

50376
1975
197

N° d'ordre : 559

50376
1975
197

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spéc. : Microbiologie

par

Bernard COURTOIS

ETUDE DES POLYOSIDES DE RHIZOBIUM



Soutenue le 22 Octobre 1975, devant la COMMISSION D'EXAMEN

MM.	J.B. GUILLAUME	Président
	J.C. DERIEUX	Rapporteur
	B. FOURNET	} Examineurs
	C. BONNIER	



030 032353 6

Ce travail a été réalisé au sein de l'ERA 275
du C.N.R.S. dans le laboratoire de Microbiologie
de l'Université des Sciences et des Techniques
de LILLE I.

Nous exprimons notre gratitude à Messieurs les Professeurs GUILLAUME et DERIEUX qui, par leurs conseils et leurs encouragements permanents ont permis la réalisation de ce travail.

Nous avons toujours trouvé l'aide et la sympathie dans les laboratoires des Professeurs MONTREUIL, SPIK et FOURNET. Nous remercions vivement ce dernier pour avoir accepté de juger cette thèse.

Monsieur le Recteur BONNIER nous a accueilli de nombreuses fois dans sa Faculté et nous a fait bénéficier de sa très grande expérience du Rhizobium ; nous lui adressons nos plus vifs remerciements et nous lui sommes reconnaissants d'avoir accepté de participer à ce jury.

Nous remercions Monsieur BRAKEL de ses compétences et de sa disponibilité qu'il nous a toujours témoignées au cours de fructueuses discussions ; nous l'assurons de toute notre sympathie.

Que Monsieur HORNEZ soit remercié de son excellente collaboration tant sur le plan scientifique qu'humain.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes des laboratoires de Microbiologie de LILLE et de GEMBLoux en particulier à Madame LETOQUART pour son aide technique.

TABLE DES MATIERES

-o-o-o-o-

<u>INTRODUCTION</u>	1
 <u>I HISTORIQUE</u>	
 <u>A ROLE DES POLYOSIDES DANS LA SYMBIOSE</u>	2
1) <u>Spécificité</u>	2
2) <u>Codage bactérie-plante</u>	3
3) <u>Induction de la courbure des poils absorbants</u>	4
4) <u>Induction des enzymes hydrolysant la paroi des cellules végétales</u> ..	5
5) <u>Polyosides : agent transformant</u>	6
 <u>B COMPOSITION CHIMIQUE DES POLYOSIDES</u>	7
1) <u>Groupes d'inoculation croisée</u>	7
2) <u>Critères modernes de classification</u>	8
3) <u>Composition chimique</u>	9
4) <u>Relation composition chimique - efficience</u>	11
 <u>C MODALITES DE LA SYNTHESE DES POLYOSIDES</u>	12
 <u>II MATERIEL ET METHODES</u>	15
 <u>A METHODES MICROBIOLOGIQUES</u>	15
1) <u>Milieus de culture</u>	16
2) <u>Isolements des souches</u>	18
3) <u>Vérification de la nodulation "in vitro"</u>	18

a - principe	19
b - désinfection des graines et prégermination	19
c - culture aseptique des légumineuses	19
α) petites graines	19
β) grosses graines	21
γ) ablations cotylédonaire	22
d - inoculation	22
 B <u>SOUCHES</u>	
1) Souches utilisées	23
2) Croissance des souches	23
3) Mise en non prolifération	26
4) Conservation des souches	26
 C <u>METHODES CHIMIQUES</u>	27
1) Préparation des polyosides	27
2) Technique de dosage des polyosides	28
a - dosage par pesée de poids secs de polyosides	28
b - dosage sans précipitation préalable	28
α) dosage biochimique sur un surnageant dialysé de culture centrifugée	28
β) fractionnement sur sephadex	30
3) <u>Analyse des polyosides</u>	32
 III <u>ETUDE DE LA PRODUCTION DE POLYOSIDES SOLUBLES PAR DES SOUCHES DE RHIZOBIUM EN CULTURE</u>	34
 A <u>SYNTHESE DE POLYOSIDES PAR DES BACTERIES EN CROISSANCE SUR UN MILIEU MINIMUM</u>	34
 B <u>SYNTHESE DE POLYOSIDES PAR DES BACTERIES EN CROISSANCE SUR DES MILIEUX COMPLETS A L'EXTRAIT DE LEVURE</u>	37

1) Synthèse en milieu RC	37
2) Synthèse en milieu de WRIGHT (W).....	39
C <u>CONDITIONS DE SYNTHÈSE</u>	41
IV <u>COMPOSITION CHIMIQUE DES POLYOSIDES SOLUBLES</u>	43
A <u>PRÉPARATION DES POLYOSIDES</u>	43
B <u>PURETÉ DES POLYOSIDES</u>	45
C <u>COMPOSITION CENTESIMALE DES POLYOSIDES</u>	46
D <u>COMPOSITION MOLAIRES DES POLYOSIDES</u>	48
1) <u>Hydrolyse</u>	48
2) <u>Identification et dosage des oses</u>	49
a - <u>les oses neutres</u>	49
b - <u>les acides uroniques</u>	51
E <u>ÉTUDE DE LA RÉALITÉ DE LA PRÉSENCE DU MANNOSE DANS LES POLYOSIDES</u>	51
F <u>DISCUSSION</u>	52
V <u>MODALITÉS DE SYNTHÈSE DES POLYOSIDES SOLUBLES PAR DES BACTÉRIES NON PROLI-FÉRANTES</u>	56
A <u>MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE RAPIDE DE DOSAGE</u>	56
1) <u>Choix du Sephadex</u>	57
2) <u>Étude du fractionnement sur G₂₅</u>	59
3) <u>Problèmes des sucres marqués au ¹⁴C</u>	60
4) <u>Standardisation de la technique</u>	63
5) <u>Étude critique de la technique</u>	67

B	<u>DETERMINATION DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE</u>	68
	1) <u>Conservation de la souche</u>	69
	2) <u>Vérification de la non prolifération</u>	69
	3) <u>Moment de la croissance</u>	71
	a - <u>principe</u>	71
	b - <u>expérience</u>	71
	4) <u>Rôle des conditions de culture en milieu complet sur la synthèse en non prolifération</u>	73
	5) <u>Stabilité du pouvoir de synthèse sans fonctionnement cellulaire</u>	75
C	<u>FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SYNTHÈSE</u>	77
	1) <u>Rôle de la température d'incubation</u>	77
	2) <u>Rôle de l'aération</u>	78
	3) <u>Rôle du pH</u>	79
	4) <u>Rôle de la concentration en substrat</u>	80
	a - <u>principe</u>	80
	b - <u>résultats</u>	80
D	<u>ROLE QUALITATIF DES OSES</u>	83
	1) <u>mise en évidence</u>	84
	a - <u>études préliminaires du rôle qualitatif des oses dans la synthèse des polyosides par des bactéries en croissance</u>	84
	α) <u>culture sur milieu complet solide</u>	84
	β) <u>culture sur milieu complet liquide</u>	87
	b - <u>rôle qualitatif des oses dans la synthèse de polyosides par des bactéries non proliférantes</u>	88
	2) <u>Mécanisme d'inhibition</u>	90
	a - <u>hypothèses</u>	90
	b - <u>rôle du glucose</u>	90
	c - <u>rôle du pH</u>	92
	α) <u>synthèse de polyosides en milieu très tamponné glucosé</u>	94
	β) <u>synthèse de polyosides en milieu RN⁻ mannité avec baisses artificielles de pH</u>	97

d - <u>compétition des substrats</u>	99
E <u>DISCUSSION</u>	101
VI <u>CONCLUSION GENERALE</u>	103
VIII <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	106

INTRODUCTION

La symbiose qui s'établit entre les plantes de la famille des légumineuses et les bactéries du genre Rhizobium aboutit à la fixation de l'azote atmosphérique. Ce dernier grâce au complexe enzymatique de la nitrogenase est réduit puis directement assimilé par la plante.

A ce sujet nous avons montré que des membranes surnuméraires parallèles aux structures externes des cellules bactériennes pourraient être le support de chaînes d'oxydations cellulaires assurant cette fixation de l'azote⁽⁴¹⁾ .

Les mécanismes biochimiques de cette transformation ont été très étudiés et sont actuellement bien connus.

Par contre, les étapes physiologiques de la symbiose plante-bactérie sont mal comprises. De nombreuses questions restent posées sur les mécanismes et signaux cellulaires et moléculaires entre les deux partenaires de la symbiose. La pénétration de la bactérie dans les tissus racinaires, la modification de l'ADN bactérien pour aboutir à la transformation en bactéroïde fixant l'azote, méritent l'attention des chercheurs.

Par ailleurs, le fait que seules les légumineuses aient le privilège de noduler représente à la fois un intérêt scientifique pour la spécificité de ces plantes vis à vis des souches de Rhizobium et un espoir agronomique de faire noduler efficacement d'autres plantes que les légumineuses.

Nos travaux ont porté sur l'étude des polysides solubles de Rhizobium dans le but de déterminer ultérieurement leur rôle dans la symbiose. Ce rôle éventuel a été très vite pressenti et étudié.

Historique

II HISTORIQUE

Le genre Rhizobium synthétise des grandes quantités de polyosides solubles. La plupart des auteurs ont expliqué cette perte d'énergie par un rôle éventuel de ces macromolécules dans la symbiose.

A - ROLE DES POLYOSIDES DANS LA SYMBIOSE

Les polyosides pourraient intervenir soit dans la protection des souches de Rhizobium dans le sol (84) soit dans les mécanismes de codage de la bactérie et des racines des plantes et être ainsi le support de la spécificité légumineuse-Rhizobium. Les polyosides pourraient aussi intervenir dans le mécanisme de l'infection lui-même et enfin dans l'état bactéroïde où ils constitueraient une réserve d'énergie.

La ligne directrice des travaux concernant l'étude des rôles éventuels des polyosides est la spécificité entre une bactérie et une plante.

1) Spécificité

La question réelle est de savoir si les souches de Rhizobium qui ont une origine donnée portent une information génétique qui les lie assez étroitement à un groupe de plantes.

BONNIER 1958, (9) soutient la thèse de la non-spécificité et de l'adaptation réciproque bactérie-légumineuse. Il indique à ce propos "A notre avis, il n'existe pas 2, 6, 9, 12 ou 32 espèces de Rhizobium (selon les auteurs) mais bien un vaste groupe de bactéries possédant des caractères communs et capables dans certaines conditions de vivre en symbiose avec les racines de légumineuses en fixant l'azote atmosphérique. Ce groupe est constitué de formes en perpétuelle évolution

liée à l'influence de facteurs internes ou externes (sol, plantes, conditions climatiques)".

En précisant le rôle de ces "facteurs de spécificité", BONNIER dit que "le phénomène de spécificité semble confirmer la théorie de NUTMAN, de THORNTON et LUDWIG et ALLISON sur l'excrétion de substances stimulatrices et inhibitrices qui régularisent la formation et l'effectivité des nodules de légumineuses".

Dans ce cadre on a souvent voulu prêter aux polyosides, un rôle stimulateur dans les différentes étapes de la symbiose.

La majorité des auteurs ne décrivent pas de différences chimiques importantes dans la composition des polyosides. Seul SOMME 1974

(81) met en évidence des différences mineures entre les polyosides de souches efficaces et ceux de souches inefficaces. De plus il émet l'hypothèse que les groupements acetyl et pyruvyl présents dans les polyosides de Rhizobium pourraient être le support de cette spécificité. Cette thèse est appuyée par les travaux de DUDMAN et HEIDELBERGER, 1969(24) qui montrent que les polyosides de Rhizobium débarrassés des groupements acetyl et pyruvyl perdent leur spécificité antigénique.

2) Codage bactérie-plante

La reconnaissance bactérie-plante doit avoir son siège dans les structures biochimiques externes des deux symbiontes en présence. En ce qui concerne les structures externes végétales, HAMBLIN et KENT 1973 (38) montrent que les cellules de racines de haricot possèdent à leur surface des phytoagglutinines capables d'agglutiner les globules rouges. Par ailleurs, ces mêmes globules rouges s'agglutinent avec des cellules de Rh - phaseoli mis en contact avec des phytoagglutinines.

Il émet l'hypothèse que ces glycoprotéines pourraient permettre l'adsorption des cellules de Rhizobium sur les racines de légumineuses. Il pourrait y avoir une reconnaissance entre par exemple, l'haptène des phytoagglutinines et les polyosides de Rhizobium.

A ce sujet, ALBERSHEIM 1969 (1) montre que des molécules renfermant des sucres peuvent participer à la reconnaissance de molécules protéiques. Ce mécanisme qui ferait intervenir les phytoagglutinines dans l'adsorption bactérie-plante pourrait être généralisé à toutes les légumineuses. TOM S (87) décrit en effet la présence de phytoagglutinines chez l'ensemble des légumineuses.

3) Induction de la courbure des poils absorbants

L'entrée des bactéries dans les racines peut se faire par exemple au point de jonction des racines secondaires et de la racine principale chez l'arachide (ALLEN et ALLEN 1940 (3)) de même que chez le lupin SHAEDE 1931 (74) et HAACK 1961 (37) .

Néanmoins, l'infection chez la majorité des espèces de légumineuses a lieu dans les poils absorbants. Ces derniers ont, la particularité de se courber ou de se ramifier en présence de Rhizobium MAC COY 1932 (58) THORNTON 1936 (86) FARAHEUS 1957 (26) NUTMAN 1959 (68) .

Le filtrat stérile d'une culture de Rhizobium a la propriété d'induire la courbure des poils absorbants chez les plantes homologues THORNTON 1936 (86) THORNTON et NICOL 1936 (85) CHEN 1938 (14) YAO et VINCENT 1969 (95) LJUNGGREN 1969 (55) SOLHEIM et RAA 1973 (80) .

HUBBEL 1970 (42) décrit le même effet des polyosides bruts de Rh-Trifolii sur les poils absorbants de trèfle.

SOLHEIM et RAA 1973 (80) montrent que le principe actif est composé de 2 fractions, l'une ayant les propriétés d'acides nucléiques et l'autre des protéines ou des polyosides.

4) Induction des enzymes hydrolysant la paroi des cellules végétales

Il existe de nombreuses enzymes capables de détruire la paroi des cellules végétales. Les cellulases (1.4. Glucanases) les hémicellulases (hydrolysant les polysides autres que la cellulose) les polygalacturonases (1.4. Glucosidases et pectidases), les liases pectiques (trans-éliminases).

Les souches de Rhizobium ne produisent pas ces enzymes (MAC COY 1932 (58) SMITH 1958 (78) LILLICH et ELKAN 1968 (53) LJUNGGREN 1969 (55)) qui peuvent être synthétisées par certains champignons et bactéries pathogènes des plantes (ALBERSHEIM 1969 (1)).

Elles sont aussi synthétisées durant la croissance normale des légumineuses (ROGGEN et STANLEY 1969 (73) , LEE et col 1967 (52)). La présence de ces enzymes augmenterait le taux d'infection (DARBYSHIRE 1964 (17) , FARAHEUS et LJUNGGREN 1959 et 1968 (28)(27), LJUNGGREN et FARAHEUS 1959 et 1961 (56)(57), LJUNGGREN 1969 (55)).

LJUNGGREN et FARAHEUS, 1961 (57) mettent en évidence un taux plus élevé de polygalacturonase sécrétée par des racines de légumineuses mises en présence de souches de Rhizobium homologues et effectives qu'en présence de souches non homologues et ineffectives. Ils font les mêmes observations en ajoutant les polysides solubles d'une souche homologue effective.

Ces auteurs postulent l'hypothèse d'une induction possible de la polygalacturonase par les polysides de Rhizobium. Cette induction irait dans le sens de la spécificité de groupe.

LILLICH, ELKAN 1968 (53) , MAC MILLAN et COOK 1969 (59) , SOLHEIM et RAA 1971 (79) , BONISH 1973 (7) en répétant scrupuleusement les conditions de LJUNGGREN et FARAHEUS détectent les mêmes quantités de polygalacturonase sécrétées à la fois par des plantules non inoculées et

par celles inoculées par des souches de Rhizobium homologues.

BONISH 1973 (8) entreprend une étude détaillée de la sécrétion de la polygalacturonase par les racines des légumineuses. Il en conclut que les enzymes de dégradation de la paroi des cellules végétales sont présentes durant la germination, la croissance des plantules de légumineuses avec des taux plus influencés, par les changements de condition de croissance et le milieu extérieur pour plantes, que par un effet bactérien.

Néanmoins, les problèmes de la participation éventuelle de ces enzymes et leur induction restent posés et on peut penser que les recherches doivent s'orienter vers l'utilisation de techniques de détection enzymatiques très fines, intéressant uniquement les localisations d'infections.

5) Les polyosides : agent transformant

LJUNGGREN 1969 (55) montre que les polyosides d'une souche de Rh-trifolii effective ajoutés à une souche mutante avirulente induisent la nodulation du trèfle par cette souche.

Cet auteur montre même que les polyosides de Rh-trifolii ont la propriété d'induire la nodulation du trèfle par différentes souches très différentes et non homologues (Rh léguminosarum, Chromobactérium violaceum et Agrobactérium radiobacter).

Ces résultats suggèrent l'idée que les polyosides pourraient posséder de l'ADN qui transformerait les différentes souches étudiées en souches homologues (LANGE and ALEX ANDER 1961 (51)). Il a été impossible à HUMPHREY et à VINCENT 1963 (45) de réobtenir ces résultats.

Le problème de la spécificité plante-bactérie est complexe et semble lié à la présence de substances végétales et bactériennes. Dans

ce dernier cas, on a voulu très fortement incriminer les polyosides de Rhizobium. Ceux-ci pourraient être amenés à jouer un rôle qu'il reste encore à définir avec précision.

B - COMPOSITION CHIMIQUE DES POLYOSIDES

Les polyosides ont surtout été étudiés du point de vue de leur composition chimique. Ces études ont deux buts principaux. Tout d'abord essayer de différencier les espèces de Rhizobium à l'aide de la composition chimique. Puis de trouver une relation entre l'efficacité et des particularités chimiques des polyosides.

En effet, la taxonomie du genre Rhizobium repose essentiellement sur l'aptitude à provoquer la nodulation chez les plantes du groupe des légumineuses. Cette propriété peut disparaître par mutation (83) . Il est donc nécessaire d'y ajouter d'autres critères de classification. Ainsi dans un premier temps, nous rappellerons brièvement les différents types de classification du genre Rhizobium. Puis nous rapporterons les études de la composition chimique des polyosides de Rhizobium. Par ailleurs, les modalités de la synthèse des polyosides et leur biosynthèse par des systèmes "in vitro" ont été peu étudiées.

1) Les groupes d'inoculation croisée

La division du genre Rhizobium en variétés (62) puis en groupes d'inoculation croisée (13) , élevés au statut d'espèces (30) contestées par de nombreux auteurs (75,92) montre les difficultés posées par l'établissement de la taxonomie du genre Rhizobium.

Actuellement, le "BERGEY'S Manual of determinative bacteriology 7° edition 1957", divise le groupe Rhizobium en 6 espèces correspon-

dant à 6 groupes d'inoculation croisée (soja, lupin, pois, luzerne, haricot et trèfle).

A côté de ces groupes, NORRIS 1956 (66) introduit le "cowpea-group" qui correspond essentiellement à des souches de Rhizobium infectant des légumineuses tropicales.

Cette classification est en fait très sommaire et ne concerne qu'un petit nombre de souches de Rhizobium et de légumineuses. ALLEN et BALDWIN 1954 (4) montrent que les études d'inoculation croisée ne portent que sur environ 1000 légumineuses parmi 11000 espèces connues.

2) Critères modernes de classification

Les Rhizobium de certaines légumineuses n'entrent en symbiose avec aucune plante des six groupes cités dans le Bergey's manual. On aurait pu multiplier le nombre de groupes d'inoculation croisée et FRED, BALDWIN et MAC COY 1932 (30) préconisent 16 groupes. Enfin, WILSON en 1944 (93) cite plus de 500 raisons d'abandonner les groupes d'inoculation croisée.

Devant ces difficultés d'établir la taxonomie du genre Rhizobium, de nombreux auteurs ont tenté d'utiliser d'autres moyens de classification.

Ainsi, DELATTRE et col 1971 (19) ont établi les bases d'une galerie de détermination du genre Rhizobium, en utilisant les propriétés métaboliques qui permettent ainsi de le différencier des autres bactéries du sol. Mais l'uniformité des caractères biochimiques de toutes les espèces de Rhizobium ne permet pas de subdiviser ce genre en groupes selon leur plante hôte.

L'utilisation de la flagellation, des caractères sérologiques et lysotypiques, de la physiologie et de l'analyse adansonienne (33,34, 89,32,35) ont abouti à la séparation du genre Rhizobium en deux grands

groupes :

D'une part, les souches à croissance lente du "cowpea-group" et des groupes du soja et du lupin. D'autre part, les souches à croissance rapide des groupes du trèfle, du pois, du haricot, et de la luzerne.

NORRIS 1956 (66) est en accord avec cette conception de l'existence des 2 groupes de Rhizobium. Il considère que les souches à croissance rapide représentent "un cul de sac d'évolution" et sont atypiques de la majorité des légumineuses concernées par des souches à croissance lente.

Par contre l'étude des polyosides pourrait paraître plus prometteuse. Elle permettrait d'après certains auteurs de subdiviser le groupe des souches de Rhizobium à croissance rapide en deux sous-groupes.

3) Composition chimique des polyosides

De nombreux auteurs ont décrit la structure primaire des polyosides de certains groupes. Ainsi HOPKINS, PETERSON et FRED 1930 (40) détectent du glucose et de l'acide glucuronique dans les polyosides des souches de Rhizobium de trèfle, pois et luzerne. HUMPHREY et VINCENT 1959 (44) confirment ces résultats excepté pour le groupe de la luzerne où ils ne trouvent que du glucose.

Mais, pour AMARGER, OBATON et BLACHERE 1967 (5), les polyosides de Rh-meliloti renferment du glucose et du galactose. CLAPP et DAVIS 1970 (15) mettent en évidence du glucose, de l'acide glucuronique mais aussi du galactose et du mannose dans les polyosides de toutes les espèces de Rhizobium. BAILEY et GREENWOOD 1971 (6) font les mêmes observations et confirment les résultats d'AMARGER et col 1967 (5) pour le groupe de la luzerne.

ZEVENHUIZEN 1973 (96) utilisant la chromatographie en phase gazeuse ne fait plus mention de mannose, de même que SOMME 1974 (81) .

GRAHAM 1965(36) et de LEIZAOLA et DEDONDER 1955(21) outre ces oses communément rencontrés, mettent en évidence du mannose.

Récemment, HUMPHREY et Coll 1974 (46) montrent que le mannose des polysides issus des souches à croissance rapide serait dû aux mannanes présents dans les extraits de levure entrant dans la composition des milieux de culture.

L'hétérogénéité des résultats publiés paraît tenir à deux causes : d'une part, l'identification des souches de Rhizobium étudiées pour leurs polysides n'est pas toujours réalisée par inoculation à la plante et d'autre part, certains composants des milieux de croissance interféreraient avec ceux des polysides ; enfin, la plupart des auteurs étudient seulement quelques groupes de Rhizobium.

Néanmoins de l'ensemble de ces résultats, on peut dégager deux tendances.

CLAPP et DAVIS 1970 (15) affirment que la composition des Polysides de Rhizobium ne peut être utilisée à des fins taxonomiques.

BAILEY GREENWOOD 1971 (6) et ZEVENHUIZEN 1973 (96) différencient les polysides de Rh-phaseoli, leguminosarum et trifolii qui contiennent de l'acide glucuronique de ceux de Rh-meliloti qui en contiennent très peu.

GRAHAM 1964 (35) caractérise en plus un troisième groupe constitué des souches de Rhizobium à croissance lente qui produisent des polysides le plus souvent liés à la paroi. Ces polysides renferment parfois du rhamnose (DE LEIZAOLA et DEDONDER 1955 (21)).

4) Relation composition chimique - efficience

L'étude globale des polyosides synthétisés par différentes souches de Rhizobium efficaces et inefficaces ne révèle pas de différences significatives dans la composition primaire. Ainsi, AMARGER et Col 1966 (5) constatent l'uniformité de la composition chimique des polyosides de Rh-meliloti efficaces et inefficaces.

HEPPER 1972 (39) étudie le groupe du trèfle et montre que les polyosides d'une souche efficace et ceux d'une souche inefficace ont la même composition chimique. Par contre les polyosides de 2 souches efficaces voisines ont des compositions chimiques très différentes. Ainsi les polyosides d'une souche efficace de trèfle renferment dix fois plus de galactose que ceux d'une autre souche efficace.

HEPPER 1972 (39) pense que la composition chimique globale des polyosides de Rh-trifolii ne permet pas de différencier les souches efficaces de celles inefficaces. Par contre elle émet l'hypothèse que le support de l'indication de l'efficience pourrait concerner un produit mineur des polyosides non encore identifié ou un détail structural. Elle imagine enfin que les polyosides de Rhizobium puissent avoir une composition différente selon qu'ils sont synthétisés en milieu de culture ou dans la rhizosphère.

SOMME 1974 (81) met en évidence des différences structurales au niveau des liaisons osidiques et d'ions présents dans les polyosides de Rhizobium.

Les polyosides de souches inefficaces contiennent plus de liaisons de type 1.3., plus d'ions K^+ , et moins d'ions Na^+ que ceux de souches efficaces.

En conclusion, on peut dire qu'il semble difficile actuellement de préciser le rôle exact des polyosides de Rhizobium dans la

symbiose, en particulier au niveau de la spécificité et de l'efficacité.

C - MODALITES DE LA SYNTHÈSE DES POLYOSIDES

En fait les modalités de la synthèse de polyosides n'ont jamais été étudiées en détail. Quelques facteurs ont seulement été recherchés pour mettre au point des milieux de culture convenables pour la croissance du Rhizobium et pour la production de polyosides dans le but d'étudier leurs compositions chimiques.

Ainsi le rôle de la nature de l'ose du milieu de culture a été principalement étudié pour la croissance des souches de Rhizobium. Ainsi JOHSIN 1920 (48) remarque que le mannitol est la source de carbone la mieux adaptée à la croissance des souches de Rhizobium. NEAL, RH et WALKER, R.J. 1935(63) concluent que le galactose et l'arabinose conviennent mieux que le glucose à la croissance du Rhizobium. GEORGI, C.E. et ETTINGER, J.M. 1940(31) étudient le rôle de plusieurs oses sur la croissance et dressent les résultats d'efficacité suivants :
Inositol et Cellobiose > Xylose et Glucose > Fructose > Melibiose.

