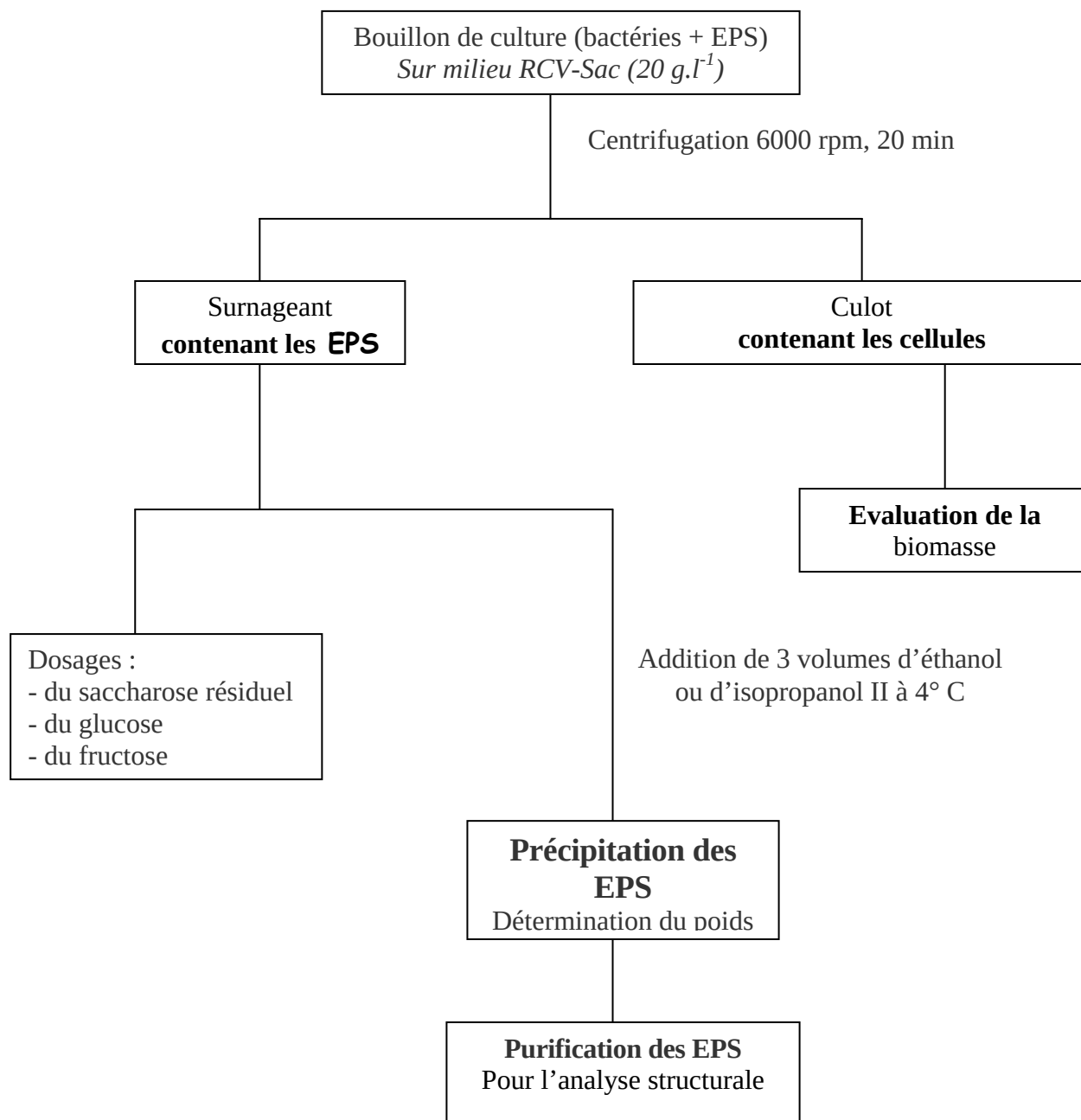


Séparation par électrophorèse
des fragments amplifiés
et analyse des profils



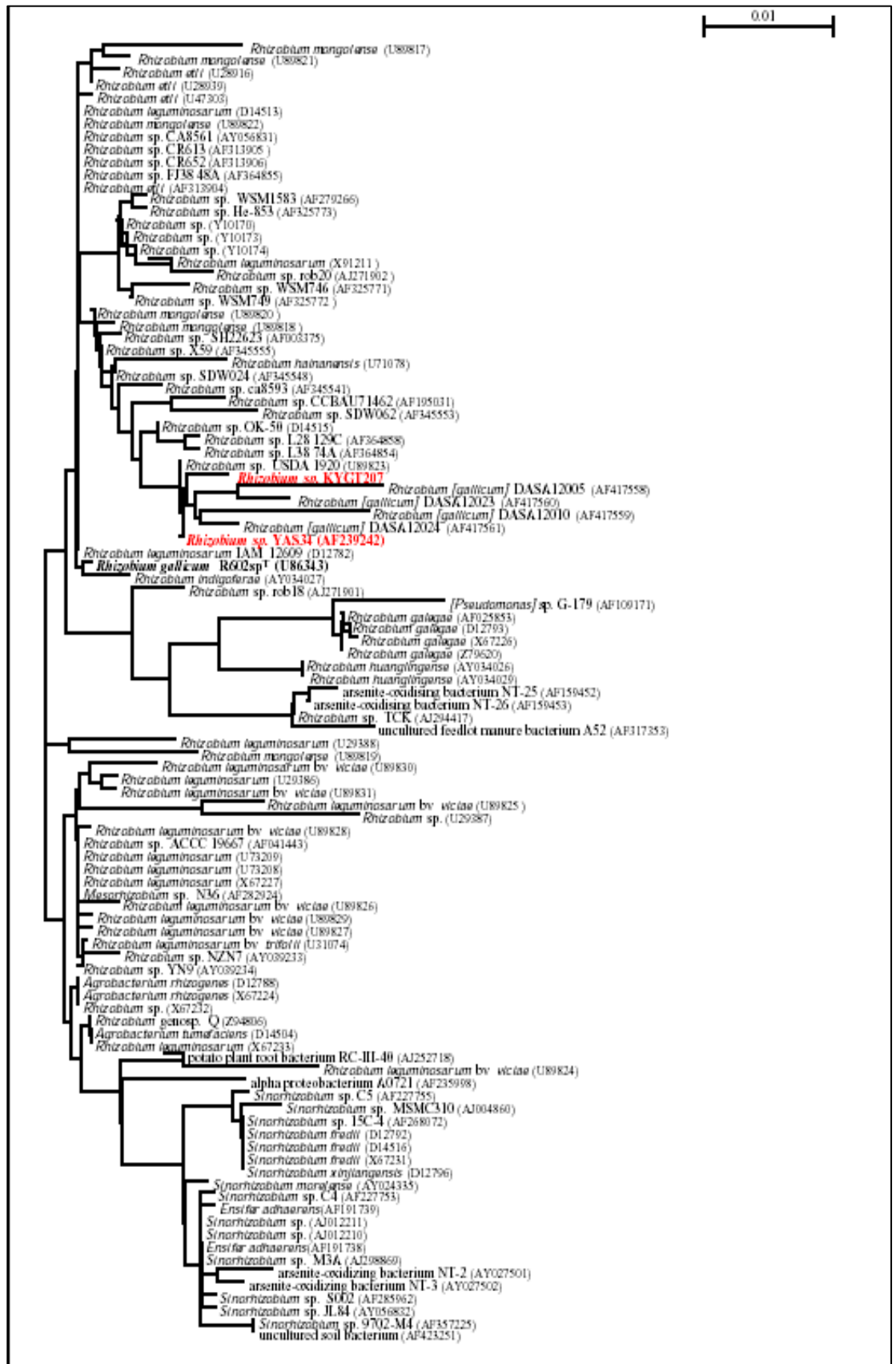
Annexe III

Protocole d'extraction des EPS et détermination des bilans de production



Annexe IV

Positionnement de la souche *Rhizobium* sp. KYGT207 et *Rhizobium* sp. YAS34 dans l'arbre phylogénétique général, basé sur les séquences d'ADNr 16S (réalisé par R. Christen).



INDEX DES TABLEAUX

Tableau I.	Classement des particules minérales en fonction de leur taille.	7
Tableau II.	Relation entre la texture et la capacité de rétention d'eau.	8
Tableau III.	Relation entre la taille des pores et la tension de succion nécessaire pour les vider de leur eau.	10
Tableau IV.	Localisation et caractéristiques climatiques des stations étudiées.	20
Tableau V.	Caractérisation pédologique sommaire des sols retenus.	20
Tableau VI.	Evaluation du taux de germination des graines de blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha).	22
Tableau VII.	Mélange réactionnel pour l'amplification des régions inter-REP.	32
Tableau VIII.	Cycles d'amplification des régions inter-REP.	32
Tableau IX.	Préparation du mélange réactionnel.	34
Tableau X.	Amplification de l'ADN16s.	35
Tableau XI.	Paramètres d'analyse en CPG.	39
Tableau XII.	Antibiotiques ajoutés au milieu de culture pour contre-sélectionner les bactéries inoculées.	45
Tableau XIII.	Proportion de bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	51
Tableau XIV.	Niveau de production d'EPS par les souches isolées de la rhizosphère du blé à partir de différentes sources de carbone, sur milieu solide.	54
Tableau XV.	Répartition des isolats bactériens producteurs d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha), cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	59
Tableau XVI.	Nombre et pourcentage d'isolats producteurs d'EPS sur les trois sources de C (glucose, saccharose et mannitol) dans les différentes stations étudiées.	67

Tableau XVII.	Utilisation des substrats carbonés par les souches hyperproductrices d'EPS.	71
Tableau XVIII.	Principales caractéristiques des souches sélectionnées.	74
Tableau XIX.	Caractères phénotypiques des souches sélectionnées et identification provisoire.	75
Tableau XX.	Caractéristiques biochimiques des souches bactériennes KYGT207, KYEGB2 et KYT15.	76
Tableau XXI.	Comparaison des séquences du gène <i>rrs</i> par BLAST.	81
Tableau XXII.	Effet de la nature des substrats carbonés sur la production d'EPS (RCV solide).	90
Tableau XXIII.	Déplacements chimiques des quatre protons H^{-1} de l'unité de répétition de l'EPS KYGT207.	111
Tableau XXIV.	Attribution des déplacements chimiques en RMN 1H et ^{13}C pour les quatre résidus osidiques constituant l'unité de répétition de l'EPS KYGT207.	114
Tableau XXV.	Détermination du rapport EPS/biomasse des moûts bactériens. <i>Production des EPS pendant 8 j à 30 °C sur milieu solide contenant du saccharose (20 g.l⁻¹).</i>	126
Tableau XXVI.	Principales caractéristiques pédologiques des sols étudiés.	132
Tableau XXVII.	Granulométrie des sols de la station agronomique de Oued Smar ITGC, de Tamanrasset et d'El Goléa.	132
Tableau XXVIII.	Antibiogramme des souches <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207 et <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2.	158
Tableau XXIX.	Caractéristiques pédologiques du sol de la station Oued Smar (ITGC).	159
Tableau XXX.	Dénombrement des bactéries inoculées dans la rhizosphère du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha), après 4 semaines de culture, sur milieu « RCV-saccharose » avec antibiotiques (traitements <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 et <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207) ou sans antibiotique (témoin).	163

Tableau XXXI.	Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur la masse de sol adhérent aux racines du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var Waha), après 4 semaines de culture.	164
Tableau XXXII.	Effet de l'inoculation des 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur la biomasse racinaire du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var Waha), après 4 semaines de culture.	165
Tableau XXXIII.	Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur le rapport SA/RA, après 4 semaines de culture.	165
Tableau XXXIV.	Effet de l'inoculation des 2 souches bactériennes (KYEGB2 et KYGT207) sur la biomasse aérienne du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var Waha), après 4 semaines de culture.	166