Néanmoins la source de carbone la plus couramment utilisée pour la croissance du genre Rhizobium, est le mannitol (milieu de WRIGHT (94)).

Par contre FERRY, P ; BLACHERE, M et OBATON, M 1959(29) démontrent que le glucose ajouté à un milieu de culture minimum permet d'obtenir un poids sec de cellules de Rh-meliloti supérieur à celui obtenu en présence de mannitol.

Plus récemment les voies métaboliques des sources de carbone

utilisées par les souches de Rhizobium ont été étudiées.

Le glucose est dégradé selon la voie d'ENTNER-DOUDOROFF chez Rhizobium japonicum (KEELE et Col 1970 (49)). L'arabinose est converti en 2 Keto - 3 desoxy gluconate qui est clivé en Glycoaldehyde et en pyruvate selon une voie oxydative (PEDROSA, F.O. et ZANCAN, G.T. 1974 (71)).

Enfin le mannitol et le sorbitol sont tous deux oxydés en fructose (MARTINEZ de DRETS, G ; et ARIAS, A 1970 (60)).

Par ailleurs DUDMAN 1964 (23) met au point un milieu de culture convenable pour la synthèse de polyosides par des souches de Rh-meliloti. Cet auteur étudie le rôle de la concentration en source de carbone et en source d'azote sur la synthèse. Il en conclut que les polyosides sont synthétisés de façon optimale en présence d'un excès de source de carbone et d'une quantité réduite d'azote.

Ces observations avaient déjà été faites pour la synthèse de Polyosides de Klebsiella aerogenes et Escherichia coli (DUGUID et WILKINSON 1953 (25) et WILKINSON et Col 1954 (91)).

Enfin contrairement aux entérobactéries, les souches de Rhizobium synthétisent préférentiellement leurs polyosides en aérobiose faible (SUTHERLAND 1972 (84)).

La biosynthèse des polyosides a été étudiée "in vitro" à partir d'extraits enzymatiques de cellules de Rh-japonicum mis en contact d'UDP-Glucose. DEDONDER, R.A. et HASSID, W.Z. 1964 (18) qui réalisent cette étude montrent que le système enzymatique de synthèse a une activité optimale à pH 7,5 en présence d'ions Mg^{2+} et Mn^{2+} . Le glucanne synthétisé est constitué de résidus glucosés reliés principalement en β 1—2 et quelquefois en β 1—3 et β 1—6.

Les polyosides de Rhizobium ont été principalement étudiés du point de vue de leur composition chimique qui n'est pas encore connue

avec exactitude.

Leur rôle dans la symbiose est très hypothétique et les modalités de leur synthèse par des cellules viables ou par des extraits enzymatiques cellulaires ont été très peu étudiés. Tout cela a motivé notre travail dans le but de mieux connaître les polyosides par eux-mêmes pour pouvoir ensuite leur attribuer un rôle éventuel dans la symbiose.

Dans un premier temps, nous avons étudié les conditions de synthèse des polyosides par des bactéries en croissance. Cette étude avait pour but la production massive de polyosides par l'ensemble des espèces de Rhizobium.

Dans un deuxième temps, la composition chimique de ces macromolécules a été déterminée.

Enfin, dans un troisième temps les modalités de la synthèse ont été étudiées indépendamment de la croissance, à l'aide d'une souche de Rh-méliloti placée dans des conditions de non-prolifération.

Materiel et Methodes

II MATERIEL ET METHODES

Pour réaliser ce travail, des souches de Rhizobium de différentes espèces sont isolées des nodules de légumineuses. Ces souches sont caractérisées et conservées selon des techniques particulières. Par ailleurs les polyosides solubles produits par ces souches sont analysés du point de vue qualitatif et quantitatif selon des techniques citées ci-après.

A - METHODES MICROBIOLOGIQUES

L'isolement des souches à partir des nodules racinaires des légumineuses est une opération délicate.

Cela nécessite la désinfection de la surface des nodules en maintenant en vie les cellules de Rhizobium intra-tissulaires. Les souches de Rhizobium présumées doivent alors pouvoir provoquer la nodulation "in vitro" de légumineuses adéquates. Cette vérification se fait à partir de graines désinfectées qui, placées dans des conditions aseptiques engendrent des plantules pouvant entrer en symbiose avec les souches de présumé Rhizobium.

Ces dernières se cultivent mal sur les milieux classiques peptonnés et sur les milieux minima. Elles ont besoin de facteurs de croissance présents dans des milieux souvent très complexes. Leur temps de génération assez long favorise l'apparition de contaminations à croissance plus rapide.

Enfin, leur conservation nécessite certaines précautions particulières.

1) Milieux de culture

Les milieux utilisés (complexes ou minima, il s'agit des milieux de WRIGHT et de LAIRD modifié par DELATTRE ou RC) sont utilisés pour la croissance des souches de Rhizobium. Par contre les solutions tamponnées sucrées dépourvues d'azote maintiennent les bactéries en vie en les plaçant dans des conditions de non-prolifération. Ces dernières permettent d'étudier la production de polyosides indépendamment de la croissance. Enfin nous décrirons un milieu pour la culture des légumineuses "in vitro".

Milieu de WRIGHT à l'extrait de levure fraîche (94)

Milieu de WRIGHT (W)

K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$NaCl$	0,2 g
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 g
$CaCO_3$	0,1 g
Mannitol	10 g
Extrait de levure fraîche	100 ml
H_2O distillée	900 ml

pH 7.5

L'extrait de levure fraîche est obtenu par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes de 100 g de levure fraîche de boulangerie dans 1 litre d'eau distillée. La suspension autoclavée est filtrée à chaud sur un papier filtre jusqu'à colmatage de ce dernier. Le filtrat obtenu est jaune limpide et est conservé à la température du laboratoire après avoir été réautoclavé à 120° pendant 20 minutes (communication personnelle de BRAKEL).

Milieu RC (milieu de LAIRD (50) modifié par DELATTRE (20))

Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g	
HK ₂ PO ₄	0,5 g	
Yeast extract	1 g	
Ose	10 g	pH 7,5

Milieu minimum R

Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g	
HK ₂ PO ₄	0,5 g	
NH ₄ NO ₃	0,5 g	
Biotine	10 µg	
Thiamine	500 µg	
Ose	10 g	
Eau distillée	1 litre	pH 7,5

Tampon sucré exempt d'azote RN⁻

Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g	
HK ₂ PO ₄	0,5 g	
Eau distillée	1 litre	
Ose	10 g	pH 7,8

Milieu de NICOL et THORNTON pour culture des légumineuses (65)

K_2HPO_4	0,5 g
$Mg SO_4, 7H_2O$	0,2 g
$NaCl$	0,1 g
$Fe PO_4$	1 g
$Ca_3 (PO_4)_2$	2 g
$Fe Cl_3$	0,01 g
Eau distillée	1 litre

2) Isolement des souches

Les nodules sont séparés de la légumineuse qui les porte en ménageant des morceaux de racine de part et d'autre de ces nodules. Ils sont lavés à grande eau puis désinfectés 5 minutes dans un bain d' $HgCl_2$ à 2,5 ‰ additionné de Teepol (0,5 %). Il est nécessaire d'effectuer huit rinçages à l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace de désinfectant. Les vidanges successives de désinfectant et d'eau distillée sont réalisées à l'aide d'une pipette Pasteur connectée à une trompe à vide. Les nodules sont répartis dans des tubes à hémolyse contenant 0,5 ml de milieu tamponné stérile et broyés à l'aide d'un agitateur stérile. Les colonies de Rhizobium sont obtenues par isolement à l'öse à partir des broyats sur milieu de WRIGHT .

Les colonies de Rhizobium apparaissent au bout de 4 à 8 jours d'incubation à 30°C. Elles sont souvent très muqueuses et ont un aspect soit translucide soit plus opaque.

3) Vérification de la nodulation "in vitro"

a - Principe

Le seul critère de classification réelle que nous possédons pour décider de l'appartenance d'une souche au genre Rhizobium est la nodulation "in vitro" de la légumineuse adéquate par cette souche. Cette nodulation doit se faire dans des conditions aseptiques. Dans un premier temps des graines sont désinfectées, mises à germer stérilement puis placées dans des conditions aseptiques et nutritives convenables pour engendrer des "plantules aseptiques". Les dernières seront inoculées avec la souche dont on veut vérifier l'identité.

b - Désinfection des graines et prégermination

Les graines sont désinfectées selon le même processus que les nodules avec une solution de chlorure mercurique à 2,5 %. Le mouillant (teepol) est utilisé pour la désinfection de toutes les graines exceptées celles d'arachides. Ces dernières possèdent une cuticule très fine et très mouillable et l'adjonction d'un mouillant rend trop drastique l'effet du chlorure mercurique. Le désinfectant est éliminé par huit rinçages à l'eau distillée stérile. Pour la germination les graines sont déposées stérilement sur le milieu de WRIGHT coulé en boîtes de Petri. La prégermination dure 2 à 4 jours à 30°C selon les graines jusqu'à l'apparition des radicules.

c - Culture aseptique des légumineuses

Les techniques utilisées diffèrent selon la grosseur des graines prégermées.

α) petites graines

Elles sont placées dans des tubes de 20 x 200 renfer-

mant un milieu minéral dépourvu d'azote (Milieu de NICOL et THORNTON). Les plantules utilisées comme témoins non inoculés sont cultivées sur le même milieu contenant en outre 0,5 g de Na NO_3 par litre. Le milieu minéral peut-être utilisé liquide ou gélifié à 12 o/oo d'agar. Le milieu liquide est déposé dans un tube à ergots sur lesquels on dispose un morceau de coton hydrophile. La graine est simplement déposée sur ce dernier (fig 1 B).

Le milieu solide est incliné et la graine est déposée à la partie supérieure de la tranche dans une petite "logette" établie à l'aide d'un fil droit (fig 1 A).

Les tubes sont placés dans des conditions de 16 heures d'éclairage par jour et de 80 % d'humidité constante. Ces techniques conviennent pour les graines de trèfle et de luzerne. Par contre le développement de la partie aérienne des graines de pois, haricot, soja, lupin et arachide est incompatible avec la mise en tube de 20 x 200.

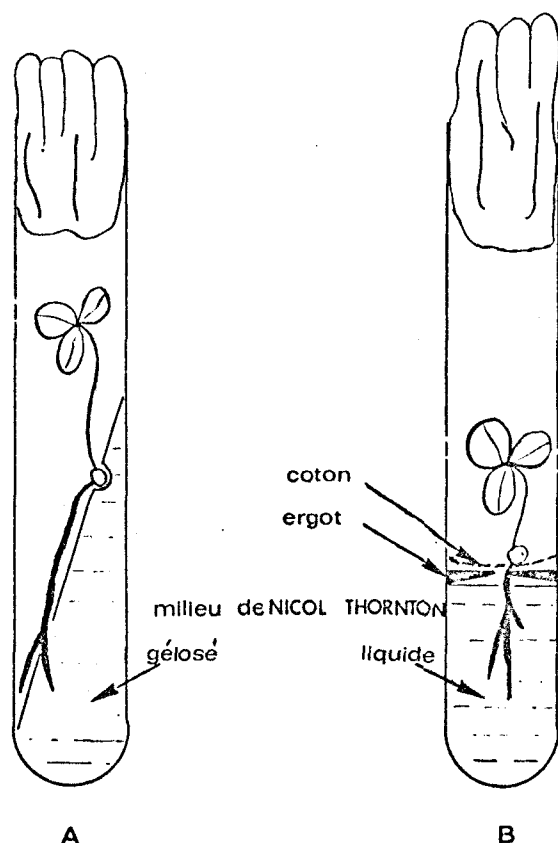


FIG. 1

plantules aseptiques en tubes de 20 x 200 renfermant un milieu de NICOL et THORNTON

A. gélifié incliné

B. liquide

d'après BONNIER et BRAKEL (10)

β) Grosses graines

Le procédé décrit par BRAKEL 1965 (12) permet de placer les légumineuses à grosses graines dans des conditions semi-stériles satisfaisantes pour la nodulation "in vitro". En effet des vases tronconiques en terre cuite de 13 cm de diamètre sont remplis de vermiculite additionnée de 250 ml de solution de NICOL et THORNTON. Un tube en verre percé de 4 trous est placé dans la vermiculite de façon à ce que les 4 ouvertures se situent un centimètre en deça de la surface de la vermiculite. Ce tube obturé par une bourre de coton sert de réservoir d'arrosage. L'ensemble recouvert de papier d'aluminium est autoclavé trois fois de suite à 24 heures d'intervalle à une température de 120°C pendant 1 heure. Les pots sont ensemencés avec les graines désinfectées qu'on enfonce de 2 à 3 fois leur épaisseur dans la vermiculite. Après le semis les graines sont recouvertes de sable paraffiné préparé selon la méthode de VAN SCHREVEN 1959 (88) . (Fig. 2)

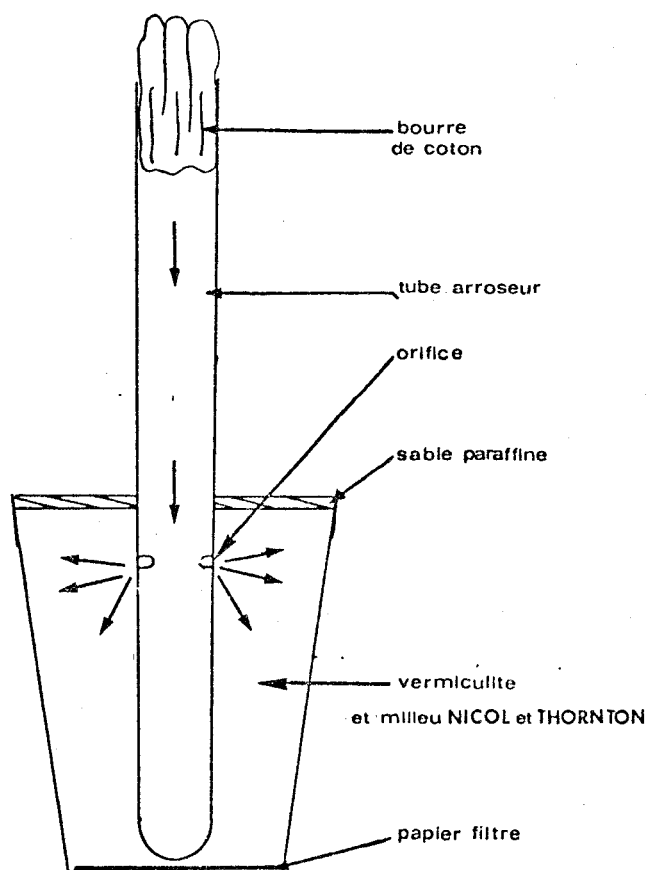


FIG. 2
dispositif pour la culture aseptique de
légumineuses à grosses graines
d'après BRAKEL (12)

Les pots sont placés dans les mêmes conditions de lumière et d'humidité que celles précitées. L'arrosage se fait à l'aide d'eau distillée introduite dans le tube percé. BRAKEL 1965 (12) ne décrit que 2 à 3 % d'infections de pots non inoculés après 3 mois de culture.

γ) Ablations cotylédonnaires

Pour empêcher ce risque BONNIER et EROUWERS 1959 (11) préconisent l'opération des cotylédons des grosses graines. Cela permet d'obtenir des "mini-plantules" à partie aérienne réduite capables de noduler dans des tubes en verre de 3 cm de diamètre.

Les graines désinfectées sont mises en prégermination, subissent l'ablation cotylédonnaire puis sont remises en prégermination pour contrôler l'asepsie de l'opération. Elles sont ensuite transplantées dans un milieu minéral liquide placé dans un tube à ergots. Les plantules plus petites résistent bien au flétrissement et sont plus susceptibles de bien noduler puisque privées d'une partie de leur réserve d'azote qui a tendance à inhiber la nodulation.

d - Inoculation

Les plantules des petites graines et des mini-plantules sont inoculées dès l'apparition des racines secondaires par environ 10^8 cellules lavées par un tampon (milieu R).

Les plantules dans les vases de végétation sont inoculées en plaçant environ 10^9 bactéries dans le tube d'arrosage après l'apparition des racicules.

Dans les 2 cas, l'inoculation peut également se faire par trempage des graines désinfectées dans une suspension de germes lavés.

B - SOUCHES

1) Souches utilisées

La collection du laboratoire est constituée de souches isolées des nodules de diverses légumineuses provenant de terrains différents. L'aptitude à noduler et l'efficacité de chaque souche ainsi isolée ont été contrôlées en laboratoire par culture aseptique, excepté pour le groupe du lupin ; en effet, nous n'avons jamais réussi à réaliser sa nodulation "in vitro".

Les souches L1S, L2S, L3S, L4S, L21S ont été isolées du pois ; M2011, M3S, M5S, M5N1 (mutant spontané de M5S), M11S, M12S, de la luzerne ; P2S, P3S, P7S, P8S du haricot ; T1S, T2S, T3S, T13S, T35S du trèfle ; V21S, V39S, V40S de l'arachide ; K62S, K63S, K64S du lupin et J3S, J4S, J5S, J6S, J7S du soja.

2) Croissance des souches

Contrairement à bon nombre de microorganismes il n'a pas été facile de trouver un milieu synthétique ou même complet qui assure la survie des souches de Rhizobium. Après quelques repiquages ces dernières ne cultivent plus sur des milieux simples ; ce qui prouve que d'autres constituants sont nécessaires.

NEUMANN 1902 (64) a essayé plus de 70 milieux à bases d'extraits de plantes et de sol. Les auteurs ont des avis très différents sur les facteurs de croissance indispensables au Rhizobium. Il s'agirait de la biotine et de la thiamine pour WEST et WILSON 1939 (90) , d'acides aminés pour JORDAN 1952 (47) ou d'oligoéléments pour STEINBERG 1938 (82) et NORRIS 1958 (67) .

Nous remercions Monsieur DENARIE de son aimable envoi de la souche M2011, Monsieur J. MOLLION qui nous a envoyés des nodules d'arachide du Sénégal et le Professeur BONNIER qui nous a fourni les souches T₃₅S, K₆₃S, K₆₄S, J₃S, J₄S, J₅S, J₆S, et J₇S.

La croissance des souches M5N1 et L2S est peu importante sur le milieu minimum R glucosé (fig 3).

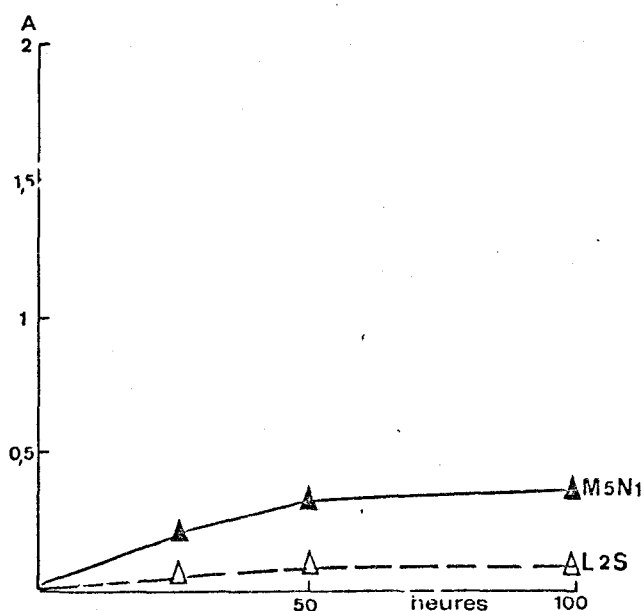


FIG. 3

croissance sur un milieu R glucosé de la souche M₅N₁ (trait plein) et de la souche L₂S (pointillé)

L'absorbance est lue à : 600 nm

En ce qui concerne la croissance sur milieu complet, DELATTRE avait proposé en 1971 (20) le milieu de LAIRD (50) qu'il avait modifié et appelé RC. Ce dernier milieu permet la croissance de toutes les espèces de Rhizobium à condition de les repiquer tous les mois. Néanmoins après de nombreux repiquages les colonies perdent leur caractère muqueux, cultivent difficilement et finissent par mourir.

Les fig 4A et 4B montrent que le milieu de WRIGHT (W) (94) permet à la fois une croissance convenable des souches L2S et M5N1. Par contre, le milieu RC ne permet que la croissance de la souche M5N1.

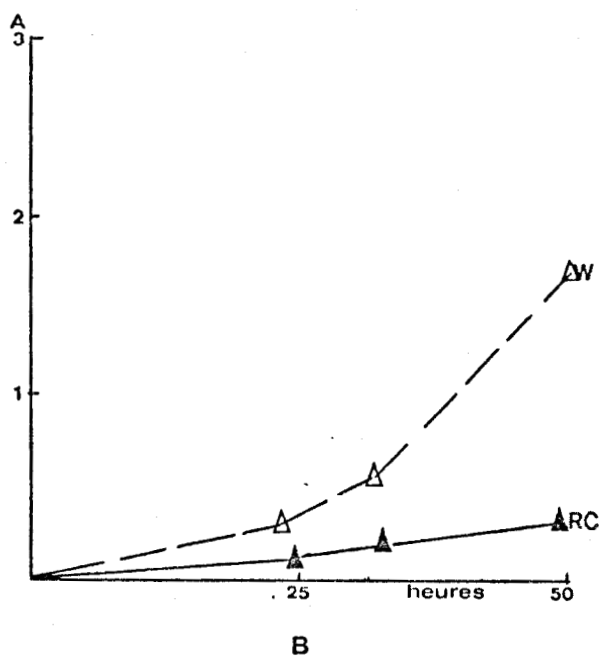
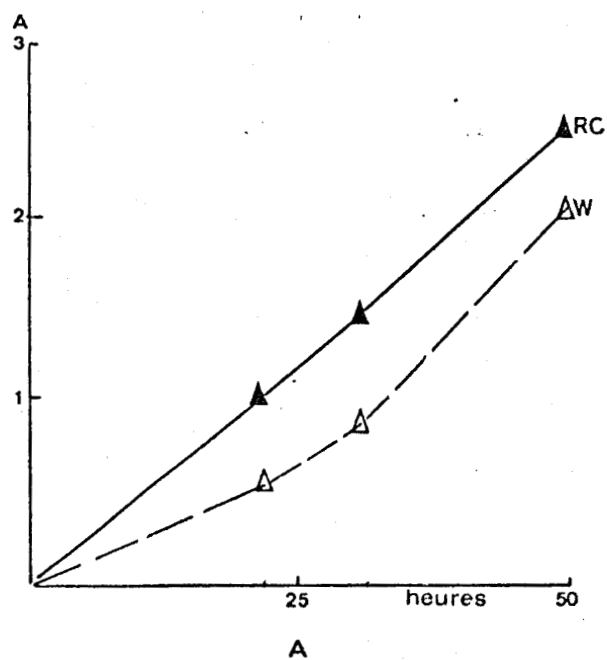


FIG. 4

croissances comparées sur 2 milieux complets différents :

RC (trait plein) et WRIGHT, W (en pointillé) de

A. souche M_5N_1

B. souche L_2S



La supériorité de ce milieu à l'extrait de levure fraîche avait déjà été remarqué par BONNIER et BRAKEL 1969 (10). Nous avons choisi le milieu de WRIGHT pour faire cultiver toutes les espèces de Rhizobium exceptées celles du groupe de la luzerne qui peuvent être cultivées invariablement sur les milieux RC et W.

3) Mise en conditions de non-prolifération

Des cellules cultivées en milieu complet sous agitation moyenne à 30°C pendant un temps donné sont lavées en milieu RN^- . Elles sont ensuite placées dans le même milieu additionné d'un ose en concentration finale donnée.

L'addition d'une partie aliquote d'ose radioactif permet d'obtenir des polyosides dosables par la technique de fractionnement sur Sephadex. Les conditions exactes de mise en non-prolifération sont étudiées en détail dans le dernier chapitre qui traite des modalités de synthèse des polyosides solubles.

4) Conservation des souches

Pour éviter l'apparition de mutants sélectionnés par des repiquages fréquents nous avons utilisé le milieu de WRIGHT pour conserver nos souches. Ces dernières survivent sur ce milieu sans être repiquées pendant des temps très longs voisins de 1 an. La conservation au froid à + 4°C bien que préférable n'est pas obligatoire (communication personnelle de BRAKEL).

Par ailleurs, les souches de Rhizobium exceptées celles du groupe de la luzerne (communication personnelle de Mme TERRIEN) sont maintenues en vie environ 1 an en pique profonde dans l'eau gélosée à 7,5 o/oo d'agar contenue dans des tubes scellés (communication per-

sonnelle de HEUMANN).

Les souches de Rh-meliloti durant des temps relativement longs dans du milieu RC glucosé ou mannité renfermant du Glycérol à 20 % comme antigel et placés à -15°C (communication personnelle de BECHET).

Enfin il est à noter que l'ensemble des souches de Rhizobium se conservent très bien lyophilisées dans du lait cystéiné à 2 %.

C - METHODES CHIMIQUES

Elles concernent la préparation des polyosides qui sont des substances solubles excrétées par les bactéries dans le milieu extérieur. Ces macromolécules doivent donc être séparées des cellules puis extraites du milieu acellulaire.

Dans un 2ème temps, nous étudierons les différentes techniques susceptibles de doser quantitativement ces polyosides dans un milieu contenant des bactéries ayant effectué une synthèse.

Dans un 3ème temps, les techniques d'analyse qualitative et quantitative des oses constituant ces polyosides seront rapportées.

1) Préparation des polyosides

Les cultures obtenues sont centrifugées à 16300 g pendant 30 mn. Le surnageant est centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant final est traité par 5 volumes d'éthanol glacé, additionné d'acétate de sodium. La précipitation se poursuit 12 heures à $+ 4^{\circ}\text{C}$. Le précipité est séché, repris dans l'eau distillée, dialysé 24 heures à $+ 4^{\circ}\text{C}$ contre l'eau distillée et lyophilisé. Le résidu est repris par l'eau distillée et à nouveau dialysé dans les mêmes conditions.

2) Techniques de dosage des polyosides

Pour étudier la synthèse des polyosides par des bactéries, il convient d'avoir une technique de dosage de ces macromolécules. Ces dernières peuvent être dosées à différents temps de la synthèse par pesée des poids secs des polyosides précipités et purifiés selon la technique précitée. Celle-ci est longue et l'on essaie le plus souvent de la remplacer par des techniques de dosages plus rapides qui permettent une estimation de la concentration en polyosides au cours de la synthèse.

a - Dosage par pesée de poids secs de polyosides

Ce procédé nécessite de travailler sur des volumes importants. Ces derniers débarrassés des bactéries par centrifugation doivent être traités par l'éthanol glacé. Les polyosides précipités doivent être purifiés. Ils sont extraits par défaut des macromolécules non entraînées au cours du relargage éthanolique.

b - Dosage sans précipitation préalable

Ils se font directement sur le surnageant des cultures sans précipitation préalable des polyosides. L'élimination du sucre non utilisé à la synthèse est le plus souvent obligatoire.