INDEX DES FIGURES

Figure 1.	Schéma représentant un modèle simplifié de la biosynthèse du xanthane.	5
Figure 2.	Modèle d'organisation des agrégats avec les agents de liaison majoritaires.	9
Figure 3.	Représentation schématique des composants de la matière organique (humus) en fonction de leur degré de polymérisation.	12
Figure 4.	Relations mutuelles entre dynamique des matières organiques et l'agrégation du sol.	13
Figure 5.	Représentation schématique de la rhizodéposition.	14
Figure 6.	Illustration physique de la rhizosphère du blé dur.	16
Figure 7.	Localisation géographique des stations d'étude.	19
Figure 8.	Cycle de développement du blé dur (<i>Triticum durum</i>).	22
Figure 9.	Histogramme de fréquence des poids des graines de blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha).	23
Figure 10.	Profil électrophorétique sur gel d'agarose des séquences inter-REP d'un échantillon de 22 isolats bactériens producteurs d'EPS.	33
Figure 11.	Séquences des amorces rD1 et fD1.	34
Figure 12.	Organisation schématique de l'opéron ribosomique procaryotique.	34
Figure 13.	Profil électrophorétique sur gel d'agarose des produits PCR du gène codant pour l'ARNr 16S de 6 souches bactériennes productrices d'EPS.	35
Figure 14.	Chromatogramme «standard» obtenu en HPLC avec un mélange «étalon» constitué de : Glucose, Xylose, Galactose, Arabinose et Mannose.	38
Figure 15.	Chromatogramme « standard » obtenu en chromatographie en phase gazeuse.	39

Figure 16.	Importance numérique des bactéries mésophiles totales dans la rhizosphère du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	48
Figure 17.	Dénombrement des bactéries productrices d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	50
Figure 18.	Courbe de corrélation "Nombre de bactéries productrices d'EPS / Nombre de bactéries mésophiles".	52
Figure 19.	Courbe de corrélation "Nombre d'isolats producteurs d'EPS / Nombre de bactéries productrices d'EPS".	57
Figure 20.	Courbe de corrélation entre le nombre d'isolats producteurs d'EPS et le nombre de bactéries mésophiles totales.	57
Figure 21.	Pourcentage de souches bactériennes productrices d'EPS isolées à partir des racines de blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé dans des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	58
Figure 22.	Pourcentage de souches bactériennes productrices d'EPS isolées à partir de sol adhérent aux racines de blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé dans des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	59
Figure 23.	Répartition globale des isolats bactériens producteurs d'EPS dans le sol adhérent et au niveau des racines du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	61
Figure 24.	Répartition des isolats producteurs d'EPS à Gram+ et à Gram- au niveau des racines du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	61
Figure 25.	Répartition des isolats bactériens producteurs d'EPS à Gram+ et à Gram- dans le sol adhérent aux racines du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	62
Figure 26.	Répartition des isolats producteurs d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de régions humides à sub humides.	63
Figure 27.	Répartition des isolats producteurs d'EPS dans la rhizosphère du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de régions semi-arides arides à sahariennes.	63

Figure 28.	Répartition globale des isolats producteurs d'EPS en fonction de leur vitesse de croissance dans le sol adhérent et au niveau des racines du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	64
Figure 29.	Répartition des isolats producteurs d'EPS en fonction de leur vitesse de croissance dans le sol adhérent aux racines du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	64
Figure 30.	Répartition des isolats producteurs d'EPS en fonction de leur vitesse de croissance au niveau des racines du blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha) cultivé sur des sols provenant de différentes régions d'Algérie.	65
Figure 31.	Influence des sources de carbone (saccharose, glucose et mannitol) sur la production d'EPS des souches isolées, sur milieu solide.	66
Figure 32.	Arbre phénologique des souches bactériennes hyperproductrices d'EPS.	69
Figure 33.	Arbre phylogénétique établi à partir des séquences <i>rrs</i> .	79
Figure 34.	Positionnement de la souche <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207 et <i>Rhizobium</i> sp. YAS34 dans l'arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S.	81
Figure 35.	Effet de 3 sources de carbone (glucose, saccharose et mannitol) sur la production d'EPS, après 5 jours d'incubation sur milieu RCV liquide.	91
Figure 36.	Effet des conditions de culture (milieu RCV-solide et RCV-liquide) sur la production d'EPS des 2 souches bactériennes (<i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 et <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207), en présence de différents substrats carbonés (Glc, Sac et Man.).	92
Figure 37.	Effet de la nature du substrat carboné et de la nature du milieu de culture (milieu solide et milieu liquide) sur la production d'EPS, au 5ème jour d'incubation de <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 et <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207.	93
Figure 38.	Cinétique de production d'EPS des souches bactériennes <i>Paenibacillus</i> sp., KYEGB2 et <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207.	94
Figure 39.	Cinétiques comparées de production de biomasse cellulaire des deux souches bactériennes <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 et <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207.	96

Figure 40.	Evolution de la teneur en saccharose résiduel dans le milieu de culture (RCV-saccharose, 20 g.l ⁻¹), lors de la production d'EPS par les deux souches <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 et <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207.	97
Figure 41.	Evolution comparée des teneurs en glucose et fructose dans le milieu de culture, en présence de la souche <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2.	99
Figure 42.	Evolution comparée des teneurs en glucose et fructose, lors de la production d'EPS par <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207 sur milieu RCV-sac liquide.	100
Figure 43.	Analyse de l'hydrolysate de l'EPS KYT15 sur colonne échangeuse de cations. Hydrolyse à l'acide trifluoroacétique (TFA 2N), pendant 3 h à 100 °C.	104
Figure 44.	Analyse de l'hydrolysate de l'EPS KYT15 sur colonne échangeuse de cations. Hydrolyse à l'acide trifluoroacétique (TFA 2N), pendant 1 h à 100 °C.	104
Figure 45.	Chromatogramme obtenu en CPG de l'EPS KYT15.	105
Figure 46.	Analyse de l'hydrolysate de l'EPS KYGT207 sur colonne échangeuse de cations. Hydrolyse à l'acide trifluoroacétique (TFA 2N), pendant 1h à 100 °C).	106
Figure 47.	Chromatogramme obtenu en CPG de l'EPS KYGT207.	106
Figure 48.	Spectre RMN ¹ H de l'EPS KYT15.	108
Figure 49.	Spectre RMN ¹ H de l'EPS KYEGB2.	108
Figure 50.	Spectre RMN ¹³ C de l'EPS KYT15.	109
Figure 51.	Spectre RMN ¹³ C de l'EPS KYEGB2.	109
Figure 52.	Spectre RMN ¹ H de l'EPS KYGT207.	110
Figure 53.	Spectre RMN ¹ H de l'EPS KYGT207 après déacétylation par addition de NaOD.	111
Figure 54.	Spectre RMN ¹³ C normal de l'EPS KYGT207.	112
Figure 55.	Spectre RMN ¹³ C selon la technique DEPT de l'EPS KYGT207 déacétylé (300 MHz à 50 °C dans de l'eau lourde D ₂ O).	112

Figure 56.	Spectre RMN ^{13}C (333 K, 75 MHz) de l'EPS KYGT207 désacétylé.	113
Figure 57.	Spectre HMQC H^1/C^{13} à 400 MHz à 50 °C dans de l'eau lourde (D_2O) de l'EPS produit par <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207.	113
Figure 58.	Viscosités relatives à l'eau des EPS KYEGB2 et KYGT207.	116
Figure 59.	Influence de différentes températures (25 °C, 50 °C et 105 °C) sur la viscosité relative à l'eau de l'EPS KYEGB2.	117
Figure 60.	Influence de différentes températures (25 °C, 50 °C et 100 °C) sur la viscosité relative à l'eau de l'EPS KYGT207.	117
Figure 61.	Viscosité relative en fonction du gradient de cisaillement dans l'eau, le NaCl, le CaCl_2 et l'HCl de l'EPS KYGT207 à 25 °C.	118
Figure 62.	Structure 3D de l'EPS KYGT207 dans l'eau.	119
Figure 63:	Représentation 3D de la simulation de l'effet des cations bivalents (Ca^{++}) sur la structure de l'EPS KYGT207.	120
Figure 64.	Humidité relative des moûts bactériens <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207 et <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2.	127
Figure 65.	Humidité relative des moûts bactériens <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207 et <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2.	128
Figure 66.	Evaluation de la capacité de rétention d'eau des EPS purifiés KYGT207 et KYEGB2.	129
Figure 67.	Cinétiques de dessiccation à 105°C des EPS KYGT207 et KYEGB2.	130
Figure 68.	Effet de différentes concentrations en EPS sur la rétention d'eau du sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC), soumis à une pression de 800 mBars (pF 2,7).	134
Figure 69.	Effet des EPS bactériens KYGT207, KYEGB2 et xanthane sur la réserve utile du sol de la station ITGC de Oued Smar.	135
Figure 70.	Effet de différentes concentrations en EPS KYGT207 et KYEGB2 sur la capacité de rétention en eau du sol de la station agronomique, ITGC sous pression atmosphérique.	137
Figure 71.	Cinétique de dessiccation à 105°C du sol de la station agronomique ITGC, mélangé aux EPS bactériens KYEGB2 et KYGT207.	138