Le sucre restant peut être éliminé par dialyse contre l'eau distillée ou par rétention sur une colonne de Séphadex qui exclue les polyosides.

α) Dosage biochimique sur un surnageant dialysé de culture centrifugée

Les milieux de culture non inoculés (RC et W) tels quels ou dialysés donnent une interférence quantitativement importante avec le dosage à l'orcinol sulfurique (tableau **I**).

NATURE	Absorbance à 510 nm dosage à l'orcinol sulfurique
Polyosides 250 µg	0,15
Lactose 250 µg	0,28
Milieu RC sans sucre	0,175
Milieu RC sans sucre dialysé	0,11
Milieu de WRIGHT sans sucre	0,95
Milieu de WRIGHT sans sucre dialysé	0,34

TABLEAU I : Interférences des milieux RC et W dans le dosage à l'orcinol sulfurique

L'interférence est telle qu'un dosage biochimique sur le surnageant d'une culture dialysée n'aurait aucune signification.

Par contre les milieux utilisés pour placer les bactéries dans des conditions de non-prolifération ne renferment pas des extraits de levure. Ils ne donnent pas d'interférence avec les réactions colorées des oses. Le dosage peut être réalisé directement sur un surnageant dialysé de culture centrifugée. La dialyse n'est pas nécessaire si le sucre du milieu est le mannitol ; en effet celui-ci ne donne pas de réponse avec l'orcinol sulfurique (tableau II).

Concentration en mannitol en µg/ml	Absorbance à 510 nm dosage à l'orcinol
10	0,002
100	0
1000	0,009
10000	0,0013

TABLEAU II : Interférence du mannitol à différentes concentrations dans le dosage à l'orcinol sulfurique

En conclusion le dosage sur le surnageant dialysé d'une culture de germes centrifugée ne peut se faire que pour des polyosides synthétisés en conditions de non-prolifération. De plus cette technique n'est pas rapide car elle suppose la réalisation d'une dialyse pour éliminer le sucre non utilisé à la synthèse. Par ailleurs, le dosage biochimique direct sur le surnageant dialysé d'une culture excède environ de 10 à 20 % celui donné par la pesée de poids secs. La différence remarquée pourrait s'expliquer par 2 raisons. Tout d'abord la précipitation alcoolique n'entraîne pas tous les polyosides. Puis le dosage biochimique pourrait interférer avec des métabolites non polyosidiques inhérents à la croissance bactérienne.

Dans le but de palier à ces inconvénients et d'utiliser une technique plus rapide nous avons utilisé le fractionnement sur sephadex des polyosides et des sucres non utilisés à la synthèse.

β) Fractionnement sur sephadex

- principe

Le but de la technique est de fractionner sur sephadex le surnageant d'une suspension de germes centrifugés. La Gel filtration doit séparer les molécules à haut poids moléculaire (polyosides) et le sucre restant dans le milieu. Cette séparation a été effectuée sur G25 (1,5 x 60) en éluant au tampon phosphate (de composition ci-après) avec un débit de 65 ml/heure.

- solution de phosphate monosodique 0,2 M39 ml

- solution de phosphate disodique 0,2 M61 ml

- dosage des fractions polyosidiques et osidiques

Les deux fractions peuvent être dosées par le phénol sulfurique ou l'orcinol sulfurique. Mais le plus souvent nous avons détecté et mesuré les 2 fractions par le comptage à la radioactivité. En effet, nous réalisons des synthèses de polyosides en présence d'aliqots de sucres marqués (tableau III).

Fournisseur	Nature	Activité spécifique en $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$
CEA	Glucose ^{14}C , u	190
NEN	Mannitol ^{14}C 1	47,5
NEN	Fructose ^{14}C , u	188

TABLEAU III : Oses marqués utilisés pour la synthèse de polyosides de la souche M_5N_1

Les parties aliquotes radioactives des fractions ont été diluées à 20 % V/V dans le liquide scintillant de composition suivante :

PPO	8 g
POPOP	0,4 g
Naphtalène	65 g
Xylène	100 ml
2 Ethoxyéthanol	300 ml
Dicxane	300 ml

La radioactivité a été mesurée dans le spectromètre à scintillation liquide INTERTECHNIQUE ABAC SL 40.

Pour l'analyse qualitative et quantitative des oses de nos polyosides de Rhizobium nous avons très largement utilisé les techniques et mises au point décrites dans les "monographies du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille" de MONTREUIL et SPIK. (61)

Aussi nous citerons très brièvement les principales techniques utilisées pour la réalisation de ce travail.

3) Analyse des polyosides

Les polyosides en solution (2500 µg/ml) sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 2N à 100°C en tube scellé (61). Les sucres libérés sont dosés par la méthode de SOMOGYI modifiée par NELSON (5). Les résultats sont exprimés en pourcentages de sucres réducteurs. L'hydrolysat est passé sur colonne de duolite A 102 D forme acétate (61). Les oses neutres sont élués par l'eau distillée, les acides uroniques par l'acide formique à 5 % (61). Les effluents neutres et acides sont concentrés sous vide. L'analyse de la fraction oses neutres a été réalisée par chromatographie sur papier Whatman n°3 dans le système solvant de JERMYN et ISHERWOOD (61). Les acides uroniques sont séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice imprégné de phosphate disodique 0,5 M dans le système solvant de OVODOV (69) et par électrophorèse en tampon pH 9,2 de HAUGH et LARSEN (61) sous une tension de 7 V/cm pendant 13 h. Les chromatogrammes sont révélés par l'oxalate d'aniline (61). Le dosage des oses neutres totaux des polyosides est réalisé par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI, modifiée par RIMINGTON (61). Les acides uroniques sont dosés par la méthode au carbazol de DISHE (22). Ces dosages sont réalisés sur une solution aqueuse de polyosides (500 µg/ml).

Les compositions molaires en oses ont été établies en utilisant la technique de HUGHES et JEANLOZ (43). L'azote a été dosé par la technique de KJELDHAL, le phosphore par la technique de ALLEN (2) et le pyruvate par la technique de SLONEKER et ORENTAS (77).

Les polyosides sont produits en quantités très variables

selon les espèces de Rhizobium utilisées et les milieux de cultures employés pour la synthèse. Nous allons étudier les principales conditions d'obtention de ces macromolécules par des bactéries en croissance.

**Etude de la production de
polyosides solubles par des
souches de Rhizobium
en culture**

III ETUDE DE LA PRODUCTION DE POLYOSIDES SOLUBLES PAR DES SOUCHES DE RHIZOBIUM EN CULTURE

Le but de notre étude est de produire en grande quantité des polyosides solubles secrétés par les souches de Rhizobium des différents groupes d'inoculation. Le milieu de culture utilisé pour cette synthèse devait être simple et non empirique pour éviter toute interférence des constituants du milieu avec la composition des polyosides synthétisés. Nous rapporterons ici les études comparées de synthèses de polyosides sur différents milieux minima et complets. Ces derniers milieux pourraient être utilisés aux synthèses sans modifier la composition chimique des polyosides d'après AMARGER et coll 1967 (5) .

A - SYNTHESE DE POLYOSIDE PAR DES BACTERIES EN CROISSANCE SUR UN MILIEU MINIMUM

FERRY, BLACHERE et OBATON 1959 (29) affirment qu'il n'existe pas de milieu minimum qui permette la croissance des souches de Rhizobium des différents groupes d'inoculation. Les avis sont très partagés pour les exigences en facteurs de croissance. Les milieux minima mis au point conviennent surtout à la croissance des souches d'un seul groupe de Rhizobium. Ainsi DUDMAN 1964 (23) , FERRY, BLACHERE et OBATON 1959 (29) RIGAUD 1965 (72) ont mis au point des milieux pour la croissance des souches de Rh-meliloti. Ainsi nous avons vérifié que le milieu de FERRY et coll convenait effectivement à la croissance des souches de Rh-meliloti avec une production de polyosides variables (tableau IV).

Les quantités de polyosides obtenues étaient faibles le plus souvent et insuffisantes pour réaliser l'analyse biochimique. Par ailleurs ce milieu convient très mal à la croissance et à la synthèse de polyosides

pour les souches des autres groupes d'inoculation (tableau IV).

Souche	Groupe d'inoculation	Quantité de polyosides poids sec en $\mu\text{g/ml}$ de milieu de culture
M5N1	Luzerne	80
M3S	Luzerne	20
L2S	Pois	8
P3S	Haricot	0
T2S	Trèfle	0

TABLEAU IV : Quantités de polyosides (exprimées en poids sec : $\mu\text{g/ml}$ de milieu de culture) obtenues à l'aide de différentes espèces de *Rhizobium* cultivées sur le milieu de FERRY, BLACHERE et OBATON.

Nous avons également utilisé le milieu minimum R additionné de glucose et de mannitol qui est employé dans le laboratoire pour la croissance des souches de *Rh-meliloti* en génétique bactérienne.

Ce milieu ne permet pas la production de quantités convenables de polyosides par une souche de luzerne M5N1 (fig 5 & 6).

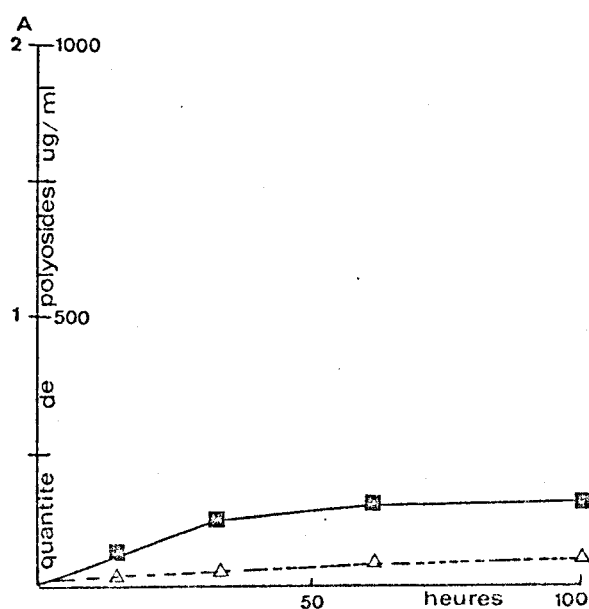


FIG. 5

Croissance (en trait plein) et synthèse de polyosides (en pointillé) par une souche de luzerne (M_{5N1}) sur milieu R. glucosé à 1 % (CF)

(CF) : Concentration finale

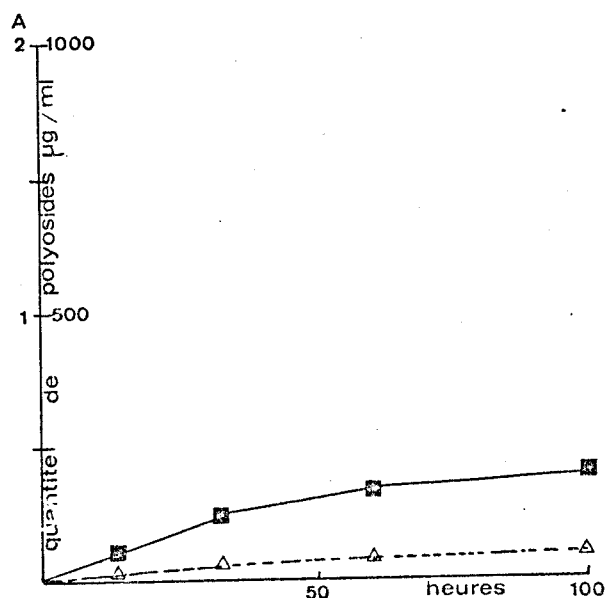


FIG. 6

Croissance (en trait plein) et synthèse de polyosides (en pointillé) par une souche de luzerne (M_5N_1) sur milieu R minité à 1 % (CF)

En fait la faible production de polyosides sur ce milieu est en relation avec la mauvaise croissance des souches de Rhizobium (D.O de 0,4 en milieu R et D.O de 2,5 en milieu RC). En effet sur le milieu R, on obtient beaucoup moins de cellules capables de réaliser la synthèse de polyosides (fig 5 et 6).

Nous avons, pour notre travail de production de polyosides, abandonné l'utilisation de milieux minima. Nous avons cherché à utiliser des milieux plus complexes pour permettre à la fois la croissance et la synthèse des polyosides par l'ensemble des souches de différentes espèces.

B - SYNTHESE DE POLYOSIDES PAR DES BACTERIES EN CROISSANCE SUR DES MILIEUX COMPLETS A L'EXTRAIT DE LEVURE

Nous avons vu précédemment que la conservation des souches et la pérennité de leur caractère muqueux était réalisé sur le milieu de WRIGHT à l'extrait de levure fraîche. Ce milieu est peu pratique. Fastidieux de par sa fabrication il est sujet à la non reproductivité selon les lots de levure fraîche utilisés. Aussi dans un premier temps avons-nous essayé de réaliser nos synthèses dans des milieux RC.

a - Synthèse en milieu RC

Le milieu RC mannité convient à la croissance et à la synthèse de polyosides par la souche M5N1 (fig 7).

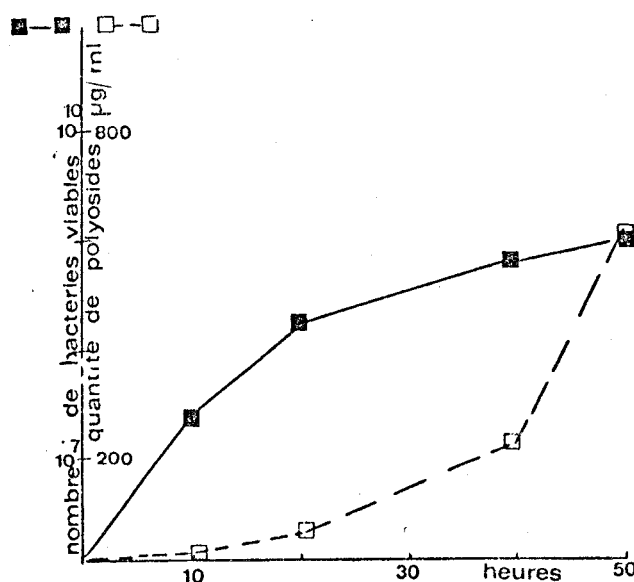


FIG. 7

Croissance (en trait plein) et synthèse de polyosides (en pointillé) par une souche de *luzerne* (M_5N_1) sur le milieu RC mannité à 1 % (CF)

Par contre une souche de pois (L2S) y cultive mal et produit peu de polyosides (fig 8).

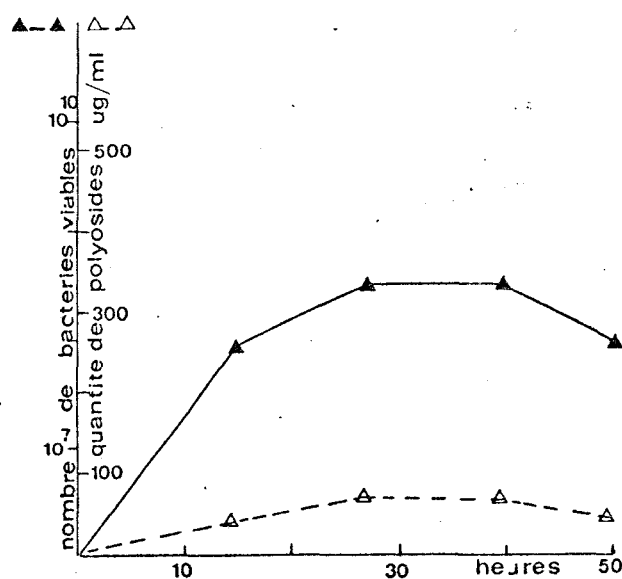


FIG. 8

Croissance (en trait plein) et synthèse de polyosides (en pointillé) par une souche de pois (L₂S) sur le milieu RC mannité à 1 % (CF)

La majorité des souches utilisées se comporte comme la souche L2S et fournit peu de polyosides sur le milieu RC mannité. Nous avons étudié la synthèse de ces macromolécules par des souches de Rhizobium cultivant sur le milieu de WRIGHT à l'extrait de levure fraîche.

b - Synthèse en milieu de WRIGHT

Ce milieu permet à la fois la croissance et la synthèse des polysides pour les souches L2S et M5N1 (fig 9 et 10).

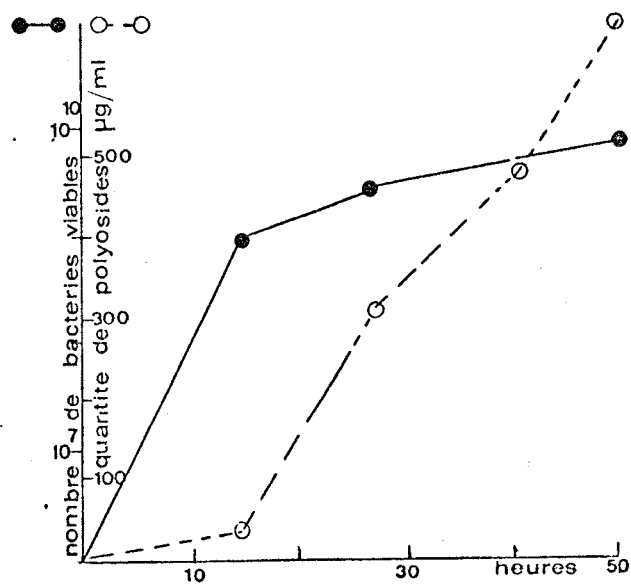


FIG. 9

Croissance (en trait plein) et synthèse de polysides (en pointillé) par une souche de pois (L₂S) sur le milieu de WRIGHT (W)

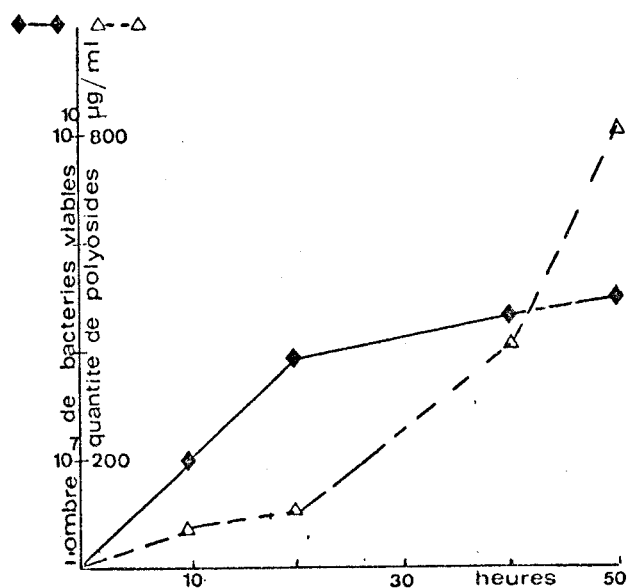


FIG. 10

Croissance (en trait plein) et synthèse de polysides (en pointillé) par une souche de luzerne (M₅N₁) sur le milieu de WRIGHT (W)



Nous avons choisi le milieu de WRIGHT qui permet des synthèses convenables de polysides bien que variables selon les souches (tableau v).

	Groupe d'inoculation	Quantité de polysides poids secs en µg/ml de milieu de culture
J3S	Soja	0
J4S	Soja	0
J5S	Soja	0
J6S	Soja	0
J7S	Soja	0
K62S	Lupin	800
K63S	Lupin	0
K64S	Lupin	0
L1S	Pois	700
L2S	Pois	560
L3S	Pois	715
L4S	Pois	890
L21S	Pois	1400
M2S	Luzerne	165
M3S	Luzerne	200
M5N1	Luzerne	1650
M11S	Luzerne	65
M12S	Luzerne	100
M2011	Luzerne	900
P2S	Haricot	50
P3S	Haricot	950
P7S	Haricot	670
P8S	Haricot	1000
T2S	Trèfle	450
T3S	Trèfle	430
T35S	Trèfle	220
V21S	Cowpea-Group	30
V39S	Cowpea-Group	0
V40S	Cowpea-Group	0



TABLEAU V : Quantités de polysides produites par des souches de Rhizobium des différentes espèces cultivées sur le milieu de WRIGHT (W)

Le milieu de WRIGHT devait posséder des facteurs de croissance que ne possédait pas le milieu RC. Ce dernier est exempt de calcium et de sodium. DELATTRE avait montré que ces facteurs n'influençaient en rien la croissance des souches de *Rhizobium*. Nous avons donc recherché les constituants supplémentaires que pourrait posséder l'extrait de levure fraîche par rapport à l'extrait de levure sec commercialisé.

La souche L2S semble mieux cultiver et produire plus de polyosides sur un milieu RC solide additionné de l'une quelconque des vitamines de la série B suivantes (thiamine, vit. B6, vit. B12). Par contre l'addition de la vit. B2 semble défavorable à la synthèse de polyosides. Les vitamines ont été ajoutées aux concentrations finales de 25 µg et 50 µg/ml.

Néanmoins, la production de mucus n'égale jamais celle observée sur le milieu de WRIGHT.

On peut penser que l'extrait de levure fraîche apporte des facteurs de croissance telles les vitamines de la série B en quantités excédentaires. Mais aussi d'après FERRY, BLACHERE et OBATON (29) des substrats carbonés et azotés.

En effet les auteurs observent une croissance importante des souches de *Rhizobium* sur un milieu où l'extrait de levure fraîche est utilisée seule sans substrat carboné.

C - CONDITIONS DE SYNTHÈSE

Dans le cas des bactéries proliférantes la synthèse de polyosides est corrélative d'une bonne croissance (fig 9 et 10). Nous avons recherché des conditions de synthèse standard de façon à obtenir une production relativement importante de polyosides par l'ensemble de nos

souches. Les synthèses ont donc été réalisées dans le milieu de WRIGHT inoculé à raison de 10^7 bactéries/ml provenant d'une préculture de 3 jours. L'incubation se fait à 30° en agitation moyenne.

En effet les souches de Rhizobium ont une température optimale de croissance entre 28° et 30° . Seules les souches de Rh-meliloti peuvent cultiver à 37° et les souches de Rh-trifolii ne croissent plus entre 31° et 32° (20). Enfin, DELATTRE (20) observe une mauvaise croissance des souches cultivées sans agitation.

Les productions de polyosides que nous avons réalisées en milieu complet n'avaient pas la prétention d'être optimales. Ainsi les modalités de la synthèse ont été étudiées plus en détail dans le chapitre V en utilisant des bactéries non proliférantes.

Composition chimique des polyosides solubles

IV COMPOSITION CHIMIQUE DES POLYOSIDES SOLUBLES

La préparation des polyosides et l'étude de leur pureté sont décrites dans un premier temps. La composition chimique est étudiée des points de vue centésimale et molaire. Enfin, la présence du mannose dans les polyosides est contestée. Cet ose pourrait en effet provenir de certains composants des milieux de culture utilisés à la synthèse des polyosides par les souches de Rhizobium.

A - PREPARATION DES POLYOSIDES

Pour les souches des groupes de la luzerne, du pois, du haricot, du trèfle et deux souches de Rh-lupini et du "Cowpea-Group", les polyosides obtenus ont été précipités à l'éthanol glacé additionné d'acétate de sodium. Nous n'avons étudié que peu de souches du groupe du lupin et du "Cowpea-Group" et aucune du groupe du soja. En effet ces souches (K63S, K64S, V39S, V40S, J3S, J4S, J5S, J6S, J7S) produisent des polyosides qui adhèrent aux structures pariétales des cellules. La centrifugation des cultures de ces souches permet de séparer un surnageant limpide exempt de bactéries et un culot hétérogène (fig 11).

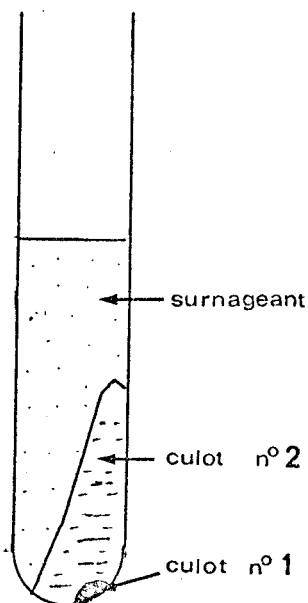


FIG. 11

Aspect d'une culture de *Rh. japonicum*
après centrifugation à 16300 g pendant
30 mn.

Le surnageant, rarement visqueux, est dépourvu de polyosides solubles précipitables à l'éthanol glacé.

Le culot est composé de 2 parties distinctes. Tout d'abord, un culot n°1 qui sédimente au fond du pot à centrifuger et qui est constitué de petites bactéries coccoïdes à bacillaires. Puis un culot n°2 visqueux qui surnage, sédimente mal et se remet très vite en suspension. Ce second culot est formé de bactéries plus grandes noyées dans une structure gélatineuse qui pourrait faire songer à des polyosides.

La coloration à l'encre de chine de ces cellules met en évidence des structures analogues à des capsules. La séparation des cellules et de la substance visqueuse est difficile. L'utilisation de procédés drastiques (l'alcali diluée, eau bouillante (84)) qui risquent de contaminer les polyosides extraits par des constituants cellulaires pariétaux s'est révélée ici inefficace.

Par ailleurs nous avons voulu étudier les polyosides préparés dans les mêmes conditions dans un but de standardisation. Nous avons donc étudié principalement les polyosides des souches de Rhizobium à croissance rapide (pois, trèfle, luzerne et haricot). Néanmoins, les polyosides solubles d'une souche de lupin (K62S) et d'une souche de "Cowpea-Group" (V21S) ont pu être précipités à l'éthanol et étudiés.

B - PURETE DES POLYOSIDES

Les polyosides préparés selon la technique précitée renferment environ 1 % d'azote et 1 à 2 % de phosphate. Le faible taux d'azote ne nécessite pas de déprotéinisation de SEVAG (76) et le spectre en UV (fig 12) de solutions aqueuses de polyosides de 10 000 $\mu\text{g/ml}$ est exempt de pic de protéines à 280 nm et de pic d'acides nucléiques à 260 nm.

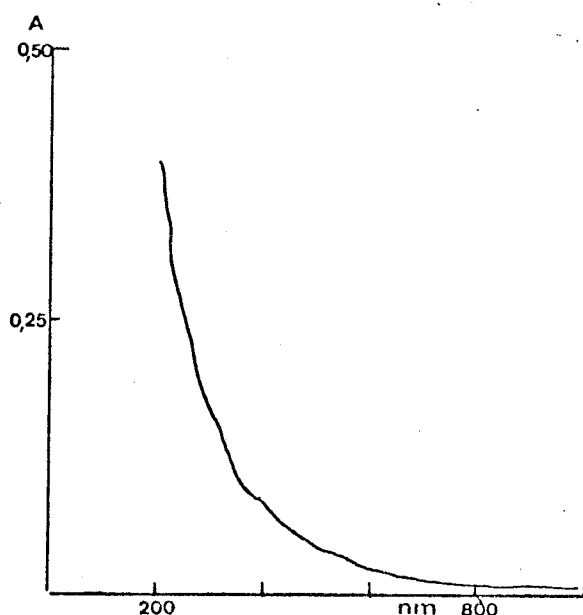


FIG. 12

spectre d'absorbance d'une solution aqueuse de polyosides à 10000 $\mu\text{g/ml}$ de 200 nm à 800 nm

C - COMPOSITION CENTESIMALE DES POLYOSIDES

Les polyosides de Rhizobium renferment essentiellement des oses neutres et le plus souvent des acides uroniques. Ils sont exempts d'acides sialiques et d'osamines.

Le pyruvate est en faible quantité (1 à 4 %).

L'établissement des spectres d'absorbance de 350 à 625 nm de solutions de polyosides traitées par le carbazol sulfurique permet de déceler la présence d'acides uroniques quand ils sont en quantité relativement importante et d'évaluer leurs proportions par rapport aux oses neutres. On constate sur la fig 13 que l'on trouve le pic caractéristique des acides uroniques à 530 nm sur les spectres des polyosides synthétisés par les différents groupes de Rhizobium à l'exception de ceux formés par des souches de Rh-meliloti (tableau VI).

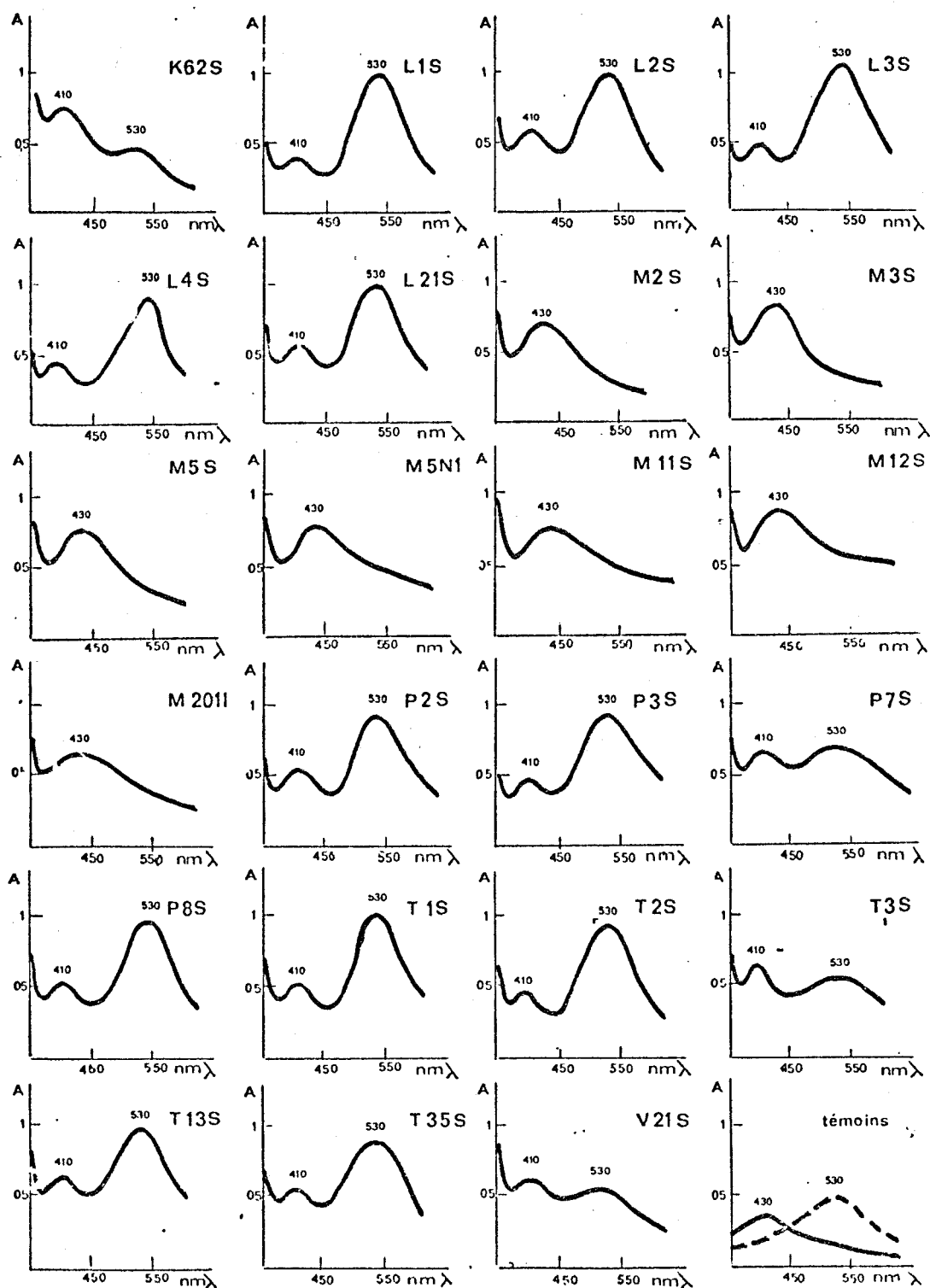


FIG. 13.

spectres d'absorbance de 350 nm à 650 nm réalisés sur des solutions aqueuses de polyosides (500 µg/ml) traitées par le carbazol sulfurique



Groupes d'inoculation	K lupin	L pois	M luzerne	P haricot	T trèfle	V arachide
Acides Uroniques	+	+	-	+	+	+

TABLEAU VI : Présence d'acide uronique dans les polyosides des différentes espèces de Rhizobium

Les polyosides des différentes espèces renferment 8 à 23 % d'acides uroniques sauf ceux des souches des groupes du lupin (4 %), du "Cowpea-Group" (7 %) et de la luzerne qui en sont pratiquement dépourvus (0 à 2 %). Les oses neutres représentent 46 à 80 % des polyosides exceptés pour le groupe de la luzerne qui en renferment sensiblement 100 %.

Contrairement à HEPER 1972 (39) et ZEVEHUIZEN 1973(96) , les techniques que nous avons utilisées (77) n'ont abouti qu'à la mise en évidence de pyruvate en faibles proportions (1 à 4 %). Nous avons vérifié que les conditions d'hydrolyse ne détruisaient pas le pyruvate ajouté en tant que témoin interne à des polyosides de Rhizobium.

D - COMPOSITION MOLAIRE

1) Hydrolyse

Les conditions d'hydrolyse des polyosides ont été établies en réalisant des cinétiques de libération des oses. Ils sont dosés en pour cent des sucres réducteurs. Le temps d'hydrolyse optimum est variable selon les polyosides. On voit sur la fig 14A que la quantité d'oses libérés d'un polyoside T3S n'augmente plus après 2 heures. Par contre, on remarque un maximum de libération à partir de 1h 30 pour une souche de luzerne (M5N1) (fig14 B) et à partir de 30 mn pour une souche

d'arachide V21S (fig 14C).

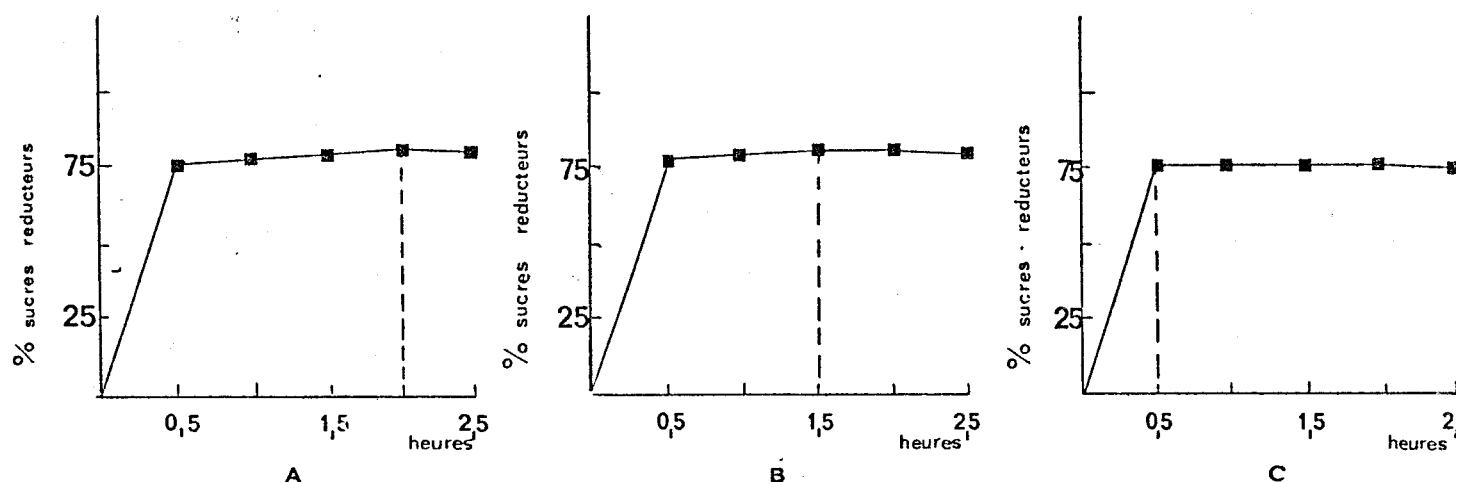


FIG. 14

Cinétique d'hydrolyse par HCL 2 N des polyosides de :

- A souche de trèfle (T_3S)
- B souche de luzerne (M_5N_1)
- C souche d'arachide (V21S)

Malgré des maxima de libération d'oses à partir de temps variables, le taux d'oses libres ne diminue pas de façon appréciable jusqu'à 2 heures, ce qui correspond au domaine de stabilité des oses conjugués ou libres (61). Nous avons donc choisi un temps d'hydrolyse de 2 heures pour mettre en évidence les oses neutres de tous les polyosides. Par contre, l'acide uronique, beaucoup moins stable dès sa libération, a été mis en évidence après hydrolyse d'une heure.

2) Identification et dosage des oses

a - Oses neutres

Les oses neutres sont constitués en moyenne de glucose (70 %), galactose (20 %) et mannose (10 %) pour tous les groupes d'inoculation sauf pour une souche du "Cowpea-Group" où l'on trouve du rhamnose

(14 %). Les oses neutres de cette souche ont leurs proportions d'oses inversées en ce qui concerne le glucose (20 %) et le galactose (58 %). Par contre, le taux de mannose est sensiblement le même (tableau VII). (16)

Souches	Oses Neutres	Acide uronique	% glucose	% galactose	% mannose	% rhamnose
K62S	96	4	73	19	8	-
L1S	46	23	69	21	10	-
L2S	80	20	68	20	10	-
L3S	60	23	72	17	11	-
L4S	53	20	72	18	10	-
L21S	71	20	80	16	4	-
M2S	84	2	75	15	10	-
M3S	97	2	75	14	11	-
M5S	100	0	80	11	9	-
M5N1	100	0	74	16	10	-
M11S	96	1	72	15	13	-
M12S	99	2	75	15	10	-
M2011	80	2	44	30	26	-
T1S	60	21	72	18	10	-
T2S	50	20	67	22	11	-
T3S	70	8	68	21	11	-
T13S	78	20	70	21	9	-
T35S	70	20	67	21	12	-
P2S	60	19	70	19	11	-
P3S	65	18	71	19	10	-
P7S	75	14	65	18	17	-
P8S	61	22	44	33	22	-
V21S	75	7	20	58	8	14

TABLEAU VII : Dosage des polysides de Rhizobium des différents groupes d'inoculation
 Dosage des oses Neutres: totaux par l'orcinol sulfurique, des acides uroniques
 par le carbazolsulfurique et des oses libérés après hydrolyse, séparés par
 chromatographie par la technique de HUGHES et JEANLOZ.

b - Les acides uroniques

L'identification par électrophorèse et chromatographie en couche mince montre qu'il s'agit d'acide glucuronique.

E - ETUDE DE LA REALITE DE LA PRESENCE DU MANNOSE DANS LES POLYOSIDES.

Afin d'éviter une éventuelle interférence de la composition du milieu de WRIGHT sur la structure primaire des polysides, nous avons réalisé une synthèse de ces macromolécules par des bactéries non proliférantes. Nous avons obtenu, dans ce milieu dépourvu d'azote, des synthèses beaucoup plus importantes que par culture sur milieu minimum et comparables à celles obtenues sur milieu complet à l'extrait de levure fraîche.

Les polysides synthétisés dans ces conditions par une souche de luzerne (M5N1) sont exempts de mannose et renferment 80 % de glucose et 20 % de galactose. (16)

La présence de mannose dans les polysides synthétisés par des bactéries proliférantes pourrait provenir du milieu de WRIGHT et plus spécialement de l'extrait de levure fraîche que nous avons analysé. En effet, celui-ci est exempt de mannose libre mais renferme des mannanes libérés lors de l'autoclavage des levures à pH 7 (70) .

Nous avons abordé ce problème de la façon suivante :

L'extrait de levure fraîche est hydrolysé par HCl 2 N pendant 2 heures à 100°C puis dialysé contre l'eau distillée. Le dialysat est purifié sur colonne de Duolite A 102 D forme acétate et l'effluent neutre est chromatographié sur papier Whatman n°3 dans les mêmes conditions que les oses neutres. La chromatographie révèle la présence d'une tache très importante de mannose.

Néanmoins, les mannanes de l'extrait de levure fraîche ne

précipitent pas dans les conditions de préparation des polyosides. Il faudrait donc admettre comme HUMPHREY 1974 (46) que ces mannanes seraient entraînés au cours de la précipitation alcoolique des polyosides.

Dans ces conditions, on peut affirmer que les bactéries non proliférantes synthétisent des polyosides exempts de mannose, par contre il est impossible de dire si dans un milieu contenant des mannanes le Rhizobium n'est pas capable d'incorporer le mannose dans ses polyosides.

F - DISCUSSION

Les techniques de relargage des polyosides par l'éthanol glacé et de purification par le traitement dialyse-lyophilisation répété 2 fois donnent des résultats convenables quant à la pureté du produit préparé. Ce dernier en effet ne contient que des traces d'azote et de phosphate (voisines de 1 %). Nos résultats sur la composition des polyosides synthétisés par des bactéries non proliférantes et l'analyse de l'extrait de levure fraîche prouve que cette dernière renferme des mannanes qui pourraient être entraînés avec les polyosides lors de la précipitation alcoolique. Cette hypothèse semble confirmée par les travaux de HUMPHREY et coll 1974 (46) qui, par des techniques différentes, aboutissent aux mêmes conclusions. Par ailleurs, HUMPHREY 1959 (44) , AMARGER et coll 1967 (5) et ZEVENHUIZEN 1973 (96) ne détectent pas de mannose dans des polyosides synthétisés en milieu minimum.

Néanmoins, on ne peut affirmer avec certitude que le mannose ne fait pas partie des polyosides synthétisés par des cellules cultivées sur un milieu à la levure. D'autant que BAILEY et GREENWOOD 1971 (6) et de LEIZAOLA et DEDONDER 1955 (21) ne trouvent pas du mannose dans tous les polyosides synthétisés sur milieu à la levure.

Les rapports glucose/galactose sont sensiblement les mêmes pour les polyosides de toutes les souches, excepté pour la souche V21S où le rapport est inversé (58 % de galactose et 20 % de glucose).

On constate une grande uniformité en ce qui concerne les taux d'acide uronique (environ 20 %) des groupes du pois, du trèfle et du haricot.

Les polyosides des groupes du lupin et du "Cowpea-Group" ferment très peu d'acide uronique (4 % pour K62S et 7 % pour V21S) et ceux du groupe de la luzerne en sont pratiquement exempts (0 à 2 %). Le fait que nous ayons étudié peu de souches du groupe du lupin et du "Cowpea-Group" et aucune du groupe du soja est lié à la rareté de la synthèse des polyosides libres dans le milieu de culture. Dans ce cas, les polymères synthétisés adhèrent aux structures pariétales de la cellule bactérienne (36). L'ensemble de ces résultats nous autorise à diviser les souches de Rhizobium étudiées en deux catégories :

1) tout d'abord des souches à croissance rapide (groupes du pois, du haricot et du trèfle) synthétisant des polyosides en grande quantité. Ce dernier est constitué d'environ 60 à 70 % d'oses neutres avec une prédominance du glucose sur le galactose et d'environ 20 % d'acide glucuronique.

2) un ensemble constitué par les souches du groupe de la luzerne qui synthétisent des polyosides plus riches en oses neutres (environ 100 %) puisque pratiquement exempts d'acide glucuronique (0 à 2 %). Ceci est en accord avec les travaux d'AMARGER et coll 1967 (5).

Les rapports molaires glucose/galactose sont sensiblement identiques à ceux du premier groupe. Néanmoins, la différenciation des polyosides de Rhizobium phaseoli, leguminosarum et trifolii qui contien-

nent de l'acide glucuronique, de ceux de Rh-meliloti qui en contiennent très peu, confirme les données de ZEVENHUIZEN 1973 (96) en ce qui concerne ce constituant.

Par ailleurs, cette différenciation est en accord avec les résultats de GRAHAM 1963 et 1964 (34,35) qui avait utilisé des techniques de sérologie et de taxonomie numérique ainsi qu'ultérieurement la composition chimique des polyosides. Cet auteur caractérisait en plus un troisième groupe constitué par les souches de Rhizobium à croissance lente.

Nous n'avons étudié que peu de représentants de ce dernier groupe constitué de souches produisant un polyoside le plus souvent lié à la paroi, donc difficilement extractible, et peu comparable aux polyosides des autres groupes, lorsqu'on peut l'obtenir.

Ce polyoside est constitué de glucose et de galactose aux proportions parfois inversées par rapport aux deux premiers groupes, mais aussi de rhamnose (souche V21S). Ces polyosides liés semblent assez pauvres en acide uronique (4 % pour K62S et 7 % pour V21S).

Le petit nombre de souches étudiées et leur faible représentativité d'un ensemble aussi vaste que celui des Rhizobium à croissance lente ne nous autorise pas à tirer des conclusions pour ce groupe.

Néanmoins, on peut dire contrairement à CLAPP et DAVIS 1970 (15) que la composition des polyosides des souches de Rhizobium à croissance rapide peut être utilisée à des fins taxonomiques en différenciant le groupe de la luzerne des groupes du haricot, pois et trèfle. On pourrait penser par analogie qu'elle pourrait être utile pour la classification des espèces à croissance lente.

L'étude chimique des polyosides a permis de mieux connaître ces macromolécules secrétées par les souches de Rhizobium de différents groupes d'inoculation. Les modalités de leur synthèse ont été recherchées

à l'aide d'une souche de Rh-meliloti (M5N1). Nous avons choisi une souche de ce groupe pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les souches de Rh-meliloti ont une croissance rapide qui peut même s'effectuer à des températures d'incubation supérieures à 30° . Par ailleurs, la vérification de la symbiose "in vitro" est aisée pour les souches de ce groupe qui nodulent facilement la luzerne. La souche M5N1 a aussi été utilisée car elle a la propriété de produire des grandes quantités de polyosides. Enfin la souche M5N1 possède de nombreux mutants auxotrophes.

**Modalités de synthèse
des polyosides solubles
par des bacteries
non - proliférantes**

V MODALITES DE SYNTHÈSE DES POLYOSIDES SOLUBLES PAR DES BACTÉRIES NON-PROLIFÉRANTES

Dans ce chapitre les conditions de synthèse des polyosides solubles sont étudiées. Pour cette étude la souche M5N1 (mutant spontané de M5S) est choisie ; Elle produit des colonies blanches opaques qui la différencient de la souche M5S produisant des colonies translucides.

Tout le travail a été réalisé à l'aide de bactéries non-proliférantes, c'est-à-dire en absence de source d'azote leur permettant de se diviser.

Après avoir mis au point un procédé rapide de dosage des polyosides formés, nous avons étudié leur synthèse à partir du mannitol comme source de carbone. En effet, de nombreux auteurs préfèrent cet ose au glucose pour la croissance des Rhizobium (30,94). La souche M5N1 produit à la surface d'un milieu nutritif solide additionné de mannitol, des grosses colonies muqueuses. Par contre sur le même milieu additionné de glucose les colonies sont petites et non muqueuses. Ainsi tout d'abord, avons-nous étudié les conditions de synthèse des polyosides solubles à partir du mannitol.

Pour ce faire, l'état physiologique convenable des cellules a été étudié et les facteurs physico-chimiques optimaux ont été recherchés.

Puis l'étude du rôle qualitatif des oses dans la synthèse a été réalisée.

A - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE RAPIDE DE DOSAGE

Le dosage chimique des polyosides peut se faire directement sur le surnageant de suspensions de germes centrifugés. Néanmoins au préalable ce surnageant doit être débarrassé des oses non utilisés à la

synthèse. A cet effet la dialyse est une technique longue et délicate de part les contaminations microbiennes qui peuvent interférer avec les résultats. Par ailleurs il est difficile de contrôler l'efficacité de la dialyse.

Pour pallier à ces inconvénients les surnageants de suspensions de germes centrifugées sont fractionnés sur des gels de Séphadex. Cette technique doit permettre de recueillir les polyosides dans les fractions d'exclusion et les oses restants dans les fractions plus tardives. Ce procédé est sûr mais présente l'inconvénient d'une dilution de l'échantillon aliquote au sein des fractions. L'utilisation d'un traceur radioactif (ose ^{14}C) permet la détection des fractions osidiques.

a - Choix du Séphadex

Sur la figure 15 sont reportés les diagrammes d'élution de mélanges de polyosides de la souche M5N1 et de glucose ou de mannitol. Les dosages sont réalisés par le phénol sulfurique.

Nous avons choisi les Séphadex G25 qui en permettant une bonne séparation des polyosides et du glucose ou du mannitol, excluent à $\text{PM} \gg 5000$ en dextrans et permettent une élution identique des polyosides de début et de fin de synthèse. Les G25 par ailleurs sont d'un emploi facile et supportent des débits d'élution importants.

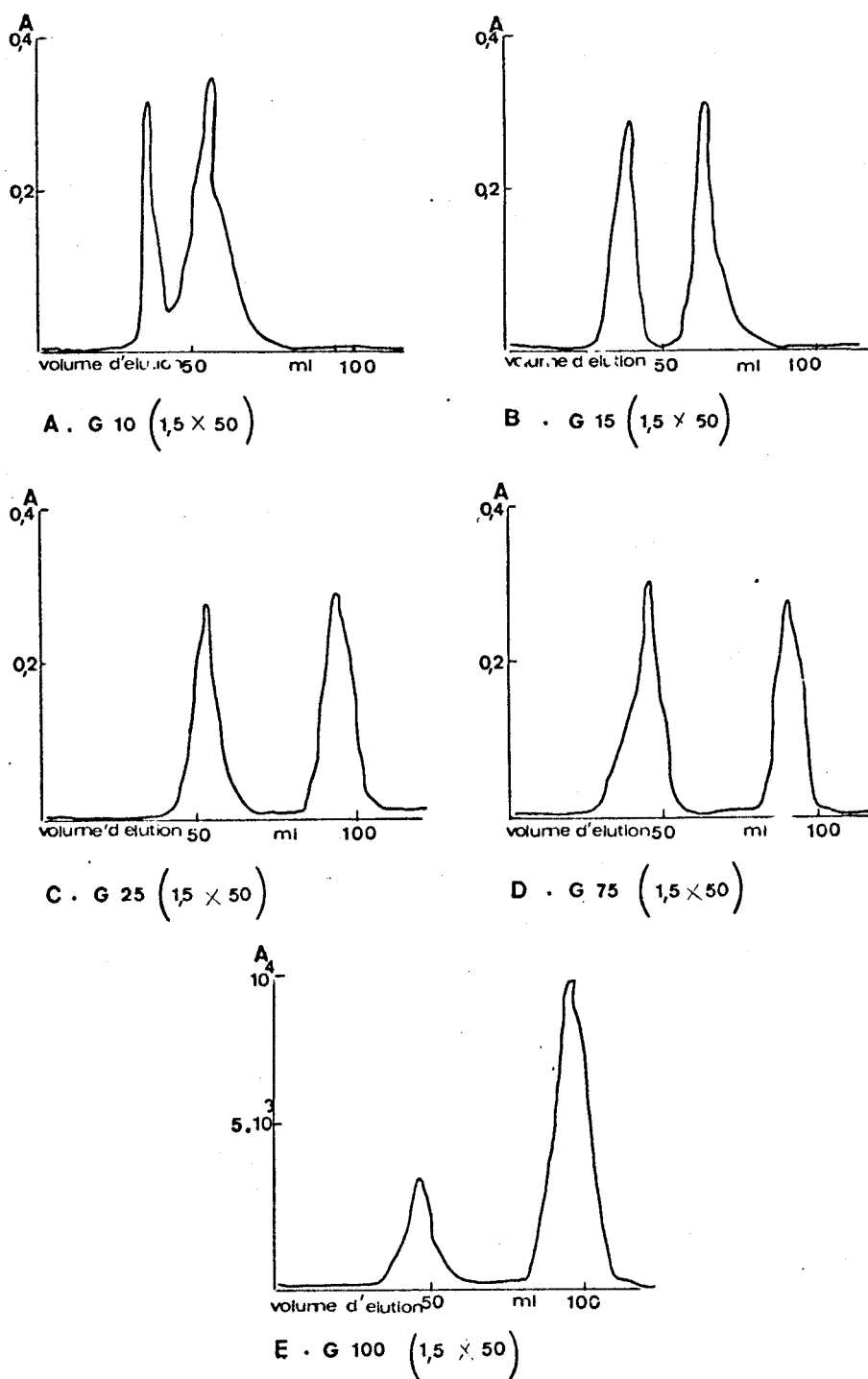


FIG. 15

fractionnement d'un mélange de polysides et de glucose ou de mannitol sur des Séphadex de même volume total (1,5 cm x 50 cm)

1° - dépôt de 500 µg de polysides et 500 µg de glucose sur les Séphadex G 10 (A) ; G 15 (B) ; G 25 (C) ; G 75 (D) ; Dosage au phénol sulfurique sur des fractions de 2 ml, lecture à 492 nm

2° - dépôt de mélange (0,1 µci) de polysides ^{14}C et mannitol ^{14}C sur Séphadex G 100 (E). Comptage de radioactivité sur des parties aliquotes appartenant à des fractions de 2 ml



b - Etude du fractionnement sur G₂₅

Afin de rendre plus rapide notre technique de dosage, nous avons effectué tous nos fractionnements avec un débit d'élution assez élevé (65 ml/h). En maintenant ce débit fixe nous avons essayé de réduire le V_0 de la G₂₅ et la figure 16 montre que la diminution de la taille moyenne des colonnes de Séphadex d'un diamètre intérieur de 15 mm aboutit à une séparation de plus en plus mauvaise des polyosides et du glucose.