Figure 72.	Effet des EPS bactériens KYGT207 et KYEGB2 sur le taux d'agrégats stables à l'eau du sol de la station agronomique de Oued Smar (ITGC).	139
Figure 73.	Effet des polysaccharides bactériens (KYGT207, KYEGB2) sur la capacité de rétention en eau du sable d'El Goléa.	140
Figure 74.	Effet de polysaccharides bactériens (KYGT207, KYEGB2) sur la capacité de rétention en eau du sable de Tamanrasset.	141
Figure 75.	Influence de 2 EPS bactériens (KYGT207, KYEGB2) sur le taux d'agrégats stables à l'eau d'un sol sableux d'El Goléa	143
Figure 76.	Influence de 2 EPS bactériens (KYGT207, KYEGB2) sur le taux d'agrégats stables à l'eau du sable de Tamanrasset.	144
Figure 77.	Cinétique de dessiccation à 105 °C du sol d'El Goléa mélangé aux EPS bactériens (KYEGB2 et KYGT207).	145
Figure 78.	Cinétique de dessiccation à 105 °C du sol de Tamanrasset mélangé aux EPS bactériens (KYEGB2 et KYGT207).	146
Figure 79.	Représentation hypothétique de l'effet de l'addition de l'EPS produit par la souche <i>Rhizobium sp.</i> KYGT207 sur la structure poral du sol de la station ITGC de Oued Smar.	150
Figure 80.	Taille des populations bactériennes "totales" et de chacune des souches inoculées (KYEGB2 et KYGT207) au niveau des racines de blé dur (<i>Triticum durum</i> var. Waha) et du sol adhérent, après 2 semaines de culture sur le sol de la station ITGC.	161
Figure 81.	Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes productrices d'EPS (KYEGB2 et KYGT207) sur la stabilité structurale du sol adhérent aux racines du blé dur <i>Triticum durum</i> var. Waha.	168
Figure 82.	Effet de l'inoculation de 2 souches bactériennes sur la stabilité structurale des différentes tailles d'agrégats du sol rhizosphérique de Oued Smar (ITGC).	169
Figure 83.	Représentation hypothétique de l'effet de l'inoculation par la souche <i>Rhizobium sp.</i> KYGT207 sur la structure porale du sol adhérent aux racines de blé dur (<i>Triticum durum</i> L. var. Waha).	173

INDEX DES PHOTOS

Photo 1.	Mise en place des sols dans les anneaux et humectation pour la mesure de l'humidité équivalente à pF _{2,7} .	25
Photo 2.	Aspect des EPS bactériens après précipitation à l'éthanol.	36
Photo 3.	Dispositif permettant l'extraction du sol adhérent.	44
Photo 4.	Aspect morphologique de la souche KYEGB2 dénombrée dans le sol rhizosphérique après 4 semaines de culture, sur milieu RCV-sac (Streptomycine + Ampicilline).	45
Photo 5.	Aspect morphologique de la souche KYGT207 dénombrée dans le sol rhizosphérique après 4 semaines de culture, sur milieu RCV-sac (Acide nalidixique + Kanamycine + Rifampicine)	45
Photo 6 et 7.	Sable d'El Goléa mélangé à l'EPS KYGT207	142
Photo 8 et 9.	Sable d'El Goléa mélangé à l'EPS KYEGB2	142
Photo 10.	Morphologique des colonies de <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207, cultivées sur milieu RCV-saccharose pendant 8 j à 30 °C.	156
Photo 11.	Morphologique des colonies de <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 cultivées sur milieu RCV-saccharose pendant 8 j à 30 °C.	157
Photo 12.	Morphologie cellulaire de <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207.	157
Photo 13.	Morphologie cellulaire de <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2.	158
Photo 14.	Aspect des colonies de la souche <i>Paenibacillus</i> sp. KYEGB2 dénombrée sur milieu RCV-saccharose, après 5 j d'incubation à 30°C.	160
Photo 15.	Aspect des colonies de la souche <i>Rhizobium</i> sp. KYGT207 dénombrée sur milieu RCV-saccharose, après 5 j d'incubation à 30°C.	160