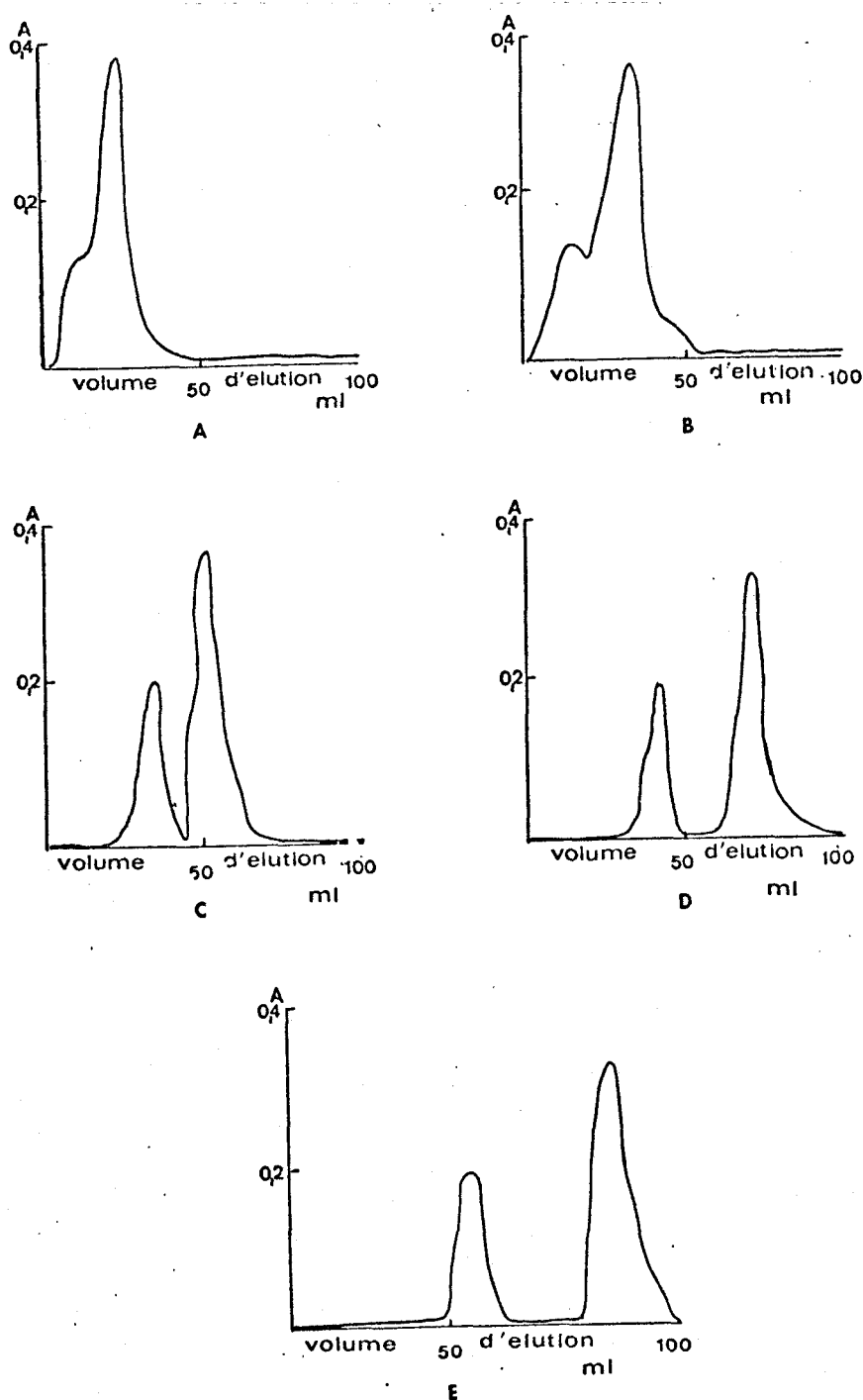


FIG. 16

fractionnement de mélange de 500 µg de polyosides et 500 µg de glucose sur G₂₅ en colonnes de $\varnothing$ 1,5 cm et de hauteurs de gel différentes

A, 16 cm ; B, 25 cm ; C, 30 cm ; D, 45 cm ; E, 60 cm.

Dosage au phénol sulfurique sur des parties aliquotes de 0,5 ml appartenant à des fractions de 2 ml

Le Séphadex G25 (1,5 x 60) assure une bonne séparation des 2 fractions osidiques. Cette taille de colonne ménage un volume mort de sécurité suffisamment grand entre les 2 fractions (fig 16).

c - Problème des sucres marqués ^{14}C

Le fractionnement de surnageants de suspensions de germes centrifugés renfermant des polyosides marqués au ^{14}C et du glucose ^{14}C révèle l'existence d'un artéfact. En effet le glucose ^{14}C seul fractionne en 2 pics, l'un à l'exclusion et l'autre avec un K_d normal du glucose (fig 17).

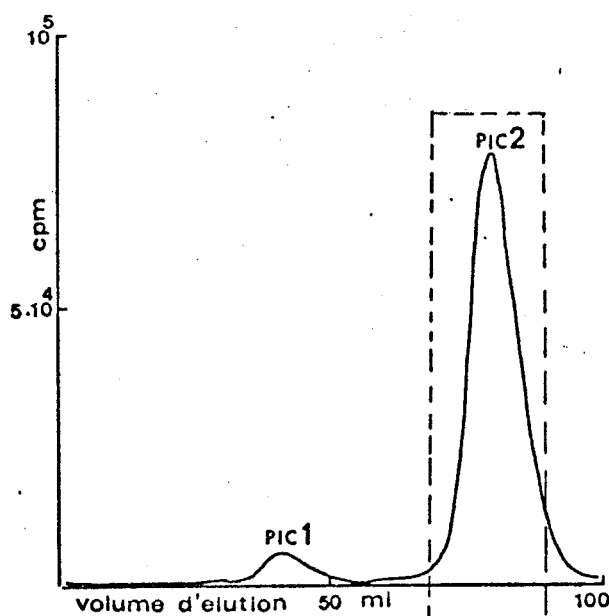


FIG. 17
fractionnement de 1,6 μCi de glucose ^{14}C
sur G_{25} (1,5 cm x 50 cm) élution par
l'eau distillée - mesure de la radioactivi-
té sur des parties aliquotes de 0,5 ml
appartenant à des fractions de 2 ml

Le pic 1 représente en moyenne 5 % du pic 2. Le fractionnement du pic 2 isolé redonne à nouveau 2 pics sur G_{25} (fig 18). Ceci exclue la possibilité d'une impureté dans le glucose ^{14}C ★

★ Nous remercions Monsieur DUFFAY à SACLAY qui nous a donné des précieux conseils pour le problème du glucose ^{14}C .

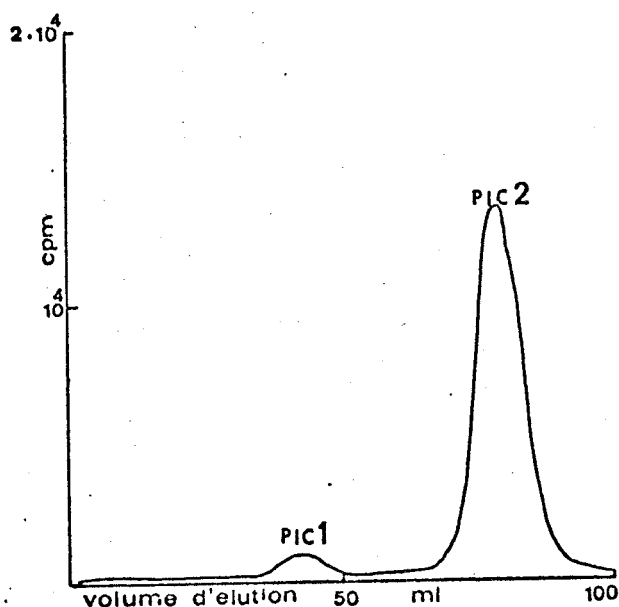


FIG. 18
fractionnement du pic 2 (fig. 17) sur G_{25}
(1,5 cm x 50 cm) - élution par l'eau
distillée - mesure de la radioactivité sur
des volumes de 0,5 ml appartenant à des
fractions de 2 ml

Deux hypothèses peuvent être émises :

1° le glucose ^{14}C pourrait s'adsorber sur des particules de Séphadex qui seraient relâchées par la colonne. Ces parties glucaniques vectrices de glucose ^{14}C auraient un $\text{PM} \geq 5000$ et seraient exclues sur G_{25} .

2° les molécules de glucose ^{14}C pourraient s'adsorber les unes aux autres pour former un pseudo-polymère exclu.

Dans les deux cas, il s'agirait d'un processus d'adsorption qui semblerait spécifique du glucose ^{14}C . En effet, le fractionnement simultané de glucose ^{14}C et de glucose froid en quantité suffisante pour permettre le dosage biochimique d'un éventuel artéfact ne met en évidence ce dernier que dans le cas du glucose ^{14}C (fig 19).

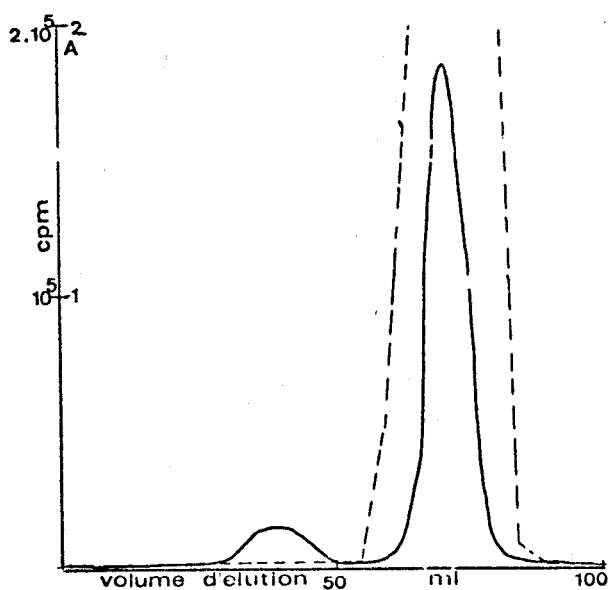


FIG. 19

fractionnement d'un mélange de 10 mg de glucose (en pointillé) et 5 μ Ci de glucose ^{14}C (en trait plein) sur G_{25} (1,5 cm x 50 cm) Dosage au phénol sulfurique et mesure de la radioactivité sur des parties aliquotes de 0,5 ml appartenant à des fractions de 2 ml.

L'élution par de l'eau distillée additionnée d'un anti-bactérien l'azide de sodium en concentration finale 0,2 % crée une légère force ionique et déplace le pic artéfact (pic 1) vers le pic 2 de glucose (fig 20).

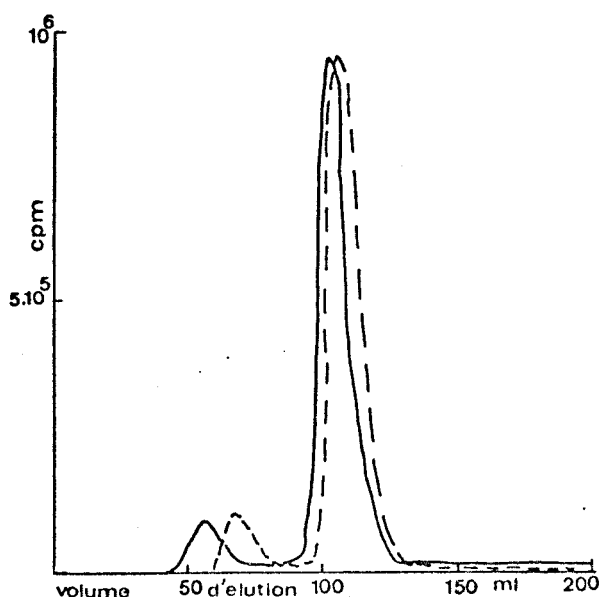


FIG. 20

*fractionnement de 50 μ Ci de glucose ^{14}C sur G_{25} (1,5 cm x 50 cm)
en trait plein : élution par l'eau distillée
en pointillé : élution par l'eau distillée additionnée d'azide de sodium à 0,02 % (CF) comptage de la radioactivité sur des parties aliquotes appartenant à des fractions de 2 ml*



Le pic artéfact disparaît en éluant avec un tampon phosphate pH 7 (fig 21).

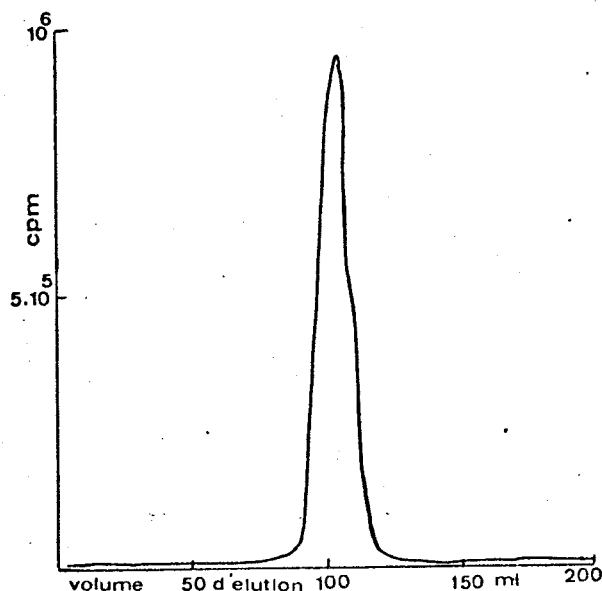


FIG. 21
fractionnement de 50 μCi de glucose ^{14}C
sur G_{25} (1,5 cm x 50 cm) : élution par
le tampon phosphate pH 7

Nous avons réalisé toute l'étude de cet artéfact sur le glucose ^{14}C mais les autres oses marqués au ^{14}C (fructose et mannitol) ont le même comportement sur Séphadex en élution par l'eau distillée. Le pic artéfact disparaît dans les mêmes conditions en éluant par le même tampon phosphate pH 7.

d - Standardisation de la technique

En tampon phosphate le fractionnement du surnageant d'une suspension de germes ayant réalisé une synthèse de polysides à partir d'un mélange glucose froid et aliquot de glucose ^{14}C donne le diagramme suivant (fig 22).

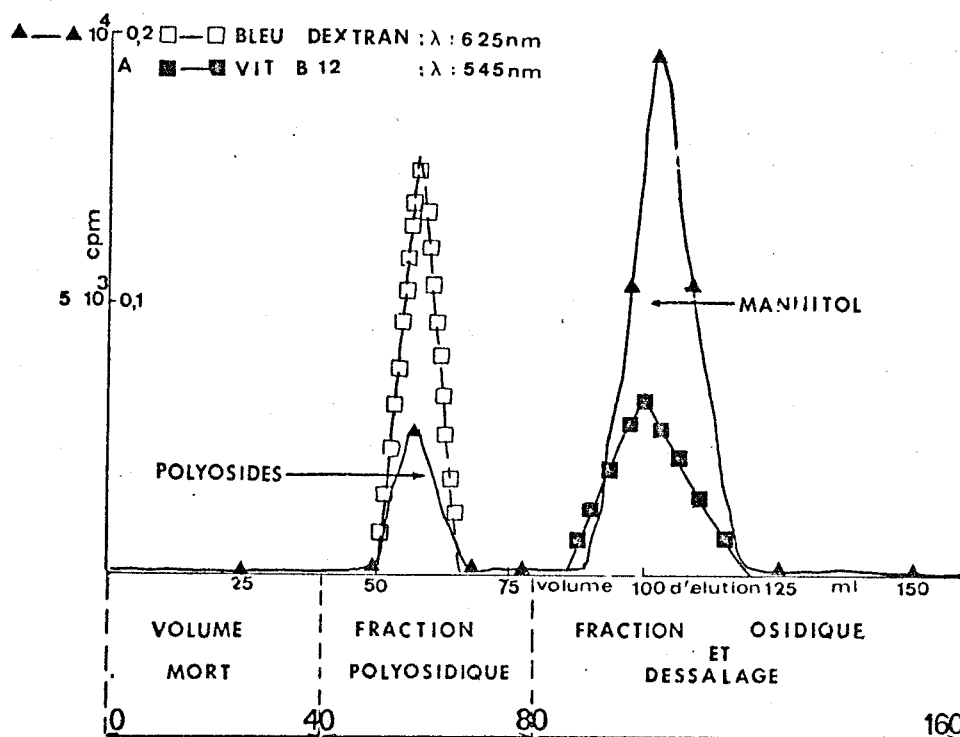


FIG. 22

fractionnement standard d'un mélange de polyside ^{14}C et mannitol ^{14}C ($0,1 \mu\text{Ci}$), de bleu dextran et de Vit. B_{12} sur G_{25} ($1,5 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$). Comptage de la radioactivité et mesure de l'absorbance à 625 nm (bleu dextran) et 545 nm (Vit. B_{12}) sur des parties aliquotes de $0,5 \text{ ml}$ appartenant à des fractions de 2 ml .

La vitamine B_{12} passe presque en même temps que le glucose et est élue de façon très légèrement antérieure. Nous avons donc introduit systématiquement la vit. B_{12} dans nos échantillons déposés sur G_{25} pour visualiser le fractionnement.

La systématisation du fractionnement a été réalisée comme suit :

1° le dépôt s'étale entre $0,2$ et 1 ml au maximum. Nous avons vérifié que ces variations quantitatives de l'échantillon n'avaient pas de répercussions sur l'étalement des 2 pics. $0,1 \text{ ml}$ de solution de vitamine B_{12} à $1000 \mu\text{g/ml}$ est ajouté en tant que témoin interne à l'échantillon.

2° l'élution est réalisée avec du tampon phosphate pH 7 avec un débit fixe de 65 ml/heure.

3° les 40 premiers ml représentent le volume mort et sont éliminés. On peut vérifier l'absence de composés osidiques dans cette fraction.

4° les 40 ml suivants correspondent à la fraction polyosidique et sont recueillis. Une partie aliquote de 2 ml est analysée en radioactivité.

5° enfin la fraction comprise entre 80 ml et 160 ml d'élution représente à la fois la récupération de la fraction osidique et le dessalage de la colonne. Le comptage de radioactivité est réalisé sur 2 ml.

La relation entre le nombre de cpm/ml et la quantité de polyosides en $\mu\text{g/ml}$ s'établit comme suit :

On calcule le nombre de cpm/ml dans la suspension bactérienne en tenant compte du coefficient de dilution dans le fractionnement. Puis on considère par approximation que les polyosides sont un polymère de n oses utilisés à la synthèse. Par ailleurs, on ne tient pas compte quantitativement de l'ose marqué au ^{14}C qui est en quantité négligeable par rapport à l'ose froid. Pour le calcul final on utilise la relation (nombre de cpm/ml d'ose radioactif correspond au nombre de $\mu\text{g/ml}$ d'ose froid).

Dans le but de réaliser des dosages en série, 12 colonnes de Séphadex G25 (1,5 x 60) sont connectées à une pompe péristaltique de 12 canaux. La colonne N°1 est reliée à un collecteur de fractions qui permet de réaliser un spectre d'élution témoin. Par ailleurs le collecteur peut programmer les volumes d'élution des 3 fractions (volume mort, polyosidique et osidique) pour les 11 colonnes restantes (n° 2 à n° 12) montées en parallèle. Dans les conditions de montage les volumes des fractions collectées simultanément sur les 12 colonnes sont identiques à

1 à 2 % près. (Fig. 23)

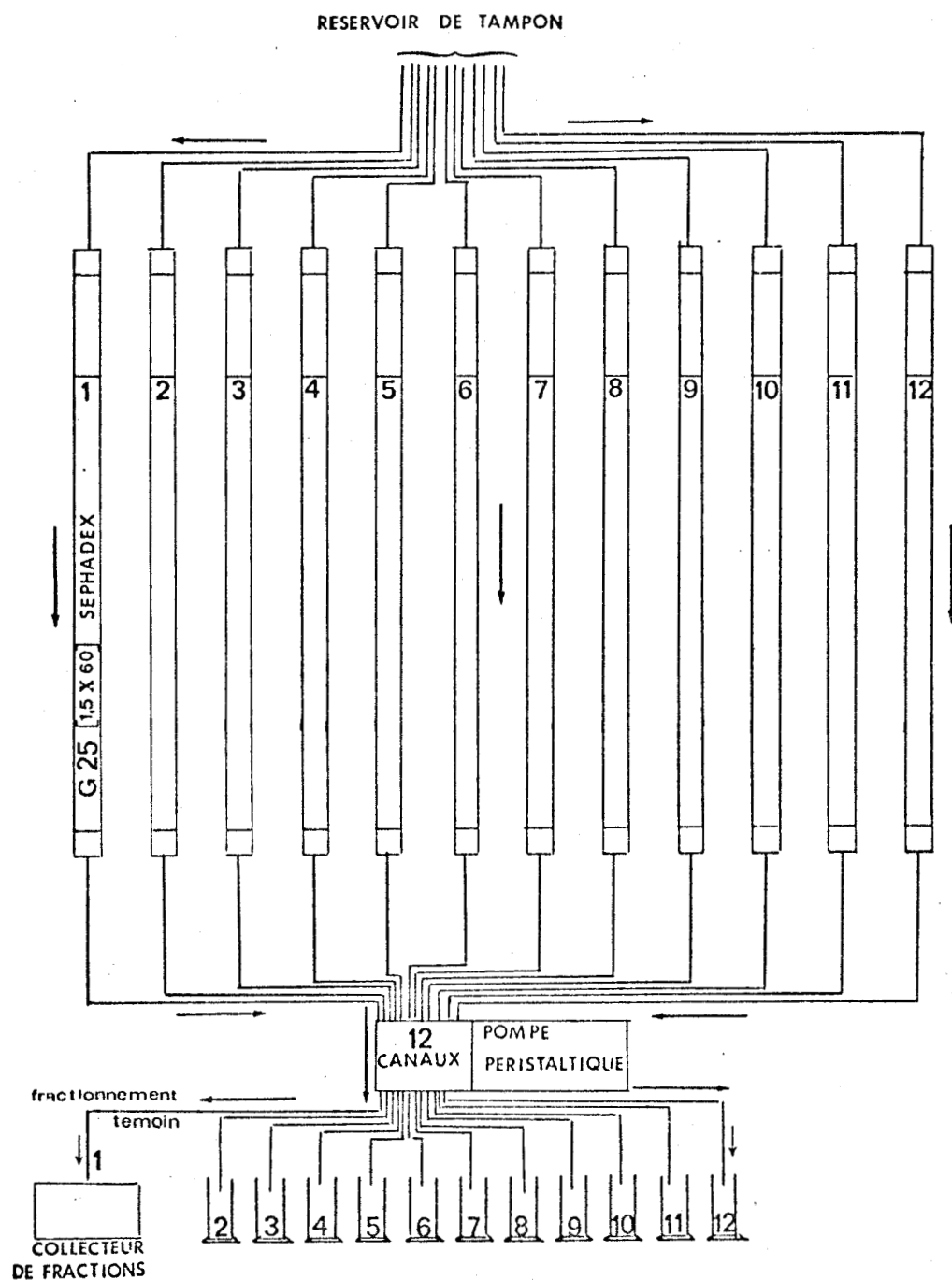


FIG. 23

schéma de multi-fractionnement sur 12 colonnes de Sephadex G_{25} (1,5 cm x 60 cm) montées en parallèle



e - Etude critique de la technique

Cette technique présente l'avantage d'être rapide. Elle permet de doser presque immédiatement les polyosides solubles secrétés par la souche M5N1 au cours d'une synthèse. Par ailleurs le dosage de la fraction osidique restante facilite l'établissement à tout moment de la synthèse, d'un bilan polyosides formés/oses résiduels. La comparaison de cette méthode de dosage avec celle réalisée par un dosage biochimique après dialyse met en évidence des différences quantitatives pour une même mesure (fig 24).

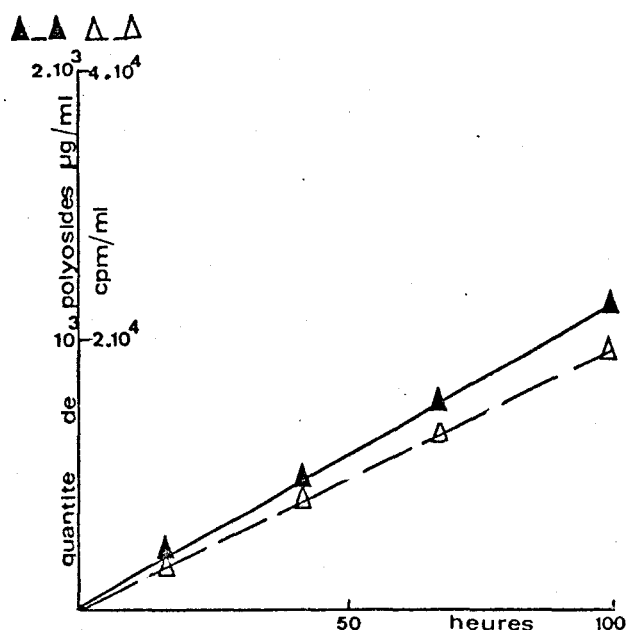


FIG. 24

comparaison de 2 techniques de dosage de polyosides en milieu RN⁺ marmité à 0,5 % (CF) additionné de glucose ¹⁴C à 0,1 µCi/ml (CF)
 en trait plein dosage par le phénol sulfurique
 en pointillé : dosage par la technique de radioactivité

Le dosage biochimique donne des valeurs de quantités de polyosides supérieures à celles données par le dosage par la radioactivité (fig 24).

On pourrait expliquer cela de la façon suivante : le dosage biochimique mesurerait non seulement les polyosides solubles secrétés dans le milieu mais aussi par interférence les métabolites y donnant une réponse.

Par ailleurs la technique de dosage par la radioactivité présente quelques inconvénients. Elle est sujette aux artéfacts par des

phénomènes d'adsorption des sucres marqués.

Le calcul de la quantité de polyosides dépend des coefficients de dilutions qui sont sujets aux erreurs mais aussi de l'approximation de la composition des polyosides comme étant des polymères de n oses utilisés à la synthèse.

Cette technique ne donne pas en fait la quantité réelle de polyosides solubles. Elle doit être utilisée pour des études comparatives qui permettent ainsi de déterminer des conditions favorables d'une synthèse.

Nous avons réalisé cette étude pour la souche M5N1 en utilisant à la fois la technique classique de dosage biochimique sur les surnageants dialysés de prélèvements centrifugés et la technique par la radioactivité.

Ont été successivement étudiées la détermination de l'état physiologique favorable à la synthèse, les facteurs physico-chimiques qui conditionnent le fonctionnement du complexe enzymatique de synthèse et enfin le rôle qualitatif des oses qui semblent utiliser des voies métaboliques parfois très différentes.

B - DETERMINATION DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE

La synthèse des polyosides pourrait varier en fonction de l'état physiologique des cellules lors de la mise en condition de non-prolifération.

Les cellules possèdent-elles toujours le stock enzymatique nécessaire à la synthèse quelque soient les conditions antérieures de croissance.

Par ailleurs, les cellules dans un état optimal à la synthèse peuvent-elles conserver cette aptitude pendant un temps donné dans des

conditions données.

La réponse à cette dernière question pourrait permettre de préparer des quantités importantes de cellules aptes à la synthèse ; et de pouvoir réaliser de nombreuses expériences avec les mêmes cellules convenablement conservées.

1) Conservation de la souche

Dans nos essais préliminaires, pour obtenir des cellules en croissance mises ensuite en non-prolifération, nous repiquions la souche M5N1 en milieux complets RC mannités liquides successifs. Nous avons remarqué une grande hétérogénéité des réussites des synthèses en cultures puis en non-prolifération. D'ailleurs, l'aptitude à la synthèse diminue avec le nombre de repiquages successifs en milieux liquides. Cela doit correspondre à une sélection progressive de bactéries non muqueuses.

Pour standardiser l'inoculation, la souche M5N1 a été conservée en milieu complet additionné de glycérol, à 20 % en concentration finale, comme antigél et maintenue à -15°C . La souche ainsi conservée cultive sans latence sur milieu liquide complet et permet des synthèses de polysides convenables et reproductibles.

Avant d'étudier les facteurs de synthèse de polysides nous avons vérifié que les conditions de non-prolifération dans lesquelles nous plaçons nos cellules étaient effectives ; c'est-à-dire incapables de se diviser.

2) Vérification de la non-prolifération

10^9 cellules/ml ayant cultivé dans du milieu RC mannité ont été lavées dans du milieu RN^- puis placées dans des conditions de non-prolifération dans le milieu RN^- additionné de mannitol à 1 % et

dans un milieu exempt de mannitol. Dans les deux cas nous avons vérifié par des numérations régulièrement effectuées dans le temps, le maintien du nombre sensiblement constant de germes.

Par ailleurs la synthèse de polyosides reste effectivement nulle dans le milieu RN^- sans mannitol mais est normale en présence de cet ose à la concentration finale de 1 % (fig 25).

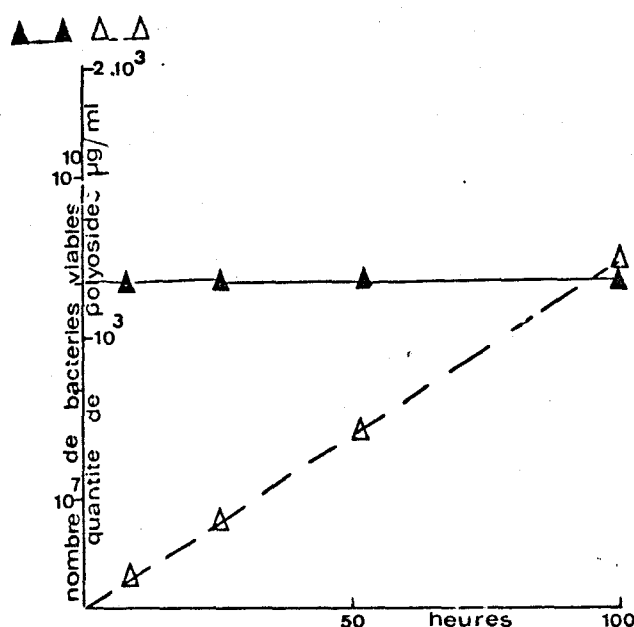


FIG. 25

vérification des conditions de non-prolifération de la souche M_5N_1 en milieu RN mannité à 1 % (CF)
 en trait plein : nombre de germes viables
 en pointillé : synthèse de polyosides

Dans ces conditions effectives de non-prolifération nous avons essayé de trouver un état physiologique optimal des cellules pour la synthèse.

3) Moment de la croissance

a - Principe

On étudie l'aptitude à la synthèse de polyosides en non-prolifération, à différents moments de la croissance, de la souche M5N1 en milieu RC mannité à 1 % en concentration finale. On réalise des prélèvements, en fonction du temps, pour lesquels

1° on mesure le nombre de germes viables et la production de polyosides

2° une partie des cellules en nombre constant est placée en non-prolifération. On contrôle alors dans le temps l'évolution de la synthèse de polyosides.

b - Expérience et résultats

La souche M5N1 est mise en culture dans du milieu RC mannité à 1 % (CF) inoculé de façon à avoir une concentration finale de 10^7 bactéries par ml. L'inoculation a lieu à 30°C en agitation moyenne. On peut voir sur la figure 26 l'évolution des paramètres de la croissance et de la synthèse de polyosides.

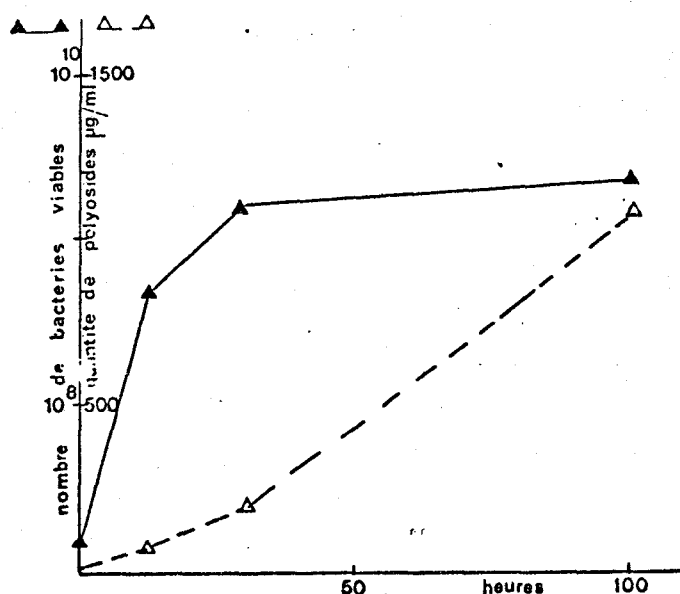


FIG. 26

croissance (en trait plein) et synthèse de polyosides (en pointillé) par la souche M_5N_1 sur milieu RC mannité à 1 %. Dosage des polyosides par détermination de poids secs.

Les cellules du premier prélèvement correspondant à 13 h de culture sont mises en non-prolifération, dans du milieu RN^- mannité à 1 % (CF), en concentration finale identique à celle des cellules en prolifération (7×10^8 bactéries/ml). Les cellules des deux autres prélèvements (30 h 30 et 102 h) sont placées en non-prolifération à la même concentration finale en germes que celle du premier prélèvement.

On voit sur la figure 27 que les cellules de M_5N_1 ont sensiblement la même capacité de synthèse de polyosides pour des temps de croissance très différents.

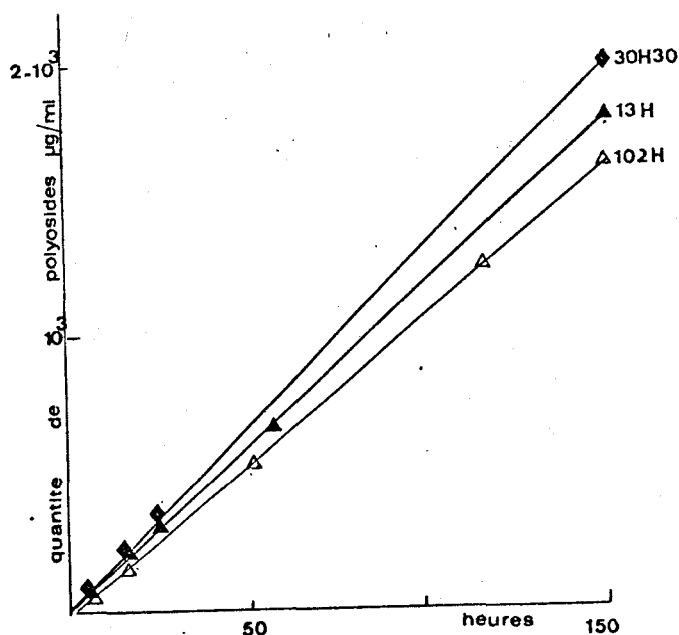


FIG. 27

synthèse de polyosides en RN⁻mannité à 1 % (CF) par des cellules de la souche M₅N₁ prélevées à 3 moments différents de la croissance sur RC mannité à 1 % (CF) (13 h, 30h 30 et 102 h) et placées en non-prolifération. Dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

Néanmoins des cellules jeunes ont été préférentiellement utilisées pour la mise en non-prolifération. Cela représente entre autres l'avantage de pouvoir séparer aisément par centrifugation les cellules d'un milieu de culture non visqueux, où la synthèse de polyosides est encore faible.

Pour toutes nos expériences réalisées en condition de non-prolifération, nous avons utilisé des cellules qui avaient cultivé pendant 20 heures (cela correspond à une densité optique de 1,00 et une concentration en germes de 10^9 bactéries/ml) sous agitation moyenne à 30°C.

4) Rôle des conditions de culture en milieu complet sur la synthèse en non-prolifération

Les colonies de la souche M5N1 sont peu muqueuses sur un milieu complet solide RC additionné de glucose à 1 % (CF). Les figures

26 et 28 indiquent que cette souche cultive aussi bien sur un milieu RC additionné de glucose que de mannitol. Par contre, le milieu glucosé est beaucoup moins favorable à la synthèse de polyosides (fig. 28).

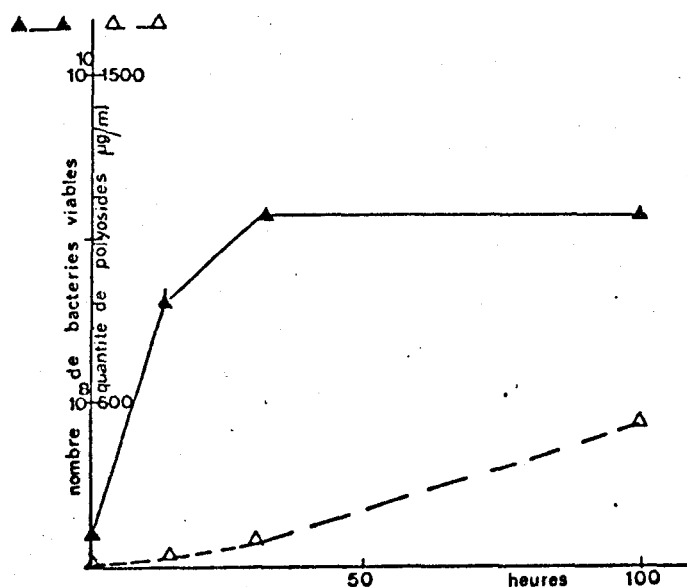


FIG. 28

croissance (en trait plein) et synthèse de polyosides (en pointillé) par la souche M_5N_1 sur un milieu RC glucosé à 1 % (CF). Dosage des polyosides par détermination de poids secs

On a recherché l'influence des conditions de cultures en milieu complet sur la synthèse des polyosides lors de la mise en non-prolifération. Pour cela l'aptitude à la synthèse de cellules de M5N1 cultivées sur un milieu RC glucosé à 1 % (CF) et prélevées à différents moments de la croissance (13h, 30h 30, 102h) a été étudiée. L'expérience a été conduite de la même façon que celle décrite précédemment. Les cellules de la souche M5N1 synthétisent sensiblement les mêmes quantités de polyosides aux différents moments de la croissance excepté pour le temps de 102h où le système enzymatique semble un peu moins actif (fig 29).

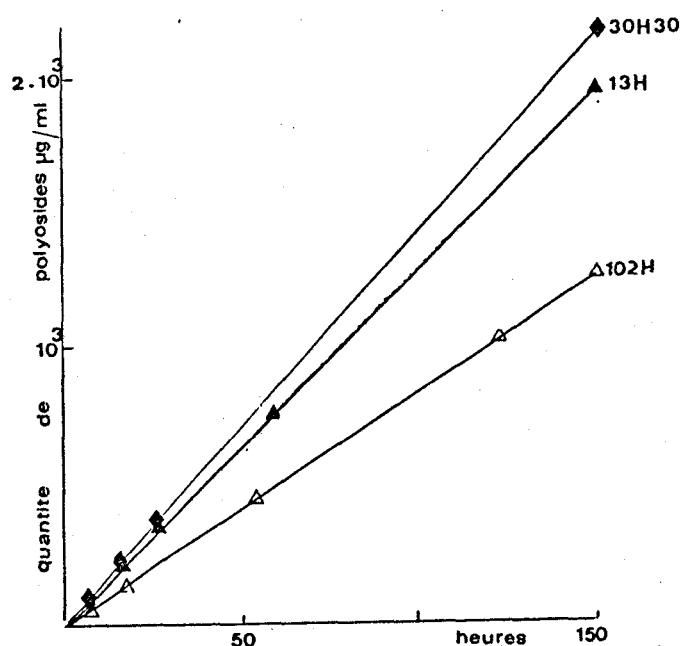


FIG. 29

synthèse de polyosides en RN mannité à 1 % (CF) par des cellules de la souche M_5N_1 prélevés à 3 moments différents de la croissance sur RC glucosé à 1 % (CF) (13 h, 30 h 30 et 102 h) et placées en non prolifération. Dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

Par ailleurs, les vitesses de synthèses sont identiques à celles observées pour des cellules ayant cultivé sur RC mannité (rappel fig 27).

On peut donc dire que le complexe enzymatique nécessaire à la synthèse des polyosides est formé de la même façon en présence de glucose ou de mannitol. Cela dénote le caractère stable de l'activité du complexe enzymatique de synthèse.

Afin de pouvoir conserver des quantités importantes de cellules qui garderaient leur pouvoir de synthèse, la stabilité du complexe enzymatique a été étudiée sans fonctionnement cellulaire.

5) Stabilité du pouvoir de synthèse sans fonctionnement cellulaire

Des cellules ayant cultivé sur un milieu RC mannité à 1 % (CF) sont lavées dans du milieu RN⁻ puis concentrées et mises en

suspension dans du milieu RN^- sans source de carbone. Elles sont conservées pendant des temps variables à $+4^\circ C$. A chacun des temps de conservation étudiés, des cinétiques de synthèse de polyosides ont été réalisées en fonction du temps. Les numérations réalisées sur des cellules conservées pendant respectivement 0h, 68h, et 196h indiquent une absence de lyse. Par ailleurs, les bactéries ainsi conservées gardent le même pouvoir de synthèse quelque soit le temps de conservation (fig 30).

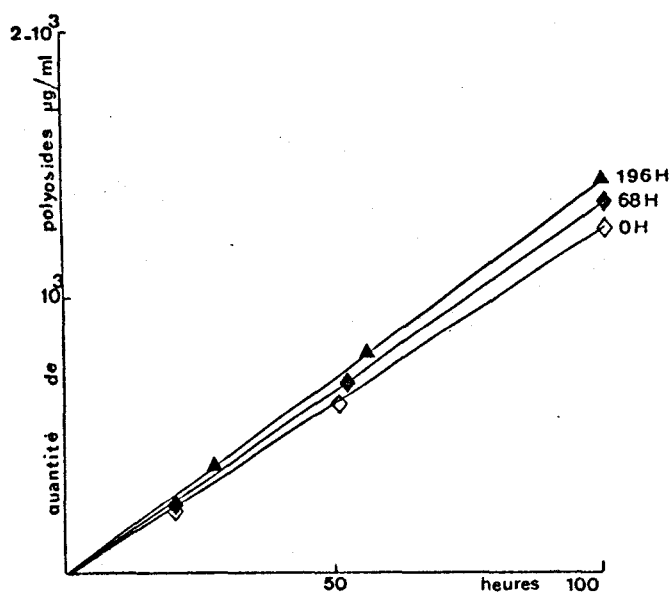


FIG. 30

synthèse de polyosides en milieu RN^- mannité à 1 % (CF) par des cellules de la souche M_5N_1 prélevées à 20 h de croissance et conservées en RN^- sans oses à $+4^\circ C$ pendant des temps variables (0 h, 68 h, 196 h). Dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

Les synthèses se font sans aucune latence et celà corrobore l'idée de l'existence d'un complexe enzymatique très stable même en l'absence de tout fonctionnement cellulaire.

En conclusion, on peut dire que le complexe enzymatique de synthèse des polyosides par la souche M5N1 existe de façon permanente dans des conditions parfois très différentes (croissance et non-prolifération). L'activité de synthèse est importante surtout en présence de mannitol et demeure très stable dans des conditions de repos cellulaire à $+4^\circ C$.

Celà nous a permis de déterminer les conditions expérimentales suivantes. Nous préparons un litre de culture de la souche M5N1 en milieu RC mannité sous agitation rotative moyenne à $30^\circ C$ pendant 20 heures.

La culture est lavée par du tampon RN^- puis remise en suspension dans 20 ml gsp de RN^- et conservée à + 4°C. A partir de ce stock de cellules qui gardent toutes leurs aptitudes de synthèse pendant au moins 196h, nous pouvons réaliser de nombreuses manipulations. Les cellules sont mises en non-prolifération en quantité telle qu'il y ait une concentration finale d'environ 10^9 bactéries/ml.

C - FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SYNTHÈSE

Dans ce chapitre, nous étudions quelques facteurs pouvant avoir un retentissement sur la synthèse des polyosides.

Ont été successivement analysés les rôles de la température d'incubation des cellules, de l'aération des suspensions de germes, du pH de départ du milieu de non-prolifération et enfin de la concentration en substrats mis à la disposition du complexe enzymatique de synthèse des polyosides.

L'influence de ces différents facteurs a été étudiée sur des cellules mises en non-prolifération en présence de mannitol qui permet des synthèses correctes de polyosides. Le rôle qualitatif du substrat osidique semble dès à présent très important et sera étudié dans un chapitre ultérieur.

1) Rôle de la température d'incubation

Quatre suspensions de germes en non-prolifération dans du milieu RN^- mannité à 1 % (CF) sont placées sous agitation rotative moyenne et incubées chacune à une température différente (20°, 30°, 37°, 42°).

Le complexe enzymatique de synthèse à une température optimale de fonctionnement voisine de 30°C (fig 31) mais supporte des températures voisines de 37°C. Il est partiellement inactivé à + 42°C.

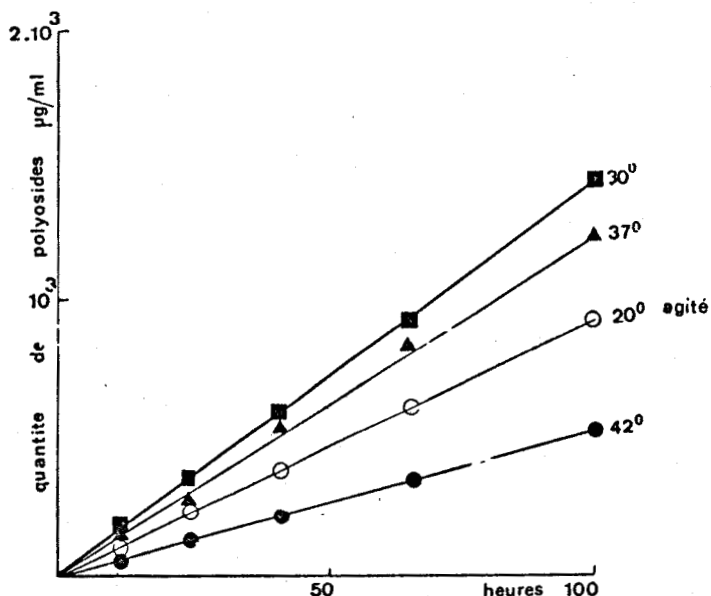


FIG. 31

synthèse de polyosides par des bactéries non proliférantes (souche M_{5N_1}) en milieu RN^- mannité à 1 % (CF) à différentes températures (20°, 30°, 37°, 42°) d'incubation sous agitation moyenne rotative. Dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

2) Rôle de l'aération

La même expérience que précédemment est réalisée aux 4 températures différentes sans agitation, c'est-à-dire en anaérobiose partielle. La température optimale reste voisine de 30°C. Néanmoins, les vitesses de production de polyosides sont très nettement diminuées ce qui indique que le complexe enzymatique de synthèse est inhibé par le manque d'oxygène (fig 32).

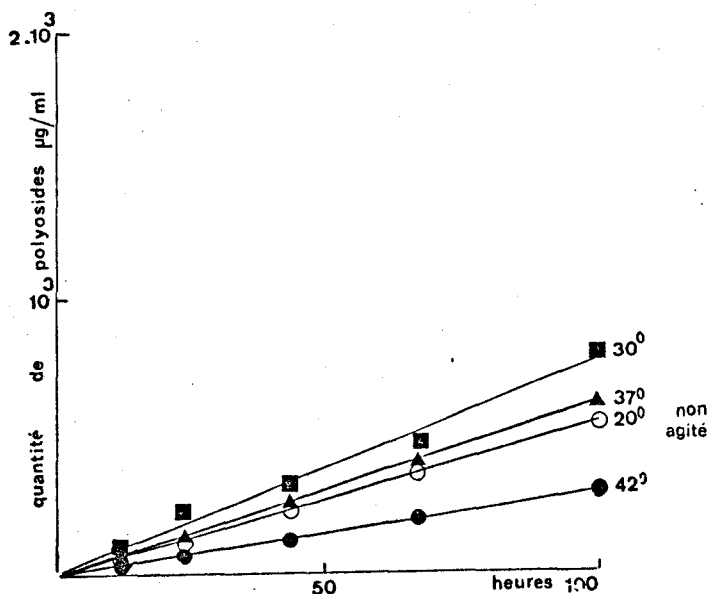


FIG. 32

synthèse de polyosides par des bactéries non proliférantes (souche M_5N_1) en milieu RN^- mannité à 1 % (CF) à différentes températures (20°, 30°, 37°, 42°) d'incubation sans agitation. Dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

Par ailleurs, l'anaérobiose totale pratiquée dans une jarre à vide "BBL Gaspak System" inhibe presque totalement la synthèse de polyosides. Ce qui confirme le fonctionnement aérobie du complexe enzymatique

3) Rôle du pH

Des synthèses de polyosides par la souche M5N1 au sein de milieux RN^- mannités à 1 % (CF) ajustés à différents pH (de 5 à 9) ont été réalisées sous agitation à 30°C. La figure 33 indique que le complexe enzymatique de synthèse fonctionne de façon optimale à un pH voisin de 7

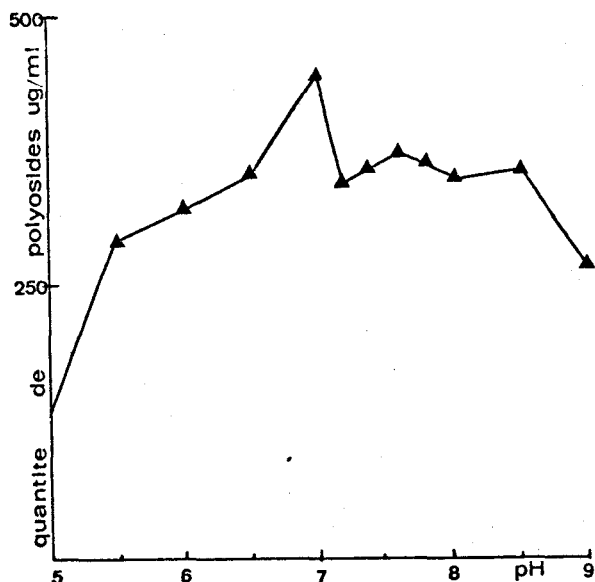


FIG. 33

Synthèse de polyosides par des bactéries non proliférantes (souches M_5N_1) en milieu RN^- mannité à 1 % CF ajustés à différents pH. Incubation à 30° sous agitation moyenne pendant 60 heures. Dosage des polyosides par la technique de la radioactivité.

4) Rôle de la concentration en substrat

a - Principe

Le substrat du complexe enzymatique de synthèse est la source de carbone que l'on ajoute au milieu RN^- de non-prolifération. On réalise des synthèses de polyosides par la souche M_5N_1 en faisant varier la concentration finale en mannitol (de 5 % à 0,02 %).

Les cinétiques de synthèse en fonction des différentes concentrations en substrat sont établies.

b - Résultats

Les vitesses de synthèses sont pratiquement identiques pour des concentrations finales en mannitol supérieures à 0,2 %. A partir de cette dernière concentration en substrat le complexe enzymatique a pratiquement atteint sa vitesse maximale (fig 34 et 35).

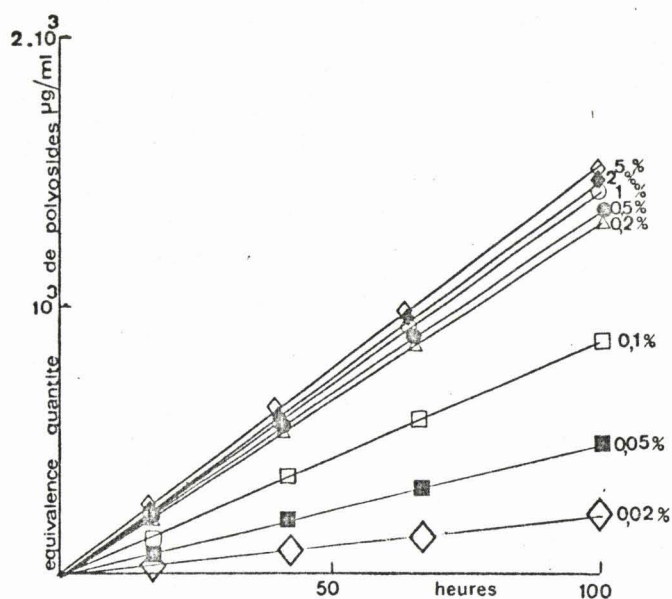


FIG. 34

synthèse de polyosides par des bactéries non proliférantes (souche M_{51}) en milieu RN^- additionné de mannitol à différentes concentrations finales (0,02 % à 5 %) dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

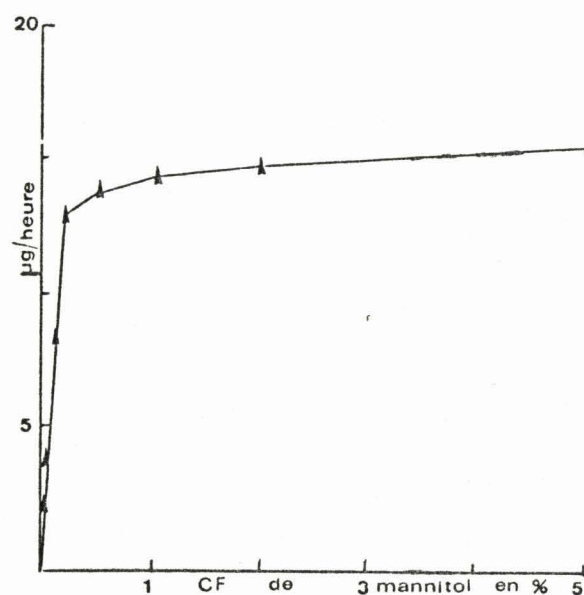


FIG. 35

étude de la vitesse de production de polyosides en fonction de la concentration de substrat (en mannitol de 0,02 % à 5 % (CF))



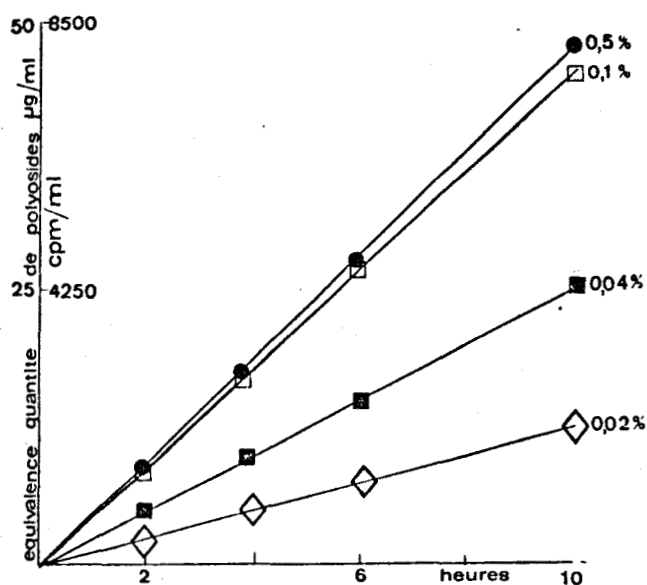


FIG. 36

débuts de synthèses de polysides par des bactéries non proliférantes (M_5N_1) en milieu RN^- additionné de mannitol à différentes concentrations finales et de mannitol ^{14}C ($0,1 \mu Ci/ml$ C.F.)

Dosage des polysides par la technique de radioactivité.

Nous avons vérifié que les concentrations en substrats inférieures à 0,2 % provoquaient des fonctionnements du complexe enzymatique à des vitesses effectivement différentes. Les vitesses de synthèse ont été étudiées en détail au début de la mise en non-prolifération pendant des temps plus courts.

La figure 36 confirme les observations faites pour des synthèses réalisées pendant des temps plus longs.

En conclusion, on peut dire que le complexe enzymatique de la synthèse des polyosides de la souche M5N1 fonctionne préférentiellement en aérobiose à un pH optimal voisin de 7. L'activité de ce complexe est presque maximale pour une concentration en substrat égale ou supérieure à 0,2 % et pour une température d'incubation des cellules voisine de 30°C.

Après avoir étudié le rôle de ces facteurs physico-chimiques de la synthèse des polyosides, l'influence qualitative du substrat osidique a été recherchée.

D - ROLE QUALITATIF DES OSES

L'observation des différences d'expression du caractère muqueux par la souche M5N1 sur des milieux complets RC additionnés soit de mannitol soit de glucose, nous fait entrevoir l'importance qualitative des oses dans la synthèse des polyosides. Si nous parlons de la souche M5N1 muqueuse cultivée sur RC mannité à 1 % (CF), DELATTRE (20) fait mention de l'isolement sur le milieu RC glucosé à 1 % (CF) d'une souche M5N1 non muqueuse facile d'emploi pour les travaux de génétique bactérienne.

Par ailleurs, une étude comparative des cinétiques de production des polyosides par des bactéries en croissance en présence soit de mannitol soit de glucose nous avait montré qu'en 100 heures de culture, le mannitol permettait une synthèse sensiblement deux fois supérieure à celle observée en présence de glucose (rappels fig 26 et 28).

Nous avons tout d'abord mis en évidence les différences de fonctionnement du complexe enzymatique de synthèse des polyosides par la souche M5N1 sur différents substrats carbonés.

Puis le mécanisme d'utilisation différentielle de ces substrats a commencé à être étudié.

1) Mise en évidence

De nombreuses sources de carbone ont été utilisées comme substrats du complexe enzymatique de synthèse des bactéries M5N1 ; cette étude devait permettre de classer d'une part, à côté du mannitol, les bons substrats et d'autre part, à côté du glucose, les substrats plus médiocres.

Pour réaliser cela rapidement la souche M5N1 a été cultivée dans un premier temps sur des milieux complets RC, additionnés de l'une des sources de carbone étudiées à la concentration finale de 1 %. Dans un deuxième temps, la mise en évidence a été complétée par l'établissement des cinétiques de synthèses en non-prolifération, effectuées en présence de sources de carbone, qui étaient des substrats plus ou moins convenables pour le complexe enzymatique de synthèse.

a - Etudes préliminaires du rôle qualitatif des oses dans la synthèse de polyosides par des bactéries en croissance

La souche M5N1 a été cultivée sur des milieux RC soit solides soit liquides et dans les 2 cas additionnés de l'une des sources de carbone étudiées à une concentration finale de 1 %.

α) Culture sur milieu complet solide

On juge du rôle de l'ose dans la synthèse de polyosides, en comparant les caractères plus ou moins muqueux des colonies de M5N1 obtenues après des temps de croissance identiques et fixés ici à 5 jours.

Le tableau VIII met en évidence une préférence du fructose, mannitol, sorbitol, adonitol, ribose et glycérol en tant que substrat pour le complexe enzymatique de synthèse des polyosides.

Néanmoins, la souche M5N1 utilise presque toutes les sources de carbone étudiées pour sa croissance exceptés le dulcitol et les sucres acides (tels les acides glucuronique et galacturonique).

Toutes les autres sources de carbone permettent la croissance de la souche M5N1 mais sont de médiocres substrats pour la synthèse des polyosides

Le caractère inhibiteur du glucose dans la synthèse des polyosides s'exprime même en présence d'un bon substrat tel le mannitol. Ainsi les colonies de la souches M5N1 sont moins muqueuses si elles sont cultivées, sur un milieu RC additionné de glucose et de mannitol à 1 % chacun en concentration finale, plutôt que sur un milieu RC additionné de mannitol seul à 1 % en concentration finale (tableau **VIII**).

NATURE DE L'OSIDE OU DE L'OSE	CROISSANCE	PRODUCTION DE MUCUS
GLYCOGENE	+	-
AMIDON	+	-
RAFFINOSE	+	-
MALTOSE	+	+
SACCHAROSE	+	+
LACTOSE	+	+
CELLOBIOSE	+	-
GLUCOSE	+	-
GALACTOSE	+	+
FUCOSE	±	-
MANNOSE	+	-
XYLOSE	+	-
ARABINOSE	+	-
ACIDE GLUCURONIQUE	-	-
ACIDE GALACTURONIQUE	-	-
INOSITOL	+	-
DULCITOL	+	-
ADONITOL	+	++
SORBITOL	+	+++
MANNITOL	+	+++
FRUCTOSE	+	++++
RIBOSE	++	++
GLYCEROL	+	++
PYRUVATE DE SODIUM	+	-
GLUTAMATE DE SODIUM	+	-
SUCCINATE DE SODIUM	+	-
CITRATE DE SODIUM	-	-
MANNITOL + GLUCOSE	+	+

TABLEAU VIII : Croissance et production
de mucus par la souche M_5N_1 cultivée
sur milieu RC solide additionné de
différentes sources de carbone à
1 % (CF)



β) Culture sur milieu complet liquide

La détection des fonctionnements différentiels des substrats carbonés a été confirmée par une étude en milieu complet liquide. Les polyosides obtenus sur les milieux RC additionnés d'une des sources de carbonés étudiées ont été dosés par pesée des poids secs purifiés correspondant au même volume de milieu et incubés dans les mêmes conditions d'agitation moyenne à une température de 30°C pendant le même temps (165 heures).

La croissance a été contrôlée en mesurant régulièrement la densité optique ; on peut remarquer que tous les substrats étudiés permettent à peu près la même croissance de la souche M5N1 mais produisent des quantités très différentes de polyosides (tableau IX).

Temps de Culture	GLUCOSE		MANNOSE		ARABINOSE		GALACTOSE		FRUCTOSE		GLYCEROL		MANNITOL	
	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH	DO	pH
21H 30	160	7,4	167	7,4	144	7,4	158	7,3	165	7,5	115	7,5	124	7,5
41H 30	220	6,9	215	6,8	194	6,8	230	6,7	215	7,5	190	7,5	215	7,5
87H 30	270	4,9	265	4,6	270	4,9	270	4,9	270	7,5	270	7,5	270	7,2
165H	270	4,5	270	4,5	270	4,6	270	4,7	270	7,4	270	7,4	270	6,9
QUANTITE FINALE DE POLYOSIDES µg/ml	850		850		900		840		2300		1200		2000	

TABLEAU IX : Croissance (mesure de l'absorbance des cultures à 600 nm) et synthèse des polyosides (dosage par pesée des poids secs en fin de synthèse par la souche M₅N₁ cultivée sur des milieux RC additionnés de différentes sources de carbone à 1 % (CF)

Ces observations ont été complétées par l'étude des cinétiques de synthèses de polyosides en fonctions des substrats carbonés.

b - Rôle qualitatif des oses dans la synthèse de polyosides par des bactéries non-proliférantes

Les substrats convenables tels le fructose et le mannitol permettent des synthèses proportionnelles au temps de non-prolifération. Ces 2 substrats fonctionnent avec des vitesses un peu différentes ; la souche M5N1 préférant le fructose au mannitol (fig 37). Le glycérol est un substrat nettement inférieur aux oses précédemment cités mais il convient beaucoup mieux que le glucose. Ce dernier ainsi que les autres oses étudiés font apparaître des synthèses qui présentent très rapidement un plateau qui fait penser à une inhibition.

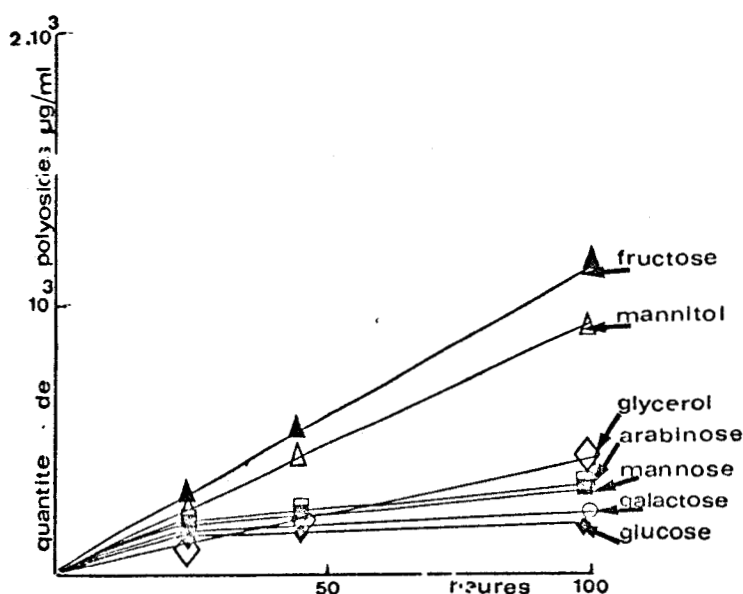


FIG. 37

synthèse de polyosides par des bactéries non proliférantes (souche M₅N₁) en RN⁻ additionné de différentes sources de carbone à 1 % (CF)

L'ensemble de ces résultats nous autorise à classer les substrats carbonés en deux catégories. D'une part, ceux qui sont des bons substrats pour le complexe enzymatique de synthèse des polyosides. Ce sont

principalement le fructose, le mannitol et le sorbitol auxquels on peut rattacher des oses qui sont des substrats un peu moins convenables tels l'adonitol, le ribose et le glycérol. D'autre part, les autres sources de carbones ci-étudiées dont le glucose qui sont de médiocres substrats pour la synthèse des polyosides.

Par ailleurs, le glucose et le galactose ajoutés ensemble à des bactéries non-proliférantes à raison de 0,5 % par ose en concentration finale ne permettent pas une meilleure synthèse que le glucose et le galactose seuls (fig 38). Il est très curieux de constater que des oses tels le fructose ou le mannitol sont plus favorables à la synthèse du polyoside que ses constituants osidiques (glucose et galactose).

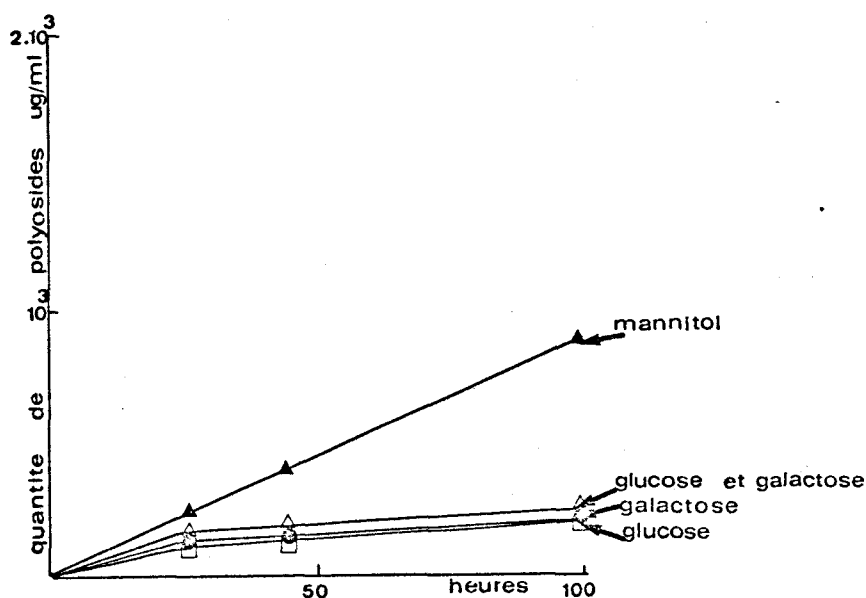


FIG. 38

synthèses comparées de polyosides par des bactéries non proliférantes (souche M₅N₁) en RN   additionnées de sources de carbone à 1 % (CF) (mannitol, glucose, glucose plus galactose).

Il devient très intéressant d'étudier le mécanisme de cette inhibition de la synthèse par certains oses dont le glucose.

2) Mécanisme d'inhibition de la synthèse

a - Hypothèses

On peut émettre 2 hypothèses expliquant le mécanisme de cette inhibition

1° dans certaines conditions, le système enzymatique de synthèse ne serait pas synthétisé. On pourrait imaginer une répression catabolique par exemple.

2° le complexe enzymatique serait synthétisé mais il serait inhibé par une cause restant à définir.

b - Rôle du glucose

Dans des expériences décrites précédemment nous avons montré que des cellules ayant cultivé en milieu complet additionné soit de glucose soit de mannitol synthétisaient des quantités de polyosides presque identiques si elles étaient placées dans des conditions de non-prolifération en présence de mannitol (rappel fig 27 et 29).

De cette expérience, on peut conclure que le complexe enzymatique de synthèse était présent en milieu complet RC glucosé où il fonctionnait mal (la synthèse est 2 fois moins importante en RC glucosé qu'en RC mannité ; (rappel fig 28 et 26). En effet dès qu'on replace les cellules issues du milieu RC glucosé dans un milieu RN⁻ mannité le complexe enzymatique partiellement inhibé retrouve immédiatement toutes ses aptitudes de synthèse (rappel fig 29).

Par ailleurs⁶ les mêmes cellules de la souche M5N1 ayant cultivé sur RC mannité et sur RC glucosé (mêmes manipulations que celles précitées) pendant 13h, 30h 30 et 102h ont été placées également en non-prolifération en présence de glucose à 1 % (CF).

Quelque soit l'âge des cellules en nombre égal la synthèse de polyosides dans les 2 cas est inhibée en présence de glucose (fig 39 et 40).

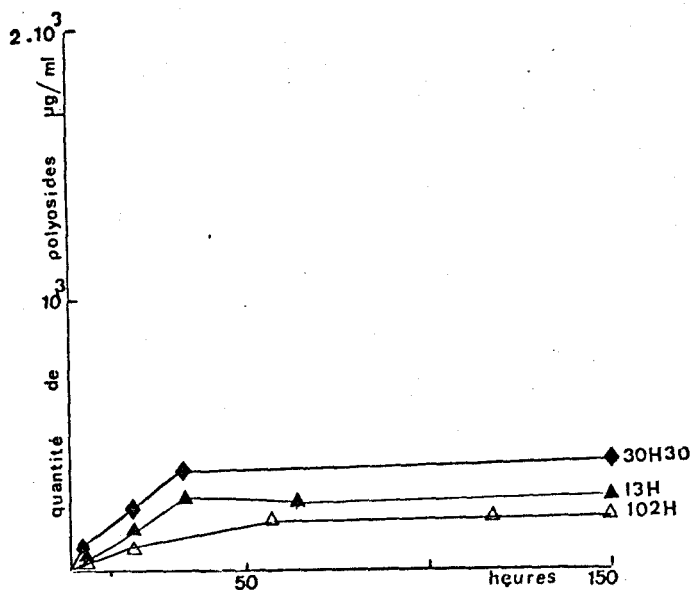


FIG. 39

synthèse de polyosides en RN⁻ glucosé à 1 % (CF) par des cellules de la souche M₅N₁ prélevées à 3 moments différents de la croissance sur RC mannité à 1 % (CF) (13 h, 30 h 30, 102 h) et placées en non prolifération. Dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

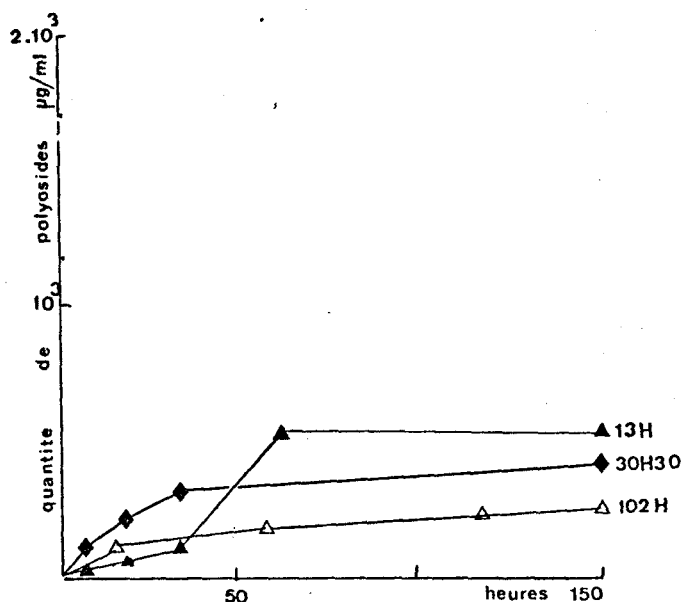


FIG. 40

synthèse des polyosides en RN⁻ glucosé à 1 % (CF) par des cellules de la souche M₅N₁ prélevées à 3 moments différents de la croissance sur RC glucosé à 1 % (CF) (13 h, 30 h 30, 102 h) et placées en non prolifération. Dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

On peut en conclure que le complexe enzymatique de la synthèse des polyosides de la souche M5N1 est produit de façon permanente en présence de glucose comme de mannitol. Cela est en faveur de la seconde hypothèse selon laquelle le complexe enzymatique serait toujours synthétisé mais il pourrait être inhibé. Le glucose semble bien remplir la

fonction d'inhibiteur. D'ailleurs si l'on compare les synthèses par des bactéries non-proliférantes en RN^- mannité et glucosé, on s'aperçoit que les vitesses de production de polyosides sont sensiblement identiques pendant 30 heures. Puis la synthèse devient stationnaire en présence de glucose (fig 41) à partir de ce moment.

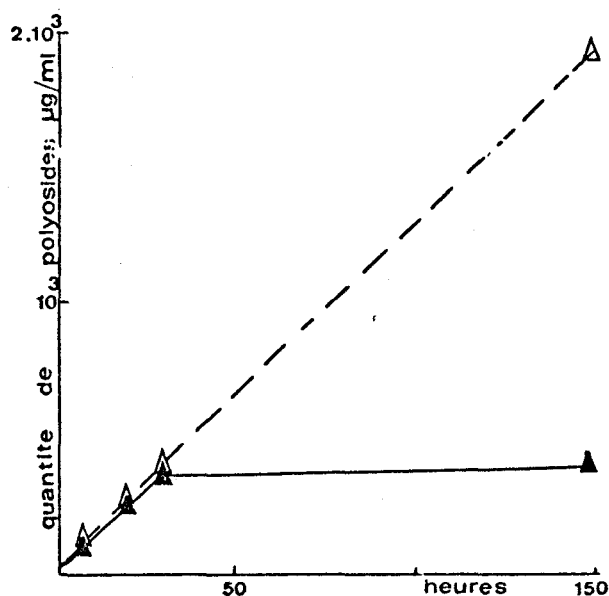


FIG. 41

synthèses comparées de polyosides par des cellules (souche $M_S N_1$) prélevées à 30 h de croissance et mises en non prolifération respectivement sur RN^- glucosé à 1 % (CF) (en trait plein) et sur RN^- mannité à 1 % (CF) (en pointillé).

Le glucose par une raison qu'il reste à préciser empêcherait la synthèse de se continuer. Néanmoins, il reste surprenant que des oses tels le fructose ou le mannitol qui devraient rejoindre les voies de dégradation du glucose, puissent favoriser la synthèse des polyosides.

c - Rôle du pH

Le glucose peut inhiber la synthèse par lui-même ou par un produit de son catabolisme. Pour tenter de préciser cela, nous sommes partis d'une observation.

En effet, on peut remarquer que la mauvaise synthèse de polyosides en présence de glucose par des bactéries en croissance

(tableau X) s'accompagne toujours d'une baisse de pH plus importante et plus rapide qu'en présence de mannitol ou de fructose.

Temps de culture	pH						
	GLUCOSE	MANNOSE	ARABINOSE	GALACTOSE	FRUCTOSE	GLYCEROL	MANNITOL
21h 30	7,4	7,4	7,4	7,3	7,5	7,5	7,5
41h 30	6,9	6,8	6,8	6,7	7,5	7,5	7,5
87h 30	4,9	4,6	4,9	4,9	7,4	7,5	7,2
165h	4,5	4,5	4,6	4,6	7,4	7,4	6,9

TABLEAU X : Evolution des pH des milieux de culture RC (additionnés de différentes sources de carbone à 1 %, CF) inoculés avec la souche M_5N_1 et incubés à 30° sous agitation moyenne.

Temps de non Prolifération	pH						
	GLUCOSE	MANNOSE	ARABINOSE	GALACTOSE	FRUCTOSE	GLYCEROL	MANNITOL
21h 30	5,1	5,4	6,1	6	7,5	7,5	7,5
41h 30	5	4,5	4,7	4,9	7,5	7,5	7,5
100h	4,9	4,4	4,5	4,5	7,3	7,5	7,4

TABLEAU XI : Evolution des pH des milieux RN (additionnés de différentes sources de carbone à 1 %, CF) inoculés avec la souche M_5N_1 en non prolifération à 30° sous agitation moyenne.

805
LILLE

Il en est de même pour les milieux de synthèse en non prolifération

(Tableau **XI**)

En fait on peut distinguer d'une part les substrats convenables (précédemment cités), pour la synthèse des polyosides, et qui font très peu baisser le pH des milieux de synthèse. D'autre part les substrats médiocres (cités antérieurement) provoquent une baisse de pH rapide et importante (tableaux X et XI).

A la suite de ces observations nous pouvons émettre l'hypothèse que le glucose lui-même n'inhiberait pas la synthèse. Il pourrait s'agir d'un produit du métabolisme qui en acidifiant le milieu inactiverait le complexe enzymatique. Cela semblerait d'autant plus vraisemblable que les pH acides inhibent la production de polyosides (rappel fig 33).

Pour confirmer le rôle inhibiteur du pH acide du milieu de synthèse, nous avons réalisé 2 types d'expériences :

1° des synthèses de polyosides en présence de glucose dans un milieu très tamponné

2° des synthèses en présence de mannitol où l'on fait baisser artificiellement le pH au bout de 30 heures, moment à partir duquel la synthèse en présence de glucose, diminue.

α) Synthèse de polyosides en milieu très tamponné glucosé

Des cellules de M5N1 sont placées en non-prolifération en présence de glucose dans 3 tampons de force ionique différente (K_2HPO_4 , 2M ; KH_2PO_4 , 0,3M dilué respectivement au 1/10°, 1/40°, 1/80°). Les contrôles du pH sont effectués régulièrement pour juger de l'efficacité des solutions tampons (tableau XII).

Temps de non prolifération	pH			
	K_2HPO_4 , 2M KH_2PO_4 , 0,3M Dilué au 1/10°	K_2HPO_4 , 2M KH_2PO_4 , 0,3M Dilué au 1/40°	K_2HPO_4 , 2M KH_2PO_4 , 0,3M Dilué au 1/80°	RN^-
24 H	7,2	7	7	5,1
43 H	7,2	6,9	6,8	5
68 H	7,2	6,6	6,2	4,7
114 H	7,1	6,2	5,6	4,6
142 H	7,1	6	5,4	4,6
186 H	7	5,8	5,2	4,6

TABLEAU XII : Evolution des pH des milieux RN^- et tampons phosphate (additionnés de glucose à 1 % (CF) inoculés avec la souche M_5N_1 en non prolifération à 30° sous agitation moyenne.

On voit sur la figure 42 que le tampon (K_2HPO_4 , 2M ; KH_2PO_4 , 0,3M dilué au 1/40°) est le plus favorable à la synthèse. Dans ce tampon le pH baisse moins rapidement qu'en milieu RN^- glucosé mais plus qu'en milieu RN^- mannité. La mise en non-prolifération dans un milieu plus tamponné (K_2HPO_4 , 2M ; KH_2PO_4 , 0,3M dilués au 1/10°) permet des variations moins importantes du pH mais la force ionique devient défavorable à la synthèse de polysides.

En fait dans ces milieux très tamponnés, les conditions deviennent défavorables au maintien en vie des cellules de M_5N_1 qui se lysent.

Cela pourrait expliquer la production plus faible de polyosides synthétisés par un nombre moins important de cellules. Par contre l'utilisation de solutions moins bien tamponnées permet la survie de cellules mises en non-prolifération mais n'empêche plus aussi efficacement la baisse de pH. Cela pourrait expliquer que la synthèse optimale de polyosides en présence de glucose soit environ deux fois inférieure à celle obtenue en présence de mannitol.

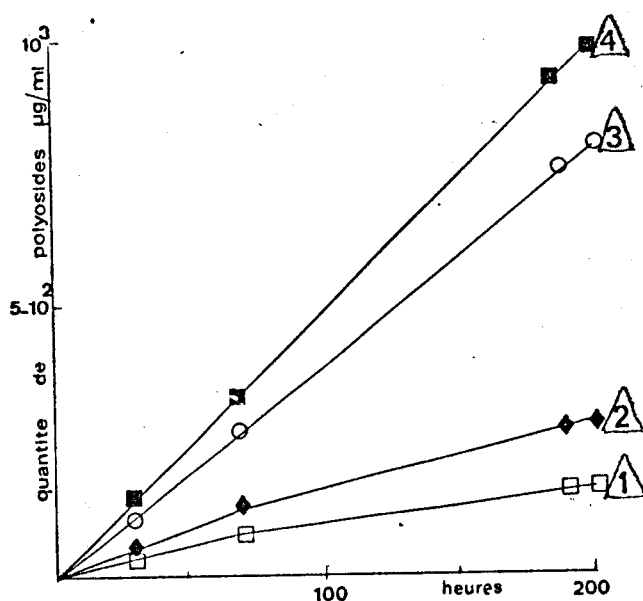


FIG. 42

synthèse de polyosides par des bactéries non proliférantes (souche M_5N_1) placées dans les milieux suivants additionnés de glucose à 1 % CF : 1. RN^- ; 2. K_2HPO_4 , 2 M et KH_2PO_4 0,3 M dilué au 1/10e ; 3. K_2HPO_4 , 2 M et KH_2PO_4 0,3 M dilué au 1/80e ; 4. K_2HPO_4 , 2 M et KH_2PO_4 0,3 M dilué au 1/40e.

Dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

Pour confirmer le retentissement du pH acide sur la synthèse des polyosides, nous avons abaissé artificiellement le pH d'une suspension de cellules de M_5N_1 dans un milieu RN^- mannité.

β) Synthèse de polyosides en milieu RN^- mannité avec baisse artificielle de pH

Une suspension de cellules de M_5N_1 est mise en non-prolifération dans du milieu RN^- mannité à 1 % (CF) en agitation moyenne à 30°C pendant 30 heures. A ce moment la suspension de germes est divisée en 3 parties égales. La première partie est laissée telle quelle. La deuxième fraction est réincubée après un ajustement de pH à 6,5 par de l'acide phosphorique dilué stérile et la troisième fraction est ajustée de la même façon à un pH de 5,5. Les trois fractions sont réincubées dans les mêmes conditions que celles initialement. La figure met en évidence une inhibition très nette de la synthèse pour un pH de 5,5 ; ce qui confirme encore le pH optimal de fonctionnement du complexe enzymatique (rappel fig 33).

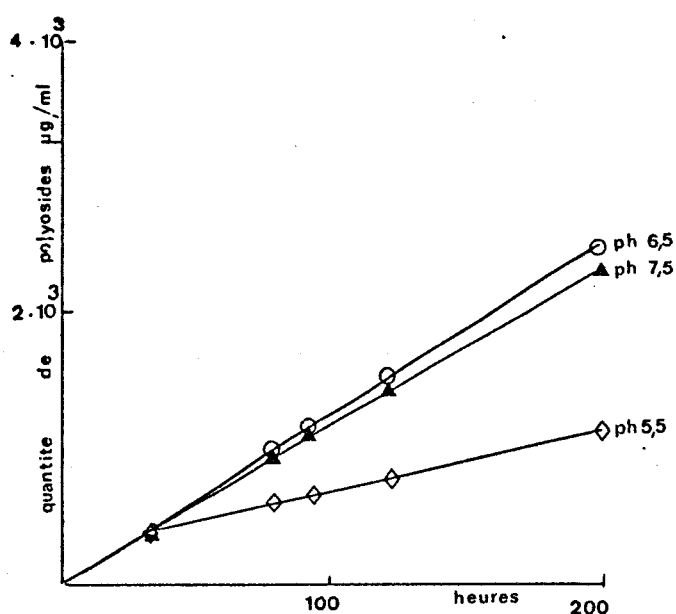


FIG. 43

Synthèse de polyosides par des cellules de la souche M_5N_1 en non prolifération en RN^- mannité 1 % (CF) pendant 30 heures puis réparties en 3 volumes égaux et ajustés à 3 pH différents (7,5 ; 6,5 ; 5,5) dosage des polyosides par le phénol sulfurique.

Notons qu'après l'ajustement artificiel du pH, ce dernier reste constant pendant toute la durée des synthèses en RN^- mannité (tableau XIII).

Temps de non prolifération	pH		
	Fraction pH 7,5	Fraction ajustée à pH 6,5	Fraction ajustée à pH 5,5
30 H	7,5	6,5	5,5
80 H	6,9	6,3	5,4
94 H	6,9	6,3	5,4
120 H	6,9	6,2	5,3
200 H	6,9	6	5,3

TABLEAU XIII : Evolution des pH des milieux RN^- (additionné de mannitol à 1 % CF) inoculés avec la souche M_5N_1 en non prolifération pendant 30 heures puis ajustées artificiellement à différents pH (7,5 ; 6,5 ; 5,5).

En conclusion, on peut dire que le glucose par lui-même n'inhibe pas la synthèse de polysides. Il s'agirait de produits acidifiants du catabolisme du glucose qui inactiveraient le complexe enzymatique. Néanmoins on peut se demander si en plus de cette inhibition le complexe enzymatique ne préférerait pas le mannitol au glucose comme substrat. Cette préférence pourrait être liée à des voies particulières de biosynthèse préférentielle à partir de substrats tels le mannitol ou le fructose. Dans ce cadre, nous avons réalisé des expériences de compétition entre le glucose et le mannitol ou le fructose.

d - compétition des substrats

Deux lots des mêmes cellules de M5N1 sont mises en non-prolifération dans du milieu RN^- additionné à la fois de glucose et de mannitol froids en quantités égales (500 $\mu\text{g/ml}$). Un des lots est additionné d'un aliquot de glucose ^{14}C et l'autre lot, de mannitol ^{14}C .

On mesure dans le temps l'incorporation du carbone marqué dans les polysides formés et la disparition des oses utilisés à la synthèse. Dans les 2 expériences, le mannitol a été plus utilisé que le glucose.

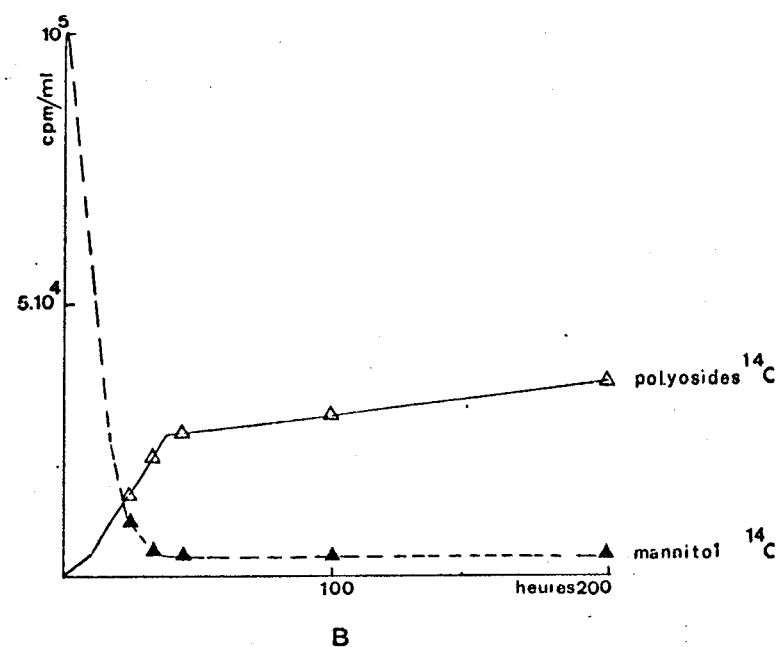
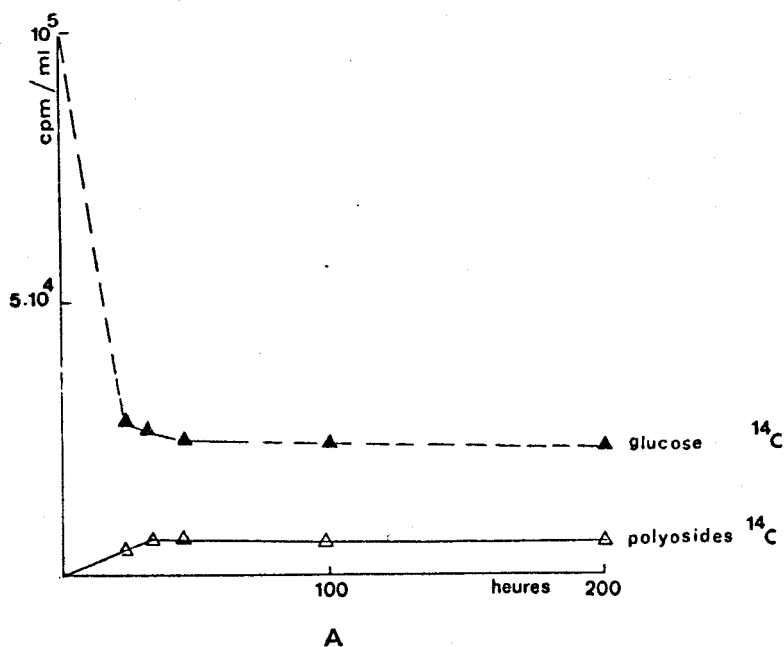


FIG. 45

synthèse de polysides par des cellules de la souche M_5N_1 placées en non prolifération en RN^- additionné de 500 $\mu\text{g/ml}$ de glucose et de 500 μg de mannitol plus une partie aliquote d'ose marqué au ^{14}C qui est soit :

A. 0,05 $\mu\text{Ci/ml}$ de glucose ^{14}C

B. 0,05 $\mu\text{Ci/ml}$ de mannitol ^{14}C

Etude de l'incorporation des oses radioactifs dans les polysides formés et de la disparition de ces oses marqués utilisés.

En effet le carbone de mannitol marqué a été incorporé en plus grande quantité (fig 45A) que le carbone du glucose marqué (fig 45 B) au sein de la même quantité de polyosides synthétisés en présence de glucose et de mannitol. Cela est en accord avec les quantités résiduelles des oses après la synthèse puisqu'il reste beaucoup plus de glucose que de mannitol (fig 45 A et 45 B). Dans les 2 cas, on constate une perte importante des oses qui ont vraisemblablement été utilisés pour le métabolisme de base des cellules en non-prolifération.

E - DISCUSSION

Le complexe enzymatique de synthèse de polyosides de la souche M5N1 est produit quelque soient les conditions de croissance. Il est stable même en repos cellulaire à +4°C. Il fonctionne de façon optimale à 30°C en aérobiose dans une zone de pH voisine de 7.

Certains oses tels le fructose et le mannitol sont des substrats particulièrement favorables à la production de polyosides et ne provoquent pas de baisse de pH du milieu de synthèse. La mauvaise synthèse en présence de substrats plus médiocres dont le glucose est correlative d'une importante baisse de pH.

L'incorporation préférentielle du ^{14}C issu du mannitol permet de dire que cet ose est dirigé préférentiellement vers des voies de biosynthèse des polyosides. Par contre le glucose serait dévié vers des voies de catabolisme correlative d'acidification du milieu de synthèse.

Néanmoins il n'est pas possible actuellement de déterminer avec précision la cause exacte de ces voies préférentielles. On peut cependant avancer 2 types d'explications :

- Le glucose serait dégradé très rapidement par les cellules. Cela provoquerait une baisse de pH importante amenant une acidification intracellulaire incompatible avec la synthèse de polyosides. Par contre le fructose ou le mannitol qui seraient plus lentement dégradés acidifieraient très peu le milieu de synthèse. Consécutivement ces oses seraient utilisés à la production de polyosides.

- Les métabolismes du fructose et du mannitol seraient dirigés préférentiellement vers la biosynthèse par l'intermédiaire des UDP fructose ou UDP mannitol qui s'épimériseraient en sucres activés constitutifs des polyosides (UDP glucose et UDP galactose). Par contre le glucose serait préférentiellement dévié vers les voies de la glycolyse.

Conclusion generale

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

Par ce travail nous avons voulu avoir une vue d'ensemble sur les polyosides de Rhizobium. Nous avons d'abord étudié la composition chimique de ces polyosides puis les modalités générales de leur synthèse.

En ce qui concerne le premier point, les polyosides du genre Rhizobium sont soit solubles et excrétés dans le milieu extérieur (souches de Rhizobium à croissance rapide) soit adhérents aux structures pariétales des souches de Rhizobium à croissance lente.

Notre étude a concerné essentiellement les polyosides solubles de Rhizobium à croissance rapide et plus spécialement ceux de Rh-meliloti.

Il est difficile de produire des polyosides en quantités appréciables dans un milieu synthétique qui convienne à la croissance et à la synthèse de ces macromolécules par l'ensemble des espèces de Rhizobium. Par contre, on peut obtenir des grandes quantités de polyosides en non-prolifération dans un milieu tamponné sucré.

La production de polyosides en milieu complet est favorisée par l'emploi d'extraits de levure fraîche contenus dans le milieu de WRIGHT ; ce dernier donne de meilleurs résultats que des milieux renfermant des extraits de levure sec commercialisés. Le milieu de WRIGHT permet une synthèse de polyosides en quantités variables mais le plus souvent assez importantes par l'ensemble des souches de Rhizobium à croissance rapide et 2 souches à croissance lente.

Les polyosides obtenus sont relativement purs puisque pratiquement

exempts de phosphates et d'azote. Ils sont constitués d'oses neutres (glucose, galactose, mannose et quelquefois mannose) et d'acide glucuronique en quantités variables.

L'absence de mannose dans les polyosides synthétisés par des bactéries non-proliférantes et la présence de mannanes dans l'extrait de levures permettraient de penser que le mannose des polyosides de bactéries proliférantes sur un milieu de WRIGHT pourrait provenir tout au moins en partie de ces mannanes.

L'étude de la synthèse des polyosides de la souche M_5N_1 par des bactéries non proliférantes a pu être réalisée grâce à l'utilisation d'une technique de fractionnement sur Sephadex en utilisant un traceur radioactif (ose ^{14}C ajouté au milieu de non prolifération).

La synthèse des polyosides s'effectue à partir du mannitol de façon optimale à 30° C en aérobiose dans une zone de pH voisine de 7. La vitesse de synthèse est maximale pour des concentrations finales en mannitol supérieures ou égales à 0,2 %.

La nature du substrat carboné a une importance capitale pour la synthèse. On peut classer les substrats carbonés en 2 catégories ; d'une part, ceux qui sont de bons substrats (fructose, mannitol et sorbitol) et ceux qui sont de médiocres substrats (dont le glucose et le galactose).

Cependant, le complexe enzymatique de synthèse des polyosides de la souche M_5N_1 est synthétisé par des bactéries en croissance quel que soit le substrat carboné. Il est stable et fonctionne pendant des temps assez

longs en non prolifération ; les cellules gardent leur aptitude à la synthèse pendant au moins 196 h de repos cellulaire à + 4°.

Les substrats carbonés donnant une synthèse convenable (fructose, mannitol, sorbitol) ne provoquent pas d'abaissement de pH du milieu au cours de leur catabolisme; le pH reste donc optimal pour la synthèse.

Par contre, les autres oses provoquent une diminution très importante des pH (4,5) incompatibles avec la synthèse des polysides.

Il apparaît intéressant d'étudier ultérieurement les voies de catabolisme des deux types de substrats qui sont dégradés de façon aussi différente chez le genre Rhizobium.

Bibliographie

1. ALBERSHEIM, P., JONES, T. and ENGLISH, P.D.
Ann. Rev. Phytopathol., (1969), 7-171
2. ALLEN, R.J.L.
Biochem. J., (1940), 34, 858-865.
3. ALLEN, O.N. and ALLEN, E.K.
Botan. Gaz., (1940), 102, 121.
4. ALLEN, Q.N. and BALDWIN, J.L.
Soil Sci., (1954), 78, 415-427
5. AMARGER, N., OBATON, M. et BLACHERE, M.
Can. J. Microbiol., (1967), 13, 99-105
6. BAILEY, R.W., GREENWOOD, R.M. and GRAIG, A.
J. gen Microbiol., (1971), 65, 315-324.
7. BONISH, P.M.
Plant soil., (1973), 38, 307.
8. BOWISH, P.M.
Plant soil., (1973), 39, 319
9. BONNIER, C.H.
Ant Van Leuwenhock, (1958), 24, 1-17.
10. BONNIER. C. et BRAKEL. J.
Presses agronomiques de Gembloux, ASBL ed. Duculot S.A. (1969).
11. BONNIER, C. et BROUWERS, L.
Bull. Inst. Agro et Sta. Rech. Gembloux, (1959), 26, 317-321.
12. BRAKEL, J.
Biol. du sol, Bull. Int. inf Gelge, (1965), 4, 22-23.

13. BURRIL, T. and HANSEN, R.
Illinois. agr. Exp. Stat. Bull. (1917), 202, 115-181
14. CHEN, M.K.
Nature (1938), 142, 755
15. CLAPP, C.E. and DAVIS, R.
Soil. Biol. Biochem. (G.B.), (1970), 2, 109-117.
16. COURTOIS, B., DERIEUX, J.C., et HORNEZ, J.P.
Ann. Microbiol. Inst. Past. Paris (1975), 126 B, 4-15.
17. DARBYSHIRE, J.F.
Rothamsted Exp. Sta. rep. for., (1963), 74.
18. DEDONDER, R.A. and HASSID, W.Z.
Biochem. Biophys. Acta, (1964), 90, 239-248.
19. DELATTRE, J.M. et DELEPLANQUE, A.
Ann. Inst. Pasteur, Lille, (1971), 22, 215-230.
20. DELATTRE, J.M.
Thèse de Docteur Ingénieur n° 121, (1971), Université des Sciences et
Techniques de Lille.
21. DE LEIZAOLA, M. et DEDONDER, R.
C.R. Acad. Sci., Paris, (1955), 240, 1825-1827.
22. DISHE, Z.A.
J. Biol. Chem., (1947), 167, 189-198.
23. DUDMAN, W.F.
J. of Bacteriol., (1964), 88, 640-645.
24. DUDMAN, W.F. and HEIDELBERGER, M.
Science, (1969), 164, 954-955.

25. DUGUID, J.P. and WILKINSON, J.P.
J. of gen. microbiol., (1953), 9, 174
26. FARAHEUS, G.
J. of gen. microbiol., (1957), 16, 374
27. FARAHEUS, G. and FARAHEUS, H.
Pre-infection phases of the legumes Symbiosis inc the ecology of soil
Bacteria : eds T.R.G. Gray and D Parkinson (Liverpool Univ. Press), (1968),
396-421.
28. FARAHEUS, G. and LJUNGGREN, H.
Physiol. Plantarum, (1959), 12, 145
29. FERRY, P., BLACHERE, H. et OBATON, M.
Ann. agro., (1959), II, 219-233.
30. FRED, E.B., BALDWIN, L. and Mc COY, E.
Univ. Wisconsin Str Madison, U.S.A., (1932).
31. GEORGI, C.E. and ETTINGER, J.M.
J. Bact., (1940), 41, 323-340.
32. GOSTKOWSKA, K.
In STRZELCONA A., (1968).
33. GRAHAM, P.H.
Ph. D. thesis Univ. of Western Australia.
34. GRAHAM, P. H.
Antonie van Leeuwenhock (1963), 29, 281-291.
35. GRAHAM, P.H.
J. gen. microb., (1964), 35, 511-517.
36. GRAHAM, P.H.
Antonie van Leeuwenhock, (1965), 31, 349-354.

37. HAACK, A.
Zent Bakeriol. Parisitenk Abt II, (1961), 114, 577.
38. HAMBLIN, J. and KENT, S.P.
Nature New Biol., (1973), 245, 28-30.
39. HEPPER C.
Antonie van Leeuwenhock, (1972), 38, 437-445.
40. HOPKINS, E.N., PETERSON, W.H. and FRED, E.B.
J. Ann. Chem. Soc., (1930), 53, 306-309.
41. HORNEZ, J.P., COURTOIS, B., DEFIVES, C. et DERIEUX, J.C.
C. R. Acad. Sc. Paris, (1974), 278, 157,160.
42. HUBBEL
Botan. Gaz., (1970), 131, 337.
43. HUGHES, R.C. and JEANLOZ, R.W.
Biochemistry, (1964), 3, 1535-1543.
44. HUMPHREY, B.A., and VINCENT, J.M.
J. gen. microb., (1959), 21, 477-484.
45. HUMPHREY, B.A. and VINCENT, J.M.
Nature, (1963), 199, 927.
46. HUMPHREY, B., EDGLEY, M. and VINCENT, J.M.
J. gen. microbiol., (1974), 81, 267-270.
47. JORDAN, D.C.
Canad. J. Botany, (1952), 30, 693
48. JOSHI, N.V.
India. depart. Agr. Memb. Bact. Sect., (1920), 1, 247-276.
49. KEELE, B.B., HAMILTON, P.B. and ELKAN, G.H.
J. of Bacteriol., (1970), 101, 698-704.

50. LAIRD, D.J.
Arch. mikrobio., (1932), 3, 159-193.
51. LANGE, R.T. and ALEXANDER, M.
Can. J. of microb., (1961), 7, 959.
52. LEE, S., KIVILAAN, R.S., BANDURSKI, A
Plant Physiol., (1967), 42, 968.
53. LILLICH, T.T. and ELKAN, G.H.
Can. J. microb., (1968), 14, 617.
54. LJUNGGREN, H.
Nature, (1961), 191-623.
55. LJUNGGREN, H.
Physiol. Plantarum, (1969), suppl. 5.
56. LJUNGGREN, H. and FARAHEUS, G.
Nature, (1959), 184, 1578.
57. LJUNGGREN, H. and FARAHEUS, G.
J. gen. Microbiol., (1961), 26, 521.
58. Mc COY, E.
Proc. Roy. Soc. Ser. B., (1932), 110-514.
59. Mc MILLAN, J.D. and COOKE, R.C.
Can.J. Microbiol., (1969), 15, 643.
60. MARTINEZ de DRETS, G. and ARIAS, A.
J. of Bacteriol., (1970), N° 1, 97-103.
61. MONTREUIL, J. et SPIK, G.
Monographie du laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences,
Lille, (1968).

62. MOORE, C.T.
Bull. U.S. Bur plant Dep. Agr. indust., (1905), 71, 1-72.
63. NEAL, O.R. and WALKER, R.J.
J. bact. (1935), 30, 173-187.
64. NEUMANN, C
Landw Vers Sta., (1902), 56, 187-202.
65. NICOL, H. and THORNTON, H.G.
Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, (1941), 32-59.
66. NORRIS, D.O.
Empire J. Exp. Agr., (1956), 24, 247-270.
67. NORRIS, D.O.
Nature, (1958), 182, 734.
68. NOTMAN, P.S.
J. Exptl Botany, (1959), 10, 250
69. OVODOV, Y.S., EVTUSHENKO, E.V., VASKOSKY, V.E., OVODOVA, R.G. and SOLOV'EVA, T.F.
J. chromat., (1967), 26, 11-115.
70. PEAT, S. WHELAN, W.J. and EDWARDS, T.E.
J. chem. Soc , (1961), 1, 29-34.
71. PEDROSA, F.O. and ZANCAN, G.T.
J. of Bacteriol., (1974), 336-338.
72. RIGAUD, J.
Ann. Inst. Pasteur, (1965), 3, 273-279.
73. ROGGEN H.P.J.R. and STANLEY, R.G.
Planta, (1969), 84, 295.
74. SCHAEDE, R.
Zentr. Bakteriол. Parasitenk Abt II, (1931), 85, 416.

75. SEARS, O.H. and CLARK, F.M.
Soil Sci., (1930), 30, 237-242.
76. SEVAG, M.G.
Biochem. Z., (1934), 273-419.
77. SLONEKER, J.J. and ORENTAS, D.G.
Nature London, (1962), 194, 478-479.
78. SMITH, W.K.
J. gen. Microb., (1958), 18, 33.
79. SOLHEIM, B. and RAA, J.
Plant soil, (1971), 35, 275.
80. SOLHEIM, B. and RAA, J.
J. gen. microb., (1973), 77, 241.
81. SOMME, R.
Carbo. Research, (1974), 33, 89-96.
82. STEINBERG, J.
J. agric. research, (1938), 57, 461.
83. STRIJDOM, B.W. and ALLEN, O.N.
Phytophylactica S. Afr., (1969), 1, 147-151.
84. SUTHERLAND, I.W.
in Advance in microbiol. physiology, (1972), 8, 143-213.
85. THORNTON, H.G. and VICOL, H.
Nature (1936), 137-494.
86. THORNTON, H.G.
Roc Roy soc. Ser. B., (1936), 119, 574.

87. TOMS, G.C.
Phytohohaemagglutinins in chemotaxonomy of the leguminosae eds J.B. Harbone
D. Boulter and B.L. Turner, Acad. press, London and New York, (1971), 1, 367-4
88. VAN SCHREVEN, D.A.
Plant and soil, (1959), 2, 93.
89. VINCENT, J.M.
Proc. Linn. Soc. NSW, (1962), 87, 8-38.
90. WEST, P.M., and WILSON, J.K.
J. Bact., (1939), 37, 161.
91. WILKINSON, J.P., DUGUID, J.P. and EDMUNDS, P.N.
J. gen. microbiol., (1954), 11, 59.
92. WILSON, J.K.
Agric. Exp. Str. Memb., (1939), 221, 1-48.
93. WILSON, J.K.
Soil. Sci., (1944), 58, 61-65.
94. WRIGHT, W.H.
Soil. Sci., (1926), 20, 95-129.
95. YAO, P.Y. and VINCENT, J.M.
Australian J. Biol. Sci., (1969), 22, 413.
96. ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.
Carbohydr. Res., (1973), 26, 409-419.